

Das vollständige HIV-1 Tat-Protein überquert Lipidmembranen?

Einfluss des positiven Ladungsclusters und des N-terminalen Bereichs

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annegret Boll

aus Eutin

Göttingen 2011

D7

Referent: Prof. Dr. Claudia Steinem

Korreferent: Prof. Dr. Ulf Diederichsen

Tag der Disputation: 06.07.2011

Die Doktorarbeit wurde an der Georg-August-Universität Göttingen, Fakultät für Chemie, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie unter der Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem im März 2008 begonnen und bis Juni 2011 fertiggestellt.

Abstract. HIV-1 Tat belongs to the accessory proteins of HIV and has regulatory functions during the transcription of the viral RNA. Tat is concentrated in the nucleus and nucleolus of infected cells. The protein is composed of 86 amino acids with a molecular weight of 10,3 kDa. Tat is a transcriptional activator protein, which stimulates RNA polymerase II-mediated transcription elongation. Therefore, Tat interacts with Cyclin T1 and binds to the TAR RNA element. It is able to accelerate viral transcription about 100-fold. Tat exhibits different structural domains. With respect to the interaction with lipid membranes, the most important structural motif is its basic region, including 6 arginine and 2 lysine residues. The peptide derived from this basic region belongs to the cell-penetrating peptides and is capable of forming pores and translocating across lipid membranes.

By means of atomic force microscopy (AFM) and fluorescence microscopy binding of the protein onto solid supported planar lipid membranes was ruled out. Instead, a destabilization of the membrane by Tat was observed. Large unilamellar vesicles (LUVs) as well as giant unilamellar vesicles (GUVs) were used to show that native full length Tat (aa 1-86) does neither form pores in LUVs nor in GUVs. In contrast, an *N*-terminally truncated Tat protein (aa 35-86) that lacks the proline- and cysteine-rich region generates pores, through which an aqueous dye up to a size of 10 kDa can pass. Additionally, a Tat mutant, which has a reduced basic cluster, showed the ability of forming pores, so that fluorescent dyes with a size of 0.5 kDa could pass the lipid membrane.

By means of confocal laser scanning microscopy (CLSM) the translocation of fluorescently labeled full length Tat (Tat-AF633) across lipid bilayers was visualized with a concomitant accumulation of the protein at the membrane interface. However, if the dye was attached to the protein, also pore formation was induced. The size of the pores was smaller than the protein, so that the labeled protein with a mass of 11.6 kDa passed the membrane, whereas a fluorescent dye with a mass of 10 kDa could not enter the vesicles interior. These results demonstrate that pore formation is not the sole mechanism, by which the full length protein passes a membrane. The translocation of Tat across lipid bilayers was not dependent on the concentration of Tat in a range of 0.1 - 1.0 μ M, but on the presence of ions and on the presence of the cone shaped lipid DOPE.

We showed that the protein does not form pores in LUVs and GUVs, while a truncated version of the protein lacking the ordered proline- and cysteine-rich region, responsible for forming a zinc finger motif and a mutant with a reduced basic cluster do form pores. These results demonstrate that not only the basic cluster is responsible for pore formation but rather the overall charge density of the protein and its global flexibility. Full length Tat is capable of translocating across a membrane even though an attached fluorescent dye alters the interaction of the protein with the membrane. The attached dye leads to a disturbance of the lipid bilayer so that small molecules can enter into the vesicles interior. However, molecules of a size similar to that of the protein itself do not penetrate vesicles. These results illustrate that the translocation mechanism is not directly dependent on the pore formation process but presumably relies on an accumulation of the protein at the membrane, which causes a disturbance of the membrane structure to let the protein through.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	HIV und AIDS	1
1.2	Das HIV-1 Tat-Protein	2
1.3	<i>Cell penetrating peptides</i> (CPPs)	4
2	Zielsetzung	7
3	Materialien und Methoden	9
3.1	Verwendete Proteine	13
3.2	Labeling von wt Tat (1-86)	15
3.3	Festkörperunterstützte Membrane	18
3.3.1	Membranpräparation	18
3.3.2	Fluoreszenzmikroskopie	20
3.3.3	Rasterkraftmikroskopie	21
3.4	Experimente zur Untersuchung von Porenbildung und Translokation von Tat an GUVs	23
3.4.1	GUV-Präparation	23
3.4.2	Probenpräparation	24
3.4.3	Konfokalmikroskopie	27

3.5	<i>Release</i> -Messungen an LUVs	29
3.5.1	Auswertung der <i>Release</i> -Messungen	30
3.6	CD-Spektroskopie	31
4	Ergebnisse	33
<hr/>		
4.1	Ergebnisse der Untersuchungen zur Struktur von Tat	33
4.2	Ergebnisse der Untersuchungen der Interaktion von Tat mit planaren festkörperunterstützten Membranen mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie	38
4.2.1	Fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Ergebnisse der Untersuchungen der Interaktion von Tat mit festkörperunterstützten POPC-Membranen	38
4.2.2	Fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Ergebnisse der Untersuchungen der Interaktion von Tat mit POPS-haltigen Membranen	48
4.3	Ergebnisse der Untersuchungen zur Porenbildung und Translokation von Tat	58
4.3.1	Ergebnisse der Untersuchungen zur Porenbildung von Tat an <i>giant unilamellar vesicles</i> (GUVs)	59
4.3.2	Ergebnisse der Untersuchung der Porenbildung von Tat an large unilamellar vesicles (LUVs) aus POPC (<i>Release</i> -Experimente)	80
4.3.3	Ergebnisse der Untersuchung der Translokation von Tat	83
4.3.4	Ergebnisse der Untersuchung der Aggregation der GUVs	104

5	Diskussion	107
5.1	Diskussion der Destabilisierung von planaren Lipidmembranen durch Tat	107
5.2	Diskussion der Interaktion von HIV-1 Tat mit Lipidvesikeln	112
5.2.1	Porenbildung durch Tat	112
5.2.2	Translokation von Tat	119
5.2.3	Vesikelaggregation durch Tat	124
5.2.4	Modell zur Translokation von Tat über Membranen	126
6	Zusammenfassung	131
7	Literaturverzeichnis	133
8	Anhang	145
8.1	Symbolverzeichnis	145
8.2	Abkürzungsverzeichnis	146
8.3	Chemikalien und Materialien	147
8.4	Geräte	149

1 Einleitung

1.1 HIV und AIDS

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist seit 1983 als Erreger der Krankheit AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) bekannt¹, nach Schätzungen des Programms UNAIDS der Weltgesundheitsorganisation sind derzeit etwa 33 Mio. Menschen mit dem Virus infiziert.² AIDS hat sich zu einer Pandemie entwickelt, besonders betroffen sind dabei südafrikanische Länder. Im Verlaufe der Krankheit kommt es bei den Patienten häufig zu Tumorbildung und opportunistischen Infektionen, die nicht selten zum Tode führen.³⁻⁵

Das HI-Virus gehört zu den Retroviren, genauer zur Familie der Lentiviren, welche langsam fortschreitende Krankheiten verursachen. Es gibt zwei verschiedene Stämme des HI-Virus, HIV-1 und HIV-2, von denen der HIV-1-Stamm häufiger vorkommt. Retroviren sind RNA-Viren und zeichnen sich dadurch aus, dass ihr Genom in Form einer RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben wird. Dies geschieht nachdem die virale RNA in den Kern der Wirtszelle transportiert wurde. Die dann durch die Reverse Transkriptase gebildete Virus-DNA wird dort durch das Enzym Integrase in die DNA der Wirtszelle integriert. Auf diese Weise wird die virale Erbinformation in das Wirtsgenom eingebaut.⁶

Das Genom des HI-Virus in Form einer RNA enthält insgesamt etwa 9000 Basen und codiert, wie in Abb. 1.1 gezeigt ist, für neun ORFs (*open reading frames*, offene Leserahmen), die von LTRs (*long terminal repeats*, lange Wiederholungseinheiten) flankiert werden.⁷

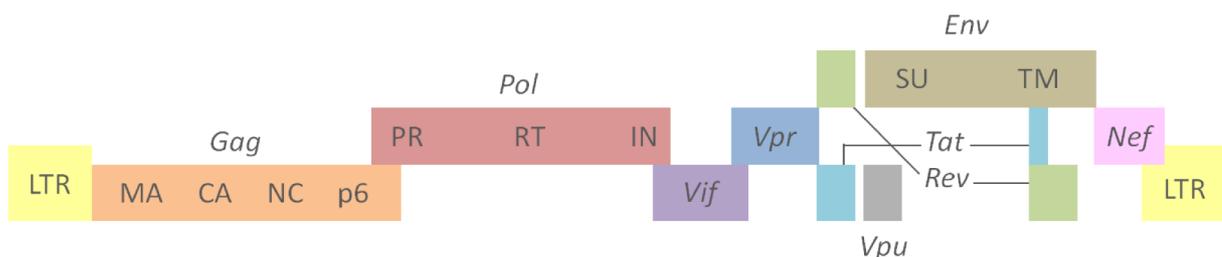


Abbildung 1.1: Aufbau des HIV-Genoms.⁸ LTR (*long terminal repeat*, lange Wiederholungseinheit), Polyproteine Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol und Env (*envelope*): MA = *Matrix*, CA = *Capsid*, NC = *Nukleocapsid*, p6 = Protein mit einer molekularen Masse von 6 kDa, PR = *Protease*, RT = *Reverse Transkriptase*, IN = *Integrase*, SU = *surface*-Protein, TM = *Transmembranprotein*. Akzessorische Proteine: Vif = *Virion-Infektionsfaktor*, Vpr = *Virion-assoziiertes Protein R*, Vpu = *virales Protein U*, Tat = *Transaktivator der Transkription*, Rev = *posttranskriptioneller Transaktivator*, Nef = *negativ factor*.

Zusätzlich zu den Polyproteinen Gag, Pol und Env codiert das Genom noch für sechs akzessorische Proteine: Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev und Nef. Das Protein Vif hat die Aufgabe die Infektion in peripheren Blutlymphozyten zu beschleunigen, Vpr fungiert als Transaktivator bei der Replikation. Das Protein

1 Einleitung

Vpu ist mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums assoziiert und interagiert dort mit CD4-Rezeptoren, um die Immunabwehr gegen die virale Infektion der Wirtszelle zu schwächen. Tat ist ein Transaktivator der Transkription, in Gegenwart dieses Proteins wird die Transkriptionsrate erhöht. Das Protein Rev fördert den Transport von einfach gespleißter und ungespleißter RNA aus dem Kern infizierter Zellen, nachdem die Transkription stattgefunden hat. Nef verringert die Anzahl an CD-Rezeptoren und reduziert damit ebenfalls die Immunabwehr der Wirtszelle. Gag steht für gruppenspezifisches Antigen, dieses Polyprotein wird in das Matrixprotein, das Kapsidprotein, das Nukleokapsidprotein und das p6-Protein zerlegt. Diese Proteine sind wichtige Strukturkomponenten für Viruspartikel, die dann neue Zellen befallen können. Aus dem Polyprotein Env gehen das *surface*-Protein und ein Transmembranprotein hervor, diese Proteine bilden die Hülle von Viruspartikeln. Das Polyprotein Pol wird durch Hydrolyse in drei Enzyme gespalten: die Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase. Diese werden in Viruspartikel integriert, die Protease ist in der Lage, die Vorläuferproteine Gag und Pol in ihre Einzelkomponenten zu spalten. Die Reverse Transkriptase fungiert als Polymerase und schreibt die virale RNA in komplementäre DNA um. Die Integrase ist dafür zuständig, die virale DNA in die DNA der Wirtszelle zu integrieren.

Während eines Infektionszyklus wird zunächst das virale Genom transkribiert, dies geschieht zunächst nur langsam, doch sobald das regulatorische Protein Tat zugegen ist, steigert sich die Transkriptionsrate um den Faktor 100. Nach vollendeter Transkription werden die Transkripte, gespleißte und ungespleißte RNAs mithilfe des Proteins Rev aus dem Zellkern ins Zytoplasma der infizierten Zelle transportiert, wo dann die Translation erfolgt, die zur Bildung der Gag- und Pol-Polyproteine führt. Nun werden Virione, kleine Viruspartikel gebildet, sie enthalten neben der viralen RNA und den Polyproteinen Gag und Pol auch die akzessorischen Proteine Nef, Vif und Vpr. Ist ein Virion fertig ausgebildet, verlässt es die Zelle, um weiter zu reifen, bis es schließlich in der Lage ist, weitere Zellen zu infizieren.⁷⁻⁹

1.2 Das HIV-1 Tat-Protein

Das Protein HIV-1 Tat, welches also aus dem Virusstamm HIV-1 stammt, spielt für die Verbreitung des Virus eine entscheidende Rolle, da es die Transkriptionsrate um das hundertfache erhöht, und somit die Produktion viraler RNA beschleunigt.^{10,11}

Tat gehört zu den akzessorischen Proteinen des Virus und kommt in infizierten Zellen im Nukleus und im Nukleolus vor.¹²⁻¹⁴ Es wird durch zwei Exons codiert und besteht aus 86-101 Aminosäuren,¹⁵ sein Molekulargewicht liegt somit im Bereich von 9-11 kDa. Das Protein kann in verschiedene strukturelle Einheiten eingeteilt werden (vergleiche Abb.1.2):¹⁶ Der N-terminale Bereich enthält einige saure

Aminosäuren und Proline (*acidic/proline-rich*). Es folgt eine Region mit insgesamt sieben Cysteinen, die in der Lage sind, ein Zinkfinger-Motiv auszubilden (*cysteine-rich/ZnF*). Einer Kerndomäne (*core*) schließt sich die basische Region an (*basic*), die zwei Lysine und sechs Arginine enthält und somit unter physiologischen Bedingungen einen positiven Ladungscluster darstellt. Der basische Bereich des Proteins spielt eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung mit Lipidmembranen, so wurde der Einfluss des Tat-Peptids (AS 47-57), welches sich von dieser Region ableitet, auf Lipidmembranen schon vielfach untersucht.¹⁷⁻²⁵ Der basischen Region folgt eine Glutamin-reiche Region (*glutamine-rich*) und schließlich der Bereich, der vom zweiten Exon codiert wird (AS 73-86/101).^{11,16,26,27}

NMR-Studien zur Struktur des Proteins zeigten, dass Tat prinzipiell ein ungefaltetes Protein ist, d. h. es liegt als *random coil* vor und ist sehr flexibel.²⁸ Allerdings kamen andere Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie zu dem Ergebnis, dass Tat in einer hydrophoben Umgebung, z.B. in hydrophoben Lösungsmitteln oder einer Lipidmembran, α -helicale Strukturen ausbildet.²⁹⁻³¹ In einem Komplex mit seinen Wechselwirkungspartnern P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*), CDK9 (*cyclin dependent kinase 9*) und Cyclin T1 in Gegenwart von Zink konnte eine Kristallstruktur von Tat erhalten werden, die zeigt, dass Tat hier ebenfalls eine geordnete Sekundärstruktur einnimmt (Abb. 1.2). Dieser Sachverhalt spricht für die besondere Flexibilität des Proteins.¹⁶

Wie schon erwähnt spielt Tat eine wichtige Rolle bei der Transkription der viralen RNA, daher wird Tat

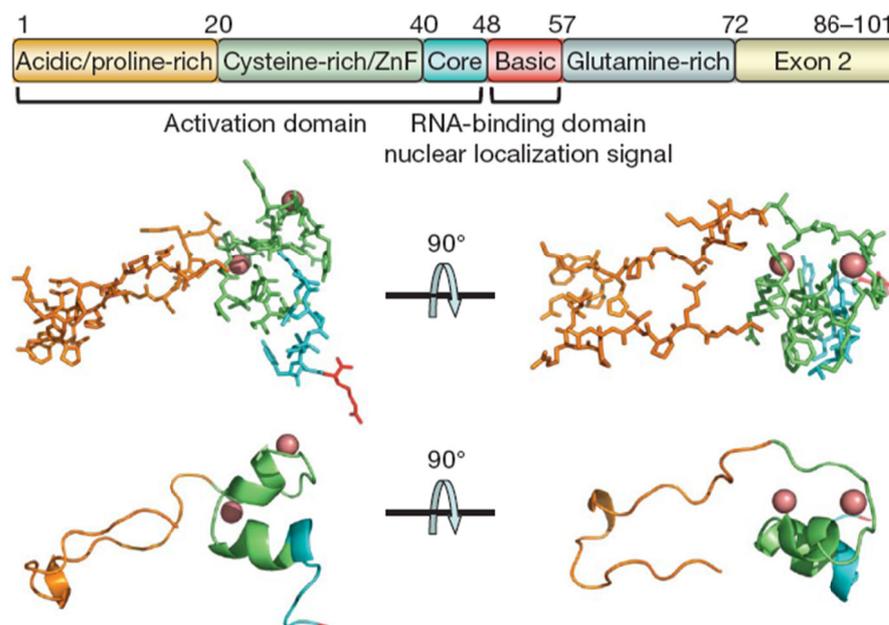


Abbildung 1.2: Oben: Einteilung von HIV-1 Tat in seine strukturellen Einheiten¹⁶, die saure bzw. Prolin-reiche Region (*acidic/proline-rich*), die Cystein-reiche Region (*cysteine-rich/ZnF*) und die Kerndomäne (*core*) bilden zusammen die Aktivierungsdomäne. Dieser schließt sich die basische Region (*Basic*) mit ihren insgesamt acht positiven Ladungen an. Nach der Glutamin-reichen Domäne (*glutamine-rich*) folgt der Abschnitt des Proteins, der durch das zweite Exon codiert wird (*Exon 2*). Unten: Schematische Struktur von HIV-1 Tat, vorkommend im Komplex mit seinen Wechselwirkungspartnern P-TEFb, CDK9 und Cyclin T1. Die roten Kugeln stellen die komplexierten Zn²⁺-Ionen dar.

schon früh während der Replikation exprimiert. Die genaue Funktion des Proteins besteht hierbei darin, die Elongation zu beschleunigen. Dazu bindet Tat mithilfe einer Aktivierungsdomäne im N-terminalen Bereich (AS 1-48) an das Protein Cyclin T1, wodurch die Affinität zum TAR-Element (*transactivation response element*) der RNA erhöht wird, hierbei handelt es sich um eine Erkennungsregion der viralen RNA. Das sogenannte ARM-Motiv (*arginine-rich motif*) von Tat, welches der basischen Region entspricht, erkennt das TAR-Element und bindet schließlich an die RNA. Durch diese Wechselwirkung wirkt das TAR-Element wie ein induzierbarer Promotor, der die Genexpression um das hundertfache beschleunigen kann.^{11,32-38}

Die Aufgabe des Tat-Proteins macht dessen Bedeutung für das Virus und seine Ausbreitung deutlich. Daher ist es von großem Interesse, die Funktionen und Wechselwirkungen dieses Proteins genauer zu untersuchen.

1.3 *Cell penetrating peptides* (CPPs)

Die *cell penetrating peptides* stellen eine Gruppe von Peptiden dar, die Poren in Lipidmembranen ausbilden können, Membranen destabilisieren und sie überqueren können. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Peptidklasse gehören unter anderem Melittin, das Tat-Peptid, Magainin und Penetratin. Melittin, ein Peptid des Bienengifts, besteht aus 26 Aminosäuren und besitzt aufgrund der Anordnung von hydrophoben und geladenen Aminosäuren einen amphiphilen Charakter. Es hat eine α -helicale Struktur und bildet transmembrane Poren in Lipidmembranen aus.³⁹⁻⁴² Andere *cell penetrating peptides* wie Penetratin oder auch Tat zeichnen sich durch einen hohen Anteil an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin aus, die dazu führen, dass diese Peptide positive Ladungscluster besitzen.^{18,19,43,44}

In verschiedenen Studien wurden die Eigenschaften von verschiedenen CPPs gegenüber Lipidmembranen untersucht. Es wurde gezeigt, dass Melittin Poren in Lipidvesikeln bildet, durch die Fluoreszenzfarbstoffe austreten können.^{40,45-49} Außerdem führt die Behandlung mit Melittin zu Defekten in planaren festkörperunterstützten Membranen.^{50,51} Auch das Peptid Penetratin ist in der Lage, Lipidmembranen zu überqueren, was durch Experimente an GUVs (*giant unilamellar vesicles*) gezeigt werden konnte.⁵²⁻⁵⁴ Des Weiteren sind diese Peptide fähig, ebenfalls in Zellen einzudringen⁵⁵⁻⁵⁷ und dabei als Transporter für Nanopartikel, Proteine oder andere Makromoleküle zu fungieren.⁵⁸⁻⁶²

Für die Porenbildung und die damit verbundene Translokation von CPPs über Lipidmembranen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Der *barrel-stave*-Mechanismus beschreibt die Porenbildung von Peptiden, die eine transmembrane Pore auskleiden. Zunächst orientieren sich die Peptide auf der Membranoberfläche, bevor sie in die Membran eindringen, um eine Pore zu bilden.

Dabei zeigen die hydrophoben Bereiche der Peptide zu den Seitenketten der Lipide innerhalb der Membran, die hydrophilen bzw. geladenen Bereiche der Peptide sind in Richtung der mit wässrigem Medium gefüllten Pore gewandt (Abb. 1.3).

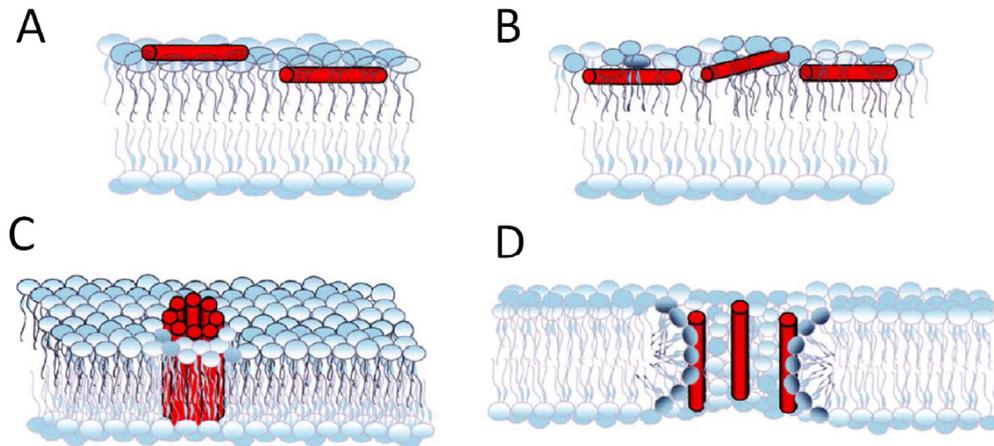


Abbildung 1.3: Porenbildung nach dem *barrel-stave*-Mechanismus.⁶³ (A) Peptide belegen Membranoberfläche. (B) Erhöhung der Peptidkonzentration. (C) Bildung einer Pore. (D) Anordnung der Peptide in der Pore.

Nach dem *carpet*-Mechanismus belegen die Peptide ebenfalls zunächst die Lipiddoppelschicht, dringen ab einer gewissen Konzentration in sie ein und tragen sie ab, d. h. Lipide werden aus der Membran herausgelöst. Dieser Mechanismus beschreibt also die Mizellierung der Membran durch CPPs (Abb. 1.4).^{63–65}

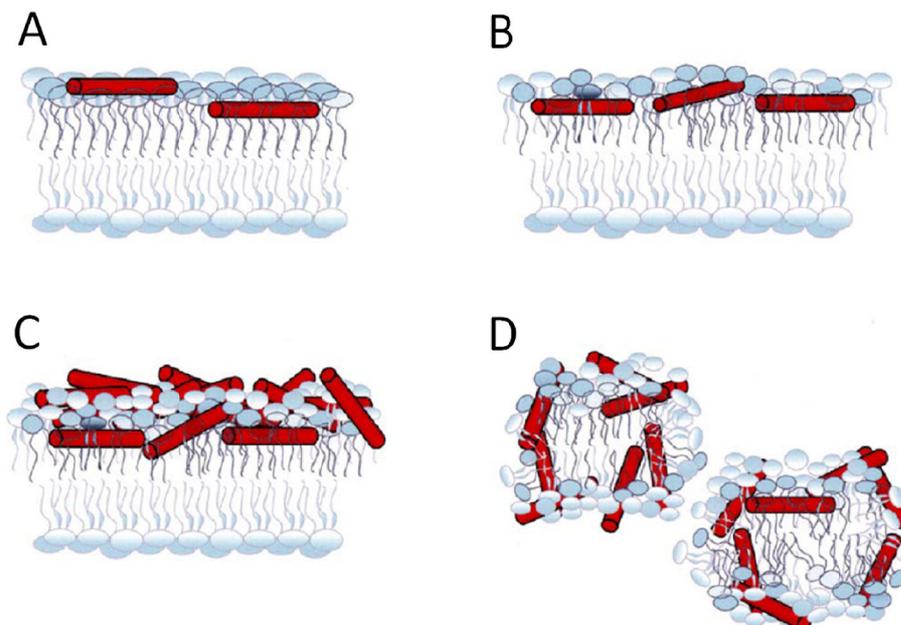


Abbildung 1.4: Mizellierung der Membran nach dem *carpet*-Mechanismus.⁶³ (A) Peptide belegen Membranoberfläche. (B) Erhöhung der Peptidkonzentration. (C) Eindringen der Peptide in die Membran. (D) Abtragung von Lipidmaterial aus der Membran.

1 Einleitung

Für die Translokation ohne Porenbildung, beispielsweise beim Eindringen der CPPs in Zellen, wird folgender Mechanismus vorgeschlagen. Das *inverted-micell*-Modell besagt, dass ein positiv geladenes Peptid zunächst mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide interagiert und sich auf der Membranoberfläche anordnet. Beim Übertritt des Peptids über die Membran interagiert der hydrophobe Bereich des Peptids mit der Membran so, dass sich eine inverse Mizelle ausbildet.^{18,66} Dieser Mechanismus gilt jedoch nur für Peptide oder Proteine, die hydrophobe Bereiche besitzen.

Das Tat-Peptid

Intensiv untersucht wurde bisher das Tat-Peptid, welches aus 10-14 Aminosäuren besteht und sich von der basischen Region (48-57) des vollständigen Tat-Proteins ableitet. Das Tat-Peptid ist einer der bekanntesten Vertreter der CPPs. Es ist Arginin-reich und besitzt somit mehrere positive Ladungen. Aufgrund seines positiven Ladungsclusters scheint das Tat-Peptid in der Lage zu sein, Poren in Membranen auszubilden und diese zu überqueren. Untersuchungen mit dem Tat-Peptid an GUVs zeigten, dass es je nach Lipidzusammensetzung der Vesikel zu Porenbildung durch das Peptid kam. Dabei war der Anteil an negativ geladenem Lipid und an kegelförmigem Lipid innerhalb der Membran ausschlaggebend für die Fähigkeit des Peptids, Poren auszubilden. Außerdem konnte das fluoreszenzmarkierte Tat-Peptid in den untersuchten Vesikeln nachgewiesen werden, es hatte also die Membran überquert.^{21,23,25} Andere Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass das Tat-Peptid nicht zu einem Farbstoffaustritt aus Lipidvesikeln führte, sondern die Aggregation dieser hervorrief.²² In Untersuchungen mit Zellen konnte gezeigt werden, dass das Tat-Peptid in Zellen eindringen kann⁶⁷⁻⁷¹ und dabei auch als Transporter für Wirkstoffe, Proteine oder Nanopartikel fungieren kann.⁷²⁻⁷⁶ Das Tat-Peptid soll in Zukunft also eine bedeutende Rolle im Anwendungsbereich *drug delivery* spielen.

Aufgrund seiner essentiellen Funktion ist es für das Virus von enormer Wichtigkeit, dass das Tat-Protein bereits in einem sehr frühen Stadium in einer zu infizierenden Zelle zugegen ist, um die Produktion viraler RNA voranzutreiben. Besäße das vollständige Protein, so wie es im Virus vorkommt, ähnliche Eigenschaften gegenüber Zellmembranen wie das Tat-Peptid, wäre dies ein entscheidender Vorteil für das Virus. Tat könnte in noch nicht infizierte Zellen eindringen und wäre bereits zugegen, wenn ein Viruspartikel die Zelle befällt. So könnte von Beginn an die Transkriptionsrate stark erhöht werden, was insgesamt eine schnelle Infizierung und Verbreitung des Virus im Körper bewirken würde. Aus diesem Grund ist es von Bedeutung, aufzuklären, wie das vollständige Tat-Protein mit Zellmembranen interagiert. Dabei kann die Untersuchung dieses Proteins mit Lipidmodellmembranen einen wichtigen Beitrag leisten.

2 Zielsetzung

Die durch das HI-Virus ausgelöste Krankheit AIDS stellt eine große Herausforderung für die Forschung dar. Seit Entdeckung des Virus im Jahr 1983 gibt es weder eine absolute Heilung der Krankheit noch konnte bisher ein Impfstoff entwickelt werden.

Das HIV-Protein Tat spielt bei der Verbreitung des Virus eine entscheidende Rolle. Als Transaktivator der Transkription erhöht es die Transkriptionsrate um den Faktor 100, was zu einer schnelleren und effizienteren Infizierung neuer Zellen durch das HI-Virus führt. Je früher Tat in einer noch nicht infizierten Zelle zugegen ist, desto schneller kann das Virus seinen Replikationszyklus durchlaufen und sich verbreiten.

Das von der basischen Region des Proteins abgeleitete Tat-Peptid (48-57) ist in der Literatur bekannt. Es gehört zu den *cell penetrating peptides* und ist in der Lage, Poren in Membranen auszubilden und diese zu durchqueren.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, ob der vollständige Wildtyp des Tat-Proteins (1-86) in der Lage ist, Membranen zu überqueren. Mithilfe fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen an festkörperunterstützten Membranen sollte ermittelt werden, ob das Tat-Protein an Membranen bindet und wie es die Struktur der Membran beeinflusst. Mittels Experimenten an Lipidvesikeln verschiedener Größe sollte herausgefunden werden, ob das Tat-Protein Poren in Membranen ausbildet und ob es Membranen überqueren kann.

Um zu untersuchen, welche Strukturelemente des Tat-Proteins für die Wechselwirkungen mit Membranen verantwortlich sind, wurden drei Varianten des Proteins verwendet. Neben dem vollständigen Wildtyp mit 86 Aminosäuren (wt Tat (1-86)), kam ein verkürzter Wildtyp, dem 34 Aminosäuren im N-terminalen Bereich fehlen, zum Einsatz (wt Tat (35-86)). Des Weiteren wurde mit einer Tat-Mutante (Tat ARM-Ala) gearbeitet, die einen um drei Ladungen verringerten Ladungscluster besitzt. Weiterhin sollte durch Variation der Lipidzusammensetzung der Membranen der Einfluss von Ladung und Struktur der Lipide innerhalb der Membran auf die Protein-Membran-Wechselwirkung untersucht werden.

3 Materialien und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden für verschiedene Experimente unterschiedliche Puffer und Lösungen verwendet, welche in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 3.1: Verwendete Puffer und Lösungen.

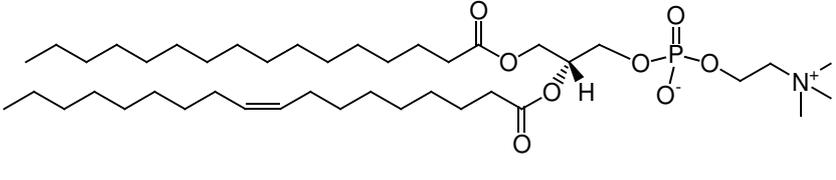
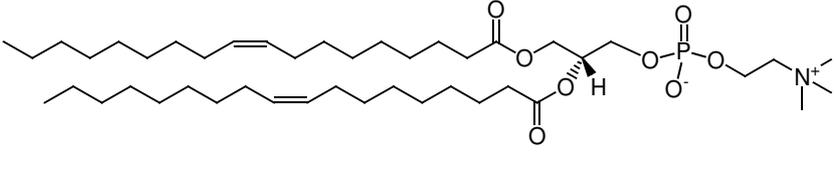
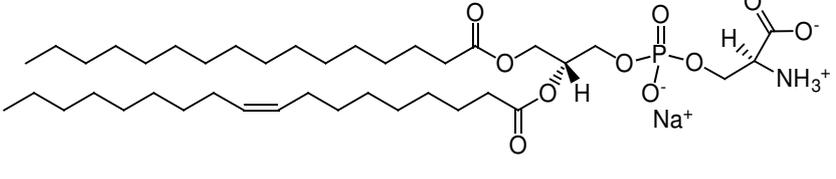
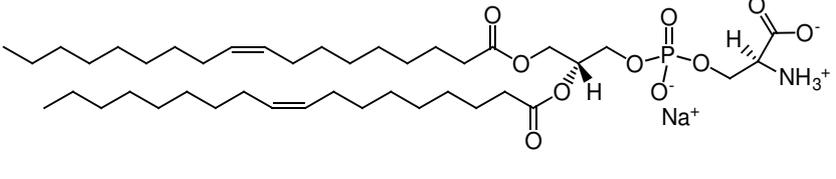
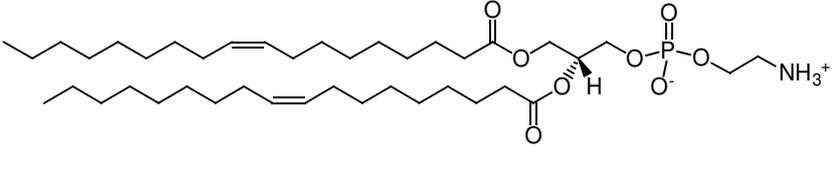
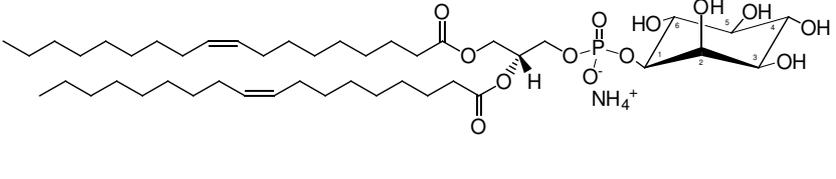
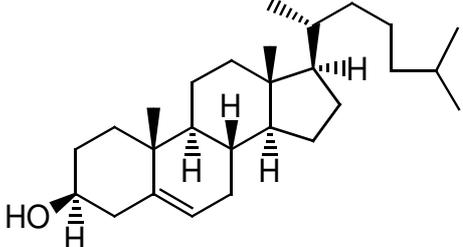
Name	Inhalt
NaCl-haltiger Puffer	100 mM NaCl 20 mM TRIS/HCl pH 7,4
KCl-haltiger Puffer	100 mM KCl 10 mM TRIS/HCl pH 7,4
AF633-haltiger Puffer (für Blindproben / Translokationsassay)	100 mM NaCl 20 mM TRIS/HCl 14 μ M AF633 pH 7,4
AF488-haltiger Puffer (für Porenassay)	100 mM NaCl 20 mM TRIS/HCl 20 nM AF488 pH 7,4
D3-AF488-haltiger Puffer (Dextran-gekoppelter AF488, 3 kDa)	100 mM NaCl 20 mM TRIS/HCl 50 nM D3-AF488 pH 7,4

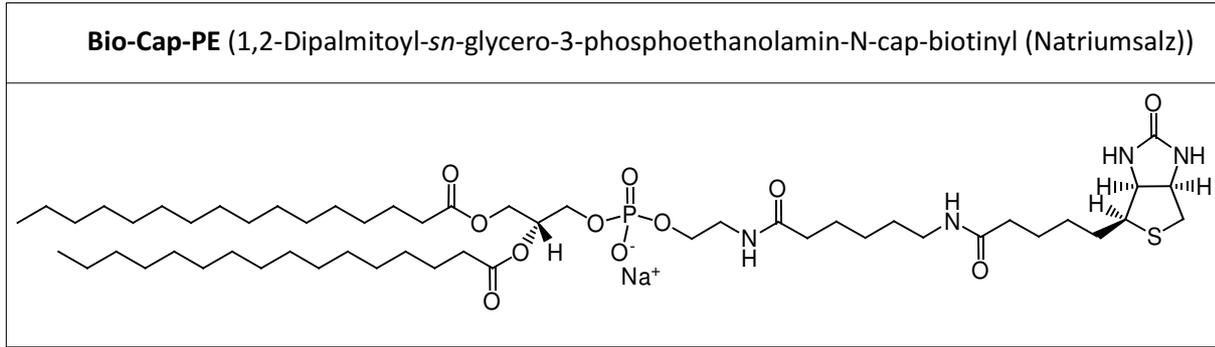
3 Materialien und Methoden

D10-AF488-haltiger Puffer (Dextran-gekoppelter AF488, 10 kDa)	100 mM NaCl 20 mM TRIS/HCl 50 nM D10-AF488 pH 7,4
Pyranin-haltiger Puffer	100 mM NaCl 20 mM TRIS/HCl 0,2 mM Pyranin pH 7,4
Glukose-Lösung	300 mM Glukose in Reinstwasser
Pyranin-haltige Glukose-Lösung	300 mM Glukose in Reinstwasser 0,2 mM Pyranin
Sucrose-Lösung	300 mM Sucrose in Reinstwasser
Phosphatpuffer (für CD-Spektroskopie)	20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1 mM EDTA pH7,4

Um in den verschiedenen Experimenten den Einfluss verschiedener Lipide auf die Wechselwirkung von Tat mit Lipidmembranen zu untersuchen, wurden verschiedene Lipide verwendet, die in Tabelle 3.2 aufgeführt sind. Dazu gehören nicht nur zwitterionische Phospholipide wie POPC und DOPC, sondern auch Lipide mit negativ geladener Kopfgruppe wie POPS und DOPS und kegelförmige Lipide wie DOPE. Außerdem wurden DOPI, welches eine Inositol-Einheit an der Kopfgruppe besitzt, und das steroide Lipid Cholesterin verwendet. In den GUV-Experimenten kam zudem das biotinylierte Lipid Bio-Cap-PE zu Einsatz.

Tabelle 3.2: Verwendete Lipide und deren Struktur.

Name	Struktur
POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin)	
DOPC (1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin)	
POPS (1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin (Natriumsalz))	
DOPS (1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin (Natriumsalz))	
DOPE (1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin)	
DOPI (1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylinositol (Ammoniumsalz))	
Cholesterin	



Um die Lipidmembranen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren, wurden Fluoreszenzsonden verwendet (siehe Tabelle 3.3). Diese wurden so gewählt, dass sich die Emissionswellenlängenbereiche der Sonden und anderer in der Probe enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe nicht überschneiden.

Tabelle 3.3: Verwendete Fluoreszenzsonden.

Name und Struktur	
<p>TR-DHPE (Texas Red DHPE (Sulforhodamin 101 DHPE Triethylammoniumsalz))</p>	<p>$\lambda_{\text{ex}} = 594 \text{ nm}, \lambda_{\text{em,max}} = 605 \text{ nm}$</p>
<p>PB-DMPE (Pacific Blue DMPE (1,2-Dimyristoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphoethanolamin Triethylammoniumsalz))</p>	<p>$\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}, \lambda_{\text{em,max}} = 455 \text{ nm}$</p>

Bei der Durchführung des Assays zur Untersuchung von Porenbildung kamen verschiedene wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz. Pyranin (Abb. 3.1 A) wurde in Kombination mit Texas Red DHPE-dotierten GUVs (*giant unilamellar vesicles*) verwendet, Alexa Fluor 488 (AF488) (Abb. 3.1 B) kam bei Pacific Blue DMPE-dotierten GUVs und Tat-AF633 zum Einsatz. Um über die Größe der verwendeten Farbstoffe Rückschlüsse auf die gebildeten Poren in der GUV-Membran ziehen zu können, wurde nicht nur mit AF488, sondern auch mit Dextran-gekoppelten AF488-Farbstoffen gearbeitet. Hierbei kam neben Dextran-3-AF488 (D3-AF488) mit einer molaren Masse von 3 kDa auch ein Dextran-gekoppelter AF488-Farbstoff mit einer molaren Masse von 10 kDa (D10-AF488) zum Einsatz.

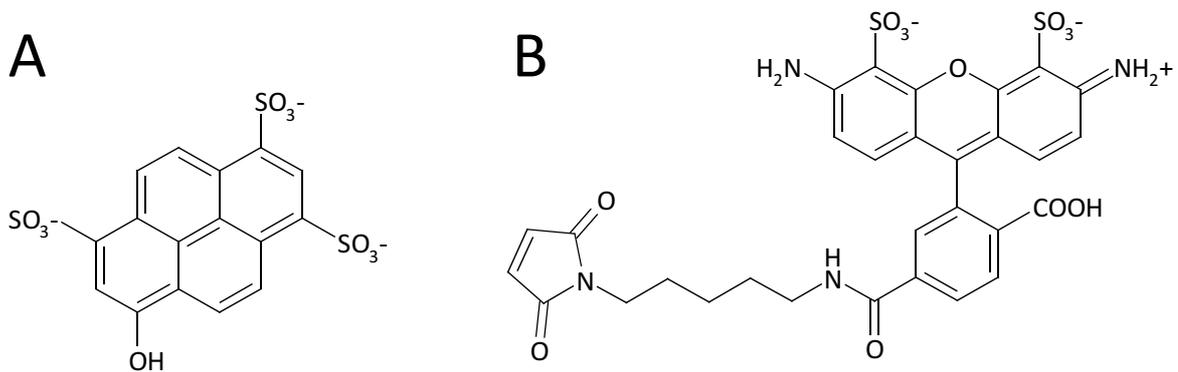


Abbildung 3.1: Strukturformeln von (A) Pyranin und (B) Alexa Fluor 488 Maleimid (AF488).

3.1 Verwendete Proteine

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Proteinvarianten gearbeitet, die sich strukturell unterscheiden, um untersuchen zu können, welches Strukturelement des Proteins für die Wechselwirkung mit Lipidmembranen verantwortlich ist. Vor allem wurden Untersuchungen mit dem vollständigen Wildtyp des Proteins (wt Tat (1-86)) durchgeführt.

wt Tat (1-86)

Der vollständige Wildtyp wt Tat (1-86) besteht aus 86 Aminosäuren und hat eine molare Masse von 10,3 kDa. Der N-Terminus besteht aus einer Prolin-reichen und einer Cystein-reichen Region. Die Cystein-reiche Region enthält sieben Cysteine, sie ist in der Lage, ein Zinkfingermotiv auszubilden. An den N-terminalen Bereich schließt sich die Kernregion des Proteins an, die überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren zusammengesetzt ist. Der Kernregion folgt die basische Region, welche sechs Arginine und zwei Lysine enthält, und somit einen positiven Ladungscluster mit insgesamt acht positiven Ladungen bildet. Des Weiteren besitzt wt Tat (1-86) einen Glutamin-reichen Bereich und

einen Bereich, welcher durch ein zweites Exon codiert wird (Abb. 3.2).

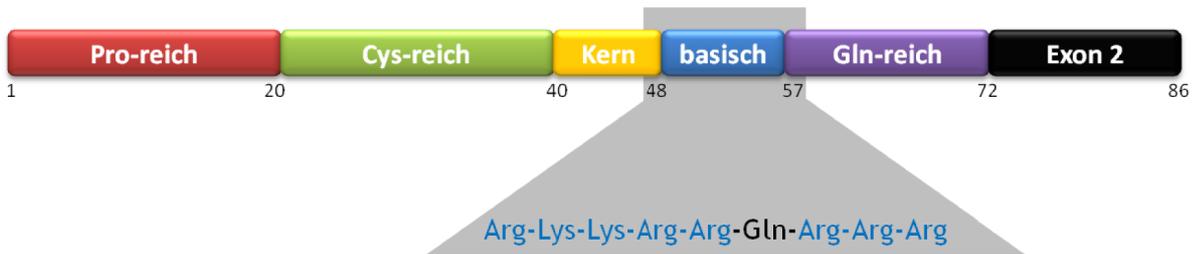


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des vollständigen Tat-Proteins wt Tat (1-86) unter Angabe der Aminosäuresequenz der basischen Region (AS 48-57). Die positiv geladenen, basischen Aminosäuren sind blau markiert.

wt Tat (35-86)

Der verkürzten Tat-Variante wt Tat (35-86) fehlt der N-Terminus, welcher die Prolin-reiche und die Cystein-reiche Region enthält. Diese Proteinvariante besitzt jedoch die basische Region mit ihrem positiven Ladungscluster, sowie die sich anschließende Glutamin-reiche Region und den Bereich, der vom zweiten Exon codiert wird (Abb. 3.3).



Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des verkürzten Tat-Proteins wt Tat (35-86).

Durch die Verkürzung ähnelt diese Variante des Tat-Proteins dem Tat-Peptid, der verkürzte Wildtyp diente zur Untersuchung des Einflusses des N-terminalen Bereichs auf die Tat-Membran-Wechselwirkung.

Tat ARM-Ala

Die Tat-Mutante Tat ARM-Ala wiederum umfasst die vollständige Länge von 86 Aminosäuren, hier wurden allerdings im basischen Bereich (ARM = *arginine-rich motif*) zwei Arginine und ein Lysin durch Alanine ersetzt, so dass der Ladungscluster um drei auf fünf positive Ladungen reduziert wurde. Tat ARM-Ala enthält sowohl den N-terminalen Bereich als auch die Kerndomäne, wie die schematische Struktur aus Abb. 3.4 zeigt.



Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Tat-Mutante Tat ARM-Ala (AS 1-86) mit reduziertem Ladungscluster unter Angabe der Aminosäuresequenz in der mutierten Region (AS 48-57). Die positiv geladenen, basischen Aminosäuren sind blau markiert, die ausgetauschten Aminosäuren sind grau markiert.

3.2 Labeling von wt Tat (1-86)

Da der vollständige Wildtyp des Proteins wt Tat (1-86) den N-terminalen Bereich mit insgesamt sieben Cysteinen enthält, konnte ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer Maleimidfunktion an ein Cystein des Proteins gekoppelt werden (Abb. 3.5). Hierbei wurde ein Alexa Fluor Farbstoff (hier AF633, $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$) verwendet, da dieser eine hohe Photostabilität, einen großen Extinktionskoeffizienten und eine hohe Quantenausbeute aufweist.

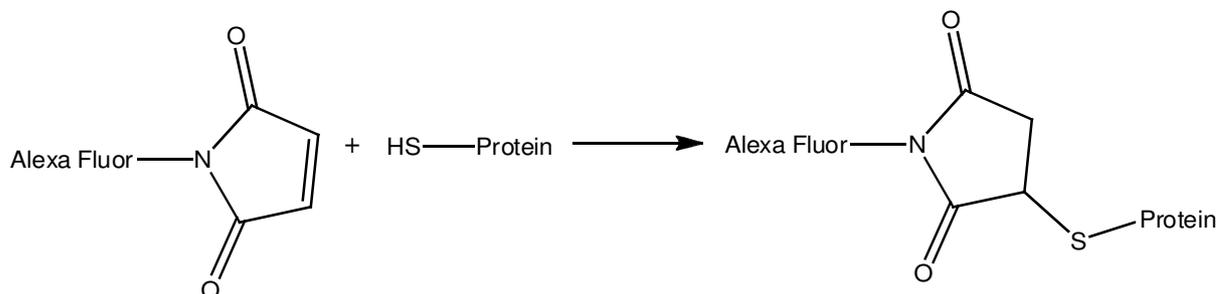


Abbildung 3.5: Prinzip der Reaktion von AF-Maleimid mit der SH-Funktion eines Cysteins im Protein.

Für das Labeling wurde wt Tat (1-86) ($c_{\text{Tat}} = 100 \mu\text{M}$, $V_{\text{Tat}} = 400 \mu\text{L}$) über eine Sephadex-G25-Säule mittels FPLC (*fast protein liquid chromatography*, Äkta) in NaCl-haltigen Puffer überführt (siehe Abb. 3.6). Die Tat-Konzentration betrug $c_{\text{Tat}} = 26 \mu\text{M}$ mit einem Gesamtvolumen von $V_{\text{Tat}} = 800 \mu\text{L}$, welches vollständig für das Labeling verwendet wurde.

Der Farbstoff Alexa Fluor 633 C₅ Maleimid (1 mg) wurde in 770 μL NaCl-haltigem Puffer gelöst, so dass eine Konzentration von 1 mM erhalten wurde. In 10-fachem Überschuss wurde anschließend der Farbstoff zum Protein langsam unter Rühren hinzupipettiert. Bei 4 °C wurde die Lösung über Nacht gerührt, danach wurde die Reaktion mit Mercaptoethanol abgebrochen. Die Trennung des gelabelten Proteins von noch freiem Farbstoff wurde mittels FPLC durchgeführt (siehe Abb. 3.7), hierbei wurde eine Sephadex-G25-Säule (Größenausschlusschromatographie) verwendet, als Laufmittel wurde der NaCl-haltige Puffer verwendet.

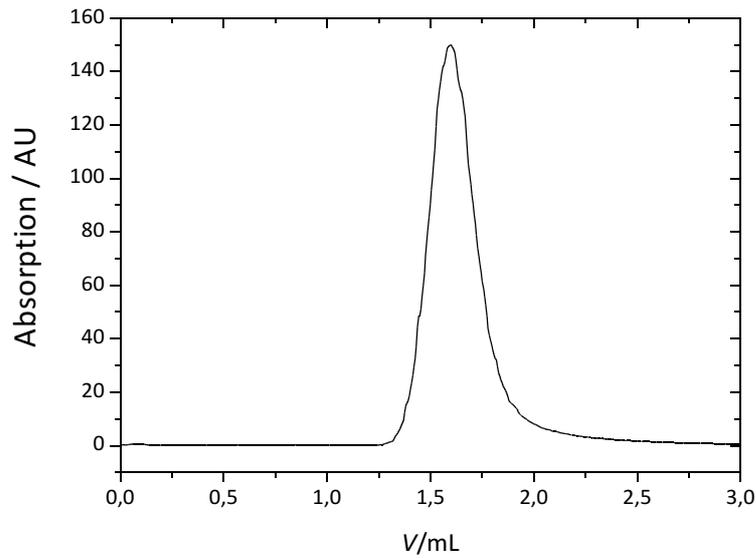


Abbildung 3.6: FPLC-Trace für wt Tat (1-86) zur Überführung des Proteins in den NaCl-haltigen Puffer. Der Peak bei $V = 1,5$ mL entspricht wt Tat (1-86).

Als erster Peak wurde das gelabelte Protein Tat-AF633 erhalten (Abb. 3.7 A), anschließend wurde über einen längeren Zeitraum der freie, nicht abreagierte Farbstoff AF633 von der Säule gewaschen (Abb. 3.7 B).

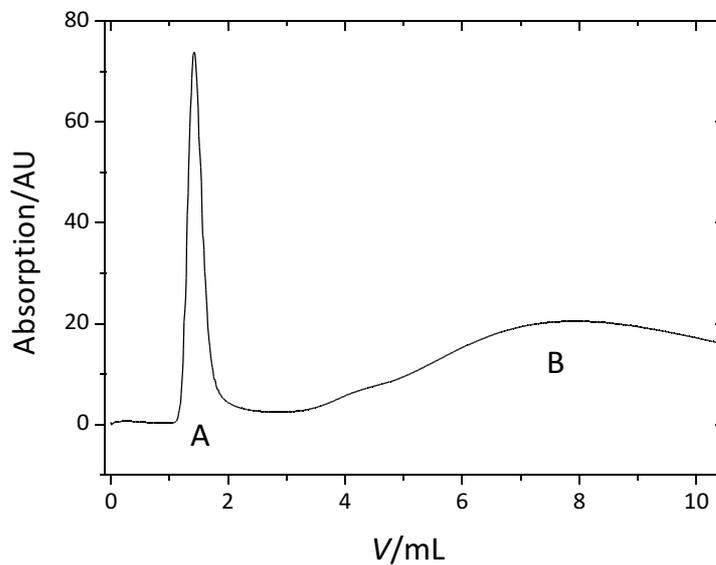


Abbildung 3.7: FPLC-Trace des gelabelten Tat-Proteins Tat-AF633 bei der Trennung des gelabelten Proteins von noch freiem Farbstoff. Peak A ($V = 1,5$ mL) entspricht Tat-AF633, Peak B (ab $V = 4$ mL) entspricht dem freien AF633-Farbstoff.

Die Konzentration von Tat-AF633 wurde mittels UV/vis-Spektroskopie unter Beachtung der Korrektur von freiem AF633 bei $\lambda = 280$ nm ermittelt. Daher wurde zunächst ein UV-Spektrum des freien AF633-Farbstoffs in NaCl-haltigem Puffer aufgenommen, um den Korrekturfaktor des Farbstoffs bei

$\lambda = 280 \text{ nm}$ zu ermitteln (Abb. 3.8). Der Faktor konnte zu $E_{280}/E_{633} = 0,31$ bestimmt werden.

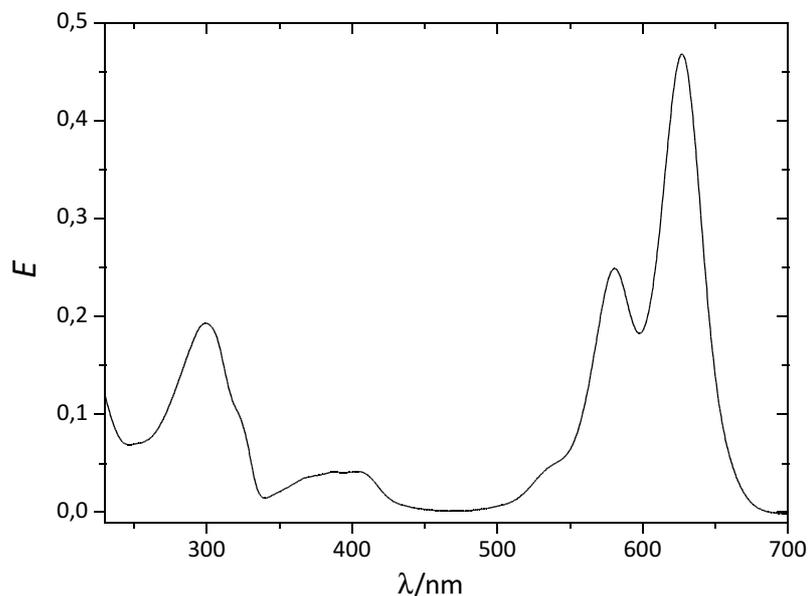


Abbildung 3.8: UV/vis-Spektrum des freien AF633-Farbstoffs in NaCl-haltigem Puffer. $E_{633} = 0,426$, $E_{280} = 0,132$, der Korrekturfaktor ergibt sich damit zu **0,31**.

Abb. 3.9 zeigt das UV/vis-Spektrum der Fraktion A (Abb. 3.7). Bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ ist die Proteinbande durch die Absorption des Tryptophans im Tat zu sehen, bei $\lambda = 633 \text{ nm}$ absorbiert der Fluoreszenzfarbstoff AF633. Die Dicke der Küvette betrug 1 cm . Die Konzentration von Tat-AF633 konnte mit der folgenden Gleichung zu $3,1 \mu\text{M}$ bestimmt werden:

$$c = \frac{E_{280} - (E_{633} \cdot 0,31)}{\epsilon_{\text{Tat}}} = \frac{0,054 - (0,075 \cdot 0,31)}{9970 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}} = 3,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} = 3,1 \mu\text{M}$$

Mithilfe der Daten des UV/vis-Spektrums in Abbildung 3.9 konnte nach der folgenden Gleichung außerdem die Labelingrate von Tat-AF633 bestimmt werden:

$$\text{mol AF633 pro mol Tat - AF633} = \frac{E_{633}}{\epsilon_{633} \cdot c_{\text{Tat}}} = \frac{0,075}{100000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot 3,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} = 0,24$$

Die Labelingrate betrug 24% , somit war nur etwa jedes vierte Tat-Protein mit dem Fluoreszenzfarbstoff AF633 markiert.

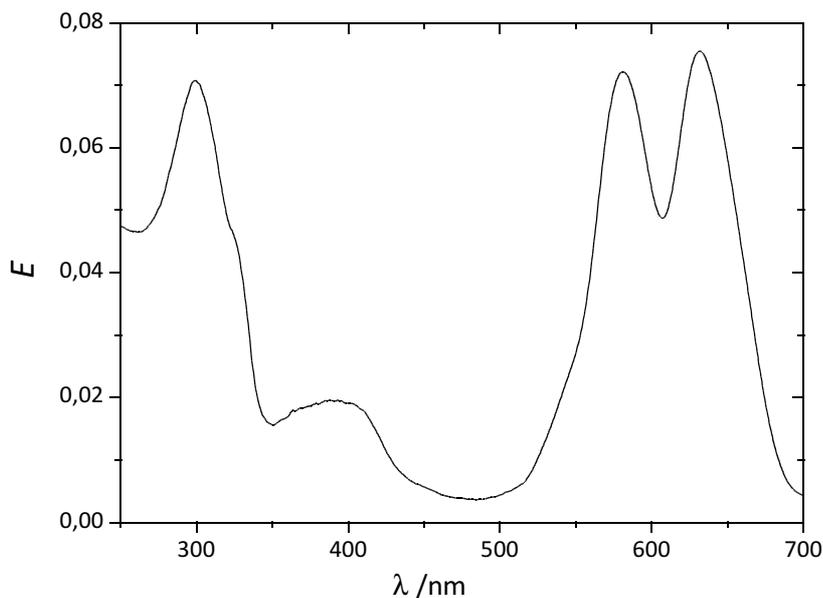


Abbildung 3.9: UV/vis-Spektrum von Tat-AF633 (Fraktion A aus Abb. 3.7) zur Bestimmung der Konzentration über die Extinktion von Tat bei $\lambda = 280$ nm und der Labelingrate.

3.3 Festkörperunterstützte Membranen

Bei festkörperunterstützten Membranen handelt es sich um Lipiddoppelschichten, die sich auf einem Festkörper wie z.B. Siliziumdioxid oder Mica befinden. Festkörperunterstützte Membranen eignen sich z.B. dazu, den Einfluss eines Proteins auf die Membranoberfläche zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde sowohl mit reinen POPC-Membranen als auch mit Membranen der Zusammensetzung POPC:POPS im molaren Verhältnis von 4:1 auf Silizium-Wafern gearbeitet.

3.3.1 Membranpräparation

Zur Herstellung von festkörperunterstützten Membranen wurden zunächst die Silizium-Wafer vorbereitet, bevor unilamellare Lipidvesikel auf diesem Substrat zu einer Lipiddoppelschicht gespreitet werden konnten.

Substratvorbereitung

In dieser Arbeit wurden Silizium-Wafer (CrysTec, Berlin, Deutschland, Dicke: 625 μm , Orientierung: (100), Dotierung: p-Typ Bor, Widerstand: 1-20 Ωcm) mit einer Siliziumdioxidschicht mit

einer Schichtdicke von 100 nm verwendet. Damit auf Silizium-Wafern durch Vesikelspreittechnik eine Membran ausgebildet werden konnte, wurden die Silizium-Wafer zuvor hydrophilisiert. Dazu wurden Silizium-Wafer, welche eine Oxidschicht von 100 nm Dicke besaßen, zunächst mithilfe eines Diamantschneiders in Stücke der Größe 2 cm x 0,5 cm geschnitten und mit Isopropanol und Reinstwasser gereinigt. Dann wurden sie in einem Bad aus Reinstwasser, 25% wässriger Ammoniak-Lösung und 30%iger Wasserstoffperoxid-Lösung im Volumenverhältnis von 5 : 1 : 1 bei 70 °C für 15 Minuten inkubiert. Nach diesem Hydrophilisierungsprozess wurden die Silizium-Wafer erneut mit Reinstwasser abgespült und bis zur Verwendung in Reinstwasser aufbewahrt.

Vesikelpräparation

Um unilamellare Lipidvesikel herzustellen, wurden zunächst Lipidfilme der entsprechenden Lipidzusammensetzung präpariert (0,3 mg Lipid). Dazu wurden entsprechende Lipidstammlösungen in Chloroform hergestellt. Das gewünschte Volumen der Lipidlösungen wurde in Reagenzgläser pipettiert, anschließend wurde das Chloroform im Wasserbad bei etwa 30 °C mithilfe eines Stickstoffstroms verblasen. Die Filme wurden für 3 h im Vakuum bei 30 °C getrocknet und mit Parafilm verschlossen bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Herstellung unilamellarer Vesikel quollen die Lipidfilme für 20 Minuten in NaCl-haltigem Puffer, anschließend wurden sie im fünfminütigen Abstand drei Mal gevortext. Durch Behandlung mit Ultraschall wurden kleine unilamellare Vesikel (SUVs, *small unilamellar vesicles*) erhalten ($c = 0,1 \text{ mg/mL}$), die zum Spreiten einer Lipiddoppelschicht auf dem hydrophilisierten Silizium-Substrat verwendet werden konnten. LUVs (*large unilamellar vesicles*) wurden mittels eines Miniextruders, der Polycarbonatmembranen mit einem Porendurchmesser von 1000 nm enthielt, hergestellt.

Spreitvorgang

Die hydrophilisierten Substrate wurden im Stickstoffstrom getrocknet, in eine Teflondurchflusskammer (siehe Abb. 3.10) eingesetzt und mit einem Teflonring fixiert. Auf das Substrat wurden 200 µL der Vesikellösung gegeben und für 1 h inkubiert. Im Falle von reinen POPC-Vesikeln konnte bei Raumtemperatur inkubiert werden, bei POPS-haltigen Vesikeln wurde bei einer Temperatur von 40 °C gearbeitet. Außerdem wurden in diesem Fall 5 mM CaCl_2 hinzugegeben. Nach dem Spreitvorgang wurden die Membranen gründlich mit Puffer gespült, um überschüssige, nicht-gespreitete Vesikel zu entfernen. Die Qualität der Membranen wurde anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Waren die festkörperunterstützten Membranen flächig auf der Substratoberfläche gespreitet und defektfrei, so konnten sie für die Inkubation mit Protein herangezogen werden.

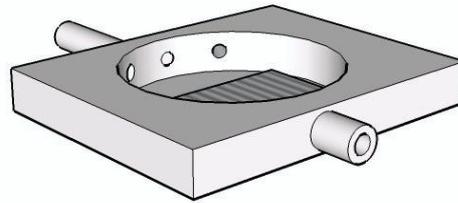


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Teflon-Durchflusskammer.

3.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie wurde in dieser Arbeit verwendet, um die festkörperunterstützten Membranen, welche Fluoreszenzsonden enthielten, zu visualisieren. Fluoreszenz kann als strahlende Desaktivierung durch spontane Emission eines Photons definiert werden. Befindet sich ein Molekül in einem angeregten Zustand, so kann es beim Übergang in niedrigere Zustände Energie in Form von Strahlung abgeben. Da das Molekül zuvor jedoch einen Teil seiner Energie durch Stöße verliert, findet die Emission bei höheren Wellenlängen statt als die Adsorption (*Stokes-Verschiebung*). Dieses Phänomen wird in der Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Der Aufbau des verwendeten Epifluoreszenzmikroskops ist in Abb. 3.11 schematisch dargestellt. Eine Quecksilberdampf Lampe mit einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 270-600$ nm diente als Lichtquelle. Ein Bandpassfilter (Filter 1)

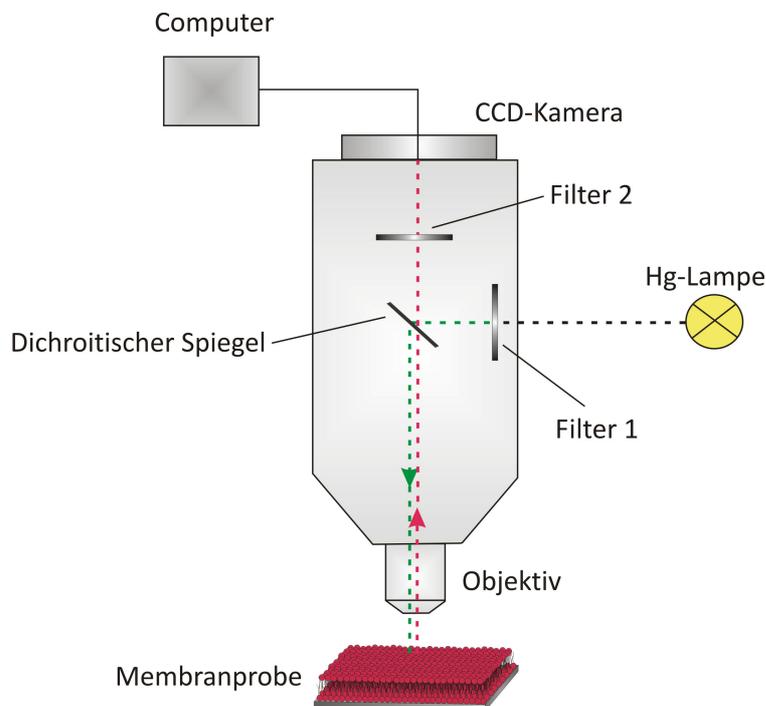


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung eines Epifluoreszenzmikroskops.¹⁶⁷

lässt nur den zur Anregung eines Fluorophors nötigen Wellenlängenbereich hindurch, dieser wird dann über den dichroitischen Spiegel durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Von der Probe emittiertes Licht passiert den dichroitischen Spiegel und einen zweiten Bandpassfilter (Filter 2), bevor es auf eine mit einem Computer verbundene CCD-Kamera trifft.

Messbedingungen

In dieser Arbeit wurde ein Axiotech Vario Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) verwendet, als Objektiv kam ein Wasserimmersionsobjektiv Achroplan (40x/n.A. 0.8 W, Zeiss) zum Einsatz. Für die Untersuchungen an den festkörperunterstützten Membranen, welche mit 0,1 mol% Texas Red DHPE ($\lambda_{\text{ex,max}} = 594 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max}} = 605 \text{ nm}$) dotiert waren, wurde der Filtersatz 45 am Fluoreszenzmikroskop verwendet (BP 560/40, FT 585, BP 630/75, Zeiss).

3.3.3 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) ermöglicht eine höhere Auflösung als Epifluoreszenzmikroskope, und bietet die Möglichkeit die Topographie einer Oberfläche abzubilden. Im Gegensatz zur Rastertunnelmikroskopie (STM, *scanning tunneling microscopy*) ist sie auch auf nicht-leitenden Oberflächen anwendbar. Da sich der Anwendungsbereich auch auf Messungen im flüssigen Medium erstreckt, ist die Rasterkraftmikroskopie eine Technik, mit der auch biologische Systeme untersucht werden können. Mithilfe eines Rasterkraftmikroskops können Informationen über die Topographie einer Oberfläche erhalten werden.^{77–83}

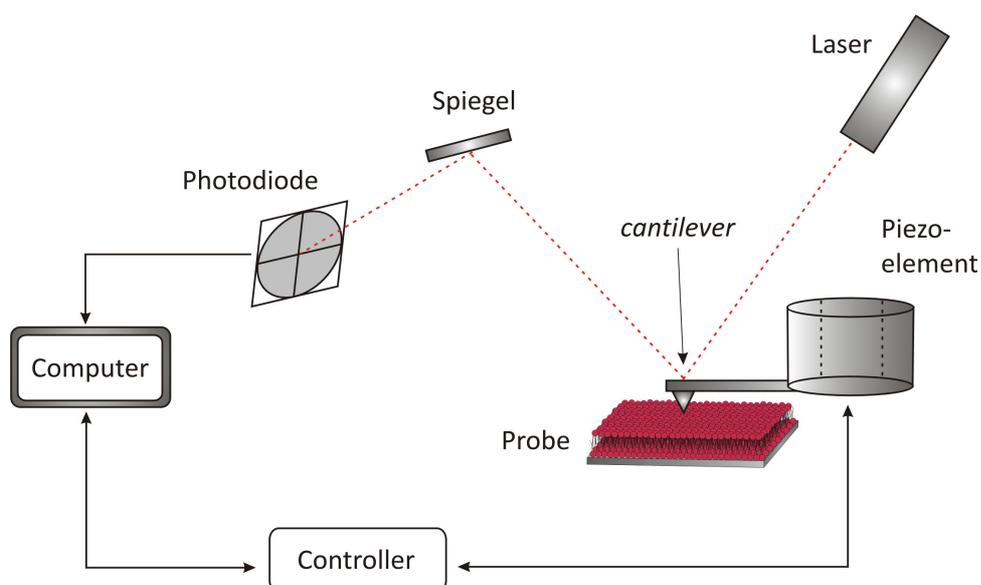


Abbildung 3.12: Schematische Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.¹⁶⁷

In Abb. 3.12 ist der Aufbau eines Rasterkraftmikroskops schematisch gezeigt. Das Messprinzip beruht auf einem mechanischen Abtastvorgang der Oberfläche der untersuchten Probe durch eine feine Messspitze, die sich wiederum an einem Federbalken, dem sogenannten *cantilever* befindet. Mit dieser Messspitze kann die Oberfläche der Probe abgerastert werden. Bei diesem Abtastvorgang wirken auf den Federbalken attraktive oder repulsive Kräfte, diese führen zu einer Verbiegung des Federbalkens. Die Verbiegung wiederum führt zu einer veränderten Auslenkung des auf den Federbalken gelenkten Laserstrahls, welche von einer 4-Quadranten-Photodiode detektiert wird.

Messmodus

In der Rasterkraftmikroskopie können verschiedene Messmodi verwendet werden, man unterscheidet zwischen statischen und dynamischen Messmodi. Zu den statischen Messmodi gehört der *contact mode*, bei dem sich der *cantilever* in ständigem Kontakt mit der Probenoberfläche befindet. Wird die z-Position des Piezoelements konstant gehalten, spricht man vom *constant height mode*, wenn dagegen die Verbiegung des *cantilevers* konstant gehalten wird, wird vom *constant force mode* gesprochen. Ein Nachteil des *contact modes* sind die hohen wirkenden Kräfte, welche zur Manipulation der Probenoberfläche führen können. Im dynamischen Modus wie dem *tapping mode* bzw. *intermittent contact mode* wird der *cantilever* durch ein zusätzliches Piezoelement zu einer sinusförmigen Schwingung angeregt und berührt so die Probenoberfläche nur periodisch schwingend. Die konstante Größe ist im Falle des *tapping modes* die Schwingungsamplitude.

Durchführung

Alle AFM-Messungen wurden in NaCl-haltigem Puffer sowohl im *contact mode* als auch im *tapping mode* durchgeführt. Als AFM-Geräte kamen das NanoWizard I und das NanoWizard II der Firma JPK-Instruments (Berlin, Deutschland) zum Einsatz. Für alle Messungen im *contact mode* wurden die Silizium-*cantilever* CSC38 (Mikromash, Tallin, Estland) verwendet, welche eine nominale Federkonstante von $0,03 \text{ N m}^{-1}$ besitzen. Für die Messungen im *tapping mode* kamen die *cantilever* MSCT (Veeco, Mannheim, Deutschland) mit einer Federkonstanten von $0,1 \text{ N m}^{-1}$ zum Einsatz. Die Scangeschwindigkeit lag im Bereich von 0,4 -1 Hz, die Bildauflösung betrug 512×512 Pixel.

3.4 Experimente zur Untersuchung von Porenbildung und Translokation von Tat an GUVs

Um den Einfluss von Tat nicht nur auf Membranoberflächen untersuchen zu können, wurden Experimente an riesigen, unilamellaren Vesikeln (GUVs, *giant unilamellar vesicles*) durchgeführt. GUVs bieten den Vorteil im Vergleich zu festkörperunterstützten Membranen, dass beide Seiten der Membran zugänglich sind, mithilfe eines Konfokalmikroskops können beide wässrige Kompartimente visualisiert werden. Mithilfe der Experimente an GUVs konnten zwei verschiedene Assays durchgeführt werden. Zum einen wurde untersucht, ob Tat Poren in Membranen ausbilden kann, zum anderen wurde mithilfe dieser Experimente die Translokation von Tat über die Membranen untersucht.

3.4.1 GUV-Präparation

Zur Präparation der GUVs wurden Lipidstammlösungen der entsprechenden Lipide in Chloroform hergestellt und zu den folgenden Zusammensetzungen zusammenpipettiert (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Verwendete Lipidzusammensetzungen der GUVs.

POPC, 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% TR-DHPE
POPC, 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% PB-DMPE
POPC:POPS (4:1), 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% TR-DHPE
POPC:POPS (4:1), 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% PB-DMPE
POPC:POPS (9:1), 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% PB-DMPE
DOPC:DOPE (4:1), 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% TR-DHPE
DOPC:DOPE (4:1), 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% PB-DMPE
DOPC:DOPE:DOPS (6:3:1), 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% TR-DHPE
DOPC:DOPI (4:1), 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% TR-DHPE
POPC:Cholesterin (4:1), 1 mol% Bio-Cap-PE, 0,1 mol% TR-DHPE

25 μL der Lipidlösungen wurden dann auf zwei ITO-Gläschen (Indium-Zinn-Oxid-beschichtete Objektträger) in einem vorgezeichneten Feld aufgetragen. Die ITO-Gläschen besaßen jeweils einen Teflonabstandshalter, auf dem angerautes Kupferklebeband aufgebracht werden konnte. Mithilfe eines flexiblen, verschließbaren Teflonringes konnten die beiden ITO-Gläschen zu einer Kammer zusammengebaut werden. In diese Kammer wurde dann Sucrose-Lösung blasenfrei eingefüllt. Über das Kupferklebeband wurden die Kammern für 3 h an einen Frequenzgenerator angeschlossen ($U = 1,6 \text{ V}$, sinusförmige Spannung, $f = 12 \text{ Hz}$). Die Qualität der GUVs wurde anschließend mittels Konfokalmikroskopie überprüft.

3.4.2 Probenpräparation

Für die Untersuchungen zur Porenbildung und Translokation an GUVs mit Tat sollten die GUVs auf einem Substrat fixiert werden, damit eine Beobachtung der GUVs von 2 h ohne ständige Mobilität möglich war. Dazu wurden zunächst, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, Silizium-Wafer hydrophilisiert. Diese wurden dann mit einer Lösung von Avidin (50 nM) in NaCl-haltigem Puffer für 1 h inkubiert, so dass die Substratoberfläche mit Avidin abgesättigt war. Anschließend wurde die Oberfläche mit NaCl-haltigem Puffer oder Glukose-Lösung gespült.

Proben zur Untersuchung der Porenbildung durch Tat

Für den Assay zur Untersuchung von Porenbildung wurden dem Puffer bzw. der Glukose-Lösung wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe zugefügt, die im Falle von Porenbildung in die GUVs durch diese Poren eindringen können und in den GUVs dann detektiert werden können. Für die Untersuchung der Porenbildung wurden verschiedene wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Neben Pyranin und AF488 kamen auch Dextran-gekoppelte Farbstoffe mit molaren Massen von 3 und 10 kDa zum Einsatz, um Aufschluss über die Größe der gebildeten Poren geben zu können.

In allen Experimenten mit GUVs war es von großer Wichtigkeit, dass diese über 2 h beobachtet werden konnten, dafür mussten sie auf dem Substrat fixiert werden. Dies wurde durch die Bindung von auf dem Substrat gebundenen Avidin mit den biotinylierten Lipiden innerhalb der GUVs erreicht (Abb. 3.13). Bei Avidin handelt es sich um ein Glykoprotein aus Hühnereiweiß, welches Biotinmoleküle binden kann. Avidin ist ein Tetramer, jedes Monomer hat eine Bindungsstelle für Biotin, sodass insgesamt pro Avidin vier Bindungsstellen für Biotin zur Verfügung stehen. Durch die Anbindung von Avidin auf dem Substrat können aufgrund der Orientierung des Avidins nur zwei Biotin-Anker der GUVs pro Tetramer anbinden. Über diese starke Wechselwirkung von Avidin, welches auf dem hydrophilisierten Substrat gebunden ist, und den Biotin-Einheiten, die über das

biotinylierte Lipid Bio-Cap-PE, in die Membran eingebracht wurden, können die GUVs auf dem Substrat fixiert werden.^{84–89}

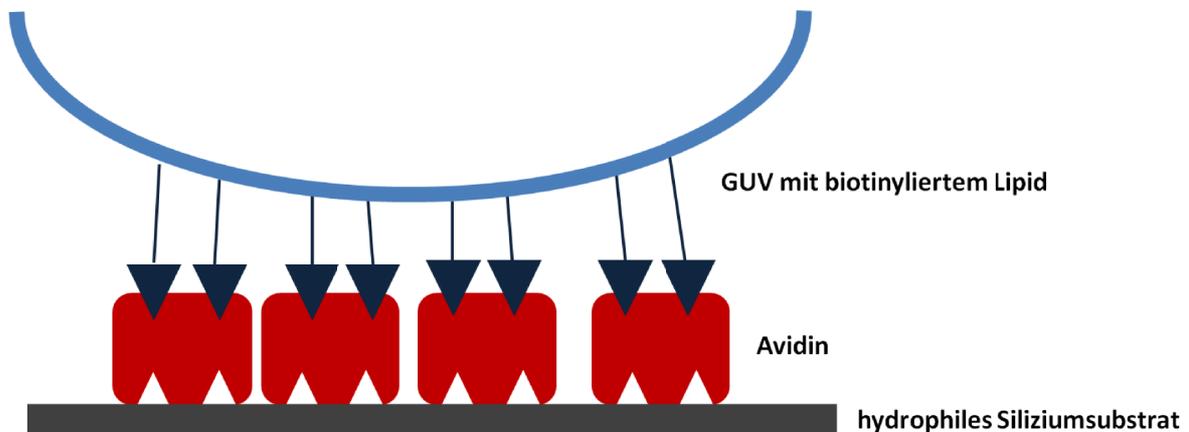


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der GUV-Fixierung auf dem Siliziumsubstrat per Avidin-Biotin-Wechselwirkung.

Waren die GUVs nach kurzer Zeit (etwa 5 Minuten) auf das Substrat abgesunken und fixiert, konnten sie nun für 2 h in Gegenwart von Tat mithilfe des Konfokalmikroskops beobachtet werden. Nach 2 h Inkubation wurde die gesamte Probe untersucht, um einen Überblick über viele GUVs zu erhalten. Für die Untersuchungen zur Porenbildung wurden Texas Red DHPE-dotierte GUVs verwendet. Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über die Komponenten der durchgeführten Experimente zur Untersuchung der Porenbildung an GUVs durch das Tat-Protein.

Tabelle 3.5: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Untersuchung der Porenbildung an GUVs durch Tat.

Wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe	Protein	Umgebendes Medium	GUVs
Pyranin	wt Tat (1-86)	NaCl-haltiger Puffer	POPC, POPC:POPS (4:1), DOPC:DOPE (4:1), DOPC:DOPE:DOPS (6:3:1), DOPC:DOPI (4:1) und POPC:Chol (4:1)
	wt Tat (35-86)		
	Tat ARM-Ala		

3 Materialien und Methoden

Pyranin	wt Tat (1-86)	Glukose-Lösung	POPC, POPC:POPS (4:1) und DOPC:DOPE (4:1)
	wt Tat (35-86)		
	Tat ARM-Ala		
D3-AF488	wt Tat (35-86)	NaCl-haltiger Puffer	POPC
D10-AF488	wt Tat (35-86)	NaCl-haltiger Puffer	POPC
AF488	Tat-AF633	NaCl-haltiger Puffer	POPC, POPC:POPS (9:1)
D3-AF488	Tat-AF633	NaCl-haltiger Puffer	POPC, POPC:POPS (9:1)
D10-AF488	Tat-AF633	NaCl-haltiger Puffer	POPC, POPC:POPS (9:1)
Pyranin	Blindprobe	NaCl-haltiger Puffer	POPC, POPC:POPS (4:1), DOPC:DOPE (4:1), DOPC:DOPE:DOPS (6:3:1), DOPC:DOPI (4:1) und POPC:Chol (4:1)
		Glukose-Lösung	POPC, POPC:POPS (4:1), DOPC:DOPE (4:1)
AF488	Blindprobe	NaCl-haltiger Puffer	POPC, POPC:POPS (4:1), DOPC:DOPE (4:1)

Auf dem mit Avidin gesättigten Silizium-Wafer wurde dem Puffer oder der Glukose-Lösung (V = 200 µL) der entsprechende wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt und gleichmäßig in

der Probe verteilt. Anschließend wurden 0,5 μM des jeweils eingesetzten Proteins zugefügt und ebenfalls gleichmäßig verteilt. Erst dann wurden zu der Probe je nach Menge an zugegebenem Fluoreszenzfarbstoff bis zu 100 μL der GUV-Lösung zugegeben, so dass das Gesamtvolumen 300 μL betrug. Nach etwa fünf Minuten waren die GUVs auf das Substrat abgesunken und über die Biotin-Avidin-Bindung darauf fixiert. Die Inkubationszeit von 2 h galt ab Zugabe der GUVs zur Probe.

Proben zur Untersuchung der Translokation von Tat-AF633

Für die Untersuchung der Translokation von Tat wurde fluoreszenzmarkiertes Tat-Protein Tat-AF633 in verschiedenen Konzentrationen (0,1 μM - 1,0 μM) verwendet. In diesen Experimenten wurden Pacific Blue DMPE-dotierte GUVs der Zusammensetzungen POPC, POPC:POPS (4:1) und DOPC:DOPE (4:1) verwendet. Die Experimente wurden sowohl in NaCl-haltigem Puffer als auch in Glukose-Lösung durchgeführt. Auf dem mit Avidin gesättigten Silizium-Wafer wurde dem Puffer oder der Glukose-Lösung ($V = 280 \mu\text{L}$) die entsprechende Konzentration an Tat-AF633 zugefügt und gleichmäßig verteilt. Dann wurden zu der Probe je nach Proteinmenge bis zu 20 μL der GUV-Lösung zugegeben, so dass das Gesamtvolumen 300 μL betrug. Nach etwa fünf Minuten waren die GUVs auf das Substrat abgesunken und über die Biotin-Avidin-Bindung darauf fixiert. Die Inkubationszeit von 2 h galt auch hier ab Zugabe der GUVs zur Probe.

3.4.3 Konfokalmikroskopie

Das Prinzip des konfokalen Laser-Rastermikroskops (CLSM, *confocal laser scanning microscope*) geht auf Marvin Lee Minsky (1957) zurück, jedoch dauerte es etwa weitere dreißig Jahre bis mithilfe von Lasern das CLSM entwickelt werden konnte.

Mittels eines Lasers als Strahlungsquelle können wie bei gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopen (siehe Fluoreszenzmikroskopie in Kapitel 3.3.2) Fluorophore in einer Probe angeregt werden, so dass sie ihrerseits fluoreszierende Strahlung emittieren. Jedoch wird hier die Probe nicht vollständig beleuchtet, sondern nur punktwise in einer bestimmten fokalen Ebene. Dies wird dadurch ermöglicht, dass der Laserstrahl zunächst eine Lochblende passiert, bevor er über den dichroitischen Spiegel in Richtung der Probe abgelenkt wird. Der bewegliche Scanspiegel sorgt dafür, dass mithilfe des Laserstrahls die Probenoberfläche abgerastert werden kann. Durch das Objektiv trifft der Laserstrahl nun auf die Probe. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird durch den dichroitischen Spiegel spektral aufgetrennt und trifft dann, nachdem es eine weitere Lochblende

passiert hat, auf den Detektor. Abb. 3.14 verdeutlicht den Aufbau eines Konfokalmikroskops. Die zweite Lochblende verhindert, dass Fluoreszenzlicht aus anderen Ebenen außerhalb der Fokusebene auf den Detektor trifft. Dieses System ermöglicht eine Auflösung von etwa 700 nm in z-Richtung und 300 nm in x- und y-Richtung. Die Konfokalmikroskopie ist eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung von biologischen Systemen.⁹⁰

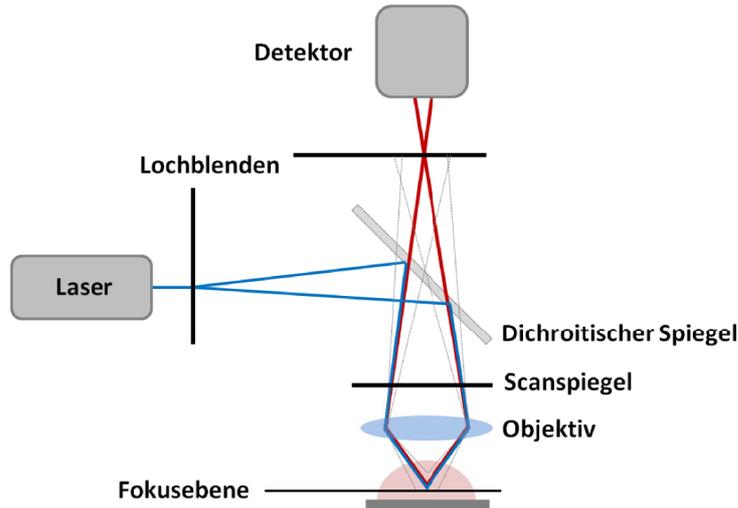


Abbildung 3.14: Schematischer Aufbau eines Konfokalmikroskops.

Messbedingungen

In dieser Arbeit wurde mit dem Konfokalmikroskop LSM 710 Examiner der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) gearbeitet. Da verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet wurden, kamen unterschiedliche Laser zum Einsatz, diese sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Verwendete Laser und damit angeregte Fluoreszenzfarbstoffe.

Laser	$\lambda_{ex,max}$ und λ_{em}	Fluoreszenzfarbstoffe
Diodenlaser	$\lambda_{ex,max} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 410 - 450 \text{ nm}$	Pacific Blue DMPE
Ar-Laser	$\lambda_{ex,max} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 490 - 540 \text{ nm}$	Pyranin, AF488, D3-AF488, D10-AF488
HeNe-Laser	$\lambda_{ex,max} = 594 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 605 - 645 \text{ nm}$	Texas Red DHPE
HeNe-Laser	$\lambda_{ex,max} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 640 - 680 \text{ nm}$	AF633, Tat-AF633

3.5 Release-Messungen an LUVs

Um untersuchen zu können, ob Tat in der Lage ist, Poren in kleineren Lipidvesikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 600 nm (LUVs, *large unilamellar vesicles*) zu bilden, wurden an diesen sogenannte *Release*-Messungen durchgeführt. Das Prinzip der *Release*-Messungen beruht auf dem Selbstlöschungsprinzip bestimmter Fluoreszenzfarbstoffe, wie 5(6)-Carboxyfluorescein, dessen Strukturformel in Abb. 3.15 gezeigt ist. Dieser Farbstoff wird in selbstlöschender Konzentration (> 50 mM) in Lipidvesikel eingebracht, diese werden dann fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Wird der Farbstoff aus den Vesikeln durch Porenbildung oder Zerstörung der Vesikel freigesetzt, gelangt er in den umgebenden Puffer, verdünnt sich auf eine nicht mehr selbstlöschende Konzentration und die Fluoreszenzintensität steigt an. Auf diese Weise kann untersucht werden, ob bestimmte Substanzen Poren in Lipidmembranen erzeugen können, durch die der Farbstoff austreten kann.

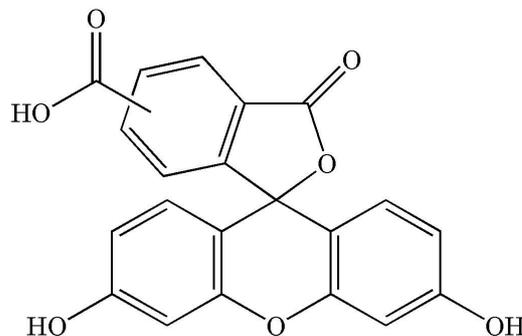


Abbildung 3.15: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs 5(6)-Carboxyfluorescein.

Für die Messungen wurden Lipidvesikel (LUVs) aus dem zwitterionischen Lipid POPC aus einem 2 mg-Lipidfilm in 400 μL Puffer, bestehend aus 100 mM NaCl, 20 mM TRIS/HCl, 100 mM 5(6)-Carboxyfluorescein (pH 7,4), hergestellt, so dass eine Lipidkonzentration von $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ erhalten wurde und anschließend mit dem entsprechenden Carboxyfluorescein-freien Puffer über eine Sephadex-G25-Säule vom umgebenden Carboxyfluorescein befreit. Die Konzentration der Vesikel nach der Größenausschlusschromatographie wurde mittels Veraschung und anschließender Bestimmung des Phosphatgehalts ermittelt. Hierbei werden die Phospholipide in anorganisches Phosphat überführt und der Phosphatgehalt über eine Komplexbildung mit Ammoniumheptamolybdat spektrometrisch bestimmt. Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Tat-Proteine Poren in den Lipidmembranen der Vesikel bilden können, wurden die 800 μL einer $1,3 \mu\text{M}$ Vesikellösung mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat versetzt und die Fluoreszenzintensität zeitlich beobachtet. Anschließend wurden 2 μL des Detergens Triton X-100 (10%ig in wässriger Lösung) hinzugegeben, um eine vollständige Solubilisierung der Vesikel und somit den maximalen Anstieg der Fluoreszenzintensität zu erreichen.

Durchführung der Veraschung

Zunächst wird als Referenz eine Eichgerade für die Absorption des mit Phosphat gebildeten Ammoniumheptamolybdatkomplex erstellt. Dazu werden 0, 12,5, 25, 50, 75 und 100 μL einer NaH_2PO_4 -Stammlösung ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) in jeweils zwei Flachbodengläschen pipettiert und mit Reinstwasser auf ein Volumen von 100 μL aufgefüllt. Je 20 μL der Vesikellösungen der Fraktionen nach der Größenausschlusschromatographie werden ebenfalls in Flachbodengläschen pipettiert und mit 200 μL 70%iger Perchlorsäure versetzt. Alle Proben werden dann für 1 h im Heizblock bei $220 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Nach Abkühlen der Proben wurden zu diesen 700 μL der Lösung A (1,7% Ascorbinsäure) und 700 μL der Lösung B (0,45% NH_4MoO_4 , 12,6% HClO_4) hinzugefügt. Die Proben wurden dann für zehn Minuten im Wasserbad bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, dabei fand eine Blaufärbung der Proben statt. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde die Absorption der Probenlösungen bei $\lambda = 820 \text{ nm}$ photometrisch bestimmt. Mithilfe der Gleichung der Anpassungsgeraden der Eichgeraden konnte die Konzentration der Vesikellösungen ermittelt werden.

$$X[\mu\text{g}] = \frac{Y - A}{B[\mu\text{g}^{-1}]}$$

Dabei ist A der Achsenabschnitt und B die Steigung der Geraden. Y ist die gemessene Intensität der untersuchten Probe, X entspricht dem enthaltenen Phosphoranteil in μg der untersuchten Probe und kann in den molaren Anteil an Phospholipid der Probe umgerechnet werden. Für die *Release*-Experimente wurden die POPC-Vesikellösungen in einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1,3 \mu\text{M}$) vermessen, es wurden $0,5 \mu\text{M}$ Tat hinzugegeben, dies entspricht einem Protein-Lipid-Verhältnis von 1:2,6.

3.5.1 Auswertung der Release-Messungen

Zum besseren Vergleich einzelner Messungen wurden die erhaltenen Intensitätswerte auf die jeweilige Maximalintensität mittels der folgenden Gleichung normiert.

$$F_{\text{rel}} = \frac{F - F_0}{F_{\text{max}} - F_0}$$

Dabei wird die relative Fluoreszenzintensität F_{rel} erhalten, F ist die gemessene und zu normierende Fluoreszenzintensität, F_0 die gemessene Intensität vor Zugabe des Proteins und F_{max} die Maximalintensität nach Zugabe des Detergens Triton X-100.

3.6 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine bewährte Methode zur Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen in Lösung. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass chirale Moleküle oder chirale Strukturelemente in Proteinen wie α -Helices oder β -Faltblätter zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Über die Absorptionsbanden, die vor allem durch elektronische Übergänge innerhalb der Amidgruppen ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$) der Proteine zustande kommen, kann eine Aussage über in einem Protein vorhandene Sekundärstrukturelemente getroffen werden (vgl. Abb 3.16).

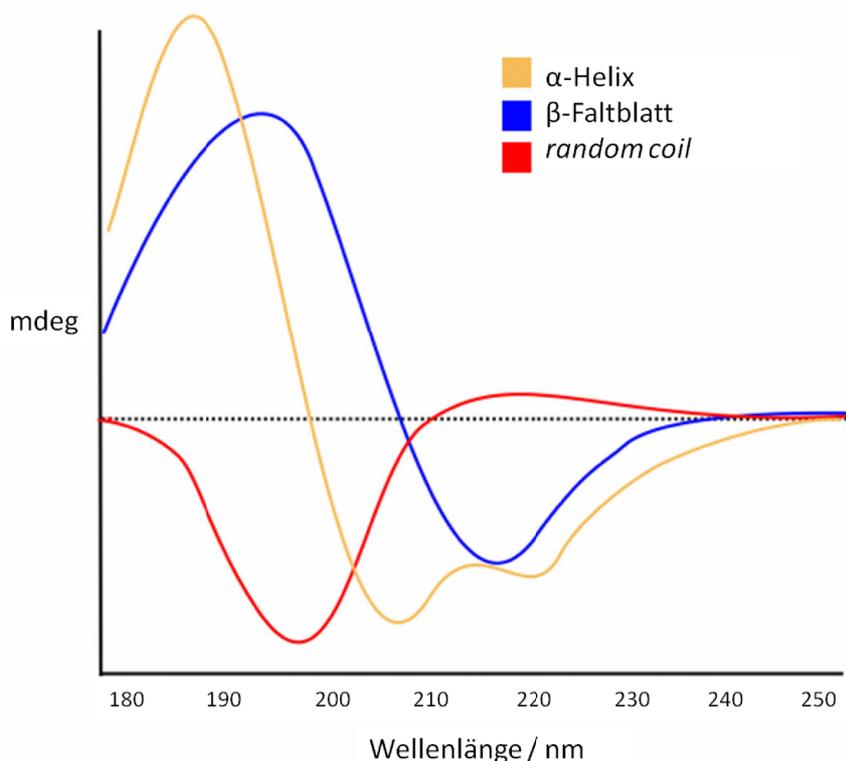


Abbildung 3.16: Simulierte CD-Spektren einzelner Strukturelemente eines Proteins.

Alle CD-Messungen in dieser Arbeit wurden in Phosphat-Puffer durchgeführt, um zu vermeiden, dass Ionen und andere Bestandteile des Puffers, wie beispielsweise TRIS, bereits eine Absorption im Bereich von 180 - 210 nm zeigen.⁹¹ Sieben Messungen wurden jeweils aufgenommen, zu einer Messkurve zusammengefasst und gemittelt. 10 μ M des vollständigen Wildtyps wt Tat (1-86) und 20 μ M des kurzen Wildtyps wt Tat (35-85) wurden eingesetzt, die Konzentrationen wurden bei der Auswertung der Daten berücksichtigt. Zusätzlich wurden Messungen in Gegenwart von POPC-Vesikeln durchgeführt (in einem molaren Protein-Lipid-Verhältnis von 1:5), um zu überprüfen, ob sich die Proteinstruktur bei der Wechselwirkung mit Lipidmembranen ändert. Die Messgröße der CD-

Spektroskopie, der molare Drehwert wurde mithilfe der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\theta_{\text{mol}} = \frac{\theta}{c \cdot L \cdot n_r}$$

Dabei war θ der gemessene Drehwert in mdeg, c die molare Konzentration der eingesetzten Proteine, n_r die Anzahl der Aminosäuren der eingesetzten Proteine (86 für den vollständigen und 52 für den kurzen Wildtyp) und L die Dicke der Küvette (0,1 cm). Um aus den gemessenen CD-Spektren Informationen zu den Strukturelementen im Tat-Protein zu erhalten, wurden die Datensätze mithilfe des Programms DichroWeb^{92,93} dekonvolviert. Dazu wurde der Algorithmus CDSSTR mit den Datensätzen 4 und 7 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Untersuchungen zur Struktur von Tat

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Tat auf Lipidmembranen zu untersuchen. Um diese Ergebnisse einordnen zu können, war es von großer Wichtigkeit, die Struktur des Proteins genauer zu kennen. Aus der Literatur ist bekannt, dass natives Tat keine übergeordnete Struktur besitzt, also ungefaltet vorliegt.²⁸ Aus NMR- und CD-spektroskopischen Studien ging hervor, dass Tat natürlicherweise als *random coil* vorliegt,²⁹ jedoch in hydrophoben Lösungsmitteln α -Helices ausbildet.^{30,31} Es konnte auch gezeigt werden, dass Tat sehr flexibel ist und in der Lage ist, in Gegenwart bestimmter Wechselwirkungspartner eine geordnete Struktur anzunehmen.¹⁶ Des Weiteren ist bekannt, dass Tat im Bereich seiner Cystein-reichen Region ein Zinkfinger-Motiv bilden kann.⁹⁴⁻⁹⁷

In dieser Arbeit wurden sowohl fluoreszenzspektroskopische als auch CD-spektroskopische Messungen am vollständigen Wildtyp (wt Tat (1-86)) vorgenommen, um die Struktur dieses Proteins zu untersuchen. Um eventuelle Strukturunterschiede in hydrophober Umgebung aufzuklären, wurden die Messungen nicht nur an freiem Protein in Puffer, sondern auch in Gegenwart von Lipidvesikeln durchgeführt. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen wurden ebenfalls an der Tat-Mutante Tat ARM-Ala mit verringertem Ladungscluster durchgeführt, die CD-spektroskopischen Messungen wurden zusätzlich mit dem verkürzten Wildtyp Tat (35-86) vorgenommen.

Fluoreszenzspektroskopische Ergebnisse

Besitzen Proteine, wie es bei Tat der Fall ist, mindestens ein Tryptophan, so haben sie eine intrinsische Fluoreszenz. Über das Emissionsmaximum der Tryptophanfluoreszenz kann eine Aussage über die strukturelle Umgebung des Tryptophans gemacht werden. Befindet sich das Tryptophan in eher hydrophober Umgebung, liegt das Emissionsmaximum im Bereich von $\lambda = 309 - 335$ nm. In hydrophiler Umgebung, wenn das Tryptophan vollständig mit Wasser umgeben ist, liegt das Emissionsmaximum bei etwa $\lambda = 355$ nm.⁹⁸

In der vorliegenden Arbeit wurden Fluoreszenzspektren von wt Tat (1-86) und der Tat-Mutante sowohl in NaCl-haltigem Puffer als auch in salzfreier Glukose-Lösung aufgenommen. Für den verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86) konnten diese Untersuchungen nicht durchgeführt werden, da dieser kein Tryptophan und somit keine intrinsische Fluoreszenz besitzt.

Nach Zugabe von Lipidvesikeln verschiedener Zusammensetzungen wurden in kurzen Abständen erneut Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Anregungswellenlänge lag bei $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, das

4 Ergebnisse

Emissionsmaximum lag sowohl für den vollständigen Wildtyp als auch für die Mutante im Bereich von $\lambda_{em,max} = 342$ nm (siehe Abb. 4.1), so dass angenommen werden kann, dass das Tryptophan an Position 11 sich in intermediärer Umgebung befindet und es diesbezüglich keinen strukturellen Unterschied zwischen dem vollständigen Wildtyp und der Mutante gibt.

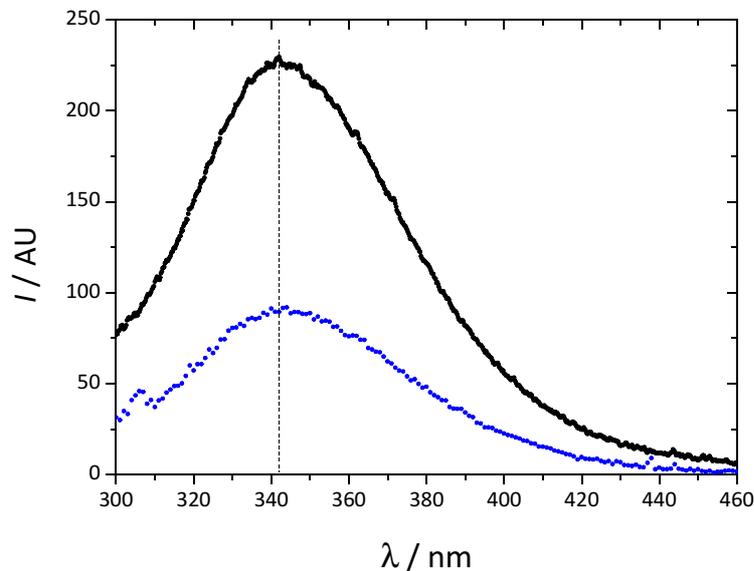


Abbildung 4.1: Emissionsspektren von $1 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) (schwarze Datenpunkte) und $1 \mu\text{M}$ der Tat ARM-Ala (blaue Datenpunkte) in NaCl-haltigem Puffer. $\lambda_{ex} = 280$ nm, $\lambda_{em,max} = 340$ nm.

Da sich das Tryptophan schon in intermediärer Umgebung befindet, konnte angenommen werden, dass sich auch durch Zugabe von Lipidvesikeln das Emissionsmaximum der Proteine nicht oder nur minimal verschiebt. So lag das Emissionsmaximum der Tryptophanfluoreszenz nach Zugabe von POPC-LUVs für beide Proteine nur minimal verschoben bei $\lambda_{em,max} = 340$ nm (Abb. 4.2 A). Allerdings wurde während der Inkubation von wt Tat (1-86) mit POPC-LUVs die Tryptophanfluoreszenz gelöscht, dies wird aus Abb. 4.2 B deutlich. Dieses Ergebnis deutet auf eine Wechselwirkung von wt Tat (1-86) mit den POPC-LUVs hin, allerdings konnte aufgrund dieser Messungen die Protein-Membran-Wechselwirkung nicht genauer bestimmt werden.

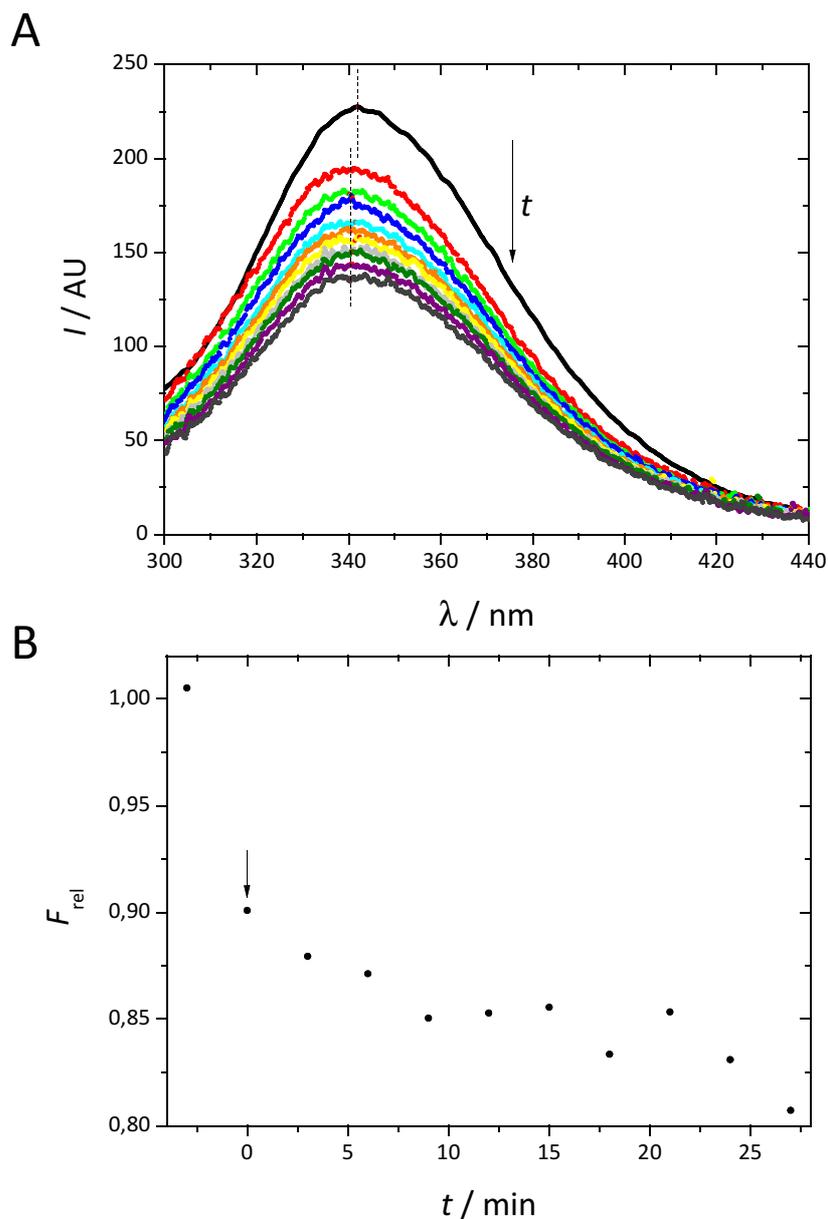


Abbildung 4.2: (A) Emissionsspektren von wt Tat (1-86) vor (schwarz) und nach Zugabe von POPC-LUVs (farbig) im Abstand von jeweils drei Minuten. (B) Zeitlicher Verlauf der Intensität der Tryptophanfluoreszenz von wt Tat (1-86) nach Zugabe von POPC-LUVs (durch Pfeil angezeigt), hierbei ist die Löschung der Tryptophanfluoreszenz über die Zeit bereits subtrahiert. Die Messungen wurden in NaCl-haltigem Puffer durchgeführt.

CD-Spektroskopische Ergebnisse

Die CD-Spektroskopie ist eine etablierte Methode, um Sekundärstrukturelemente in Proteinen wie α -Helices oder β -Faltblätter zu identifizieren.^{91,99,100} Auch das Tat-Protein und das Tat-Peptid wurden bereits mittels CD-Spektroskopie untersucht, dabei wurde von Campbell und Lorent herausgefunden, dass verschiedene Tat-Varianten in wässriger Lösung hauptsächlich als *random coil* vorliegen und

lediglich β -Schleifen aufweisen.²⁹ Eine ähnliche Studie von Foucault et al. zeigte, dass Tat in hydrophiler Umgebung ungefaltet und flexibel ist, aber in der Lage ist, in hydrophober Umgebung α -Helices auszubilden.³⁰ CD-spektroskopische Untersuchungen am Tat-Peptid von Péloponèse et al. ergaben, dass auch verschiedene Tat-Peptide in wässriger Umgebung als *random coil* vorliegen.³¹

In dieser Arbeit wurden CD-spektroskopische Messungen am vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86), sowie am verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86) durchgeführt, um eventuelle strukturelle Unterschiede, die durch den N-terminalen Bereich hervorgerufen werden, zu bestimmen. Die Messungen wurden in Phosphatpuffer durchgeführt, um eine Absorption des Lösungsmittels zu vermeiden. Es wurden ebenfalls CD-Spektren nach Zugabe von Lipidvesikeln aufgenommen, um zu überprüfen, ob Tat bei der Wechselwirkung mit Lipidmembranen eine andere Struktur annimmt. Abb. 4.3 A zeigt ein CD-Spektrum des vollständigen Wildtyps wt Tat (1-86) vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von POPC-Vesikeln. Abb. 4.3 B zeigt das analoge Spektrum mit dem verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86), ebenfalls vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von POPC-Vesikeln. Die Spektren zeigen für beide Proteine eine *random coil*-Konformation, auch nach Zugabe von POPC-Vesikeln liegen die Proteine weiterhin in dieser Konformation vor. Die Auswertung der Daten wurde mittels des Programms *DichroWeb* durchgeführt.^{92,93} Es wurde der Algorithmus CDSSTR mit den Datensätzen 4 und 7 verwendet. Der Algorithmus CDSSTR nutzt für die Anpassung die CD-Spektren von 49 löslichen Proteinen, deren Röntgenstruktur bekannt ist. Die Datensätze 4 und 7 sind optimiert für den Wellenlängenbereich von $\lambda = 190 - 240$ nm. Die Auswertung ergab ebenfalls, dass weder der vollständige noch der verkürzte Wildtyp α -helicale Anteile besitzen. Der Hauptanteil der Proteine wurde als Schleifen, Faltblattstrukturen und ungeordnete Bereiche angegeben. Dabei muss beachtet werden, dass mit der CD-Spektroskopie insbesondere α -Helices erkannt werden können, sowohl Schleifen als auch Faltblattstrukturen können im Fall von Tat eher als ungeordnete Bereiche angesehen werden. Auch in Gegenwart von POPC-Vesikeln (Lipid-Protein-Verhältnis 5:1) konnte keine signifikante Veränderung der Proteinstruktur mithilfe des Programms *DichroWeb* ermittelt werden. Sowohl wt Tat (1-86), als auch wt Tat (35-86) waren weiterhin ungeordneter Struktur, der α -helicale Anteil lag weiterhin unter 5%.

Aus den fluoreszenzspektroskopischen und CD-spektroskopischen Daten zu wt Tat (1-86) kann also geschlossen werden, dass der vollständige Wildtyp in wässriger Umgebung als *random coil* vorliegt und keine übergeordnete Struktur wie α -Helices besitzt. Allerdings befindet sich das Tryptophan an Position 11 in hydrophober Umgebung, was darauf schließen lässt, dass Tat in diesem Bereich eine gewisse Faltung aufweist. Die CD-spektroskopischen Daten zum verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86) zeigen, dass dieser eine dem Wildtyp sehr ähnliche Struktur besitzt, also in wässriger Umgebung ebenfalls ungefaltet vorliegt.

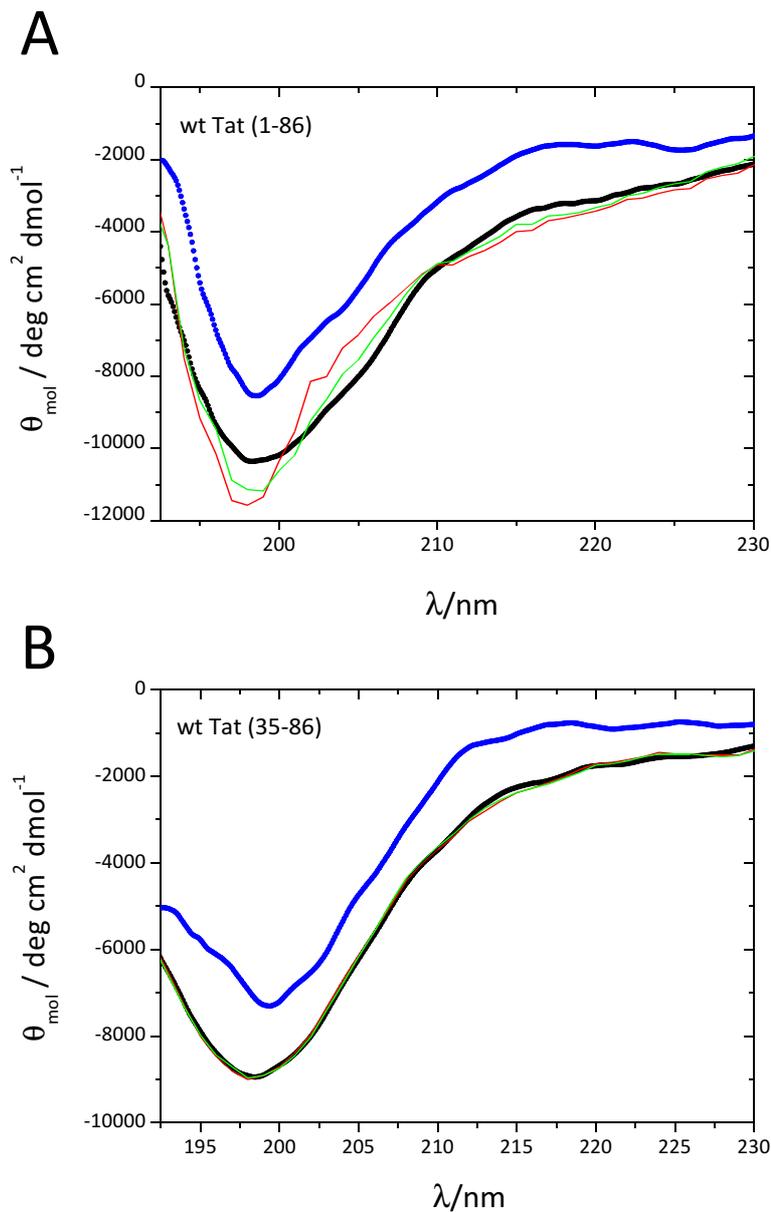


Abbildung 4.3: CD-Spektren der verschiedenen Tat-Proteine. (A) CD-Spektrum von 10 μM wt Tat (1-86) (schwarz) und nach Zugabe von POPC-Vesikeln (blau) in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 5:1. Dekonvolierte Plots nach *DichroWeb* mit Algorithmus CDSSTR mit Datensatz 4 (grün) und Datensatz 7 (rot). (B) CD-Spektrum von 20 μM wt Tat (35-86) (schwarz) und nach Zugabe von POPC-Vesikeln (blau) in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 5 : 1. Dekonvolierte Plots nach *DichroWeb* mit Algorithmus CDSSTR mit Datensatz 4 (grün) und Datensatz 7 (rot).

4.2 Ergebnisse der Untersuchungen der Interaktion von Tat mit planaren festkörperunterstützten Membranen mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie

Ziel dieser Arbeit war es, die Wechselwirkung von HIV-1 Tat mit Lipidmembranen zu untersuchen, hierfür wurde zunächst untersucht, wie Tat auf die Oberfläche einer planaren Lipidmembran wirkt. Insbesondere konnte mittels der festkörperunterstützten Membranen untersucht werden, ob das Tat-Protein an die Oberfläche der Membran bindet. Um den Einfluss der verschiedenen Tat-Proteine, also des vollständigen Wildtyps, sowie der Tat-Mutante ARM-Ala mit verringertem Ladungscluster auf Membranoberflächen zu untersuchen, wurden festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten mit Tat inkubiert und anschließend fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopisch untersucht. Es wurden zunächst reine POPC-Membranen verwendet. Um den Einfluss negativ geladener Kopfgruppen der Lipide innerhalb der Membran auf die Wechselwirkung mit Tat zu untersuchen, wurden zudem POPS-haltige Membranen verwendet. Die Inkubation der Membranen mit Tat wurden im Durchflusssystem durchgeführt, um den Massentransport an die Oberfläche der Membran zu optimieren.

4.2.1 Fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Ergebnisse der Untersuchungen der Interaktion von Tat mit festkörperunterstützten POPC-Membranen

Die Membranen wurden für die hier durchgeführten Messungen wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben präpariert und auf ihre Qualität hin überprüft, um dann mit Tat inkubiert zu werden. Um ausschließen zu können, dass der Flüssigkeitsstrom bei der Inkubation im Durchflusssystem die Stabilität der Membranen beeinflusst, wurden Blindproben durchgeführt. In diesen wurden die Lipidmembranen für zwei Stunden mit Puffer im Durchflusssystem gespült und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie untersucht.

Abb. 4.4 A zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Texas Red DHPE-dotierten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer. Es ist eine homogene Fluoreszenz zu erkennen, was darauf hindeutet, dass keine Defekte vorhanden sind. Lediglich nicht gespreitete Lipidvesikel sind noch auf der Oberfläche als kleine helle Punkte zu erkennen, diese konnten auch nach gründlichem Spülen der Membran mit Puffer nicht entfernt werden. Auch die rasterkraftmikroskopische Aufnahme (Abb. 4.4 B) zeigt eine ebene homogene Lipidmembran ohne Fehlstellen. Die Ergebnisse beweisen, dass festkörperunterstützte POPC-Membranen gegenüber dem Flüssigkeitsstrom im Durchflusssystem stabil sind.

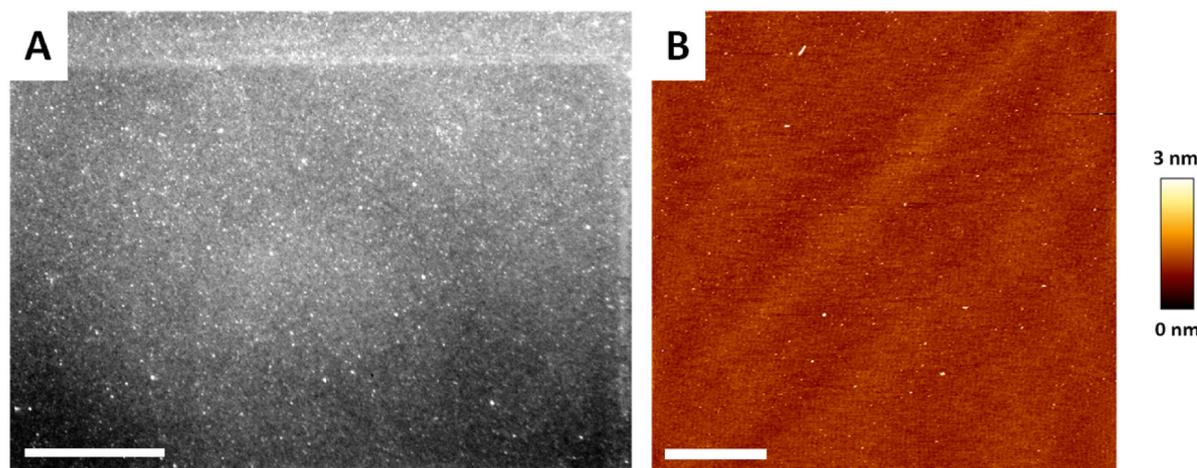


Abbildung 4.4: (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten POPC-Membran (dotiert mit 0,1 mol% Texas Red DHPE) nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: 50 μm . (B) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme im *contact mode* einer festkörperunterstützten POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: 10 μm . Cantilever: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N m^{-1} .

wt Tat (1-86)

Zur Untersuchung der Wechselwirkung des vollständigen Tat-Proteins wt Tat (1-86) mit planaren Lipiddoppelschichten wurden festkörperunterstützte POPC-Membranen für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,05 μM bis 0,5 μM wt Tat (1-86) im Durchfluss inkubiert. Die Qualität der Membranen wurden jeweils vorher fluoreszenzmikroskopisch geprüft und anschließend sowohl mittels Fluoreszenzmikroskopie als auch mittels Rasterkraftmikroskopie analysiert. Als Vergleich dienten jeweils die entsprechenden Blindproben, die für zwei Stunden in Puffer inkubiert wurden. Abb. 4.5 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von POPC-Membranen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an wt Tat (1-86). Nach zweistündiger Inkubation mit 0,05 μM wt Tat (1-86) und anschließendem Spülen der Membran mit Puffer zeigt die POPC-Membran, wie in Abb. 4.5 A dargestellt, weiterhin eine homogene Fluoreszenz, mit nur vereinzelten Defektstellen, in denen keine Fluoreszenz mehr detektiert werden kann (durch rote Kreise markiert). Weiterhin zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme dieser POPC-Membran noch einige Vesikel auf der Oberfläche, die als weiße Punkte erkennbar sind. Im Vergleich zur Blindprobe sind also nur sehr geringe Unterschiede zu erkennen. Bei Erhöhung der Tat-Konzentration auf 0,1 μM ist nach 2 h Inkubationszeit ein deutlicher Effekt des Proteins auf die festkörperunterstützte POPC-Membran zu beobachten (Abb. 4.5 B). Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt, dass sich auf der Membranoberfläche einige dunkle Bereiche gebildet haben, die keine Fluoreszenz mehr zeigen. Diese nicht-fluoreszierenden Bereiche deuten auf Defekte in der festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht hin. Dieser Effekt wird noch deutlicher nach zweistündiger Inkubation der POPC-Membranen

4 Ergebnisse

mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86), wie Abb. 4.5 C verdeutlicht. Unter dem Einfluss des Proteins hat sich ein großer Anteil an nicht-fluoreszierenden Bereichen ausgebildet, die darauf schließen lassen, dass das Protein Defekte in der Membran induziert hat.

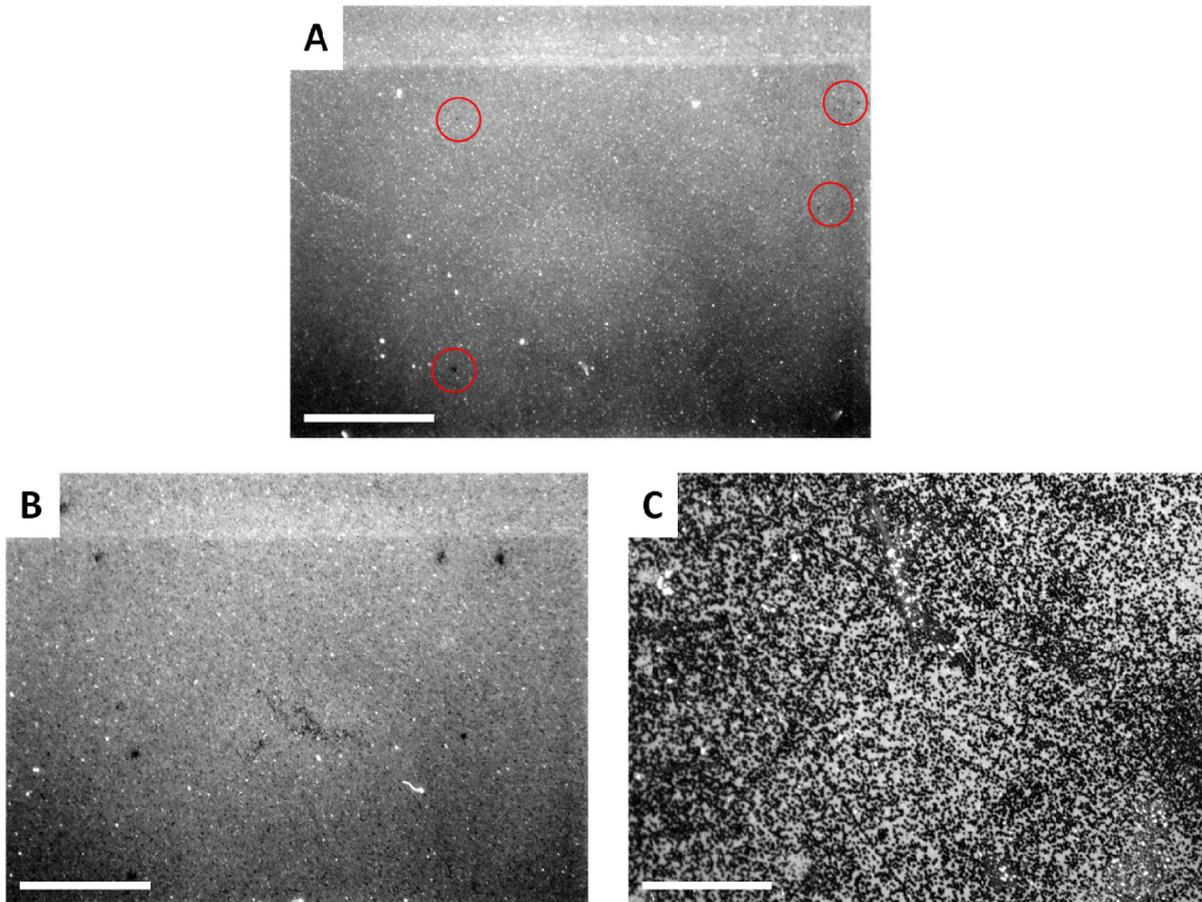


Abbildung 4.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten POPC-Membran (dotiert mit 0,1 mol% Texas Red DHPE) nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer mit (A) $0,05 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86), (B) $0,1 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) und (C) $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86). Maßstabsbalken: $50 \mu\text{m}$.

Um die Beschaffenheit der nicht-fluoreszierenden Bereiche, die sich durch den Einfluss von Tat auf der Membranoberfläche gebildet haben, näher zu untersuchen, wurden die POPC-Membranen nach der zweistündigen Inkubation mit den verschiedenen Tat-Konzentrationen zusätzlich rasterkraftmikroskopisch untersucht (Abb. 4.6). Die nicht-fluoreszierenden Bereiche, die sich nach Inkubation mit Tat in den Fluoreszenzaufnahmen der Lipiddoppelschichten zeigen, deuten auf eine Störung der Membran durch das Protein hin. An diesen Stellen ist die Membran nicht mehr vollständig intakt, jedoch geben die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen keinen Aufschluss darüber, wie die genaue Morphologie der Membran an diesen Stellen ist. Mithilfe der Rasterkraftmikroskopie, die ein deutlich höheres Auflösungsvermögen als die Fluoreszenzmikroskopie besitzt, kann die genaue Struktur der Membran aufgelöst werden.

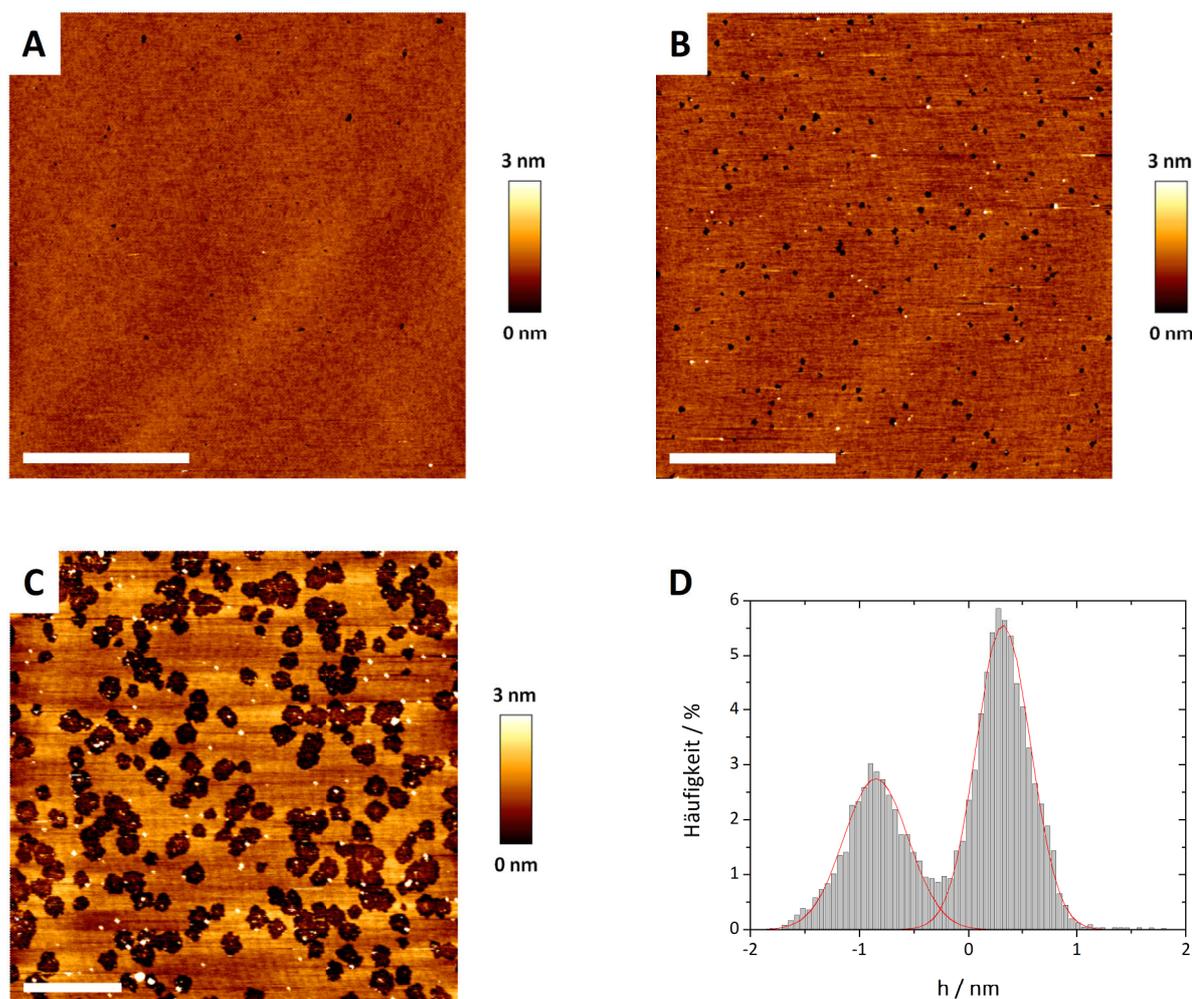


Abbildung 4.6: AFM-Aufnahmen einer POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit (A) $0,05 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) (Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$), (B) $0,1 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) (Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$) und (C) $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) (Maßstabsbalken: $5 \mu\text{m}$). (D) Die Höhenunterschiede zwischen den dunkleren und helleren Bereichen aus (C) konnten mittels einer Pixelanalyse auf $(1 \pm 0,03) \text{ nm}$ bestimmt werden ($n = 4$). Die Messungen wurden im *contact mode* aufgenommen. *Cantilever*: CSC 38, Federkonstante: $0,03 \text{ N m}^{-1}$. Die Messungen wurden im NaCl-haltigen Puffer durchgeführt. n : Anzahl ausgewerteter Bildausschnitte.

Die topographische Aufnahme in Abb. 4.6 A zeigt eine POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit $0,05 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) im Durchfluss. Die Oberfläche der Membran ist weitestgehend eben, es sind nur vereinzelte kleine Defekte vorhanden, die im topographischen Bild als dunkle Bereiche zu erkennen sind. Die rasterkraftmikroskopische Aufnahme der POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) zeigt dagegen deutlich mehr Löcher in der Membran, die ebenfalls als dunkle Bereiche zu erkennen sind (Abb. 4.6 B). Wie bereits die Fluoreszenzaufnahmen gezeigt haben, führte eine weitere Erhöhung der Tat-Konzentration auf $0,5 \mu\text{M}$ zu einer deutlich stärkeren Beeinflussung der Membran. Dieses Ergebnis wird durch die topographische Aufnahme einer POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) bestätigt (Abb. 4.6 C). Die Oberfläche der Lipiddoppelschicht ist von Defekten geprägt, die durch Tat hervorgerufen wurden.

4 Ergebnisse

Die Löcher sind zudem deutlich größer als bei den niedrigeren Konzentrationen. Um die Höhenunterschiede zwischen Bereichen intakter Membran und Defekten zu bestimmen, wurde eine Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen durchgeführt. Es konnte ein Unterschied von $(1 \pm 0,03)$ nm ermittelt werden. Der geringe Unterschied von 1 nm bei einer Dicke der Lipiddoppelschicht von etwa 5 nm deutet darauf hin, dass sich das Protein innerhalb der gebildeten Defekte befindet. Insgesamt zeigen die fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen an POPC-Membranen nach Inkubation mit verschiedenen Tat-Konzentrationen, dass der vollständige Wildtyp wt Tat (1-86) mit steigender Konzentration zu einer Destabilisierung der festkörperunterstützten Membranen führt, was die Dissoziation von Lipiden von der Oberfläche zur Folge hat. Die Ergebnisse beweisen, dass Tat nicht auf der Membranoberfläche bindet, sondern in der Lage ist, in die Membranen einzudringen.

Mittels einer Pixelanalyse, die mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt wurde, konnten die prozentualen Anteile der Membran, die durch wt Tat (1-86) zerstört wurden, bestimmt werden (Abb. 4.7). Bei der Pixelanalyse wurde anhand der AFM-Aufnahmen analysiert, wie groß der Anteil an dunklen Bereichen auf der Membran ist. Es zeigt sich, dass bei den Tat-Konzentrationen im Bereich von $0,05 \mu\text{M}$ bis $0,1 \mu\text{M}$ die Membran nur geringfügig beeinträchtigt wird, nur 0,3% bzw. 2% der Membranoberfläche weisen Defekte auf. Bei Erhöhung der Proteinkonzentration auf $0,5 \mu\text{M}$ wird jedoch ein Anteil von 40% der Membran durch den vollständigen Wildtyp des Tat-Proteins destabilisiert.

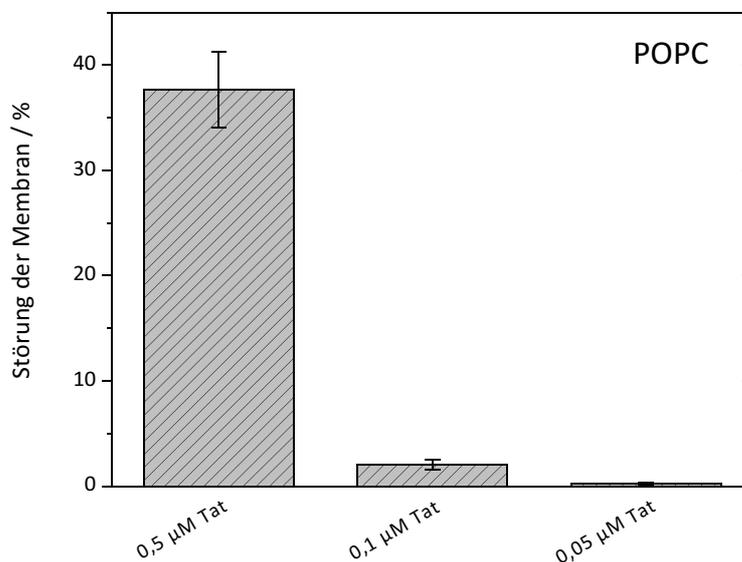


Abbildung 4.7: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen, die den Grad der Destabilisierung der festkörperunterstützten POPC-Membranen nach zweistündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an wt Tat (1-86) wiedergeben. Anzahl n an ausgewerteten Aufnahmen: $n = 17$ ($0,5 \mu\text{M}$), $n = 9$ ($0,1 \mu\text{M}$), $n = 12$ ($0,05 \mu\text{M}$).

Tat ARM-Ala

Um den Einfluss des Ladungsclusters im Tat-Protein auf seine Wechselwirkung mit Lipidmembranen zu untersuchen, wurden ebenfalls fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Messungen an POPC-Membranen mit Tat ARM-Ala mit verringertem Ladungscluster durchgeführt. Die festkörperunterstützten POPC-Membranen wurden erneut wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben präpariert und dann für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen Tat ARM-Ala im Bereich von $0,5 \mu\text{M}$ bis $1,5 \mu\text{M}$ im Durchfluss inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit Puffer gespült, um das Protein aus der Lösung zu entfernen und die POPC-Membranen fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopisch untersucht. Mit Tat ARM-Ala wurde in einem höheren Konzentrationsbereich gearbeitet, da bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ nur ein sehr geringer Einfluss beobachtbar war. Abb. 4.8 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von festkörperunterstützten POPC-Membranen nach zweistündiger Inkubation mit Tat ARM-Ala.

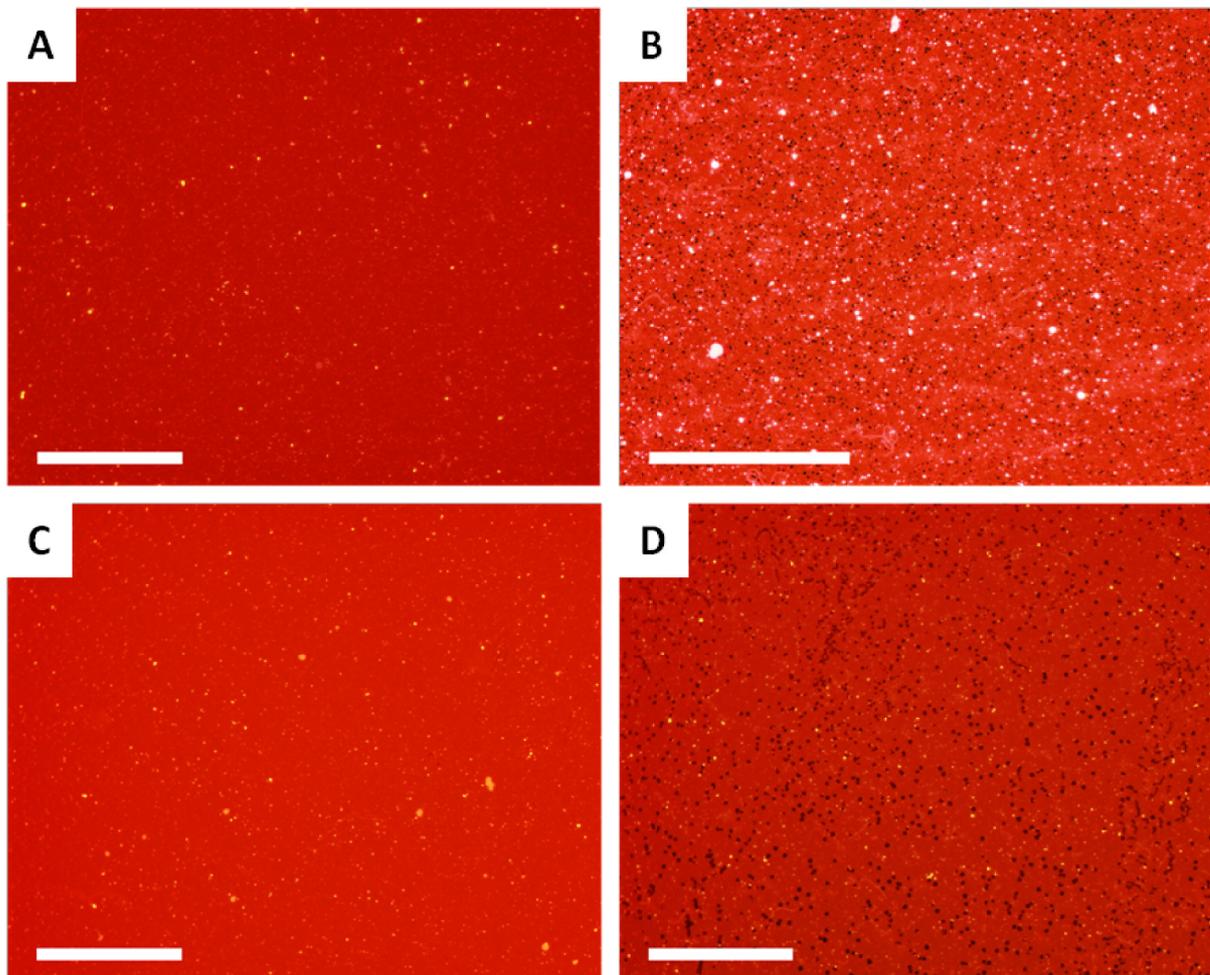


Abbildung 4.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten POPC-Membran (dotiert mit 0,1 mol% Texas Red DHPE) nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer mit (A) $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala, (B) $1,0 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala und (C) und (D) jeweils $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala. Maßstabsbalken: $50 \mu\text{m}$.

4 Ergebnisse

Nach der Inkubation der POPC-Membran mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala zeigt die Membran weiterhin eine homogene Fluoreszenz (Abb. 4.8 A). Vereinzelt ungespreitete Lipidvesikel befinden sich noch auf der Oberfläche, diese sind als helle Punkte zu erkennen. Im Vergleich mit der Blindprobe ist hier also kein Einfluss von Tat ARM-Ala auf die Membranmorphologie zu beobachten. Nach Inkubation von POPC-Membranen mit einer Konzentration von $1,0 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala konnten, wie in Abb. 4.8 B dargestellt, viele kleine nicht-fluoreszierende Bereiche auf der Membranoberfläche beobachtet werden, die auf Defekte in der Membran hindeuten. Auch hier sind erneut nicht-gespreitete Vesikel oder anderes Lipidmaterial auf der Oberfläche vorhanden. Nach der Inkubation der festkörperunterstützten POPC-Membranen mit $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse erhalten, wie die Abbildungen 4.8 C und 4.8 D zeigen. Einerseits wurden nach zwei-stündiger Inkubation mit $1,5 \mu\text{M}$ dieses Proteins homogen fluoreszierende Membranen erhalten, die keinerlei Defekte aufwiesen (Abb. 4.8 C). Andererseits führte die Inkubation mit $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala zu einer deutlichen Bildung nicht-fluoreszierender Bereiche auf der festkörperunterstützten POPC-Membran (Abb. 4.8 D), welche Defekte in der Membran vermuten lassen.

Um die Membranoberflächen weiter auf ihre Beschaffenheit nach der Inkubation mit der Tat-Mutante zu untersuchen, wurden mittels des Rasterkraftmikroskops topographische Aufnahmen der Membranen aufgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Membran, welche eine homogene Fluoreszenz gezeigt hatte, nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala Veränderungen aufwies. Dieses Ergebnis konnte durch das höhere Auflösungsvermögen des Rasterkraftmikroskops erreicht werden.

So befand sich, wie in Abb. 4.9 A und dem dazugehörigen Linienprofil in Abb. 4.9 B gezeigt, Material auf der Oberfläche, dessen Höhen im Bereich von 2-16 nm stark variierten. Defekte konnten auf diesen Membranen nicht beobachtet werden. Nach 2 h Inkubation mit $1,0 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der POPC-Membranen einige nicht-fluoreszierende Bereiche. Diese Bereiche konnten mittels Rasterkraftmikroskopie als Defekte in der Membran identifiziert werden (Abb. 4.9 C). Die Tiefe der gebildeten Defekte liegt im Bereich von 1-3 nm (Abb. 4.9 D). Bei einer Dicke der Membran von etwa 5 nm muss daher angenommen werden, dass sich Material, beispielsweise Protein, in den Löchern befindet.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der festkörperunterstützten POPC-Membranen nach zweistündiger Inkubation mit $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala hatte verschiedene Ergebnisse gezeigt. Zum einen wurden Membranen mit nicht-fluoreszierenden Bereichen erhalten, die auf Defekte schließen lassen, zum anderen wurden Membranen mit einer homogenen Fluoreszenz erhalten, auf die die Inkubation mit Tat ARM-Ala kaum einen Einfluss gehabt zu haben schien. Um die genaue Struktur der Membran nach Proteininkubation und der nicht-fluoreszierenden Bereiche auf der Membran zu charakterisieren, wurden rasterkraftmikroskopische Messungen durchgeführt. Aufgrund des höheren

Auflösungsvermögen des Rasterkraftmikroskops kann die Membranomorphologie besser analysiert werden. Es galt zu klären, ob die nicht-fluoreszierenden Bereiche auf der Membran durch eine Bindung des Proteins auf der Membran oder durch eine Destabilisierung der Membran hervorgerufen wurden.

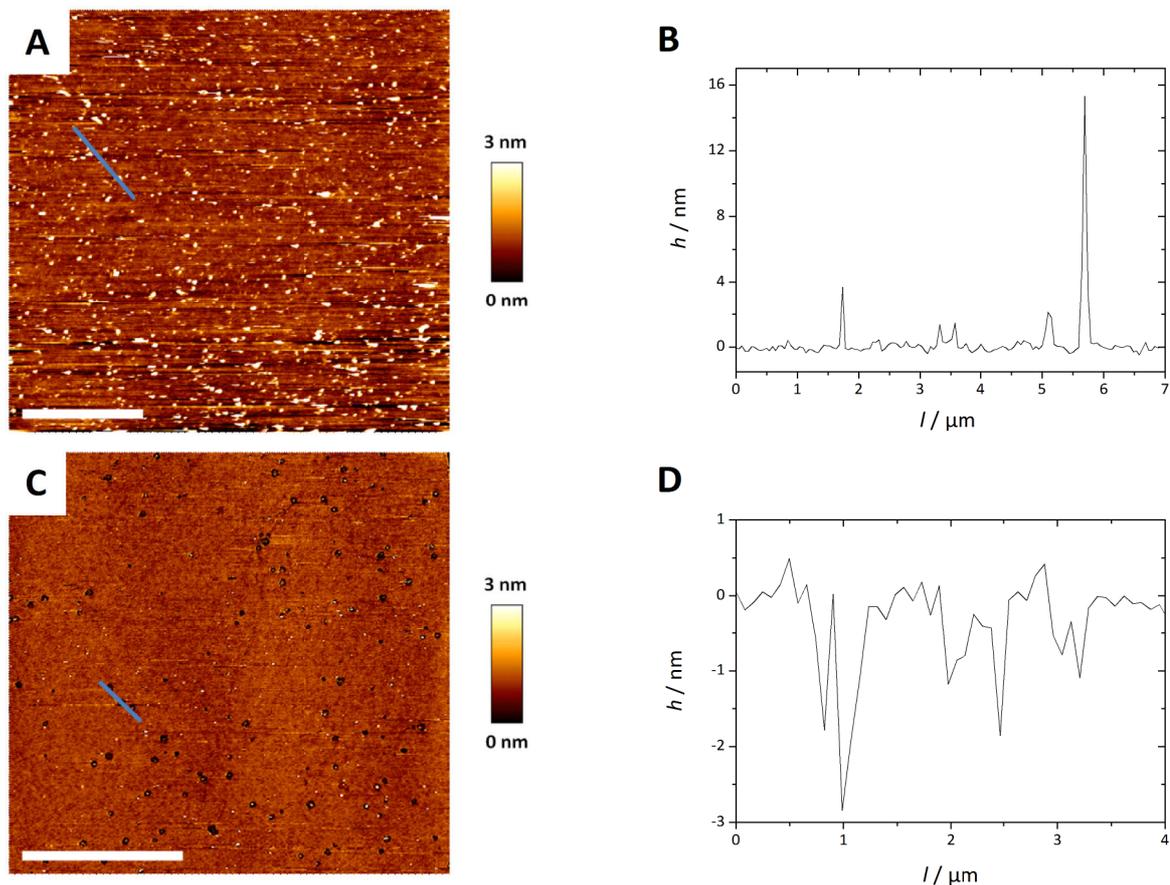


Abbildung 4.9: (A) AFM-Aufnahme einer POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala. Maßstabsbalken: $5 \mu\text{m}$. (B) Linienprofil entlang der blauen Linie in (A). h = Höhe, l = Distanz. (C) AFM-Aufnahme einer POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit $1,0 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala. Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$. (D) Linienprofil entlang der blauen Linie in C. h = Höhe, l = Distanz. Die Messungen wurden im *contact mode* aufgenommen. *Cantilever*: CSC 38, Federkonstante: $0,03 \text{ N m}^{-1}$, Resonanzfrequenz: 38 kHz . Die Messungen wurden in NaCl-haltigem Puffer durchgeführt.

Abb. 4.10 A zeigt eine POPC-Membran nach Inkubation mit $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala, auf der nicht-fluoreszierende Bereiche beobachtet werden konnten (vergleiche Abb. 4.8 D). Diese Bereiche konnten auch in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen als Defekte in der Lipidmembran identifiziert werden. Abb. 4.10 B zeigt das Ergebnis der Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen zur Untersuchung der Höhenunterschiede der hellen und dunklen Bereiche der Membranen. Es wurde ein Unterschied von $(2 \pm 0,7) \text{ nm}$ zwischen den defekten und intakten Bereichen der Membran ermittelt. Auch hier lässt die geringere Tiefe der Defekte als die gesamte Schichtdicke der

4 Ergebnisse

Lipiddoppelschicht von 5 nm die Schlussfolgerung zu, dass sich Material, beispielsweise Protein, in den Defekten der Membran befindet. Abb. 4.10 C zeigt eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer POPC-Membran, die eine homogene Fluoreszenz gezeigt hatte (vergleiche Abb. 4.8 C). Wie die topographische Aufnahme darstellt, befand sich Material auf der Membranoberfläche. Das Linienprofil (Abb. 4.10 D) entlang der blauen Linie aus Abb. 4.10 C zeigt, dass diese Materialablagerungen eine Höhe von bis zu 6 nm aufweisen und in ihrer Höhe stark variieren. Die Tat-Mutante Tat ARM-Ala mit verringertem Ladungscluster führte also zum Teil ebenfalls zu Defekten in den festkörperunterstützten POPC-Membranen, jedoch bleibt die Destabilisierung mit Dissoziation von Lipiden aus der Membran auch teilweise aus, und es können Materialablagerungen auf der Lipidmembran abgebildet werden.

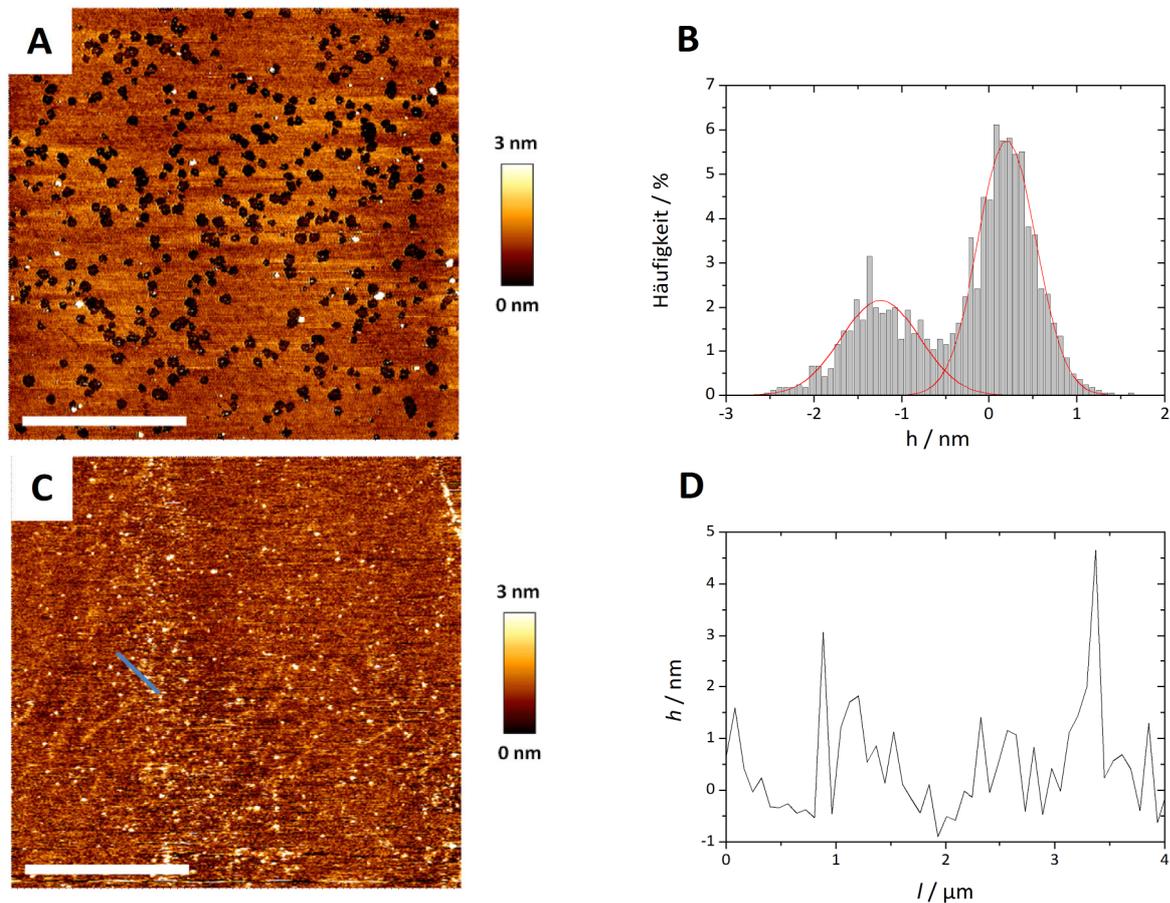


Abbildung 4.10: (A) AFM-Aufnahme einer POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 1,5 µM Tat ARM-Ala. Maßstabsbalken: 5 µm. (B) Die Höhenunterschiede zwischen den dunkleren und helleren Bereichen aus (A) konnten mittels einer Pixelanalyse auf $(2 \pm 0,7)$ nm bestimmt werden ($n = 4$). (C) AFM-Aufnahme einer POPC-Membran nach zweistündiger Inkubation mit ebenfalls 1,5 µM Tat ARM-Ala. Maßstabsbalken: 10 µm. (D) Linienprofil entlang der blauen Linie in (C). h = Höhe, l = Distanz. Die Messungen wurden im *intermittent contact mode* aufgenommen. *Cantilever*: MSCT, Federkonstante: $0,1 \text{ N m}^{-1}$, Resonanzfrequenz: 38 kHz. Die Messungen wurden in NaCl-haltigem Puffer durchgeführt. n : Anzahl ausgewerteter Bildausschnitte.

Abb. 4.11 und 4.12 fassen die Ergebnisse, die mit Tat ARM-Ala an festkörperunterstützten POPC-Membranen erhalten wurden, zusammen.

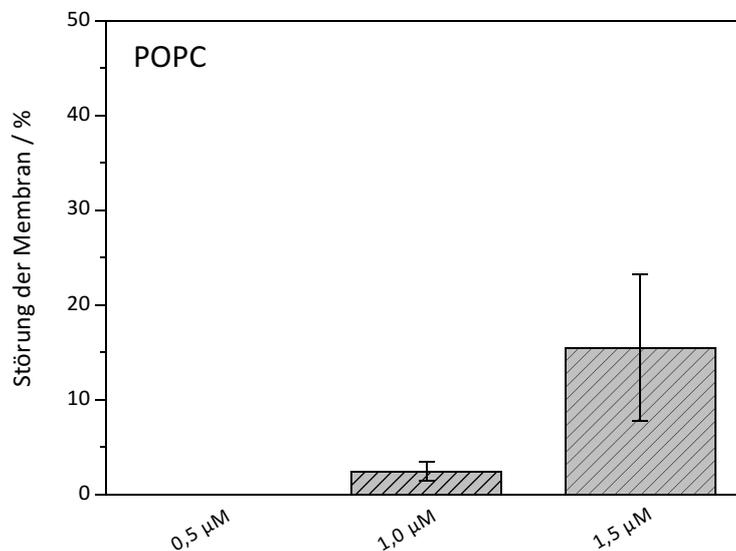


Abbildung 4.11: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen, die den Grad der Destabilisierung der festkörperunterstützten POPC-Membranen nach zweistündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Tat ARM-Ala wiedergeben. Anzahl n an ausgewerteten Aufnahmen: $n = 21$ (1,0 µM), $n = 21$ (1,5 µM).

Es konnte sowohl eine Zerstörung der Membranoberfläche, als auch eine Bedeckung der Oberfläche mit Material beobachtet werden. Anhand einer Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen mittels des Programms *ImageJ* konnten die prozentualen Anteile der Membran, die entweder destabilisiert oder

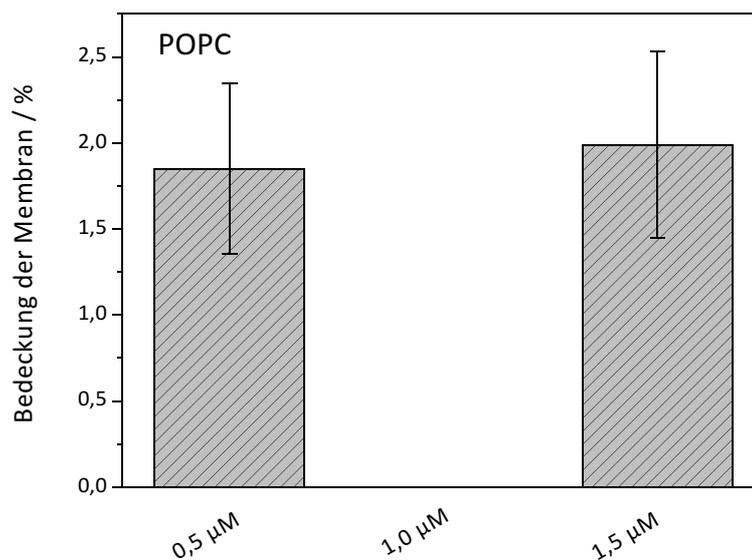


Abbildung 4.12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen, die den Grad der Bedeckung der festkörperunterstützten POPC-Membranen mit Materialablagerungen nach zweistündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Tat ARM-Ala wiedergeben. Anzahl n an ausgewerteten Aufnahmen: $n = 6$ (0,5 µM), $n = 7$ (1,5 µM).

bedeckt waren, ermittelt werden. Dies wurde über die Helligkeit der Graustufen der AFM-Aufnahmen analysiert. Die Daten zeigen, dass die Destabilisierung der Membran durch Tat ARM-Ala konzentrationsabhängig verläuft und mit steigender Tat-Konzentration stärker auftritt (Abb. 4.11). Die Störung der Membranen ist bei gleicher Konzentration allerdings nicht so stark ausgeprägt wie beim vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86). Bei einer Konzentration von 0,5 μM wurde keine Störung der POPC-Membranen beobachtet. Im Konzentrationsbereich von 1,0 μM bis 1,5 μM Tat ARM-Ala wurden bis zu 20% der Membranoberfläche so destabilisiert, dass Lipide aus der Membran herausgelöst waren. Die Materialablagerungen auf den Membranen, induziert durch die Inkubation mit Tat ARM-Ala scheinen dagegen nicht abhängig von der Konzentration zu sein (Abb. 4.12). Für alle verwendeten Konzentrationen im Bereich von 0,5 - 1,5 μM an Tat ARM-Ala wurde nur ein Anteil von 3% von POPC-Membranen detektiert, der mit Materialablagerungen bedeckt war. Bei den Materialablagerungen könnte es sich sowohl um das Protein selbst als auch um Lipidmaterial, welches aus der Membran herausgelöst wurde, handeln.

4.2.2 Fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Ergebnisse der Untersuchungen der Interaktion von Tat mit POPS-haltigen Membranen

Die Untersuchungen der Wechselwirkung der verschiedenen Tat-Proteine wt Tat (1-86) und der Tat-Mutante Tat ARM-Ala mit festkörperunterstützten Lipidmembranen sollten Aufschluss über den Einfluss der Proteine auf die Membranoberfläche geben. Hierfür wurden fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Messungen an festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten durchgeführt. Um den Einfluss von negativ geladenen Kopfgruppen in der Lipiddoppelschicht auf die Wechselwirkung des Proteins mit der Membran zu beleuchten, wurden Messungen mit POPS-haltigen festkörperunterstützten Membranen vorgenommen. Es sollte untersucht werden, ob die Tat-Proteine, welche einen positiven Ladungscluster besitzen, auf der Oberfläche der Membran binden können, wenn zusätzliche negative Ladung über das negativ geladene Lipid POPS in die Membran eingebracht ist. Zunächst wurde die Stabilität der Membranen unter Durchfluss mit Puffer überprüft. Dazu wurden die Membranen, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, auf einem Siliziumsubstrat präpariert und anschließend mit NaCl-haltigem Puffer im Durchflusssystem inkubiert. Sowohl die fluoreszenzmikroskopischen, als auch die topographischen Aufnahmen dieser Lipidmembranen zeigen, dass die Membranen auch nach zweistündiger Behandlung mit Puffer im Durchfluss intakt und defektfrei waren. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Abb. 4.13 A) zeigt eine homogene Fluoreszenz, nur sehr wenige ungespreitete Lipidvesikel sind als helle Punkte auf der Oberfläche der Membran zu erkennen. Das gleiche Ergebnis zeigt die topographische Aufnahme (Abb. 4.13 B). Es konnte eine glatte Oberfläche ohne Defekte oder Ablagerungen abgebildet werden.

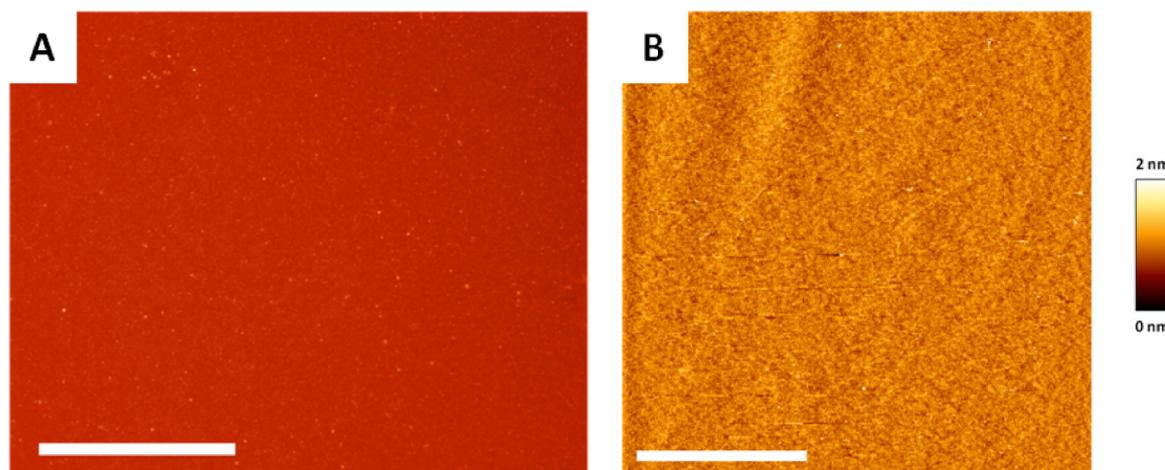


Abbildung 4.13: (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten POPC-POPS-(4:1)-Membran (dotiert mit 0,1 mol% Texas Red DHPE) nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: 50 μm . (B) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten POPC-POPS-(4:1)-Membran nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: 10 μm . Die rasterkraftmikroskopische Messung wurde im *contact mode* aufgenommen. *Cantilever*: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N m^{-1} .

wt Tat

Um den Einfluss von negativ geladenen Lipiden innerhalb der Membranen auf die Wechselwirkung mit dem vollständigen Tat-Protein wt Tat (1-86) untersuchen zu können, wurden POPS-haltige Membranen mit einem POPS-Anteil von 20 mol% auf Siliziumsubstraten präpariert und mit verschiedenen Konzentrationen von wt Tat (1-86) für 2 h im Durchfluss inkubiert. Anschließend wurden diese festkörperunterstützten POPS-haltigen Membranen fluoreszenzmikroskopisch und rasterkraftmikroskopisch analysiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse für POPS-haltige Membranen nach zweistündiger Inkubation mit 0,1 μM und 0,5 μM wt Tat (1-86) sind in Abb. 4.14 A und B dargestellt. Nach zweistündiger Inkubation mit nur 0,1 μM wt Tat (1-86) zeigten die POPS-haltigen Lipiddoppelschichten eine weitestgehend homogene Fluoreszenz mit nur vereinzelt nicht-fluoreszierenden Bereichen. Allerdings konnten noch viele Lipidvesikel als helle Punkte auf der Membranoberfläche beobachtet werden (Abb. 4.14 A). Nach Inkubation mit der erhöhten Konzentration von 0,5 μM wt Tat (1-86) zeigte sich ein anderes Bild (Abb. 4.14 B). Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der POPC-POPS-(4:1)-Membran nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM wt Tat (1-86) zeigt viele, auch größere nicht-fluoreszierende Bereiche. Weiterhin konnten auch Vesikel auf der Oberfläche detektiert werden. Die Behandlung mit 0,5 μM wt Tat (1-86) führt also auch im Fall von POPS-haltigen Membranen zu einer Vielzahl nicht-fluoreszierender Bereiche auf den festkörperunterstützten Lipidmembranen.

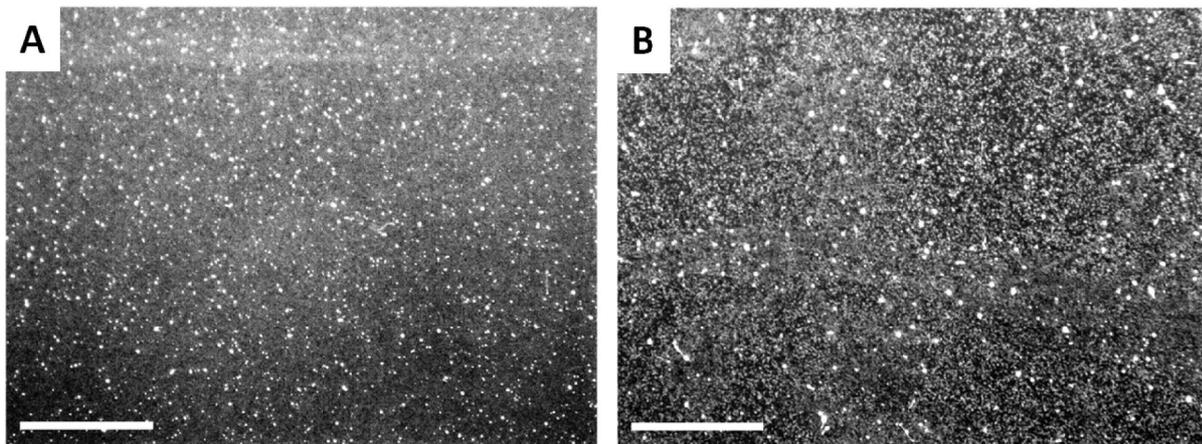


Abbildung 4.14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von festkörperunterstützten POPC-Membranen (dotiert mit 0,1 mol% Texas Red DHPE) nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer mit (A) 0,1 µM wt Tat (1-86) und (B) 0,5 µM wt Tat (1-86). Maßstabsbalken: 50 µm.

Um die Beschaffenheit der Oberfläche der Membranen nach Proteininkubation genauer zu untersuchen, wurden rasterkraftmikroskopische Messungen durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 4.15 A-F gezeigt. Wie schon die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gezeigt hatten, führte die zweistündige Inkubation mit nur 0,1 µM des vollständigen Wildtyps wt Tat (1-86) nur zu vereinzelt kleineren Defekten auf den festkörperunterstützten POPS-haltigen Lipidmembranen, wie auch die topographische Aufnahme aus Abb. 4.15 A zeigt. Außerdem konnten hier in geringem Maße Materialablagerungen auf der Oberfläche der Membran abgebildet werden. Auch nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 µM wt Tat (1-86) wurden die festkörperunterstützten POPS-haltigen Lipidmembranen rasterkraftmikroskopisch untersucht (Abb. 4.15 B-F). Es zeigte sich, dass der vollständige Wildtyp in einer Konzentration von 0,5 µM zu einer Destabilisierung der POPS-haltigen Membranen führte und Lipide aus der Membran herausgelöst wurden. Die defekten Bereiche waren über die gesamte Membranoberfläche verteilt und deutlich größer als die verursachten vereinzelt Löcher durch die geringere Konzentration von 0,1 µM wt Tat (1-86). Die Abbildungen 4.15 B, E und E zeigen topographische Aufnahmen dieser Membranen in unterschiedlicher Auflösung.

Im größeren Ausschnitt (Abb. 4.15 B) ist gut erkennbar, wie die Membran großflächig destabilisiert ist. Die Aufnahmen mit höherer Auflösung (Abb. 4.15 C und E) zeigen hingegen, dass sich in den Defekten, die durch die Inkubation mit Tat gebildet wurden, Materialablagerungen befanden, die als helle Bereiche in den Löchern (dunkle Bereiche) zu erkennen sind. Die Beschaffenheit der gebildeten Defekte in der Membran wird ebenfalls durch das Linienprofil (Abb. 4.15 F) deutlich. Es handelt sich nicht um ein durchgehendes Loch in der Membran, sondern um eine Störung der Membran, die dazu führt, dass Lipide von der Oberfläche dissoziieren. Die Höhenunterschiede zwischen intakter Membran und den Defekten konnte mittels einer Pixelanalyse anhand der Abb. 4.15 C auf $(1,3 \pm 0,15)$ nm bestimmt werden.

Da die Lipiddoppelschicht eine Schichtdicke von 5 nm besitzt, deutet dieses Ergebnis ebenfalls darauf hin, dass sich Material, Protein oder Lipide, in den Defekten befinden.

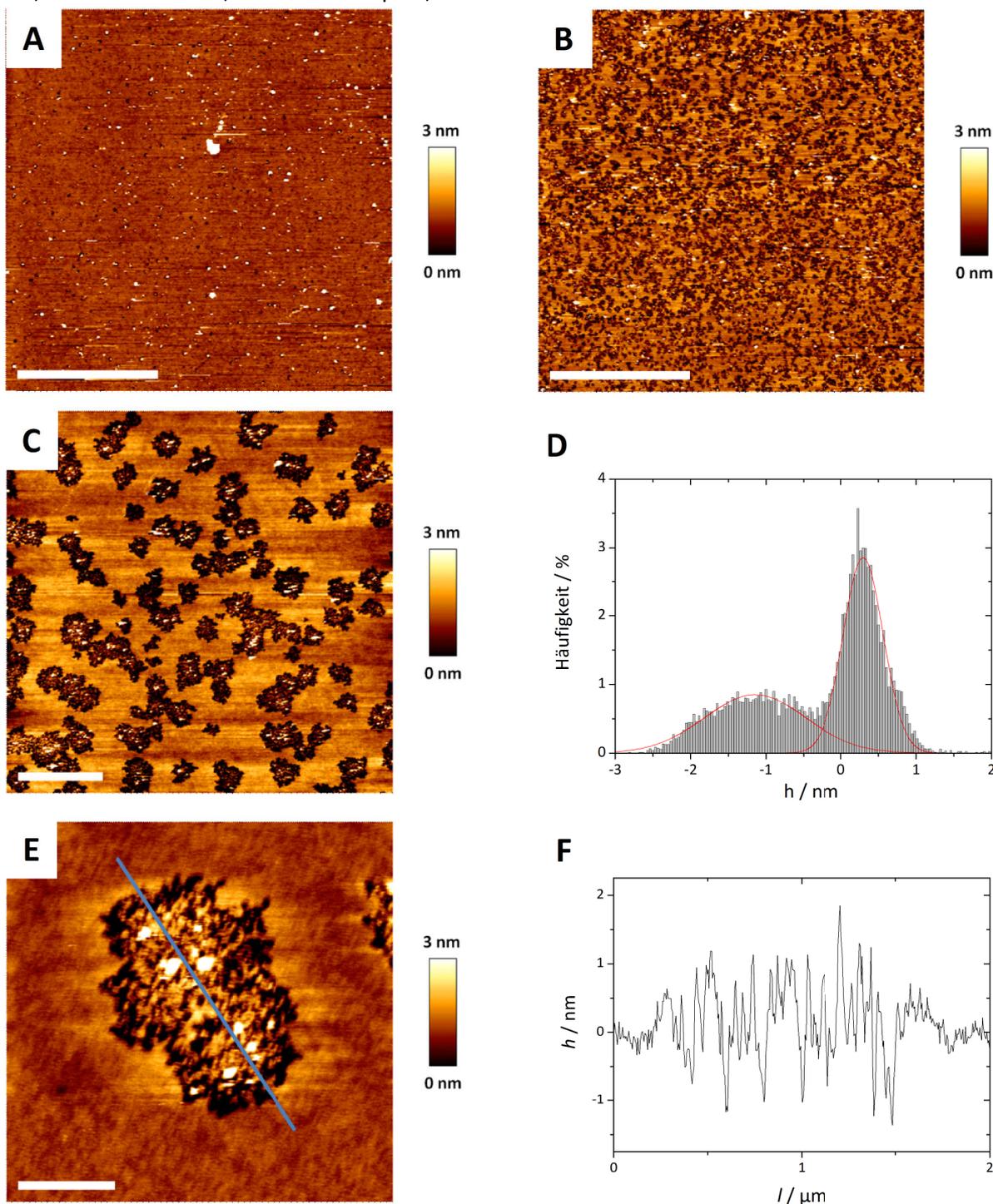


Abbildung 4.15: AFM-Aufnahmen von POPS-POPS-(4:1)-Membranen nach zweistündiger Inkubation mit (A) 0,1 μM wt Tat (1-86) (Maßstabsbalken: 10 μm) und (B), (C) und (E) 0,5 μM wt Tat (1-86) (Maßstabsbalken: 10 μm , 2 μm , 0,5 μm). (D) Die Höhenunterschiede zwischen den dunkleren und helleren Bereichen aus (C) konnten mittels einer Pixelanalyse auf $(1,3 \pm 0,15)$ nm bestimmt werden ($n = 4$). (F) Linienprofil entlang der blauen Linie in (E). h = Höhe, l = Distanz. Alle Messungen wurden im *contact mode* aufgenommen. *Cantilever*: CSC 38, Federkonstante: 0,03 N m^{-1} . Die Messungen wurden in NaCl-haltigem Puffer durchgeführt. n : Anzahl ausgewerteter Bildausschnitte.

4 Ergebnisse

Insgesamt führt die Wechselwirkung des vollständigen Wildtyps mit festkörperunterstützten POPS-haltigen Lipidmembranen zu einer Störung der Membran, deren Ausmaß von der Konzentration des Proteins abhängig ist. Des Weiteren konnten Materialablagerungen innerhalb der Löcher, die durch $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) hervorgerufen wurden, abgebildet werden. Die Ergebnisse beweisen, dass wt Tat (1-86) nicht auf der Oberfläche der negativ geladenen Membranen bindet.

In Abb. 4.16 sind die Ergebnisse für die Wechselwirkung von wt Tat (1-86) mit festkörperunterstützten POPS-haltigen Membranen zusammengefasst. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der Membran, die nach der Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen an Tat destabilisiert waren, also Defekte aufwiesen. Die Auswertung wurde anhand der topographischen Aufnahmen mittels einer Pixelanalyse mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt, hierbei wurde über die Helligkeit der Graustufen ermittelt, wie groß der Anteil an dunklen Bereichen auf den Membranen war. Die

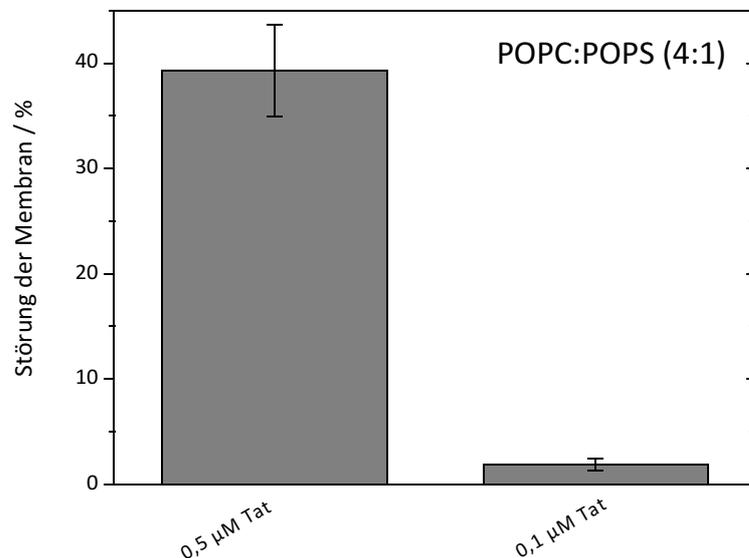


Abbildung 4.16: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen, die den Grad der Destabilisierung der festkörperunterstützten POPS-haltigen Membranen nach zweistündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an wt Tat (1-86) wiedergeben. Anzahl n an ausgewerteten Aufnahmen: $n = 5$ ($0,5 \mu\text{M}$), $n = 3$ ($0,1 \mu\text{M}$).

Ergebnisse der Pixelanalyse zeigen, dass nach der Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) nur ein minimaler Teil von 2% der POPS-haltigen Membranen gestört war. Bei der Inkubation mit fünffacher Tat-Konzentration kam es allerdings zu einer deutlichen Störung der POPS-haltigen Lipidmembranen. Es wurde ein Anteil von knapp 40% gefunden, der Bereiche der Membran darstellt, aus denen Lipidmaterial herausgelöst war.

Tat ARM-Ala

Es sollte ebenfalls der Einfluss der Tat-Mutante Tat ARM-Ala mit verringertem Ladungscluster auf festkörperunterstützte Membranen, die Lipide mit negativ geladener Kopfgruppe enthalten, untersucht werden. Dazu wurden POPC-POPS-(4:1)-Membranen auf Siliziumsubstraten präpariert und anschließend für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,5 μM bis 1,5 μM Tat ARM-Ala im Durchfluss inkubiert. Die so behandelten Membranen wurden dann mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse sind in Abb. 4.17 dargestellt. Abb. 4.17 A zeigt eine POPS-haltige Lipidmembran nach Inkubation mit 0,5 μM Tat ARM-Ala. Zu erkennen ist eine homogene Fluoreszenz, nicht-fluoreszierende Bereiche sind nicht detektierbar. Ähnliche Ergebnisse lieferten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der POPS-haltigen Membranen nach Inkubation mit 1,0 μM (Abb. 4.17 B) und 1,5 μM Tat ARM-Ala (Abb. 4.17 C). In beiden Fällen konnte eine homogene Fluoreszenz beobachtet werden, nicht-

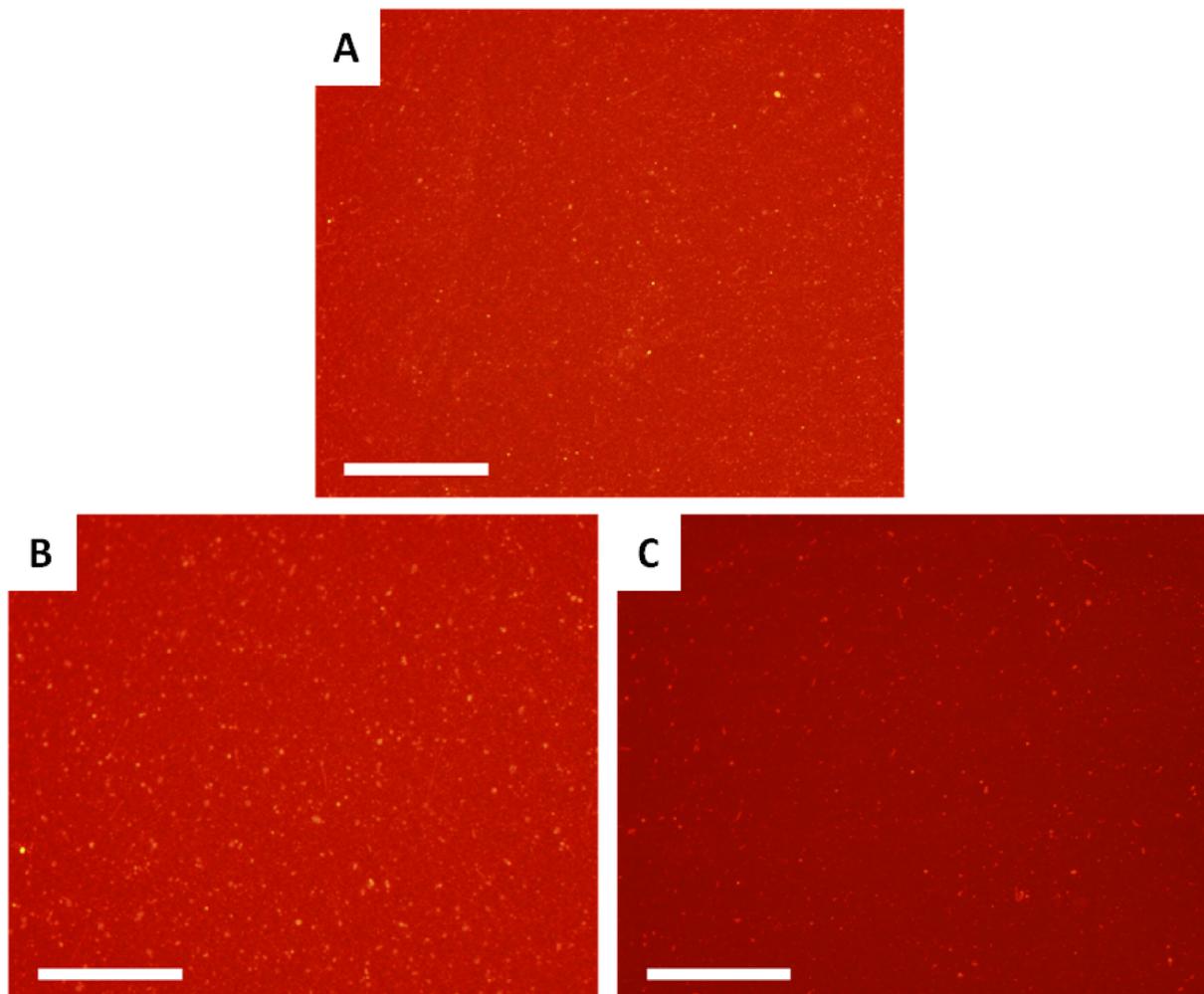


Abbildung 4.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von festkörperunterstützten POPC-POPS-(4:1)-Membranen (dotiert mit 0,1 mol% Texas Red DHPE) nach zweistündiger Inkubation in NaCl-haltigem Puffer mit (A) 0,5 μM Tat ARM-Ala mit (B) 1,0 μM Tat ARM-Ala und (C) 1,5 μM Tat ARM-Ala. Maßstabsbalken: 50 μm .

fluoreszierende Bereiche waren nicht erkennbar. Nur wenige Lipidvesikel waren auf der Oberfläche als helle Punkte zu erkennen.

Um die Membranen nach der Inkubation mit Tat ARM-Ala genauer zu untersuchen, wurden topographische Aufnahmen der POPS-haltigen festkörperunterstützten Membranen nach zweistündiger Inkubation aufgenommen, die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 4.18 und 4.19 dargestellt. Nach Inkubation der POPS-haltigen Membranen mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala konnten wie in Abb. 4.18 A zu sehen Materialablagerungen auf der Membranoberfläche abgebildet werden (helle Bereiche), Defekte wurden hingegen nicht beobachtet. Die Materialablagerungen auf der Oberfläche variierten stark in ihren Höhen, diese lagen im Bereich von 3-12 nm.

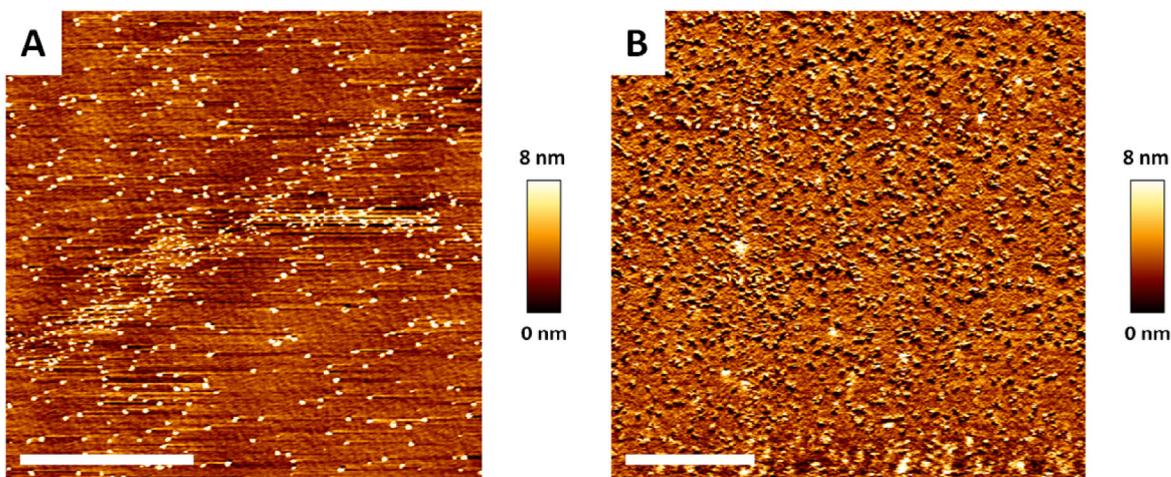


Abbildung 4.18: AFM-Aufnahmen von POPC-POPS-(4:1)-Membranen nach zweistündiger Inkubation mit (A) $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala und (B) $1,0 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala. Maßstabsbalken: $5 \mu\text{m}$. Die Messungen wurden im *contact mode* aufgenommen. *Cantilever*: CSC 38, Federkonstante: $0,03 \text{ N m}^{-1}$, Resonanzfrequenz: 38 kHz. Die Messungen wurden in NaCl-haltigem Puffer durchgeführt.

Nach zweistündiger Inkubation der Membranen mit $1,0 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala wurden topographische Aufnahmen erhalten, die sowohl Defekte als auch Ablagerungen auf der Membran zeigten (Abb. 4.18 C). Die Materialablagerungen waren außerdem stärker ausgeprägt als bei der niedrigeren Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$. Die Defekte in der Membran waren bis zu etwa 7 nm tief, die Ablagerungen waren bis zu etwa 6 nm hoch, es ist deutlich zu erkennen, dass einem Loch direkt eine Erhöhung folgte, es könnte sich daher auch um Artefakte handeln.

Die zweistündige Inkubation mit $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Abb. 4.19 A-C). Einerseits wurden nach zweistündiger Inkubation mit $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala POPS-haltige Membranen erhalten, die keine Defekte aufwiesen, auf denen aber Materialablagerungen abgebildet werden konnten (Abb. 4.19 A). Die Ablagerungen waren bis zu 8 nm hoch und über die gesamte Membranoberfläche verteilt.

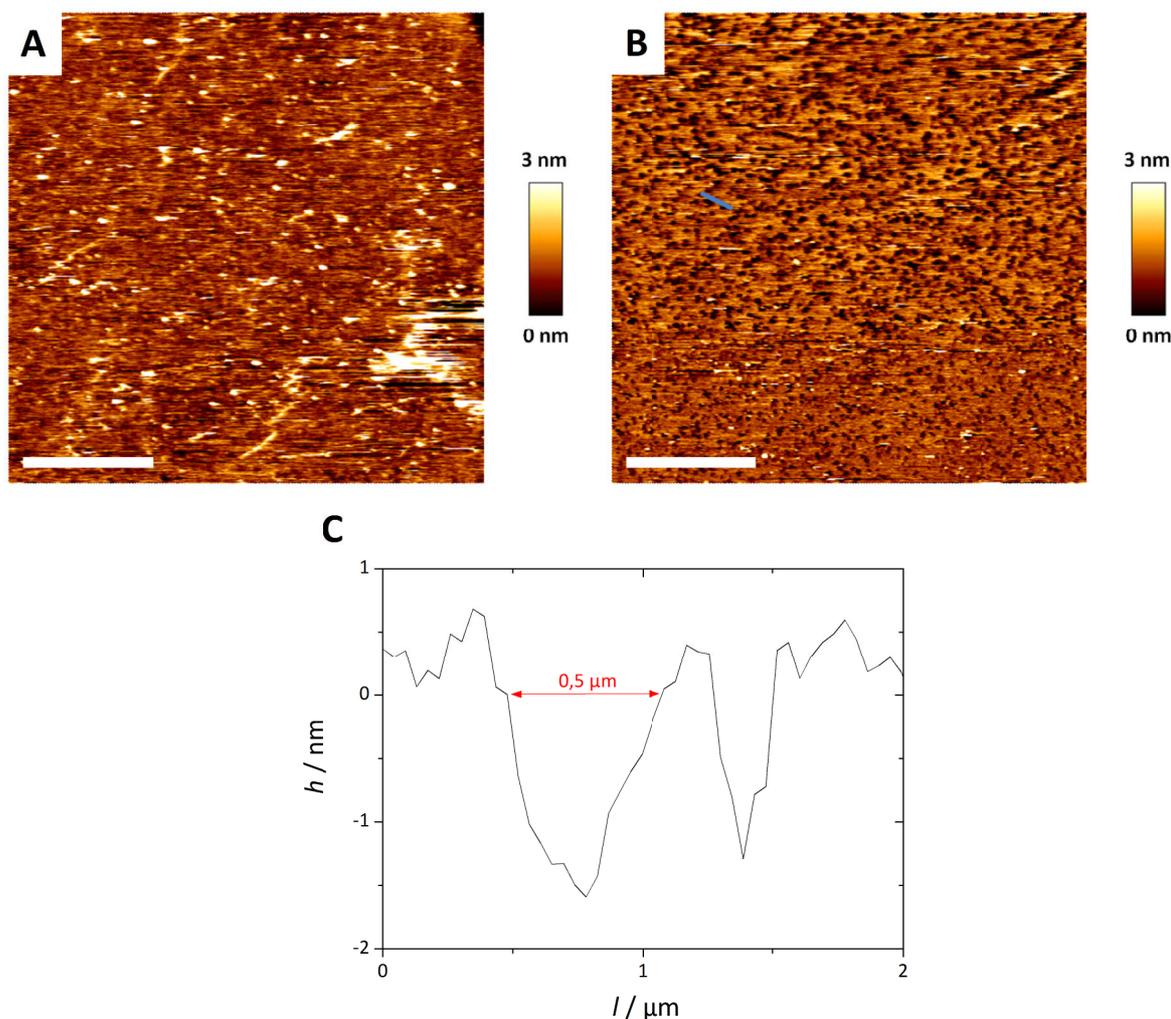


Abbildung 4.19: (A) + (B) AFM-Aufnahmen von POPC-POPS-(4:1)-Membranen nach zweistündiger Inkubation mit $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala. Maßstabsbalken: $5 \mu\text{m}$. (C) Linienprofil entlang der blauen Linie in (B). h = Höhe, l = Distanz. Die Messungen wurden im *intermittent contact mode* aufgenommen. *Cantilever*: MSCT, Federkonstante: $0,1 \text{ N m}^{-1}$, Resonanzfrequenz: 38 kHz . Die Messungen wurden in NaCl-haltigem Puffer durchgeführt.

Andererseits führte die Behandlung der POPS-haltigen Membranen mit $1,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala zu einer Vielzahl von Defekten in der Membran, wie in Abb. 4.19 B an den dunklen Bereichen zu erkennen ist. Die Löcher waren homogen über die Membran verteilt. Abb. 4.19 C zeigt das entsprechende Linienprofil entlang der blauen Linie aus Abb. 4.19 B. Es ist zu erkennen, dass die Defekte einen Durchmesser von bis zu $0,5 \mu\text{m}$ besitzen und etwa $1\text{-}2 \text{ nm}$ tief sind. Auch weist die geringe Tiefe der Defekte im Vergleich zur Gesamtschichtdicke der Lipidmembran (5 nm) darauf hin, dass sich Material in den Defekten befindet.

Insgesamt führten die Inkubationen der POPS-haltigen festkörperunterstützten Membranen mit verschiedenen Konzentrationen an Tat ARM-Ala sowohl zu einer Destabilisierung der Membran als auch zu Materialablagerungen auf der Oberfläche. Abb. 4.20 und 4.21 fassen die Ergebnisse, die mit

Tat ARM-Ala auf POPS-haltigen festkörperunterstützten Membranen erhalten wurden, zusammen. Mittels einer Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen wurde über die Helligkeit der Graustufen der Anteil an dunklen, also defekten Bereichen der Membran ermittelt.

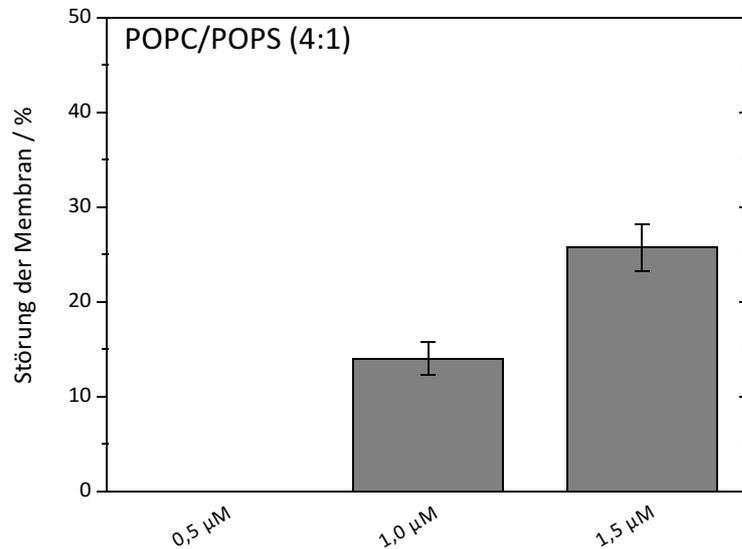


Abbildung 4.20: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen, die den Grad der Destabilisierung der festkörperunterstützten POPS-haltigen Membranen nach zweistündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Tat ARM-Ala wiedergeben. Anzahl n an ausgewerteten Aufnahmen: $n = 7$ (1,0 µM), $n = 6$ (1,5 µM).

Die Stärke der Defektbildung ist abhängig von der eingesetzten Tat-Konzentration, je höher die Konzentration ist, desto mehr Defekte treten auf. Allerdings ist der Effekt deutlich vermindert im

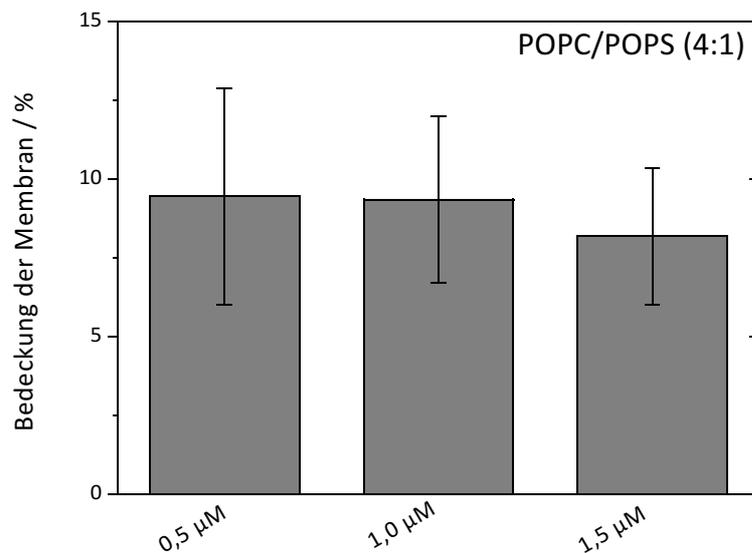


Abbildung 4.21: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Pixelanalyse der AFM-Aufnahmen, die den Grad der Bedeckung der festkörperunterstützten POPS-haltigen Membranen mit Materialablagerungen nach zweistündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Tat ARM-Ala wiedergeben. Anzahl n an ausgewerteten Aufnahmen: $n = 13$ (0,5 µM), $n = 19$ (1,0 µM), $n = 15$ (1,5 µM).

Vergleich zum vollständigen Wildtyp. Durch die Inkubation mit 0,5 μM Tat ARM-Ala wurde keine Störung der POPS-haltigen Membranen hervorgerufen. Eine Störung trat erst ab einer Konzentration von 1,0 μM auf, hier wurde ein Membrananteil von etwa 15% gefunden, der Defekte aufwies. Nach Inkubation der POPS-haltigen festkörperunterstützten Membranen mit 1,5 μM Tat ARM-Ala wurde ein Anteil von 25% der Membran ermittelt, der destabilisiert war und Defekte zeigte.

Ebenfalls mittels einer Pixelanalyse konnte der Anteil der Membran bestimmt werden, der mit Materialablagerungen bedeckt war. Auch hierfür wurde über die Helligkeit der Graustufen analysiert, wie viele helle Bereiche es auf der Membran gab. Die Materialablagerungen sind nicht abhängig von der eingesetzten Tat-Konzentration, alle eingesetzten Konzentrationen an Tat ARM-Ala im Bereich von 0,5 - 1,5 μM führten zu einer bedeckten Membranoberfläche von knapp 10%.

4.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur Porenbildung und Translokation von Tat

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob Tat in der Lage ist, Poren in Lipidmembranen auszubilden oder Membranen zu überqueren. Um hierbei verschiedene Strukturelemente des Proteins mit einzubeziehen, wurde sowohl mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) als auch mit unterschiedlichen Tat-Varianten gearbeitet. Es kam ein verkürzter Wildtyp (wt Tat (35-86)), dem 34 Aminosäuren im N-terminalen Bereich fehlen, und eine Tat-Mutante (Tat ARM-Ala), die im Vergleich zum Wildtyp einen reduzierten Ladungscluster besitzt, zum Einsatz. Die Untersuchungen von Tat auf festkörperunterstützten Membranen zeigten, dass keine Bindung von Tat an Membranen stattfindet. Allerdings hat dieses Membransystem den Nachteil, dass kein zweites wässriges Kompartiment auf der anderen Seite der Membran vorhanden ist. Um die Wechselwirkung von Tat mit freien Lipiddoppelschichten, die von zwei wässrigen Kompartimenten umgeben sind, untersuchen zu können, wurden Lipidvesikel als Membransystem gewählt. Mithilfe von Lipidvesikeln wurde untersucht, ob Tat Poren in Lipiddoppelschichten ausbilden kann. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob es zu einer Translokation des Proteins über die Membran kommt. GUVs sind hierbei ein etabliertes Membransystem für konfokalmikroskopische Untersuchungen.^{23-25,101-103}

Einige Arbeiten zum Tat-Peptid, welches der basischen Region des vollständigen Tat-Proteins entspricht, an GUVs haben bereits gezeigt, dass das Peptid in der Lage ist, Lipidmembranen zu überqueren und dabei Poren in derselben ausbildet.^{23,25} Ähnliche Untersuchungen wurden in dieser Arbeit mit dem vollständigen Tat-Protein durchgeführt, um zu überprüfen, ob auch das vollständige Protein Membranen überqueren kann. In seiner natürlichen Umgebung, also infizierten Zellen, kommt das Tat-Protein im Zellkern vor, die Zellkernmembran enthält hauptsächlich Lecithin, also Phosphocholine, aber auch Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol.¹⁰⁴ Der Einfluss dieser Lipide auf die Wechselwirkung von Tat mit den Membranen wurde in dieser Arbeit mithilfe von Lipidmodellmembranen untersucht. Dazu wurde nicht nur das zwitterionische Lipid POPC verwendet, sondern auch das negativ geladene Lipid POPS sowie das kegelförmige Lipid DOPE eingesetzt und das Lipid DOPI. Es wurde des Weiteren Cholesterin verwendet, um auch den Einfluss dieses Lipids näher zu beleuchten, welches in der Plasmamembran vorkommt. Wäre Tat in der Lage, Membranen zu überqueren und in noch nicht infizierte Zellen einzudringen, würde es auch Membranen überqueren müssen, die Cholesterin enthalten. Um nicht nur den Einfluss von Tat auf die Membranen zu untersuchen, sondern darüber hinaus auch das Protein selbst lokalisieren zu können, wurde mit fluoreszenzmarkiertem Tat-Protein Tat-AF633 gearbeitet.

4.3.1 Ergebnisse der Untersuchungen zur Porenbildung von Tat an giant unilamellar vesicles (GUVs)

Zunächst wurde untersucht, ob wt Tat (1-86), wt Tat (35-86) und Tat ARM-Ala Poren in Lipidmembranen erzeugen können, durch die wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe die Lipidmembran passieren können. Hierzu wurde ein Messaufbau gewählt, in dem GUVs in einen Pyranin-haltigen Puffer gegeben und mit den verschiedenen Tat-Varianten inkubiert wurden. Anschließend wurde analysiert, ob und wie viel des wasserlöslichen Farbstoffs Pyranin innerhalb der GUVs detektiert werden konnte. In einem weiteren Assay wurde untersucht, ob Tat selbst, hierbei handelte es sich ausschließlich um den vollständigen Wildtyp des Tat-Proteins, in der Lage ist, die Lipidmembranen der GUVs zu überqueren. Hierzu wurde fluoreszenzmarkiertes Tat verwendet.

Zunächst wurde der Durchmesser der GUVs mittels des Programms *ImageJ* anhand von

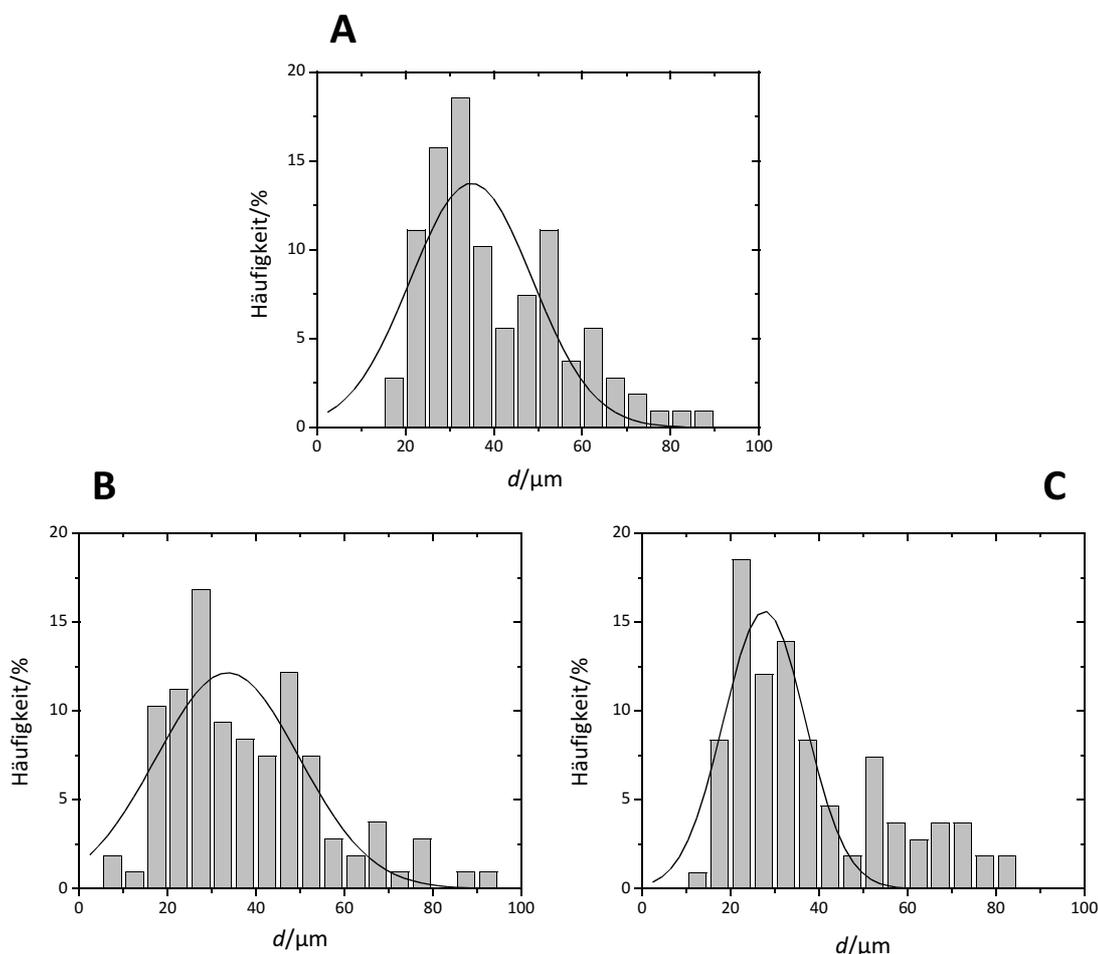


Abbildung 4.22: Größenverteilung der GUVs. (A) POPC-GUVs mit einem mittleren Durchmesser von $d = (35 \pm 14) \mu\text{m}$. $n = 108$. (B) DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs mit einem mittleren Durchmesser von $d = (34 \pm 16) \mu\text{m}$. $n = 107$. (C) POPC-POPS-(4:1)-GUVs mit einem mittleren Durchmesser von $d = (28 \pm 9) \mu\text{m}$. $n = 104$. Die Werte der Durchmesser wurden mittels des Programms *ImageJ* bestimmt, die mittleren Durchmesser wurden mittels einer Gauß-Funktion ermittelt. n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

4 Ergebnisse

konfokalmikroskopischen Aufnahmen ermittelt, um sicherzustellen, dass die Größenverteilung homogen ist. Die Verteilungen der Werte für POPC-GUVs sowie für POPS- und DOPE-haltige GUVs sind in Abb. 4.22 A-C gezeigt. Für GUVs aller drei Lipidzusammensetzungen wurden hauptsächlich Durchmesser im Bereich von 20-40 μm gefunden, für POPC-GUVs betrug der Durchmesser $d = (35 \pm 14) \mu\text{m}$, für DOPE-haltige GUVs $d = (34 \pm 16) \mu\text{m}$ und für POPS-haltige GUVs $d = (28 \pm 9) \mu\text{m}$.

Abb. 4.23 zeigt die Verteilungen für die Durchmesser der GUVs der Zusammensetzungen DOPC:DOPE:DOPS (6:3:1), sowie DOPC:DOPI (4:1) und POPC:Cholesterin (4:1). Für GUVs der Lipidzusammensetzung DOPC:DOPE:DOPS im molaren Verhältnis von 6:3:1 wurde ein durchschnittlicher Durchmesser von $d = (23 \pm 11) \mu\text{m}$ ermittelt (Abb. 4.23 A). DOPI-haltige GUVs, welche einen molaren Anteil von 20% DOPI enthielten, hatten einen mittleren Durchmesser von $d = (19 \pm 9) \mu\text{m}$ (Abb. 4.23 B). Ähnliche Werte wurden für POPC-Cholesterin-(4:1)-GUVs erhalten, diese hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von $d = (16 \pm 8) \mu\text{m}$ (Abb. 4.23 C).

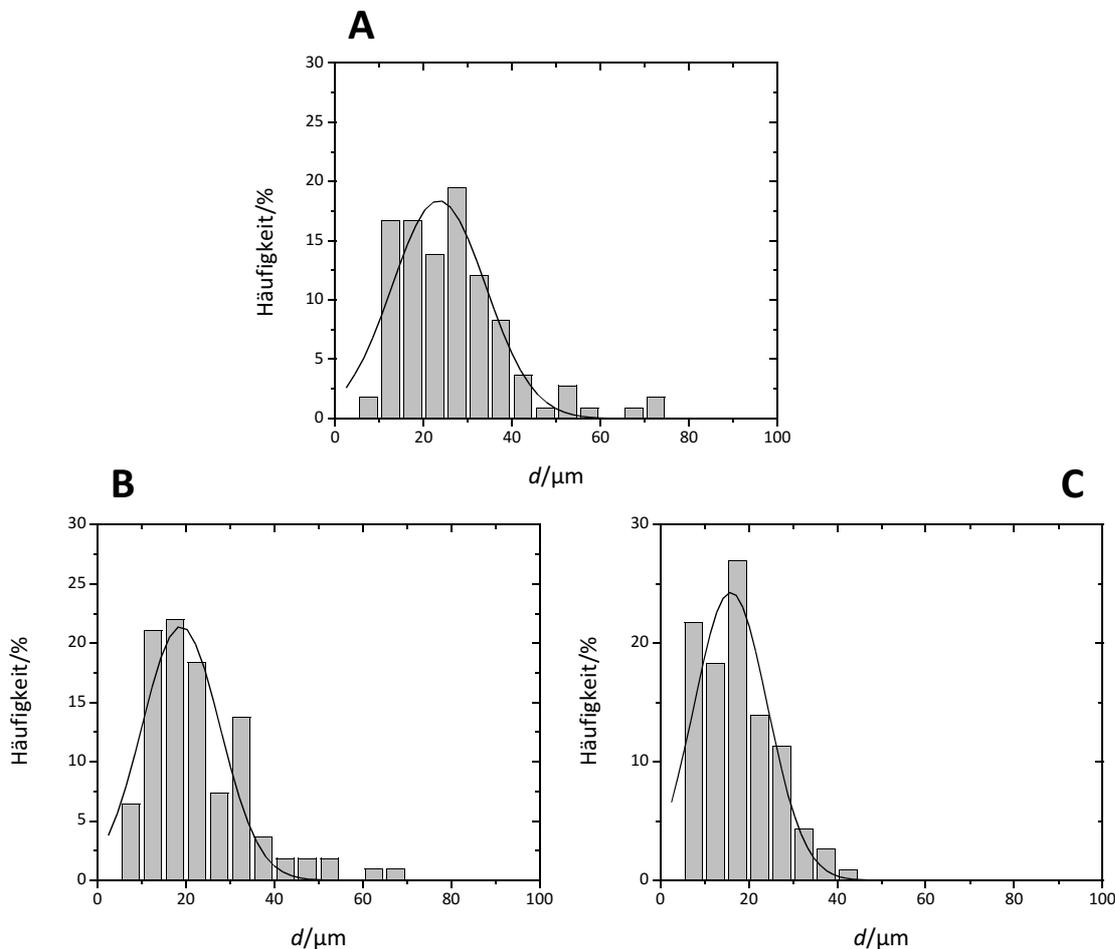


Abbildung 4.23: Größenverteilung der GUVs. Angegeben ist der Durchmesser d in μm und die auftretende Häufigkeit in %. (A) DOPC-DOPE-DOPS-(6:3:1)-GUVs mit einem mittleren Durchmesser von $d = (23 \pm 11) \mu\text{m}$. $n = 108$. (B) DOPC-DOPI-(4:1)-GUVs mit einem mittleren Durchmesser von $d = (19 \pm 9) \mu\text{m}$. $n = 109$. (C) POPC-Cholesterin-(4:1)-GUVs mit einem mittleren Durchmesser von $d = (16 \pm 8) \mu\text{m}$. $n = 115$. Die Werte der Durchmesser wurden mittels des Programms *ImageJ* bestimmt, die mittleren Durchmesser wurden mittels einer Gauss-Funktion ermittelt. n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Untersuchungen mit dem Tat-Peptid haben gezeigt, dass dieses Peptid, welches aus 10-14 Aminosäuren besteht und insgesamt acht positive Ladungen besitzt, in der Lage ist, Poren in Lipiddoppelschichten auszubilden.^{23,25} In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob das vollständige Tat-Protein wt Tat (1-86), sowie der verkürzte Wildtyp wt Tat (35-86) und die Tat-Mutante Tat ARM-Ala mit reduziertem Ladungscluster ähnliche Eigenschaften besitzen. Dazu wurden GUVs verschiedener Lipidzusammensetzungen auf einem Siliziumsubstrat fixiert und mit den verschiedenen Tat-Varianten in Gegenwart eines wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs inkubiert. Die GUVs waren mit 300 mM Sucrose-Lösung gefüllt, damit sie auf das Substrat absinken konnten. Die umgebende Lösung war entweder NaCl-haltiger Puffer oder 300 mM Glukose-Lösung, die jeweils den wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff enthielten. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde analysiert, wie viel des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs in die GUVs eingedrungen war.

Nach zweistündiger Inkubation der GUVs mit den Tat-Proteinen in Pyranin-haltigem Puffer wurden Fluoreszenzaufnahmen von der gesamten Probe aufgenommen, um eine statistische Auswertung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der GUVs durchführen zu können. Zum Auslesen dieser

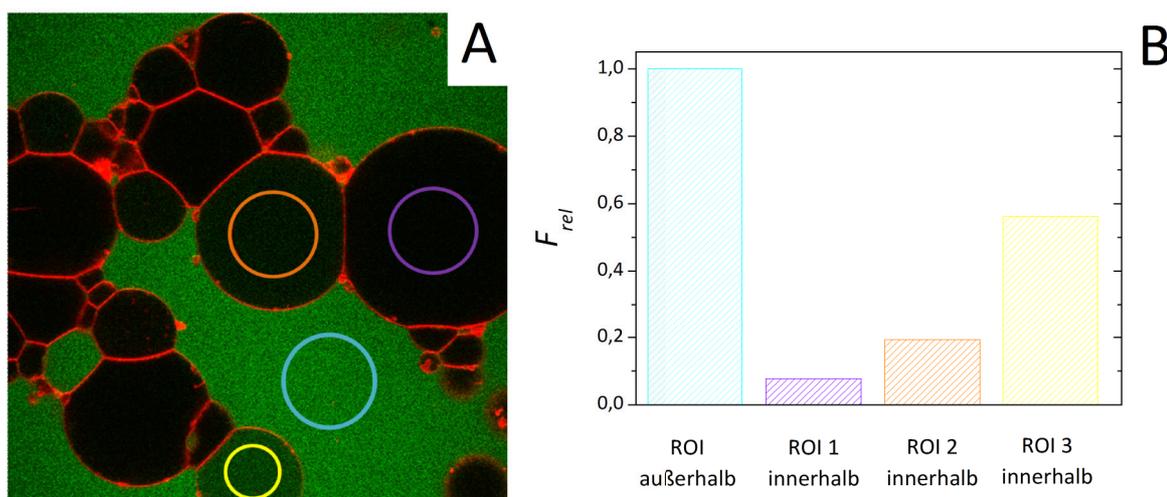


Abbildung 4.24: (A) POPC-GUVs nach 2 h Inkubation mit wt Tat (1-86). Die Kreise repräsentieren die ROIs. Die ROIs wurden mit der Software ZEN in das Bild eingefügt. (B) Normierte Fluoreszenzintensitäten aus den ROIs aus Abb. 4.24 A.

Fluoreszenzintensitäten wurden *regions of interest* (ROIs) in und außerhalb der GUVs gesetzt. Dies ist in Abb. 4.24 A für POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit wt Tat (1-86) exemplarisch gezeigt. Die Fluoreszenzintensität innerhalb des GUVs wurde auf die außerhalb des GUVs, also im umgebenden Pyranin-haltigen Puffer, normiert, so dass relative Fluoreszenzintensitäten erhalten wurden (Abb. 4.24 B). Mithilfe dieser Auswertung wurden Verteilungen der relativen Fluoreszenzintensitäten innerhalb der GUVs erhalten wie sie in Abb. 4.25 A und B für POPC-GUVs nach Inkubation mit wt Tat (1-86) und wt Tat (35-86) gezeigt sind.

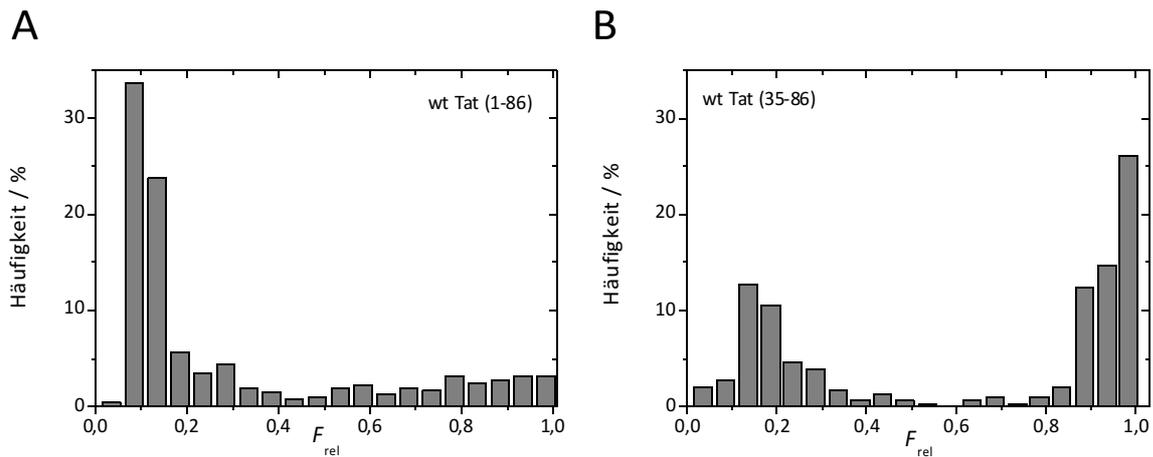


Abbildung 4.25: Häufigkeitsverteilung der Werte für die relative Fluoreszenzintensität (F_{rel}) innerhalb der POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit (A) 0,5 μ M wt Tat (1-86) und (B) 0,5 μ M wt Tat (35-86) in NaCl-haltigem Puffer.

Aus Abb. 4.25 wird deutlich, dass sich die Fluoreszenzintensitäten im Inneren der GUVs nach zweistündiger Inkubation mit den unterschiedlichen Tat-Proteinen hauptsächlich in zwei Bereichen wiederfinden lassen. Nicht gefüllte GUVs besitzen eine relative Fluoreszenzintensität im Bereich von 0,05 bis 0,3. Die Intensität von mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllten GUVs liegt im Bereich von 0,8 bis 1. Anhand dieser Verteilungen wurde ein Schwellenwert von $F_{rel} > 0,5$ festgesetzt, ab dem ein GUV als mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllt angesehen wurde.

Fehlerabschätzung für F_{rel}

Anhand von fünf unabhängigen Messungen mit dem fluoreszenzmarkierten Tat-Protein Tat-AF633 an POPC-GUVs wurde der Fehler für den prozentualen Anteil an gefüllten GUVs nach Proteininkubation abgeschätzt. Für jede einzelne der fünf Messungen wurde ermittelt, wie viele GUVs mit Tat-AF633 gefüllt waren, d. h. wie viele GUVs in ihrem Inneren eine relative Fluoreszenzintensität größer als 0,5 normiert auf die Umgebung besaßen. Der Fehler ΔF_{rel} wurde aus der Standardabweichung für den Anteil an gefüllten GUVs ($F_{rel} > 0,5$) dieser fünf Messungen zu 20% bestimmt. Dieser Fehler wurde für alle anderen Messungen angenommen, so dass sich bei einem Anteil von 50% gefüllten GUVs ein Fehler von 10% ergeben würde: $F_{rel} > 0,5 = (50 \pm 10)\%$.

Untersuchung der Porenbildung an POPC-GUVs

Die Messungen zur Untersuchung von porenbildenden Eigenschaften von Tat wurden zunächst mit reinen POPC-GUVs durchgeführt, dabei wurden die GUVs sowohl in NaCl-haltigem Puffer als auch in salzfreier Glukose-Lösung mit den verschiedenen Tat-Varianten inkubiert, um den Einfluss von Ionen auf die Protein-Membran-Wechselwirkung zu untersuchen. Zuerst wurde die Stabilität der GUVs in Puffer sowie in Glukose-Lösung über 2 h überprüft. Des Weiteren wurde das porenbildende Peptid Melittin, ein amphiphiles, 26 Aminosäuren umfassendes Peptid aus dem Bienengift, genutzt, um Porenbildung in den GUVs hervorzurufen und so das System zu evaluieren. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 4.26 dargestellt.

Abb. 4.26 A zeigt eine konfokalmikroskopische Aufnahme von Texas Red DHPE-dotierten POPC-GUVs in Pyranin-haltigem Puffer zum Zeitpunkt $t = 0$ h. Es ist gut zu erkennen, dass die GUVs nicht mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin gefüllt sind. Auch nach 2 h in Pyranin-haltigem Puffer sind nur vereinzelte GUVs mit Pyranin gefüllt (Abb. 4.26 B), was den Schluss zulässt, dass die Membranen der GUVs über die Zeit von 2 h intakt sind und nicht durchlässig für Fluoreszenzfarbstoffe werden. Allerdings führt die Inkubation in Pyranin-haltigem Puffer dazu, dass sich die GUVs aneinander lagern und sich dadurch etwas verformen. Nach zweistündiger Inkubation von Texas Red DHPE-dotierten POPC-GUVs in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung dagegen kann keine Aggregation der GUVs beobachtet werden. Auch in diesem Fall tritt kein Pyranin innerhalb der 2 h in die GUVs ein, was beweist, dass die GUVs auch in Glukose-Lösung über 2 h stabil bleiben und nicht durchlässig werden (Abb. 4.26 C). Die Inkubation Texas Red DHPE-dotierter POPC-GUVs in Pyranin-haltigem Puffer mit $0,5 \mu\text{M}$ Melittin führt, wie in Abb. 4.26 D zu sehen, zu einem deutlichen Eintritt des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs Pyranin in die GUVs. Der Anteil der POPC-GUVs, die nach 2 h Inkubation mit Melittin mit Pyranin gefüllt waren wurde auf $F_{\text{rel}} > 0,5 = (81 \pm 16)\%$ bestimmt. Das bedeutet, dass Melittin in den Membranen von mehr als 80% der GUVs Poren induziert hat, durch die Pyranin in die GUVs eindringen konnte. Mithilfe dieser Messung konnte gezeigt werden, dass sich dieser Messaufbau eignet, um Porenbildung in Membranen von GUVs durch Proteine zu untersuchen.

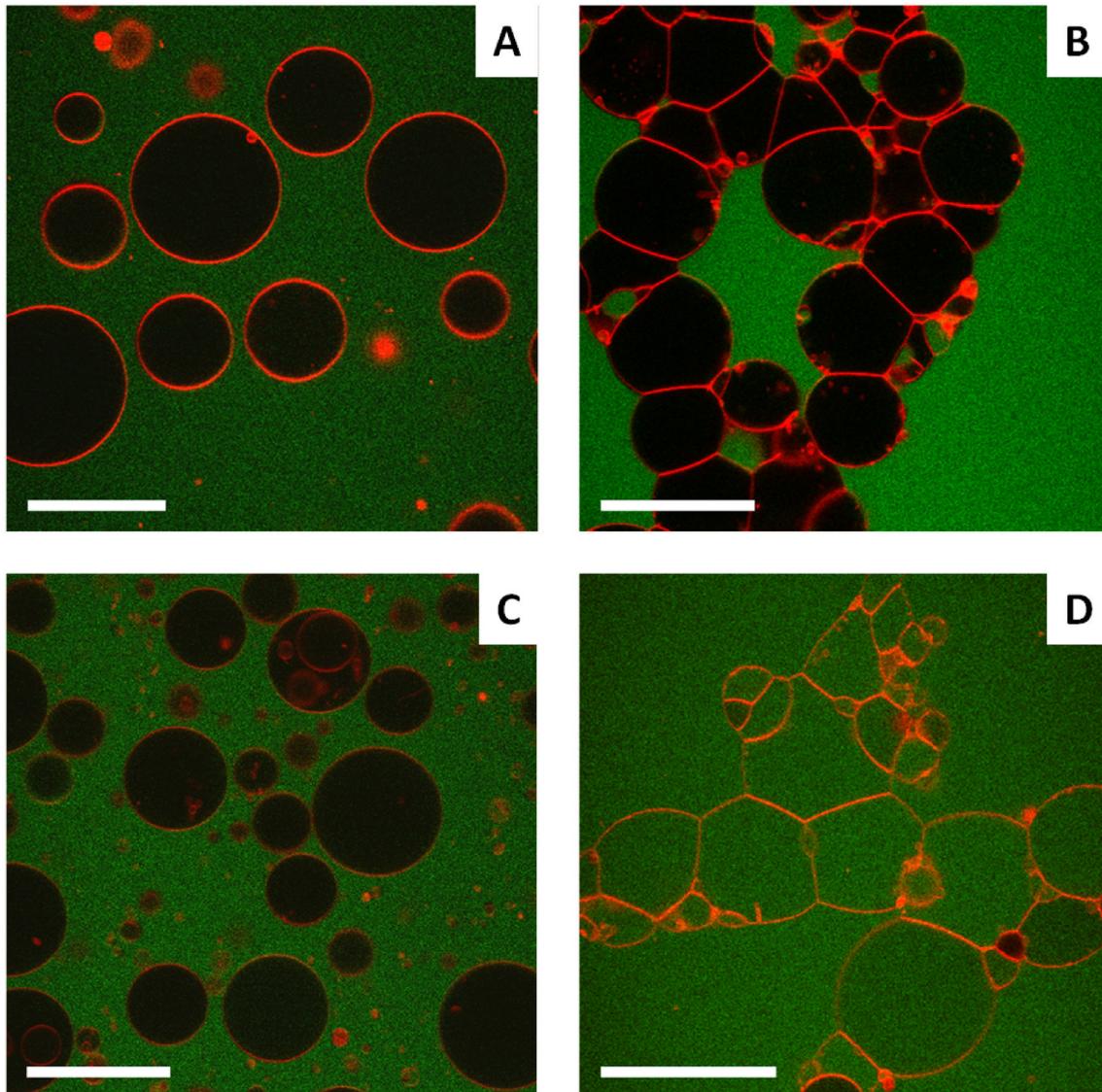


Abbildung 4.26: Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Mit 0,1 mol% Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs in Pyranin-haltigem Puffer zum Zeitpunkt $t = 0$ s (A) und $t = 2$ h (B). (C) Mit 0,1 mol % Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung. (D) Mit 0,1 mol% Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Melittin in Pyranin-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: $50 \mu\text{m}$.

Nachdem die Stabilität der GUVs überprüft und das Messsystem evaluiert worden war, konnte mit den Untersuchungen der verschiedenen Tat-Varianten begonnen werden. Dazu wurden Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs in Pyranin-haltigem Puffer bzw. in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung mit $0,5 \mu\text{M}$ der verschiedenen Tat-Proteine für 2 h inkubiert und anschließend der Anteil der GUVs bestimmt, die mit Pyranin gefüllt waren. Abb. 4.27 A und B zeigen die Ergebnisse, die mit wt Tat (1-86) erhalten wurden. Abb. 4.27 A zeigt Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) in Pyranin-haltigem Puffer. Es ist zu beobachten, dass der Großteil der GUVs weiterhin innen keine Fluoreszenz zeigt, also kein Pyranin in die GUVs

eingedrungen ist. Außerdem zeigt die konfokalmikroskopische Aufnahme, dass die GUVs aggregieren und sich dadurch verformen. Abb. 4.27 B zeigt dagegen Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung. Es tritt ebenfalls kaum Pyranin in die GUVs ein, es findet aber auch keine Aggregation der GUVs in Gegenwart von Tat statt. Der vollständige Wildtyp des Tat-Proteins führt bei POPC-GUVs sowohl in NaCl-haltigem Puffer als auch in salzfreier Glukose-Lösung zu einem sehr geringen Eintritt von Pyranin in die GUVs. Es wurden also in beiden Fällen nur wenige GUVs gefunden, die nach der zweistündigen Inkubation mit wt Tat (1-86) mit Pyranin gefüllt waren. Das bedeutet, dass die Membranen in Gegenwart des vollständigen Wildtyps nur in sehr geringem Maße durchlässig für Pyranin geworden sind.

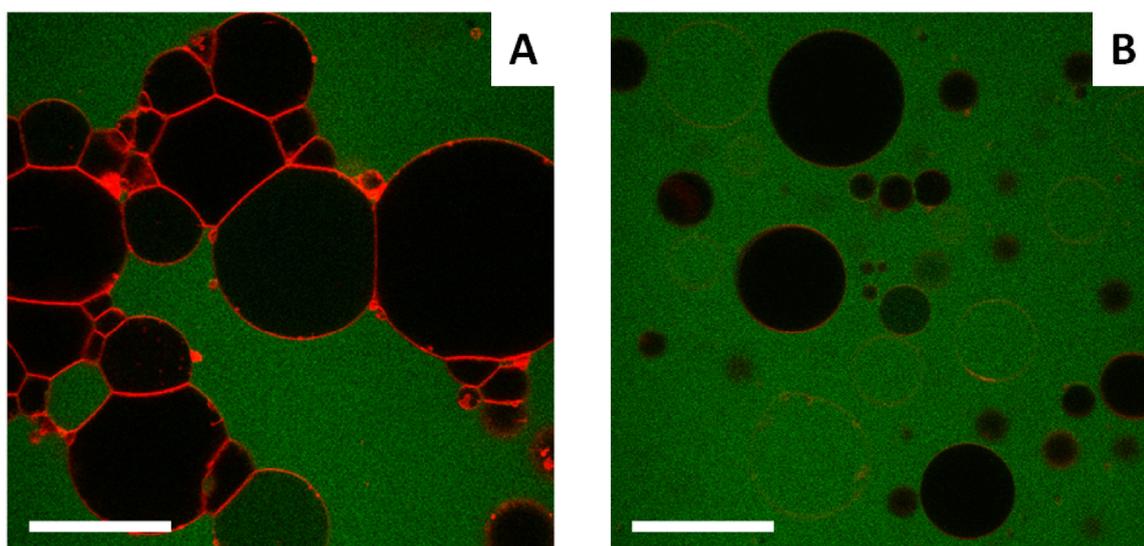


Abbildung 4.27: Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Mit $0,1 \text{ mol\%}$ Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) in (A) Pyranin-haltigem Puffer und (B) in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung. Maßstabsbalken: $50 \mu\text{m}$.

Es wurden weiterhin Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs in Pyranin-haltigem Puffer für 2 h mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (35-86) inkubiert und anschließend ermittelt, wie groß der Anteil an mit Pyranin gefüllten GUVs ist (Abb. 4.28 A). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Inkubation mit dem verkürzten Wildtyp in Puffer zu einem Anteil von 60% an GUVs führt, die nach 2 h mit Pyranin gefüllt sind. Zudem konnte beobachtet werden, dass sich die GUVs zusammenlagern und sich dadurch verformen. Nach 2 h Inkubation in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (35-86) wurde dagegen nur ein geringer Anteil an GUVs erhalten, der mit Pyranin gefüllt war. Eine Aggregation der GUVs konnte nur in sehr geringem Umfang detektiert werden, so dass nur einzelne GUVs aneinander gelagert waren. Eine Deformation der GUVs war im Vergleich zur den Messungen in NaCl-haltigem Puffer kaum festzustellen (Abb. 4.28 B).

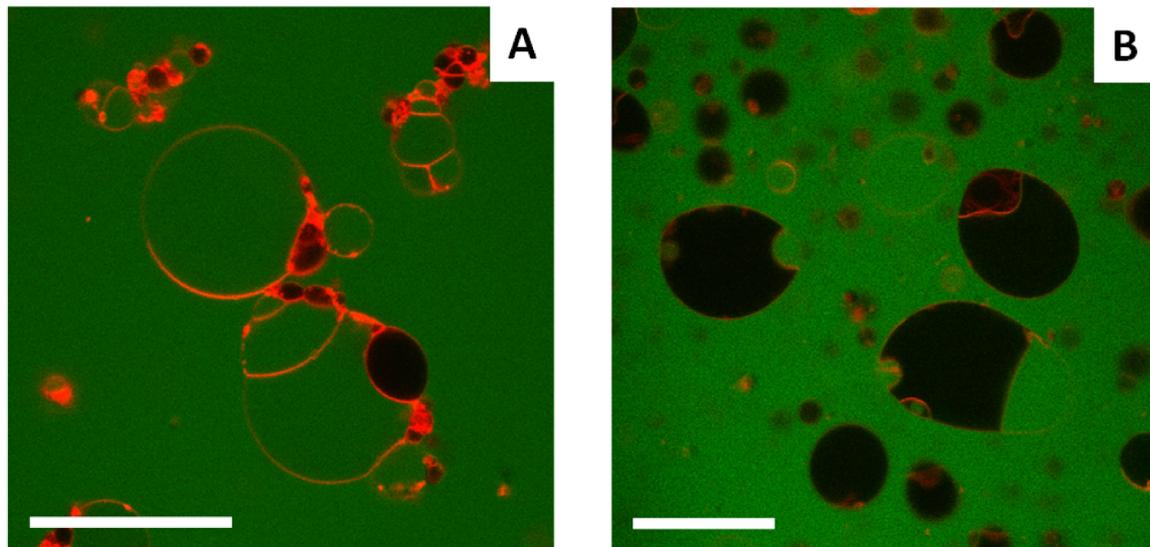


Abbildung 4.28: Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Mit 0,1 mol% Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM wt Tat (35-86) in (A) Pyranin-haltigem Puffer und in (B) Pyranin-haltiger Glukose-Lösung. Maßstabsbalken: 50 μm .

Die Messungen mit dem verkürzten Wildtyp an POPC-GUVs zeigten, dass es in Gegenwart von NaCl zu einem Eintritt von Pyranin in die GUVs innerhalb von 2 h kommt, so dass der Großteil der GUVs nach der Inkubation mit Pyranin gefüllt ist. In salzfreier Glukose-Lösung dagegen findet das Eindringen von Pyranin in die GUVs, durch wt Tat (35-86) induziert, nur in geringem Umfang statt, so dass nur sehr wenige GUVs nach der zweistündigen Inkubation mit Pyranin gefüllt waren. Um des Weiteren den Einfluss des positiven Ladungsclusters in der basischen Region von Tat auf die Porenbildung in POPC-GUVs zu untersuchen, wurden Messungen mit der Tat-Mutante Tat ARM-Ala mit reduziertem Ladungscluster durchgeführt. Im Vergleich zum Wildtyp besitzt Tat ARM-Ala nur fünf statt acht positive Ladungen in der basischen Region. Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs wurden sowohl in Pyranin-haltigem Puffer als auch in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung mit 0,5 μM Tat ARM-Ala für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten innerhalb der GUVs ausgelesen und der Anteil an GUVs bestimmt, der mit Pyranin gefüllt war. Die Ergebnisse, die mit Tat ARM-Ala an POPC-GUVs erhalten wurden, sind in Abb. 4.29 A und B dargestellt. Nach zweistündiger Inkubation von Texas Red DHPE-dotierten POPC-GUVs mit 0,5 μM Tat ARM-Ala in Pyranin-haltigem Puffer wurde ein Anteil von 40% an GUVs gefunden, die mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin gefüllt waren (Abb. 4.29 A), was zeigt, dass die GUV-Membranen in Gegenwart von Tat ARM-Ala zum Teil durchlässig für Pyranin wurden. Der Anteil an mit Pyranin gefüllten GUVs sank, wenn die Inkubation mit 0,5 μM der Tat-Mutante in salzfreier Pyranin-haltiger Glukose-Lösung durchgeführt wurde, hier wurden nur sehr wenige GUVs gefunden, die Pyranin enthielten (Abb. 4.29 B). Eine Aggregation der GUVs konnte nur beobachtet werden, wenn NaCl zugegen war, allerdings war die Aggregation nicht stark ausgeprägt. Nur einzelne GUVs waren aneinander gelagert, diese waren kaum deformiert.

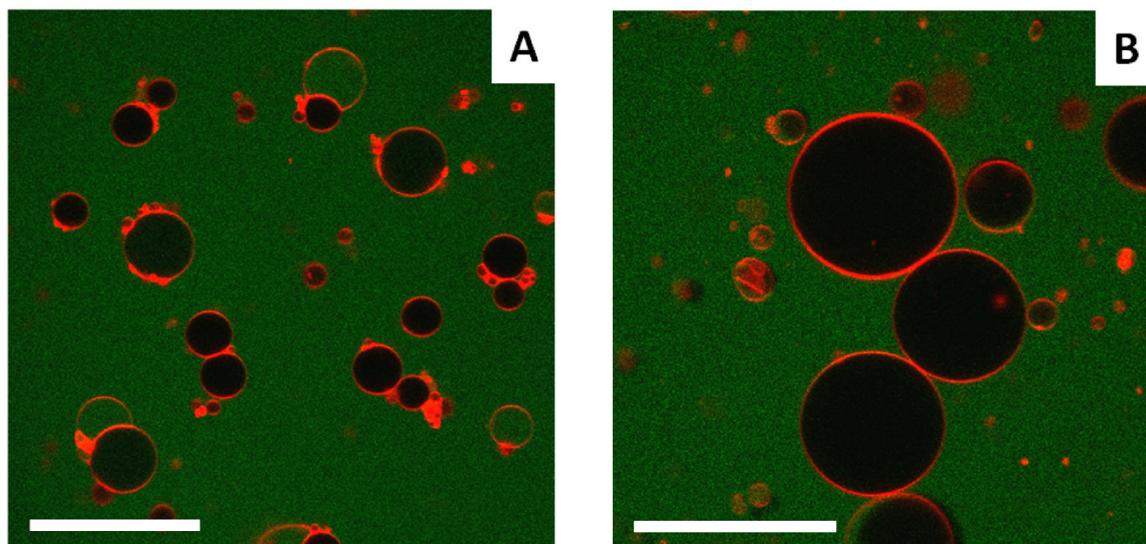


Abbildung 4.29: Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Mit 0,1 mol% Texas Red DHPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μ M Tat ARM-Ala in (A) Pyranin-haltigem Puffer und (B) in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Abb. 4.30 und 4.31 fassen die Ergebnisse der Untersuchung der porenbildenden Eigenschaften der Tat-Proteine in POPC-Membranen zusammen. Abb. 4.30 zeigt die prozentualen Anteile der POPC-GUVs, die nach einer Inkubationszeit von 2 h mit Pyranin gefüllt waren ($F_{\text{rel}} > 0,5$ / %). Die Anteile an gefüllten GUVs, hervorgerufen durch die Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86),

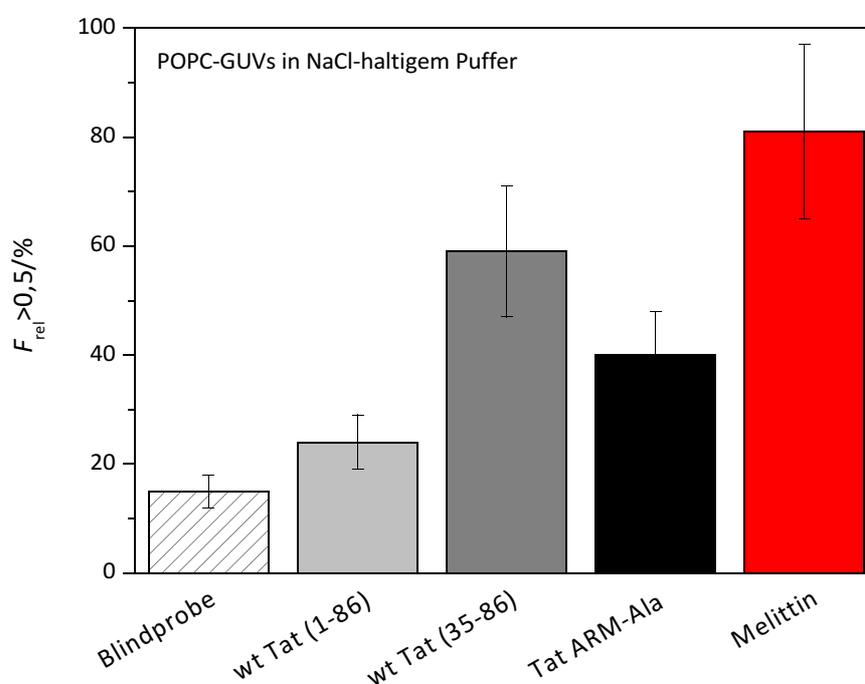


Abbildung 4.30: Prozentualer Anteil von POPC-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in NaCl-haltigem Puffer. Vergleich der Blindprobe ($n = 286$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 812$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 284$), Tat ARM-Ala ($n = 422$) und Melittin ($n = 266$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

dem verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86) sowie der Tat-Mutante mit verringertem Ladungscluster, wurden verglichen mit dem Anteil an mit Pyranin gefüllten GUVs der Blindprobe, bei der die GUVs für 2 h in Pyranin-haltigem Puffer ohne Protein inkubiert wurden. Bei der Blindprobe waren nach 2 h (15 ± 3)% der GUVs mit Pyranin gefüllt, nach zweistündiger Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp waren (24 ± 5)% der POPC-GUVs mit Pyranin gefüllt, der Unterschied zur Blindprobe ist hier sehr gering. Dagegen führte die Inkubation mit dem kurzen Wildtyp zu einem Anteil mit Pyranin gefüllten GUVs von knapp (60 ± 12)%. Dieser Anteil liegt damit deutlich über dem der Blindprobe. Aber auch durch die Inkubation mit Tat ARM-Ala wurde ein Anteil an GUVs hervorgerufen, der mit Pyranin gefüllt war, dieser lag bei (40 ± 8)%. Der Anteil an GUVs, der durch die zweistündige Inkubation mit 0,5 µM Melittin mit Pyranin gefüllt war, dieser lag bei (81 ± 16)%.

Abb. 4.31 zeigt die Anteile an mit Pyranin gefüllten GUVs nach zweistündiger Inkubationszeit mit den verschiedenen Tat-Proteinen in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung. Im Fall der Blindprobe war nur 1% der POPC-GUVs nach 2 h mit Pyranin gefüllt. Der vollständige Wildtyp führte zu einem Anteil von (5 ± 1)% mit Pyranin gefüllter POPC-GUVs, dieser Anteil konnte durch die Inkubation mit dem verkürzten Wildtyp auf (11 ± 2)% etwa verdoppelt werden. Die Tat-Mutante führte in salzfreier Umgebung nur zu einem Anteil von 2% an mit Pyranin gefüllten GUVs.

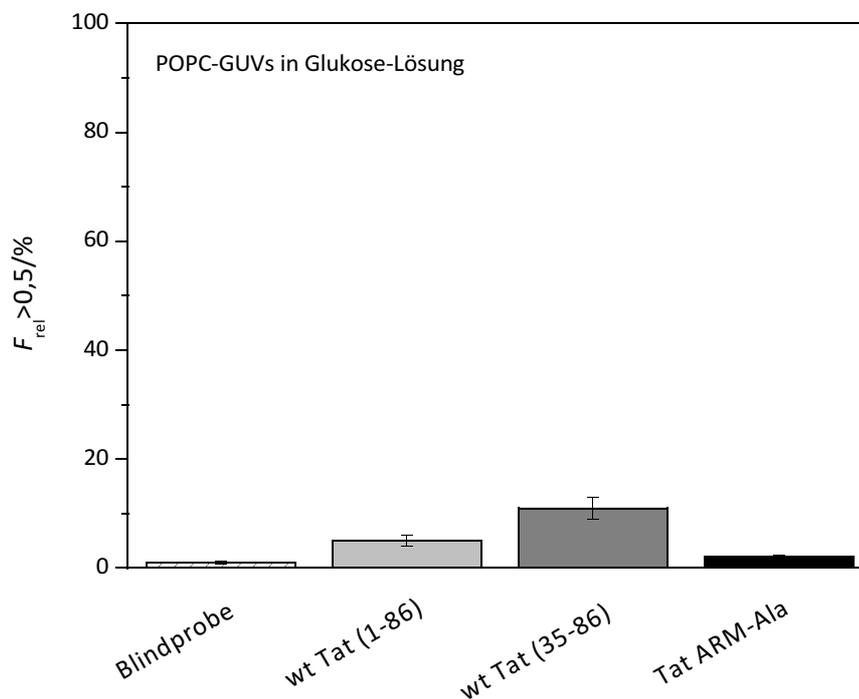


Abbildung 4.31: Prozentualer Anteil von POPC-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in Glukose-Lösung. Vergleich der Blindprobe ($n = 134$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 362$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 322$) und Tat ARM-Ala ($n = 301$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Da der kurze Wildtyp bei POPC-GUVs in NaCl-haltigem Puffer zu einem deutlichen Eintritt des Fluoreszenzfarbstoffs Pyranin führte, sollte in weiteren Untersuchungen mit größeren Fluoreszenzfarbstoffen untersucht werden, welchen Durchmesser die Poren, die durch wt Tat (35-86) in POPC-Membranen gebildet werden, besitzen. Dazu wurden Messungen mit wasserlöslichen Dextran-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Es kamen D3-AF488, ein 3 kDa großer Dextran-gekoppelter Alexa Fluor 488-Farbstoff, sowie D10-AF488, ein 10 kDa großer Dextran-gekoppelter Alexa Fluor 488-Farbstoff zum Einsatz. Aus anderen Untersuchungen konnte geschlossen werden, dass D10-AF488 mit einer molaren Masse von 10 kDa einen Durchmesser von etwa 4 nm besitzt. Für D3-AF488 kann ein Durchmesser von etwa 2 nm angenommen werden.^{105,106} Der verkürzte Wildtyp wt Tat (35-86) selbst besitzt eine molare Masse von 6,2 kDa. Abb. 4.32 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen an POPC-GUVs in salzhaltiger Umgebung mit dem verkürzten Wildtyp. Wurden POPC-GUVs für 2 h in D3-haltigem Puffer mit wt Tat (35-86) inkubiert, wurde ein Anteil von $(74 \pm 15)\%$ gefüllten GUVs erhalten. Nach zweistündiger Inkubation von POPC-GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ des kurzen Wildtyps in D10-AF488-haltigem Puffer wurde ein Anteil an gefüllten POPC-GUVs von $(51 \pm 10)\%$ gefunden. Diese Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlicher molarer Masse zeigen also, dass die von wt Tat (35-86) gebildeten Poren so groß sind, dass ein 10 kDa großer Farbstoff hindurch treten kann.

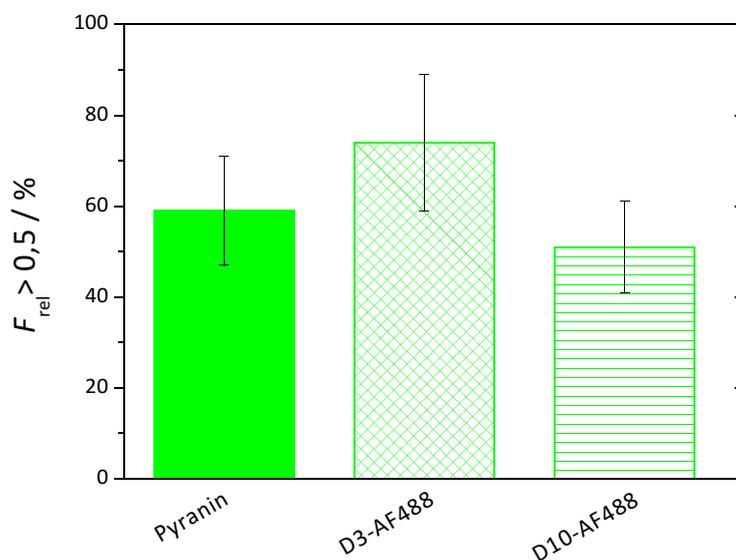


Abbildung 4.32: Prozentualer Anteil von POPC-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren der GUVs in NaCl-haltigem Puffer nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (35-86). Vergleich der Messungen mit Pyranin ($n = 284$), D3-AF488 ($n = 138$) und D10-AF488 ($n = 165$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Untersuchungen an DOPE-haltigen GUVs

DOPE ist ein kegelförmiges Lipid mit sehr kleiner Kopfgruppe, das z. B. die Fusion von Lipidvesikeln¹⁰⁷ oder die Insertion von Proteinen^{108–110} in die Membran erleichtert. In den hier durchgeführten Messungen an DOPE-haltigen GUV-Membranen sollte der Einfluss dieses Lipids auf die Fähigkeit von Tat, Poren in Membranen auszubilden, analysiert werden. Die Ergebnisse, die an GUVs der Zusammensetzung DOPC:DOPE im molaren Verhältnis von 4:1, erhalten wurden, sind in Abb. 4.33 und 4.34 dargestellt.

Zunächst wurde die Stabilität der DOPE-haltigen GUVs überprüft. Dazu wurden diese für 2 h in Pyranin-haltigem Puffer bzw. Pyranin-haltiger Glukose-Lösung beobachtet. Sowohl in Puffer als auch in Glukose-Lösung sind die DOPE-haltigen GUVs sehr stabil. Nur minimale Anteile von $(8 \pm 2)\%$ in Puffer und $(5 \pm 1)\%$ in Glukose sind nach 2 h mit Pyranin gefüllt. Auch DOPE-haltige GUVs aggregieren und verformen sich in Gegenwart von NaCl, in salzfreier Glukose-Lösung hingegen konnte keine Aggregation beobachtet werden.

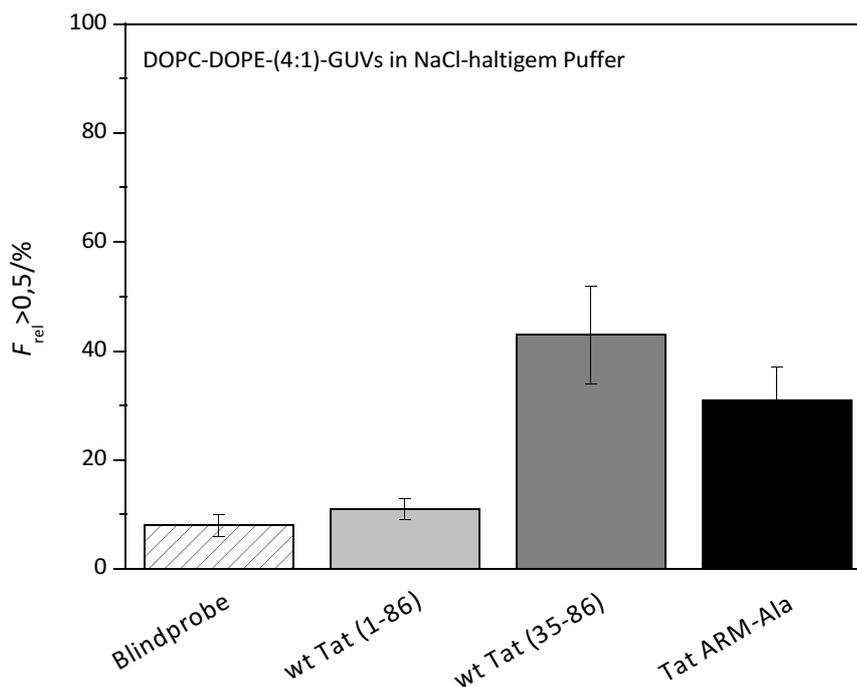


Abbildung 4.33: Prozentualer Anteil der DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in NaCl-haltigem Puffer. Vergleich der Blindprobe ($n = 252$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 493$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 505$) und Tat ARM-Ala ($n = 411$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Nach zweistündiger Inkubation der DOPE-haltigen GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ des vollständigen Wildtyps wt Tat (1-86) in Pyranin-haltigem Puffer konnten nur wenige GUVs gefunden werden, in die Pyranin eingedrungen war, der Anteil lag bei $(11 \pm 2)\%$. In salzhaltiger Umgebung kam es nach Inkubation mit

wt Tat (1-86) allerdings zu einer Aggregation mit einhergehender Deformation der GUVs. Wurde die Inkubation der DOPC:DOPE-(4:1)-GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) in salzfreier Pyranin-haltiger Glukose-Lösung durchgeführt, so wurden ebenfalls nur sehr wenige GUVs gefunden, die nach einer Inkubationszeit von 2 h mit Pyranin gefüllt waren, hier lag der Anteil bei $(2 \pm 0,4)\%$. Auch eine Aggregation oder Verformung der GUVs wurde in diesem Fall nicht beobachtet.

Analoge Messungen an DOPE-haltigen GUVs wurden auch mit dem verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86) durchgeführt. Nach 2 h Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (35-86) konnte ein Anteil von $(43 \pm 9)\%$ an GUVs detektiert werden, die mit Pyranin gefüllt waren. Außerdem war eine Aggregation mit einhergehender Verformung der GUVs zu beobachten. Nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ des verkürzten Wildtyps in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung wurden kaum GUVs gefunden, in die Pyranin eingedrungen war, hier lag der Anteil bei nur $(10 \pm 2)\%$. Auch eine Aggregation oder Deformation der GUVs wurde nicht beobachtet. Der verkürzte Wildtyp führte also auch im Fall von DOPE-haltigen GUVs in Gegenwart von NaCl zu einem Eindringen des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs Pyranin in die GUVs, außerdem zu einer Aggregation dieser mit einhergehender Deformation. Dieser Effekt konnte in salzfreier Umgebung nicht beobachtet werden.

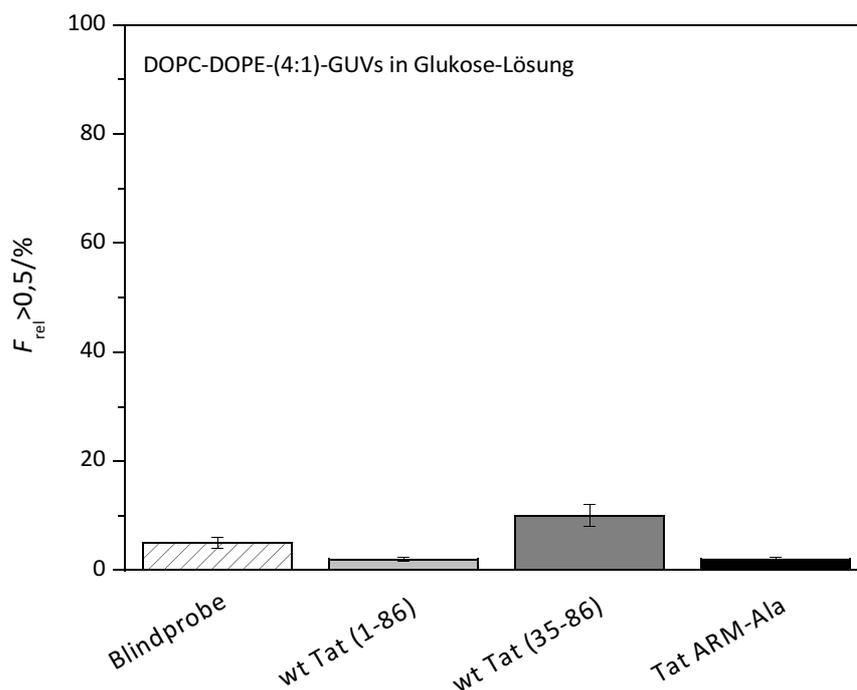


Abbildung 4.34: Prozentualer Anteil der DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in salzfreier Glukose-Lösung. Vergleich der Blindprobe ($n = 161$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 204$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 242$) und Tat ARM-Ala ($n = 187$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Um den Einfluss der basischen Region von Tat auf die Porenbildung in DOPE-haltigen Lipidmembranen untersuchen zu können, wurde analoge Messungen außerdem mit der Tat-Mutante

mit reduziertem Ladungscluster Tat ARM-Ala durchgeführt. Nach der zweistündigen Inkubation von DOPC:DOPE-(4:1)-GUVs mit 0,5 μM Tat ARM-Ala in Pyranin-haltigem Puffer wurde ein Anteil an GUVs von $(31 \pm 6)\%$ detektiert, die mit Pyranin gefüllt waren. In diesem Fall führte die Inkubation mit Tat ARM-Ala zu einer Zusammenlagerung und Verformung der GUVs. In salzfreier Pyranin-haltiger Glukose-Lösung, war nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM Tat ARM-Ala fast gar kein GUV mit Pyranin gefüllt ist. Außerdem waren die GUVs weder aggregiert, noch verformt.

Untersuchungen an POPS-haltigen GUVs

Um des Weiteren den Einfluss negativer Ladung innerhalb der Lipidmembranen auf die Porenbildung durch Tat in diesen zu untersuchen, kamen POPS-haltige Membranen zum Einsatz. Bei POPS handelt es sich um ein Phospholipid mit einer negativ geladenen Kopfgruppe. Hier sollte also untersucht werden, ob eine zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Proteinen und der Membranoberfläche die Porenbildung beeinflusst. Aus der Literatur ist bekannt, dass negativ geladene Lipide wie PG (Phosphatidylglycerol) oder PS (Phosphatidylserin) die Wechselwirkung von *cell penetrating peptides* oder *antimicrobial peptides* mit Lipidmembranen beeinflussen.^{42,64,111,112}

Es wurden GUVs verwendet, die einen Anteil von 20% POPS aufwiesen, die Ergebnisse, die an diesen GUVs erhalten wurden, sind in Abb. 4.35 und 4.36 dargestellt. Bevor Untersuchungen mit Tat durchgeführt werden konnten, musste zuerst die Stabilität der POPS-haltigen GUVs sowohl in Puffer, als auch in Glukose-Lösung gewährleistet sein. Dazu wurden POPC-POPS-(4:1)-GUVs für 2 h in Pyranin-haltigem Puffer bzw. in Pyranin-haltiger Glukose-Lösung inkubiert, anschließend wurde der Anteil bestimmt, der im Inneren eine höhere Fluoreszenzintensität als 50% der Fluoreszenzintensität der Umgebung aufwies und somit als mit Pyranin gefüllt angesehen wurde. In beiden Fällen konnten nur sehr wenige GUVs detektiert werden, die nach 2 h mit Pyranin gefüllt waren. Für die Blindprobe in NaCl-haltigem Puffer wurde ein Anteil von $(15 \pm 3)\%$ an gefüllten GUVs gefunden. Der Anteil für die Blindprobe in Glukose-Lösung lag bei $(2 \pm 0,4)\%$. Somit konnte die Stabilität der GUVs gezeigt werden. Auch im Fall von POPS-haltigen GUVs kam es in salzhaltiger Umgebung zu einer Aggregation und dadurch zu einer Deformation der GUVs.

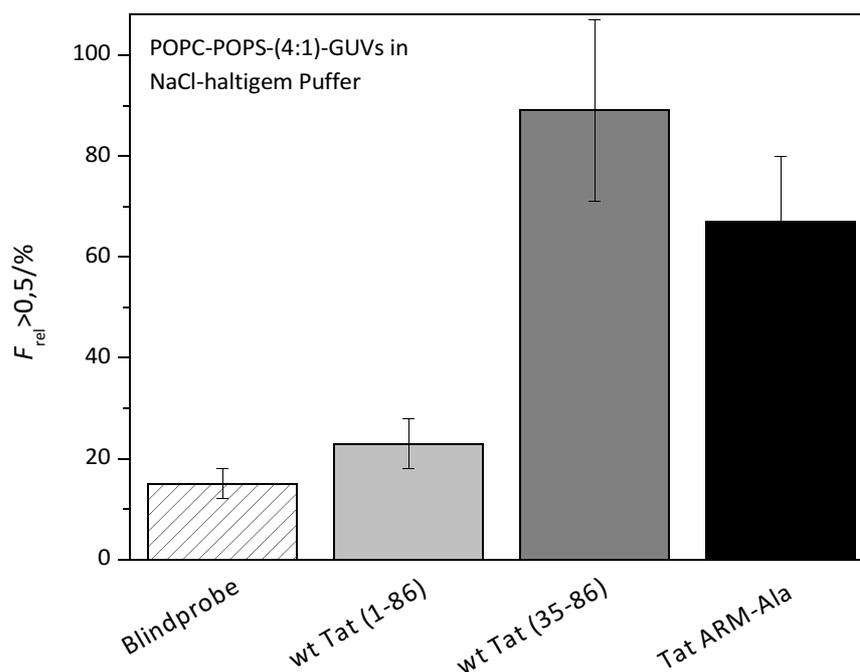


Abbildung 4.35: Prozentualer Anteil der POPC-POPS-(4:1)-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in NaCl-haltigem Puffer. Vergleich der Blindprobe ($n = 273$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 469$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 272$) und Tat ARM-Ala ($n = 235$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Um auch für POPS-haltige GUVs zu überprüfen, welchen Einfluss der N-terminale Bereich des Tat-Proteins und der basische Bereich mit seinen acht positiven Ladungen auf die Porenbildung des Proteins in Lipidmembranen hat, wurden die Messungen nicht nur mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86), sondern auch mit dem N-terminal verkürzten Wildtyp und der Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster durchgeführt. Die zweistündige Inkubation der POPS-haltigen GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) in salzhaltiger und Pyranin-haltiger Umgebung führte nur zu einem geringen Anteil an GUVs von $(23 \pm 5)\%$, welche nach 2 h mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin gefüllt waren. Jedoch ist eine starke Aggregation und Deformation der GUVs durch das Einwirken von wt Tat (1-86) zu beobachten. Die analoge Messung, durchgeführt in salzfreier Umgebung, führte ebenfalls nur zu einem sehr geringfügigen Anteil an gefüllten GUVs von $(8 \pm 2)\%$. In salzfreier Umgebung konnte auch für POPS-haltige GUVs keine Aggregation oder Verformung derselben nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) beobachtet werden.

Nach zweistündiger Inkubation der POPS-haltigen GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ des verkürzten Wildtyps wt Tat (35-86) in Pyranin-haltigem Puffer waren fast alle GUVs mit Pyranin gefüllt, der Anteil lag bei $(89 \pm 18)\%$. Außerdem waren die GUVs aggregiert und verformt. In salzfreier Glukose-Lösung hingegen führte die zweistündige Inkubation der POPS-haltigen GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (35-86) nicht zum Eindringen des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs Pyranin in das Innere der GUVs, hier

4 Ergebnisse

wurden nur $(11 \pm 2)\%$ gefüllte GUVs detektiert. Auch eine Zusammenlagerung oder Verformung der GUVs konnte in Abwesenheit von NaCl nicht beobachtet werden. Die Untersuchungen mit dem verkürzten Wildtyp zeigten also, dass auch im Fall von POPS-haltigen GUVs in Puffer ein großer Anteil an mit Pyranin-gefüllten GUVs erhalten wurde, in salzfreier Umgebung war die Porenbildung deutlich vermindert.

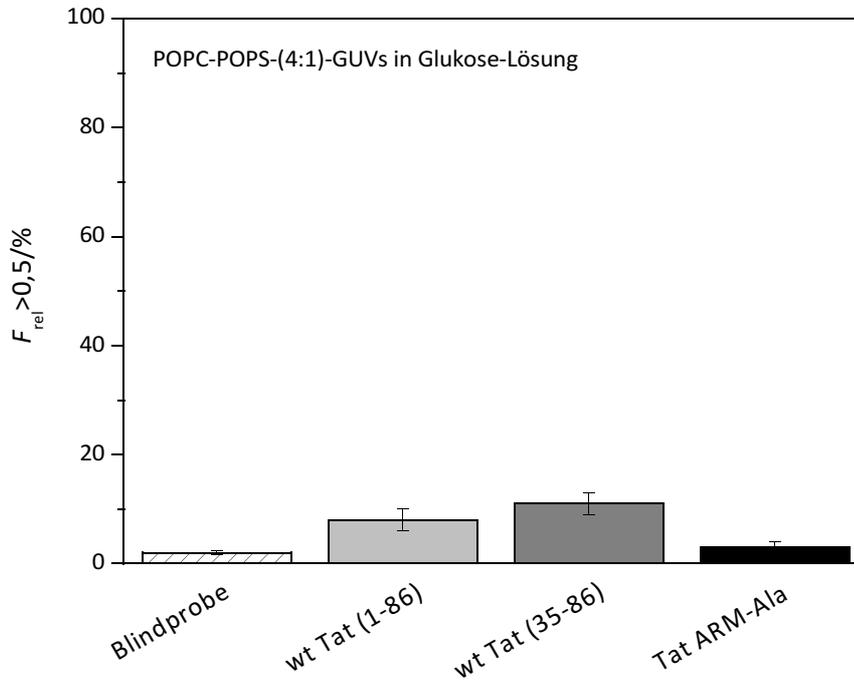


Abbildung 4.36: Prozentualer Anteil der POPC-POPS-(4:1)-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in salzfreier Glukose-Lösung. Vergleich der Blindprobe ($n = 205$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 241$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 223$) und Tat ARM-Ala ($n = 267$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Texas Red DHPE-dotierte POPC:POPS-(4:1)-GUVs wurden weiterhin für 2 h in Pyranin-haltigem Puffer mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala inkubiert. Es wurde nach 2 h ein Anteil von mit Pyranin gefüllten GUVs von $(67 \pm 13)\%$ gefunden. Es kam durch die Inkubation mit Tat ARM-Ala bei POPS-haltigen GUVs zu einer Aggregation und Verformung der GUVs. In salzfreier Pyranin-haltiger Glukose-Lösung führte die Inkubation der POPS-haltigen GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala mit verringertem Ladungscluster hingegen weder zu einer Aggregation oder Deformation der GUVs noch konnte ein Eindringen des Fluoreszenzfarbstoffs Pyranin in das Innere der GUVs beobachtet werden. Die Untersuchungen mit Tat ARM-Ala zeigten also, dass in Gegenwart von NaCl eine Porenbildung stattfand, die in salzfreier Umgebung deutlich vermindert war.

Untersuchungen an GUVs der Zusammensetzung DOPC:DOPE:DOPS (6:3:1)

Um zu untersuchen, ob der vollständige Wildtyp wt Tat (1-86), der verkürzte Wildtyp wt Tat (35-86) sowie die Tat-Mutante Tat ARM-Ala in GUVs der Zusammensetzung DOPC:DOPE:DOPS (6:3:1) Poren ausbilden können, wurden GUVs dieser Zusammensetzung für 2 h in NaCl- und Pyranin-haltigem Puffer mit 0,5 μM des jeweiligen Proteins inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an GUVs ermittelt, die mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin gefüllt waren. Der Eintritt von Pyranin in die GUVs wurde als Maß für die Porenbildung herangezogen. Abb. 4.37 zeigt die Ergebnisse an DOPC-DOPE-DOPS-GUVs. Zunächst wurde ohne Proteinzugabe überprüft, ob die GUVs dieser Zusammensetzung über 2 h in NaCl-haltigem Puffer stabil sind. Die Stabilität der GUVs war gegeben, nur ein sehr kleiner Anteil von (6 ± 1)% war nach 2 h mit Pyranin gefüllt.

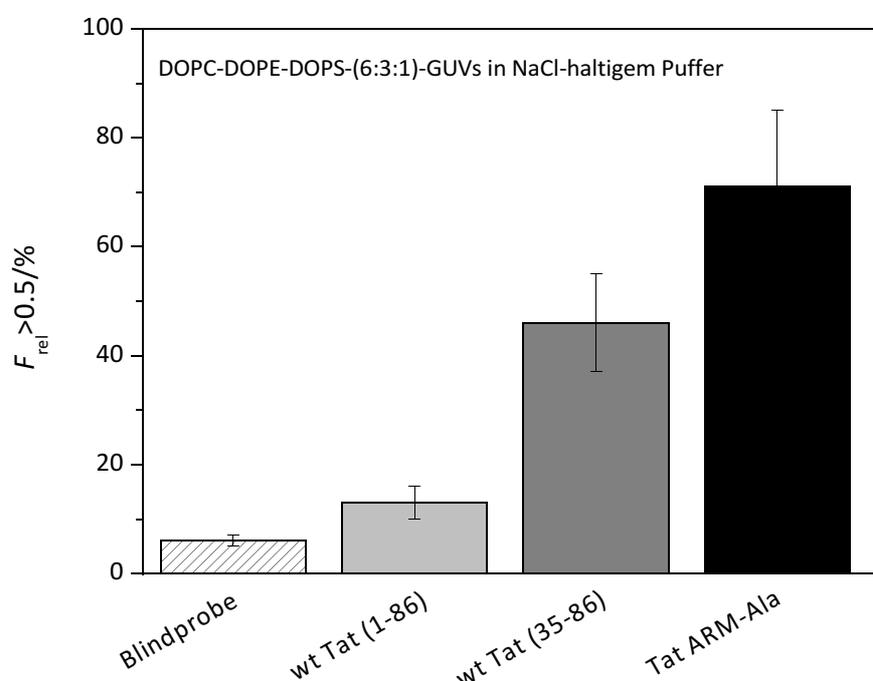


Abbildung 4.37: Prozentualer Anteil der DOPC-DOPE-DOPS-(6:3:1)-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in NaCl-haltigem Puffer. Vergleich der Blindprobe ($n = 199$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 149$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 113$) und Tat ARM-Ala ($n = 192$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Nach zweistündiger Inkubation der GUVs in Pyranin-haltigem Puffer mit 0,5 μM wt Tat (1-86) konnte ebenfalls nur ein sehr geringer Anteil von (13 ± 3)% an GUVs detektiert werden, die mit Pyranin gefüllt waren. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass wt Tat (1-86) keine Poren in DOPC-DOPE-DOPS-GUVs ausbildet. Allerdings führte die Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp erneut zu einer Aggregation der GUVs mit einhergehender Deformation. Um den Einfluss des N-terminalen Bereichs des Proteins auf die Fähigkeit, Poren in DOPC-DOPE-DOPS-GUVs auszubilden, zu untersuchen, wurden diese GUVs ebenfalls mit dem verkürzten Wildtyp inkubiert. Die Inkubation der DOPC-DOPE-

DOPS-GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (35-86) führte zu einem Anteil von $(46 \pm 9)\%$ an GUVs, in die der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff Pyranin eingedrungen war. Dieser Anteil ist deutlich größer, als der, der durch den vollständigen Wildtyp hervorgerufen wurde, und lässt vermuten, dass der verkürzte Wildtyp wt Tat (35-86) in der Lage ist, Poren ebenfalls in DOPC-DOPE-DOPS-GUVs auszubilden. Auch nach der Inkubation dieser GUVs mit wt Tat (35-86) konnte eine Aggregation und Deformation der GUVs beobachtet werden. Um weiterhin zu überprüfen, welchen Einfluss die basische Region des Proteins auf die Fähigkeit zur Porenbildung in Lipidmembranen der Zusammensetzung DOPC:DOPE:DOPS (6:3:1) hat, wurden die GUVs mit der Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster Tat ARM-Ala inkubiert. Nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala war der Großteil von $(71 \pm 14)\%$ der GUVs mit Pyranin gefüllt. Es kann daher vermutet werden, dass Tat ARM-Ala Poren in diesen Lipidmembranen ausbilden kann. Die Reduktion der Ladung im basischen Bereich führte nicht zu einer verminderten Fähigkeit, in DOPC-DOPE-DOPS-GUVs Poren zu bilden. Außerdem konnte auch in diesem Fall beobachtet werden, dass sich die GUVs unter dem Einfluss von Tat ARM-Ala zusammenlagerten und verformten.

Untersuchungen an DOPI-haltigen GUVs

Bei DOPI handelt es sich um ein Phospholipid mit einer Inositoleinheit an der Kopfgruppe, so dass in diesem Fall die Kopfgruppe sehr groß ist. DOPI kommt zu einem kleinen Anteil in der Zellkernmembran vor.¹⁰⁴ Da Tat in infizierten Zellen hauptsächlich im Nukleus zu finden ist, ist es von Bedeutung, den Einfluss dieses Lipids auf die Porenbildung durch Tat in Lipidmembranen zu untersuchen. Es wurden dazu DOPI-haltige GUVs, die 20% DOPI enthielten, mit den verschiedenen Tat-Varianten inkubiert.

Abb. 4.38 zeigt die Ergebnisse, die mit DOPC-DOPI-(4:1)-GUVs erzielt wurden. Zunächst wurde überprüft, ob DOPI-haltige GUVs in NaCl- und Pyraninhaltigem Puffer über 2 h stabil sind. Nach dieser Inkubationszeit wurde analysiert, wie viele GUVs mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin gefüllt waren. Während der zweistündigen Inkubation ohne Protein in NaCl-haltigem Puffer waren die GUVs stabil, der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff Pyranin drang nur in $(4 \pm 1)\%$ der GUVs ein.

Um den Einfluss der verschiedenen Strukturelemente des Tat-Proteins auf die Fähigkeit, Poren in DOPI-haltigen GUVs zu bilden, zu untersuchen, wurden die Messungen mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86), dem verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86), dem der N-terminale Bereich mit der Cystein-reichen Region fehlt, sowie der Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster (Tat ARM-Ala) durchgeführt. Es wurde nach zweistündiger Inkubation untersucht, in wie viele GUVs der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff Pyranin aus der Umgebung in die GUVs eingedrungen war. Das

Überqueren der Membran von Pyranin wurde als Maß für die Porenbildung herangezogen. Die prozentualen Anteile der GUVs, die nach 2 h Inkubation mit Tat mit Pyranin gefüllt waren, sind in Abb. 4.38 gezeigt.

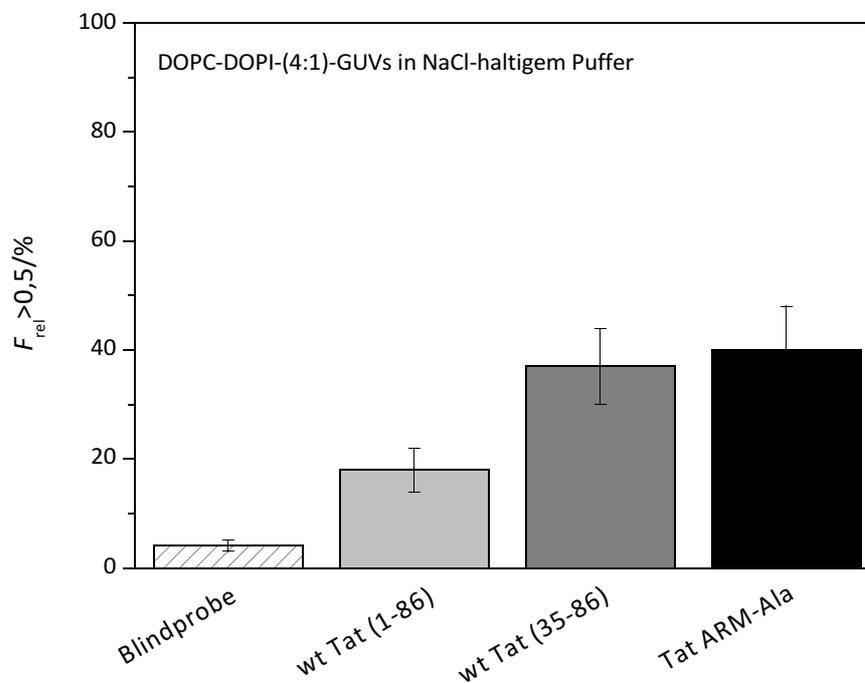


Abbildung 4.38: Prozentualer Anteil der DOPC-DOPI-(4:1)-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in NaCl-haltigem Puffer. Vergleich der Blindprobe ($n = 113$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 294$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 295$) und Tat ARM-Ala ($n = 136$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) in salzhaltiger Umgebung wurde nur ein geringer Anteil an GUVs von $(18 \pm 4)\%$ gefunden, in die Pyranin eingedrungen war. Allerdings konnte auch im Fall von DOPI-haltigen GUVs eine Aggregation und Verformung der GUVs nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp beobachtet werden. Nach 2 h Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ des verkürzten Wildtyps wt Tat (35-86) wurden etwa doppelt so viele mit Pyranin gefüllte GUVs erhalten, wie nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp. Der Anteil an gefüllten GUVs lag hier bei $(37 \pm 7)\%$. Eine Aggregation und Deformation der GUVs konnte auch hier beobachtet werden. Die Inkubation für 2 h mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala führte zu einem sehr ähnlichen Ergebnis wie die Inkubation mit dem kurzen Wildtyp, $(40 \pm 8)\%$ der GUVs waren nach 2 h mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin gefüllt. In Gegenwart der Tat-Mutante kam es nur zu einer geringfügigen Aggregation und Verformung der GUVs. Insgesamt zeigte sich also, dass der vollständige Wildtyp wt Tat (1-86) auch bei DOPI-haltigen GUVs nur einen geringen Farbstoffeintritt verursachte, was vermuten lässt, dass durch wt Tat (1-86) keine Poren in DOPI-haltigen Membranen gebildet werden. Dagegen konnte ein Farbstoffeintritt in die GUVs durch den verkürzten Wildtyp und Tat ARM-Ala beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass Poren durch diese beiden Proteine ausgebildet wurden.

Untersuchungen an Cholesterin-haltigen GUVs

Cholesterin ist ein steroides Lipid und kommt in der Plasmamembran vor, es erhöht durch seine Struktur die Steifigkeit der Membran.¹¹³ Das Tat-Protein wird hauptsächlich im Nukleus HIV-infizierter Zellen gefunden, es kommt aber auch im Blutserum von HIV-Patienten vor.¹¹⁴ Das lässt darauf schließen, dass Tat in der Lage sein muss, auch die Plasmamembran zu überqueren. Daher wurde weiterhin untersucht, ob die verschiedenen Tat-Varianten in der Lage sind, Poren in Cholesterin-haltigen GUV-Membranen auszubilden. Die verwendeten GUVs enthielten einen molaren Anteil von 20% Cholesterin in einer Mischung mit dem Phospholipid POPC.

Zunächst wurde die Stabilität der Cholesterin-haltigen GUVs über 2 h in NaCl-haltigem Puffer überprüft. Dazu wurden die GUVs ohne Protein mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin inkubiert. Es wurde anschließend analysiert, in wie viele GUVs Pyranin eingedrungen war (Abb. 4.39). Nur ein Anteil von $(7 \pm 1)\%$ der GUVs waren ohne Proteinzugabe nach 2 h mit Pyranin gefüllt, so dass die Stabilität der Cholesterin-haltigen GUVs bestätigt werden konnte.

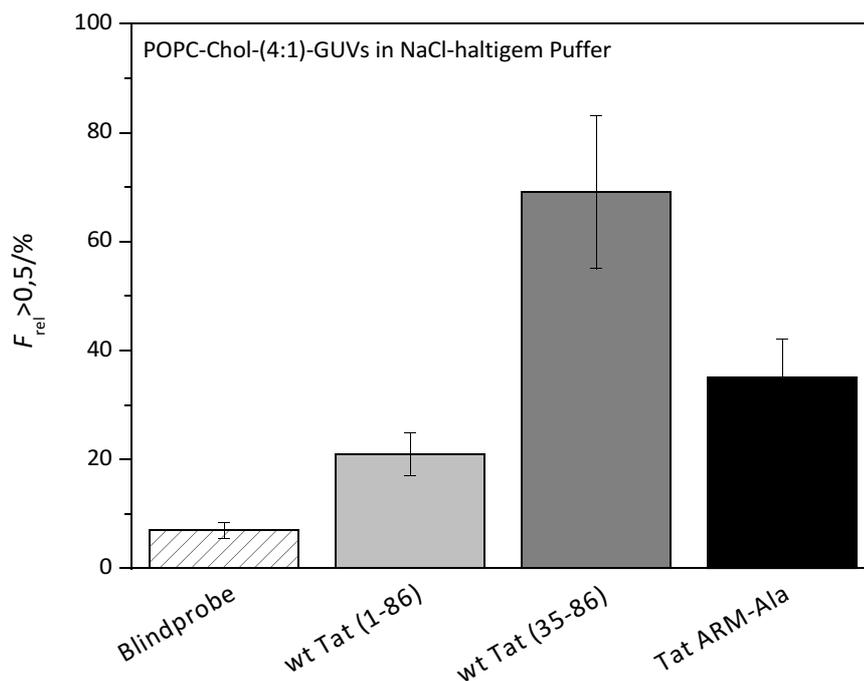


Abbildung 4.39: Prozentualer Anteil der DOPC-Chol-(4:1)-GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren in NaCl-haltigem Puffer. Vergleich der Blindprobe ($n = 118$) mit GUV-Proben nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ($n = 321$), dem kurzen Wildtyp wt Tat (35-86) ($n = 454$) und Tat ARM-Ala ($n = 254$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Um die Porenbildung durch den vollständigen Wildtyp von Tat in Cholesterin-haltigen GUVs zu untersuchen, wurden die GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) in Pyranin-haltigem Puffer für 2 h inkubiert. Die anschließende Analyse der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der GUVs ergab, dass nur ein

kleiner Anteil von (21 ± 4)% an GUVs durch den Einfluss des vollständigen Wildtyps mit Pyranin gefüllt war. Die Wechselwirkung von wt Tat (1-86) mit Cholesterin-haltigen GUVs führte auch zu einer Aggregation und Verformung der GUVs. Um den Einfluss des N-Terminus des Tat-Proteins auf die Fähigkeit, Poren in Cholesterin-haltigen Membranen zu bilden zu untersuchen, wurden auch diese GUVs mit dem verkürzten Wildtyp des Tat-Proteins, dem 34 Aminosäuren im N-terminalen Bereich fehlen, inkubiert. Nach zweistündiger Inkubation der Cholesterin-haltigen GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (35-86) wurde ein deutlich anderes Ergebnis erhalten als mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86). Der Großteil von (69 ± 14)% der GUVs war nach 2 h mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin gefüllt. Außerdem konnte eine Aggregation mit einhergehender Verformung der GUVs durch wt Tat (35-86) beobachtet werden. Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Ladungscluster der basischen Region von Tat auf die Porenbildung in Cholesterin-haltigen Membranen hat, wurden diese mit Tat ARM-Ala, welches nur fünf statt acht positive Ladungen im basischen Bereich besitzt, inkubiert. Die zweistündige Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala führte wiederum zu einem deutlich kleineren Anteil an mit Pyranin gefüllten GUVs von (35 ± 7)%. Auch nach der Inkubation mit Tat ARM-Ala konnte eine Zusammenlagerung und Verformung der GUVs beobachtet werden.

Insgesamt zeigen die Messungen mit den verschiedenen Tat-Varianten an GUVs unterschiedlicher Lipidzusammensetzungen, dass der vollständige Wildtyp nur zu einem minimalen Farbstoffeintritt in die GUVs führt, was zeigt, dass dieses Protein keine Poren in Lipidmembranen ausbildet. Dagegen führt die Inkubation mit dem kurzen Wildtyp, dem 34 Aminosäuren im N-terminalen Bereich fehlen, zu sehr deutlichen Farbstoffeintritten in die GUVs, was darauf hindeutet, dass der kurze Wildtyp in der Lage ist, Poren in Lipiddoppelschichten auszubilden, durch die Pyranin hindurchtreten kann. Auch die Inkubation der GUVs mit der Mutante mit reduziertem Ladungscluster Tat ARM-Ala führt zum Eintritt des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs Pyranin in die GUVs, was ebenfalls anzeigt, dass die Mutante Poren in Lipiddoppelschichten bilden kann.

4.3.2 Ergebnisse der Untersuchung der Porenbildung von Tat an *large unilamellar vesicles* (LUVs) aus POPC (*Release-Experimente*)

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob Tat in der Lage ist, Poren in stärker gekrümmten Membranen auszubilden. Dazu wurden *Release-Experimente* an LUVs mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 200 nm verwendet. *Release-Messungen* sind eine etablierte Methode, um porenbildende Eigenschaften von Peptiden oder Proteinen zu untersuchen.^{45,49,115,116} Das Prinzip beruht auf dem selbstlöschenden Effekt von bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen wie z. B. 5(6)-Carboxyfluorescein (CF), dieser Farbstoff zeigt oberhalb von einer Konzentration von 50 mM eine stark verminderte Fluoreszenz. Für *Release-Experimente* wurden 100 mM CF in POPC-Vesikel (LUVs) eingeschlossen, so dass mittels eines Fluorimeters nur eine Basislinie aufgenommen werden konnte. Durch Zugabe eines Detergens oder einer porenbildenden Substanz kann der Farbstoff aus den Vesikeln austreten und sich in der Umgebung verdünnen. Es wird dann ein Fluoreszenzsignal erhalten, da die Farbstoffkonzentration unter die Grenze von 50 mM sinkt. Um den maximal möglichen Anstieg der Fluoreszenzintensität zu ermitteln, wurden die Vesikel am Ende der Messungen mithilfe des Detergens Triton X-100 zerstört. Der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals wurde aufgenommen und gab Aufschluss darüber, ob der Farbstoff CF nach Zugabe von Tat aus den Vesikeln ausgetreten war.

Um den Einfluss der verschiedenen Strukturelemente des Tat-Proteins auf die Porenbildung in LUV-Membranen untersuchen zu können, kamen auch hierbei verschiedene Tat-Varianten zum Einsatz. Es wurde der vollständige Wildtyp von 86 Aminosäuren (wt Tat (1-86)) untersucht, außerdem kam ein verkürzter Wildtyp zum Einsatz (wt Tat (35-86)), dem 34 Aminosäuren im N-terminalen Bereich fehlen, um den Einfluss der Cystein-reichen Region, die sich in diesem Bereich befindet, zu untersuchen. Um den Einfluss der basischen Region von Tat auf die Wechselwirkung mit Membranen hin zu analysieren, wurde eine Mutante mit reduziertem Ladungscluster (Tat ARM-Ala) eingesetzt.

Zunächst wurden *Release-Experimente* mit POPC-LUVs und Melittin durchgeführt, um das System zu evaluieren. Melittin gehört zu den *cell penetrating peptides* und ist in der Lage, transmembrane Poren in Lipiddoppelschichten zu bilden, durch die Farbstoffe gelangen können.^{45,46,48} Abb. 4.40 zeigt den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals von CF vor und nach Zugabe von Melittin zu den CF-gefüllten POPC-LUVs in einem Peptid: Lipid-Verhältnis von 1:10. Die Zugabe von Melittin wurde als $t = 0$ s gesetzt. Es wird deutlich, dass Melittin zu einer Freisetzung des gesamten Farbstoffs aus den POPC-LUVs führt. Dies zeigt sich dadurch, dass auch die Zugabe von Triton X-100 zu keinem weiteren Farbstoffaustritt führte. Dies beweist, dass Melittin Poren in den POPC-Membranen der LUVs ausgebildet hat, durch die CF in die Umgebung gelangen konnte. Mit dieser Messung konnte also gezeigt werden, dass das Messsystem geeignet ist, um Porenbildung zu untersuchen.

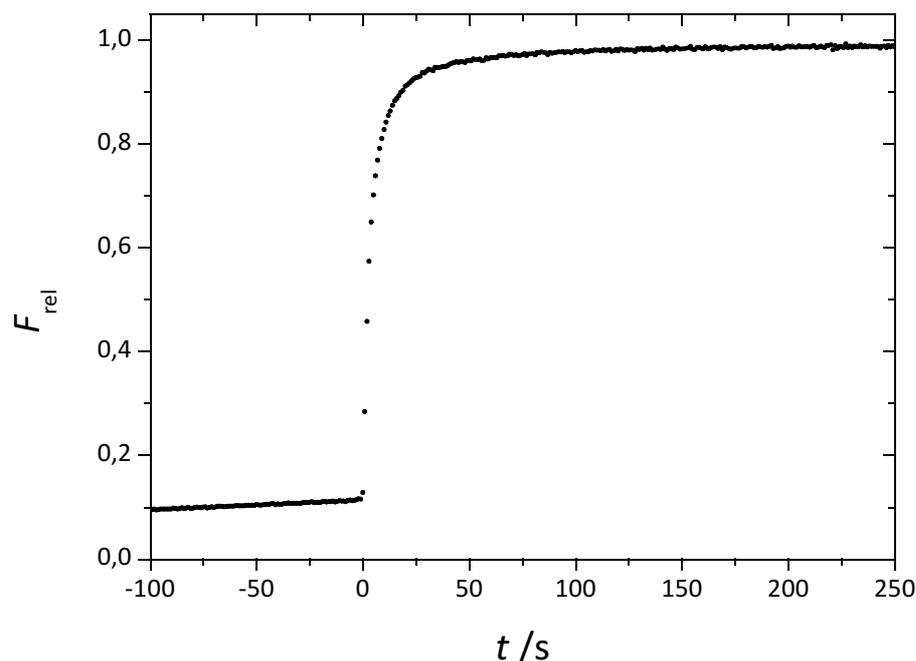


Abbildung 4.40: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität während der *Release*-Messungen an POPC-LUVs mit Melittin in einem Peptid:Lipid-Verhältnis von 1:10. Der Zeitpunkt der Zugabe der Peptidlösung zu den Vesikeln wurde als $t = 0$ s gesetzt.

Um die Porenbildung durch Tat in POPC-LUVs zu untersuchen, wurden zu CF-gefüllten POPC-LUVs die verschiedenen Tat-Varianten gegeben und der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität von CF beobachtet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 4.41 dargestellt. Die Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ des vollständigen Wildtyps wt Tat (1-86) zu den CF-gefüllten POPC-LUVs führte zu keinem Austritt von CF aus den Vesikeln (violett). Dies beweist, dass der vollständige Wildtyp keine Poren in den POPC-Membranen der LUVs ausbilden kann. Die Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ Tat ARM-Ala (blau) führte zu einem Anstieg der CF-Fluoreszenzintensität von $(0,5 \% \pm 0,1)\%$. Dies ist zwar ein sehr geringer Anstieg, aber er war detektierbar. Die Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ des verkürzten Wildtyps wt Tat (35-85) führte zu einem noch deutlicheren Anstieg der CF-Fluoreszenzintensität von $(1,7 \% \pm 0,3)\%$ (rot). Dieser Farbstoffaustritt ist deutlich detektierbar und signifikant zu unterscheiden vom Ergebnis, das mit dem vollständigen Wildtyp erhalten wurde. Allerdings muss auch festgestellt werden, dass der verkürzte Wildtyp nicht in der Lage ist, in dem Maße in LUVs Poren auszubilden wie es Melittin ist. Es ist außerdem ein deutlicher Unterschied zu den Experimenten an GUVs, die eine deutlich geringere Membrankrümmung aufweisen, erkennbar. Mithilfe der *Release*-Experimente an LUVs konnte gezeigt werden, dass die Membrankrümmung die Porenbildung durch wt Tat (35-86) und Tat ARM-Ala stark vermindert. Wt Tat (1-86) bildet weder in GUVs noch in LUVs Poren, durch die Farbstoffe gelangen können.

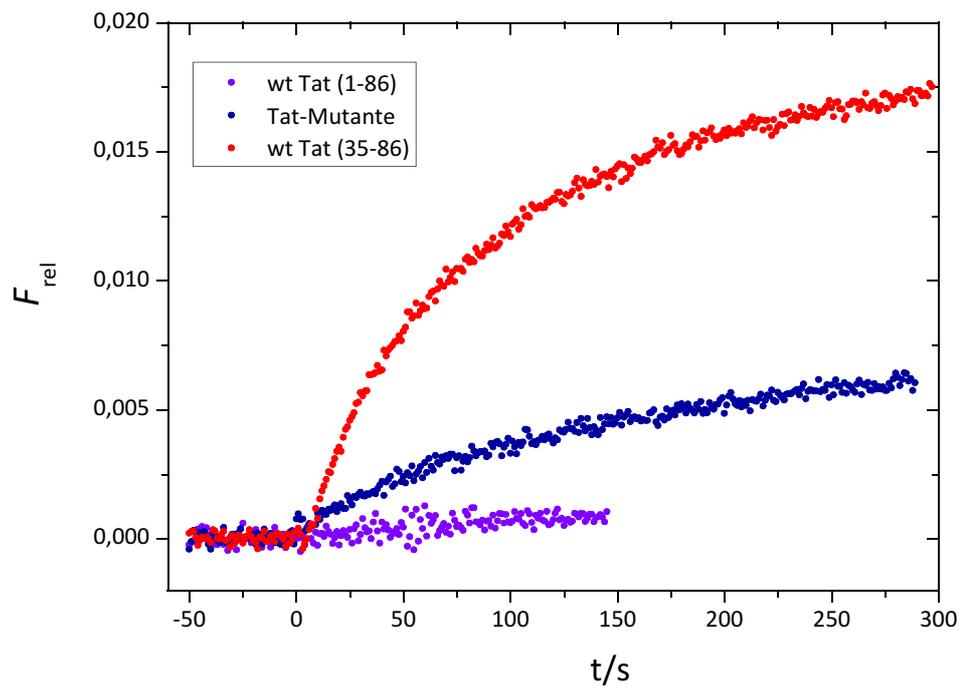


Abbildung 4.41: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität während der *Release*-Messungen an POPC-LUVs mit 0,5 μM wt Tat (1-86) (violett), 0,5 μM wt Tat (35-86) (rot) und 0,5 μM Tat ARM-Ala (blau). Der Zeitpunkt der Zugabe der Proteinlösungen zu den Vesikeln wurde als $t = 0$ s gesetzt.

4.3.3 Ergebnisse der Untersuchung der Translokation von Tat

Die Ergebnisse des bereits vorgestellten Assays zur Untersuchung von Porenbildung durch Tat in POPC-GUVs, aber auch in DOPE- und POPS-haltigen GUVs haben gezeigt, dass wt Tat (1-86) nicht zu einem Eintritt eines wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs in die untersuchten GUVs führt. Dieser Eintritt eines Farbstoffs diente als Maß für Porenbildung in den GUV-Membranen. Aus der Literatur ist bekannt, dass das von der basischen Region des Tat-Proteins abgeleitete Tat-Peptid Membranen überqueren kann.^{23,25,117} In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das vollständige Tat-Protein in der Lage ist, ebenfalls Lipidmembranen zu überqueren, obwohl es im Gegensatz zum Tat-Peptid keine Poren in Lipiddoppelschichten ausbildet. Für diese Untersuchungen wurde wt Tat (1-86) über einen Cysteinrest im N-terminalen Bereich fluoreszenzmarkiert (Tat-AF633), so dass das Protein fluoreszenzmikroskopisch lokalisierbar war. In diesen Messungen sollte außerdem der Einfluss der Struktur und Ladung der Lipide innerhalb der Membran auf die Translokation von Tat-AF633 über Membranen untersucht werden.

Untersuchungen an POPC-GUVs

Zunächst wurden die Untersuchungen zur Translokation von fluoreszenzmarkiertem Tat (Tat-AF633) an reinen POPC-GUVs durchgeführt. Tat-AF633 wurde durch die Kopplung eines mit einem Maleimidrest funktionalisierten Alexa Fluor 633-Farbstoffs an ein Cystein des Proteins im N-terminalen Bereich erreicht. Das markierte Protein wurde in einer Konzentration von 3,1 μM mit einer Labelingrate von 24% erhalten (vgl. Kap. 3.2). Um zunächst die Stabilität der GUVs gegenüber dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 633 (AF633) zu überprüfen, wurden Pacific Blue DMPE-dotierte GUVs für 2 h in AF633-haltigem Puffer sowie in AF633-haltiger salzfreier Glukose-Lösung inkubiert und anschließend überprüft, wie groß der Anteil an GUVs ist, in die der Fluoreszenzfarbstoff AF633 eingedrungen ist. Abb. 4.42 zeigt die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Stabilitätstests von Pacific Blue DMPE dotierten POPC-GUVs in NaCl-haltigem Puffer (Abb. 4.42 A1 und A2) und Glukose-Lösung (Abb. 4.42 B1 und B2). Die Aufnahmen A1 und B1 zeigen die Fluoreszenz der Pacific Blue DMPE dotierten POPC-GUVs, die Aufnahmen A2 und B2 die Fluoreszenz des freien wasserlöslichen AF633-Farbstoffs.

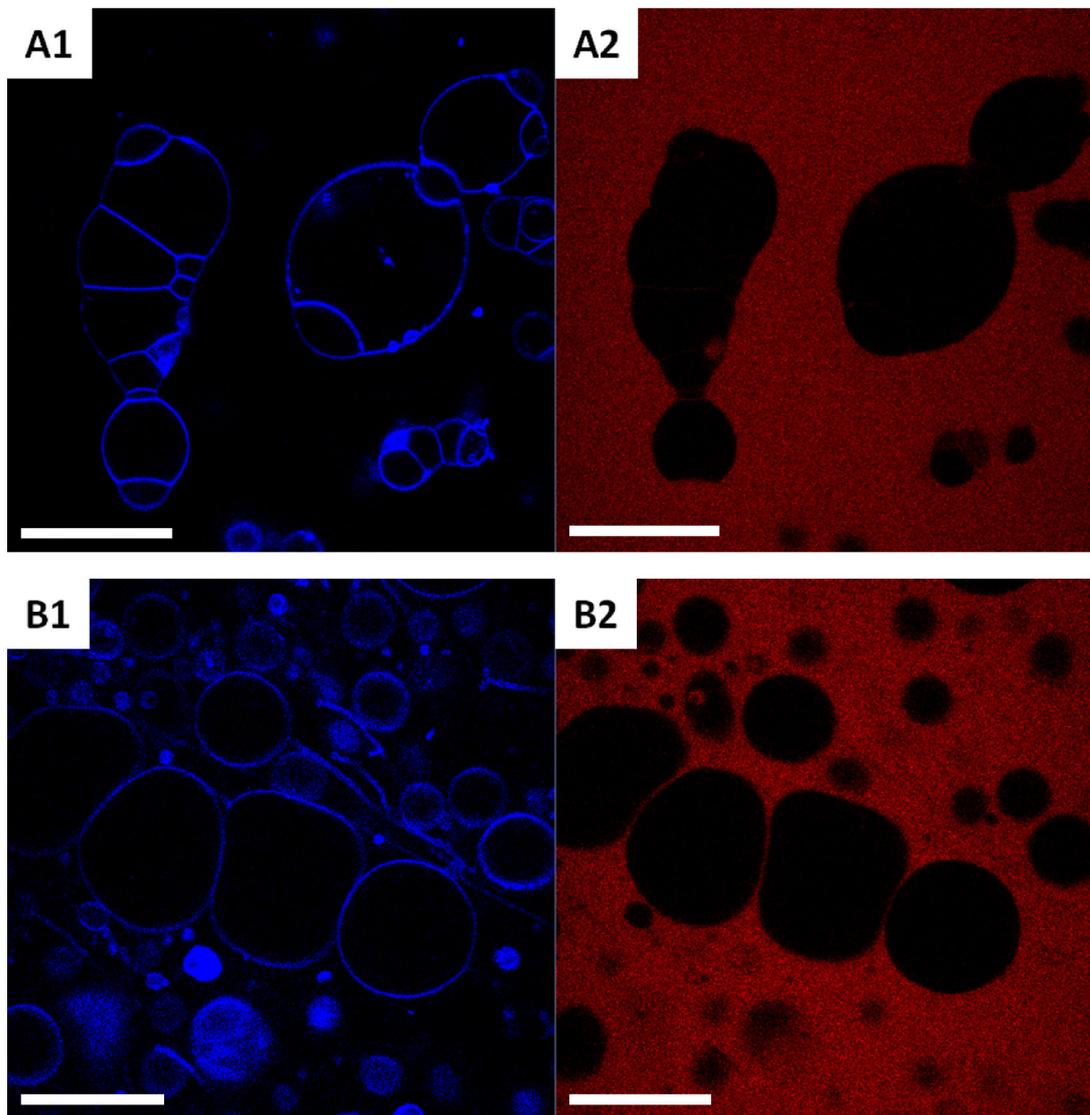


Abbildung 4.42: Konfokalmikroskopische Aufnahmen: Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation in AF633-haltigem Puffer (A1 und 2) und in AF633-haltiger Glukose-Lösung (B1 und 2). Maßstabsbalken: 50 μm .

Es ist deutlich zu erkennen, dass weder in Puffer noch in Glukose-Lösung der Fluoreszenzfarbstoff AF633 in die GUVs eindringen konnte. Aus Abb. 4.42 A2 und B2 wird deutlich, dass sich AF633 nur in der Umgebung, also außerhalb der GUVs befindet. Wie schon bei den Stabilitätstest von Texas Red DHPE-dotierten POPC-GUVs in Pyranin-haltigem Puffer, konnte auch hier eine Aggregation und Verformung der GUVs nach 2 h beobachtet werden. Abb. 4.42 A1 zeigt, dass sich die Membranen der GUVs aneinanderlagern und dass die GUVs dadurch verformt sind. Diese Verformung und Zusammenlagerung konnte in salzfreier Umgebung nur in sehr geringem Maße festgestellt werden (Abb. 4.42 B1). Es wurde mit diesen Messungen gezeigt, dass POPC-GUVs über 2 h hinweg stabil gegenüber freiem AF633 in der Umgebung waren.

Um nun die Translokation des fluoreszenzmarkierten vollständigen Tat-Wildtyps über Lipidmembranen zu untersuchen, wurden Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs in NaCl-haltigem Puffer für 2 h mit Tat-AF633 in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,1 μM bis 1,0 μM inkubiert. Analoge Messungen wurden ebenfalls in salzfreier Glukose-Lösung durchgeführt, um den Einfluss von Ionen auf die Fähigkeit von Tat-AF633, die Membran zu überqueren, zu analysieren. Da Tat-AF633 nur eine Labelingrate von 24% besitzt (vgl. Kap. 3.2) und im $\mu\text{-molaren}$ Bereich eingesetzt wird, ist die Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 schwächer als die der eingesetzten wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffe. Abb. 4.43 zeigt Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs nach 2 h Inkubation mit 0,5 μM Tat-AF633 in NaCl-haltigem Puffer (Abb. 4.43 A1 und 2) und in Glukose-Lösung (Abb. 4.43 B1 und B2).

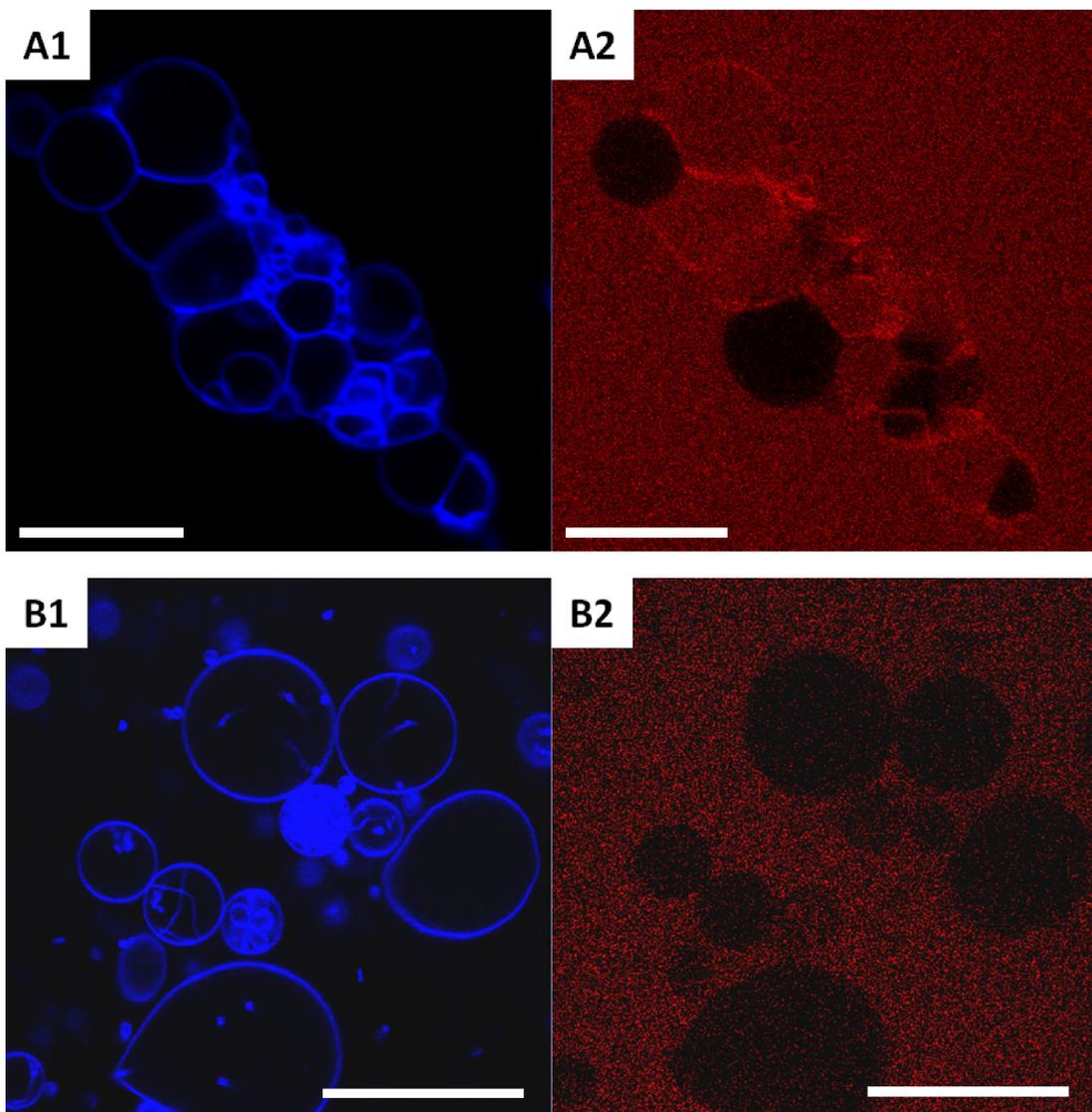


Abbildung 4.43: Konfokalmikroskopische Aufnahmen: Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation in mit 0,5 μM Tat-AF633 in NaCl-haltigem Puffer (A1 und 2) in salzfreier Glukose-Lösung (B1 und 2). Maßstabsbalken: 50 μm .

Die Aufnahmen A1 und B1 zeigen jeweils die Fluoreszenz der Pacific Blue DMPE-dotierten GUVs und die Aufnahmen A2 und B2 die Fluoreszenz des markierten Tat-Proteins Tat-AF633. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen deutlich, dass ein großer Anteil der POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit Tat-AF633 in salzhaltiger Umgebung mit Tat-AF633 gefüllt sind. Das lässt vermuten, dass Tat-AF633 in die GUVs eingedrungen ist, also die Lipidmembran überquert hat. Eine weitere Beobachtung, die anhand dieser Aufnahme aus Abb. 4.43 A2 deutlich wird, ist eine erhöhte Tat-AF633-Fluoreszenzintensität im Bereich der Lipidmembran. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich Tat-AF633 in die Lipidmembranen der GUVs, deren Membranen es überquert hat, einlagert und dort akkumuliert. Bei diesen Untersuchungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die GUVs auch in Gegenwart des markierten Tat-Proteins zusammenlagern und damit einhergehend verformen. Analoge Messungen in salzfreier Glukose-Lösung zeigten, dass in Abwesenheit von NaCl keine Translokation von Tat-AF633 über POPC-Membranen oder eine Akkumulation von Tat-AF633 in Lipidmembranen stattfand. Eine Aggregation oder Verformung konnte in Glukose-Lösung ebenfalls nicht festgestellt werden.

Um den zeitlichen Verlauf der Translokation von Tat-AF633 über die Membranen POPC-GUVs näher zu untersuchen, wurde die zweistündige Inkubation von Pacific Blue DMPE-dotierten POPC-GUVs mit 0,5 μM Tat-AF633 zeitaufgelöst aufgenommen. Dazu wurden die POPC-GUVs für 2 h mit Tat-AF633 inkubiert und währenddessen mittels des Konfokalmikroskops alle 15 s in zwei Kanälen ($\lambda_{\text{ex},1} = 405 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{ex},2} = 633 \text{ nm}$) gescannt. Die zeitaufgelösten Messungen von Tat-AF633 an POPC-GUVs ergaben, dass das Protein nach einer gewissen Verzögerungszeit von bis zu 1,5 h in die POPC-GUVs eindrang. Des Weiteren konnte nach der Translokation eine erhöhte Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 im Bereich der GUV-Membran beobachtet werden. Der Verlauf einer Translokation von Tat-AF633 in einen Pacific Blue DMPE-dotierten POPC-GUV ist in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4.44 dargestellt. Die Aufnahmen zeigen den Eintritt des markierten Tat-Proteins in einen GUV in Abständen von 30 s, dabei ist der Beginn der Translokation als $t = 0 \text{ s}$ gesetzt. Zu Beginn, bei $t = 0 \text{ s}$, erscheint der POPC-GUV noch dunkel in seinem Inneren, da sich innerhalb des GUVs noch kein fluoreszenzmarkiertes Protein befindet. 30 s nach Beginn des Translokationsprozesses steigt die Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 innerhalb des GUVs an. Zum Zeitpunkt $t = 60 \text{ s}$ ist die Fluoreszenzintensität innerhalb des GUVs stark angestiegen, und es ist bereits erkennbar, dass im Bereich der Membran eine erhöhte Tat-AF633-Fluoreszenz sichtbar ist. Nach 90 s beträgt die Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 innerhalb des GUVs annähernd 100% der Tat-AF633-Fluoreszenz in der umgebenden Lösung. Außerdem ist eine deutlich erhöhte Tat-AF633-Fluoreszenzintensität im Bereich der Membran zu erkennen, woraus geschlossen werden kann, dass sich Tat-AF633 in der POPC-Membran des GUVs angereichert hat.

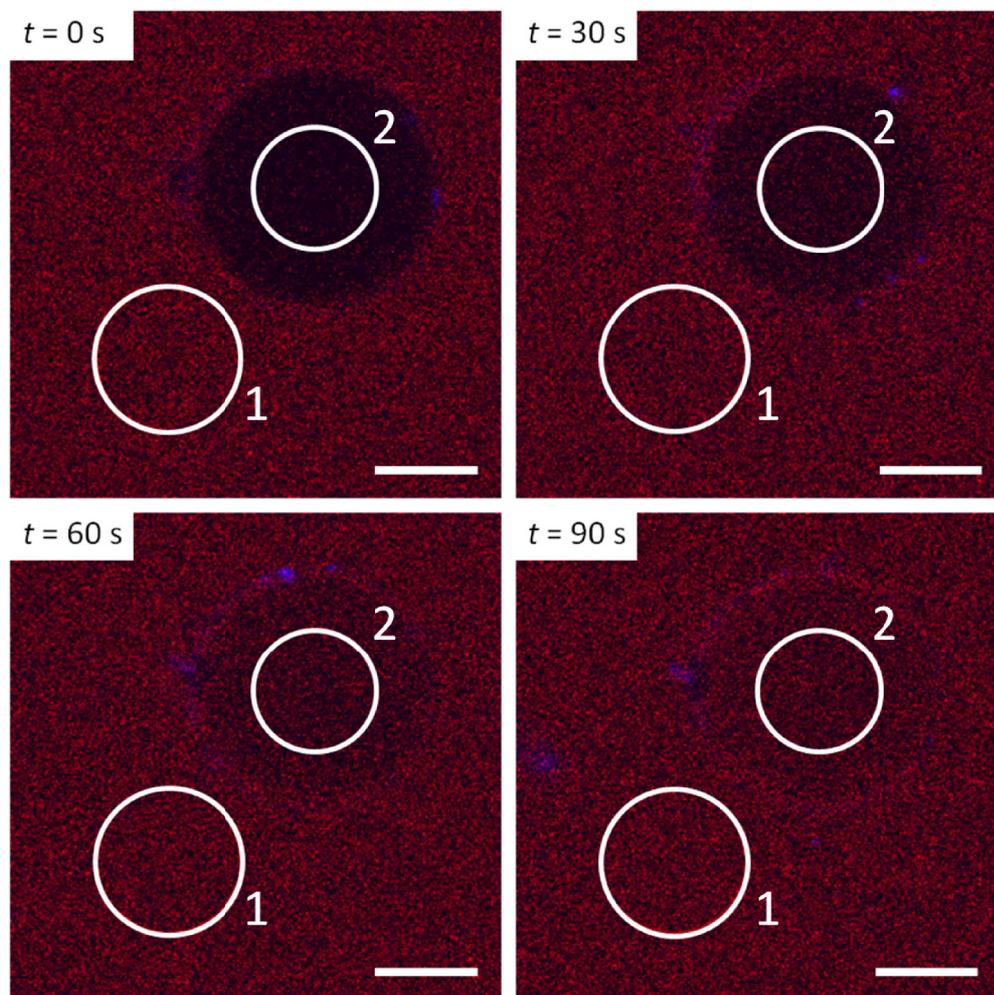


Abbildung 4.44: Konfokalmikroskopische Aufnahmen aus einer zeitabhängigen Messung. ROI 1 entspricht der Tat-AF633-Fluoreszenzintensität außerhalb des GUVs, ROI 2 der Tat-AF633-Fluoreszenzintensität innerhalb. Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs während der Inkubation mit 0,5 μ M Tat-AF633, die Pacific Blue-Fluoreszenz der Membran wurde durch das Scannen bereits geblichen. Der Translokationsbeginn ist auf $t = 0$ s gesetzt, nach 30 s ist bereits ein geringer Anstieg der Tat-AF633-Fluoreszenzintensität zu erkennen. Nach 60 s ist die Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 im Inneren weiter angestiegen. Nach 90 s ist der Translokationsprozess abgeschlossen, die Fluoreszenzintensität innerhalb des GUVs beträgt etwa 100% der Fluoreszenzintensität außerhalb des GUVs. Es wurde nach 90 s eine erhöhte Tat-AF633-Fluoreszenzintensität im Bereich der GUV-Membran detektiert. Maßstabsbalken: 5 μ m. Die weißen Kreise zeigen die ROIs, aus denen die Fluoreszenzintensität ausgelesen wurde.

Der zeitliche Verlauf der Änderung der Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 wurde mittels des Programms ZEN innerhalb und außerhalb eines GUVs ausgelesen. Die ROIs (*regions of interest*), aus denen die Fluoreszenzintensität ausgelesen wurde, sind als weiße Kreise in Abb. 4.44 markiert. Die Intensität innerhalb des GUVs (ROI 2) wurde auf die Intensität der Umgebung (ROI 1) normiert, so wurde eine relative Fluoreszenzintensität erhalten. Der zeitliche Verlauf der Tat-AF633-Fluoreszenzintensität während der Translokation aus Abb. 4.44 ist in Abb. 4.45 gezeigt. Die Fluoreszenzintensität des markierten Tat-Proteins innerhalb des GUVs lag bis zur Translokation bei $F_{\text{rel}} = 0$, nach einer Verzögerungszeit von etwa 5200 s stieg die Fluoreszenzintensität von Tat-AF633

innerhalb des GUVs sprunghaft an, um dann einen Sättigungswert von $F_{\text{rel}} = 1$ zu erreichen. Die Parameter der folgenden Gleichung wurden an die Daten des Intensitätsverlaufs angepasst, so dass eine Geschwindigkeitskonstante für diesen Translokationsprozess ermittelt werden konnte.

$$F_{\text{rel}} = F_{\text{rel,max}} \cdot (1 - e^{(-k(x-t_0))})$$

Für diesen Translokationsprozess wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 0,014 \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Insgesamt konnte für die Translokation von Tat-AF633 in POPC-GUVs aus 18 unabhängigen Messungen eine Geschwindigkeitskonstante von $k = (0,017 \pm 0,007) \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.

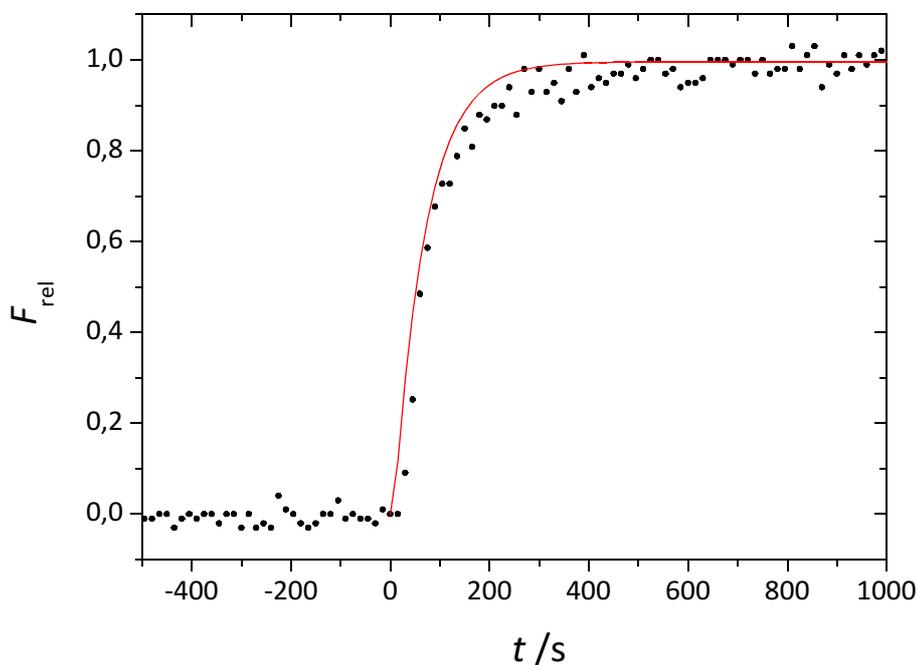


Abbildung 4.45: Zeitlicher Fluoreszenzintensitätsverlauf bei der Translokation von Tat-AF633 in den POPC-GUV aus Abb. 4.44. Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden aus den weiß markierten ROIs aus der entsprechenden Abbildung erhalten. Der Startpunkt der Translokation, der auf $t = 0 \text{ s}$ gesetzt ist, wurde nach einer Verzögerungszeit von etwa 5200 s beobachtet.

Um die Akkumulation von Tat-AF633 in den Lipiddoppelschichten nach zweistündiger Inkubation zu analysieren, wurden hoch aufgelöste (16-fach gemittelte) Fluoreszenzbilder der GUVs nach Inkubation mit Tat-AF633 aufgenommen. Es wurde dann die relative Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 im Bereich der Membran bestimmt (Abb. 4.46). Dies wurde mittels des Programms *ImageJ* anhand von Linienprofilen durchgeführt. Die Tat-AF633-Fluoreszenz in der Membranregion wurde auf die der Umgebung normiert, so dass im Bereich der Membran für die Tat-AF633-Fluoreszenz Werte > 1 erhalten wurden.

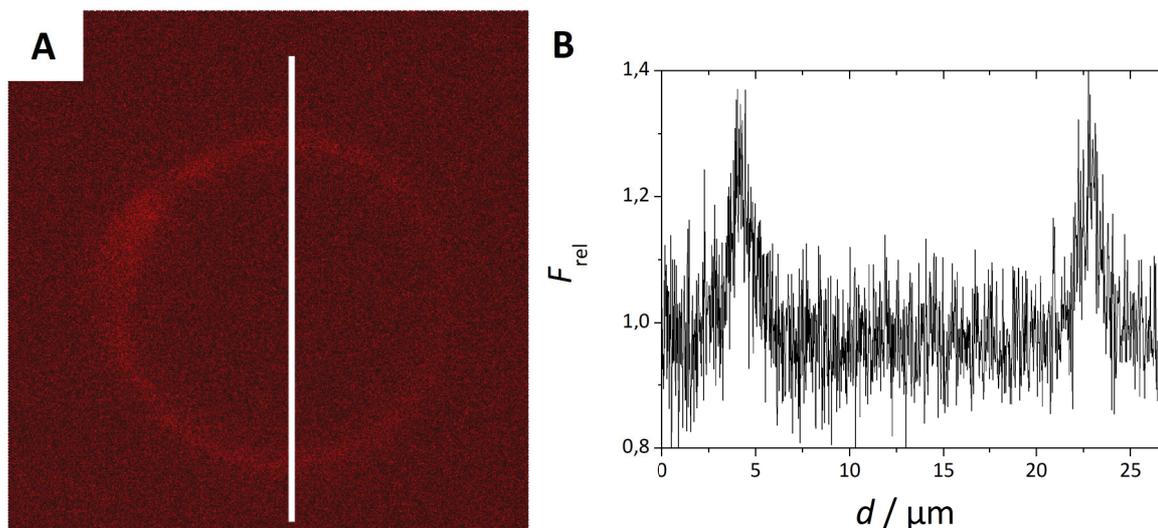


Abbildung 4.46: (A) Konfokalmikroskopische Aufnahme eines mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierten POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit 0,5 μM Tat-AF633. Die Aufnahme zeigt nur die Tat-AF633-Fluoreszenz. (B) Intensitätsprofil der Tat-AF633-Fluoreszenz entlang der weißen Linie in Abb. 4.46 A.

In diesem Fall hat eine Translokation von Tat-AF633 in den POPC-GUV stattgefunden, so dass die Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 außerhalb und innerhalb des GUVs identisch sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Bereich der GUV-Membran die Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 erhöht ist im Vergleich zur Intensität der Umgebung. Dies spiegelt auch das Linienprofil (Abb. 4.46 B) entlang der weißen Linie in Abb. 4.46 A wider. Im Bereich der Membran beträgt die relative Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 etwa 1,4, die Intensität innerhalb des GUVs ist gleich 1, da der GUV mit Tat-AF633 gefüllt ist.

Um zu überprüfen, ob die Membranen durch die Translokation von Tat-AF633 durchlässig oder instabil werden, wurden Experimente mit Tat-AF633 und einem zusätzlichen wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff in der umgebenden Pufferlösung durchgeführt. Die Messungen sollten aufklären, ob das fluoreszenzmarkierte Tat-AF633 zu einer Destabilisierung oder Porenbildung in den GUV-Membranen führte. Diese Eigenschaften konnten, wie bereits in Kap. 4.3.1.1 gezeigt, für den ungelabelten vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) ausgeschlossen werden. Für die Untersuchungen wurden Pacific Blue DMPE-dotierte GUVs mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Größe und Tat-AF633 inkubiert. Als wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe kamen Alexa Fluor 488 (AF488) mit einer molaren Masse von 0,7 kDa und einem Durchmesser von etwa 1 nm und zwei Dextran-koppelte AF488-Farbstoffe (D3-AF488 mit einer Masse von 3 kDa und D10-AF488 mit einer Masse von 10 kDa), die einen Durchmesser von 2-3 nm bzw. 4 nm besitzen, zum Einsatz. Über die Größe der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe kann, wenn sie bei der Translokation von Tat-AF633 mit in den GUV eindringen, eine Aussage über den Durchmesser der entstandenen Löcher getroffen werden. Es wurden AF488-Farbstoffe verwendet, da diese keine spektrale Überschneidung (*crosstalk*) mit den anderen verwendeten Farbstoffen, AF633 und Pacific Blue DMPE, zeigen.

Abb. 4.47 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Zunächst wurden Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs in AF488-haltigem Puffer für 2 h mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 inkubiert (Abb. 4.47 oben). Anschließend wurde analysiert, wie viele GUVs mit Tat-AF633 gefüllt waren und in wie viele GUVs ebenfalls der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff AF488 eingedrungen war.

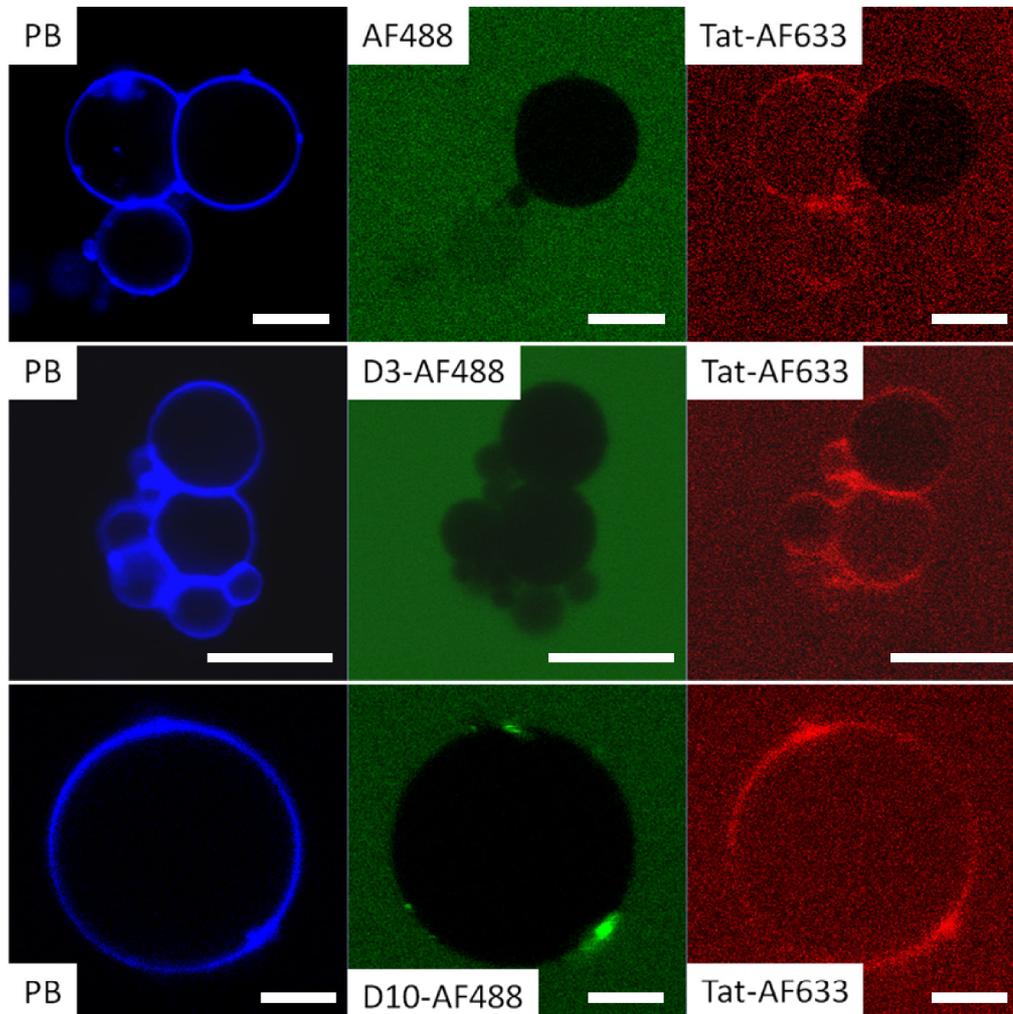


Abbildung 4.47: Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Oben: Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 in AF488-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$. Mitte: Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 in D3-AF488-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$. Unten: Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 in D10-AF488-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$. Gezeigt sind jeweils die PB-DMPE-, die AF488 und die Tat-AF633-Fluoreszenz.

Im Falle des recht kleinen Farbstoffs AF488 war in fast alle GUVs, in die Tat-AF633 eingetreten war, auch AF488 eingedrungen. Analoge Messungen in D3-AF488-haltigem Puffer und $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 führten zu einem anderen Ergebnis. Dies zeigt die mittlere konfokalmikroskopische Aufnahme aus Abb. 4.47. Wenige GUVs, in die Tat-AF633 eingedrungen ist, sind außerdem mit dem wasserlöslichen

Farbstoff D3-AF488 gefüllt. Wurde statt des 3 kDa-großen Farbstoffs ein 10 kDa-großer Farbstoff verwendet, wie im Fall von D10-AF488, so wurden nach zweistündiger Inkubation der POPC-GUVs mit Tat-AF633 kaum GUVs detektiert, die D10-AF488 enthielten, jedoch fand auch hier Translokation durch Tat-AF633 statt, ein Beispiel ist in der unteren konfokalmikroskopischen Aufnahme aus Abb. 4.47 dargestellt.

Abbildung 4.48 zeigt die prozentualen Anteile der POPC-GUVs, die mit Tat-AF633 und den wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffen AF488, D3-AF488 sowie D10-AF488 gefüllt waren. Zum Vergleich wurden die Blindprobe, welche mit freiem AF633-Farbstoff durchgeführt wurde, und die Ergebnisse, die mit 0,5 μM Tat-AF633 ohne zusätzlichen Fluoreszenzfarbstoff erhalten wurden, herangezogen. Für die Blindprobe wurde ein Anteil an GUVs, die mit AF633 gefüllt waren, von $(10 \pm 2)\%$ detektiert (Abb. 4.48 I). Tat-AF633 drang in $(56 \pm 11)\%$ der GUVs ein (Abb. 4.48 II). Es wird deutlich, dass wenn Tat-AF633 in POPC-GUVs eindringt, der nur 0,7 kDa große Farbstoff AF488 ebenfalls in die GUVs eindringen kann (Abb. 4.48 III). In Gegenwart von AF488 dringt Tat-AF633 in $(59 \pm 12)\%$ der GUVs ein, AF488 wird in $(48 \pm 11)\%$ der GUVs detektiert. Das deutet darauf hin, dass

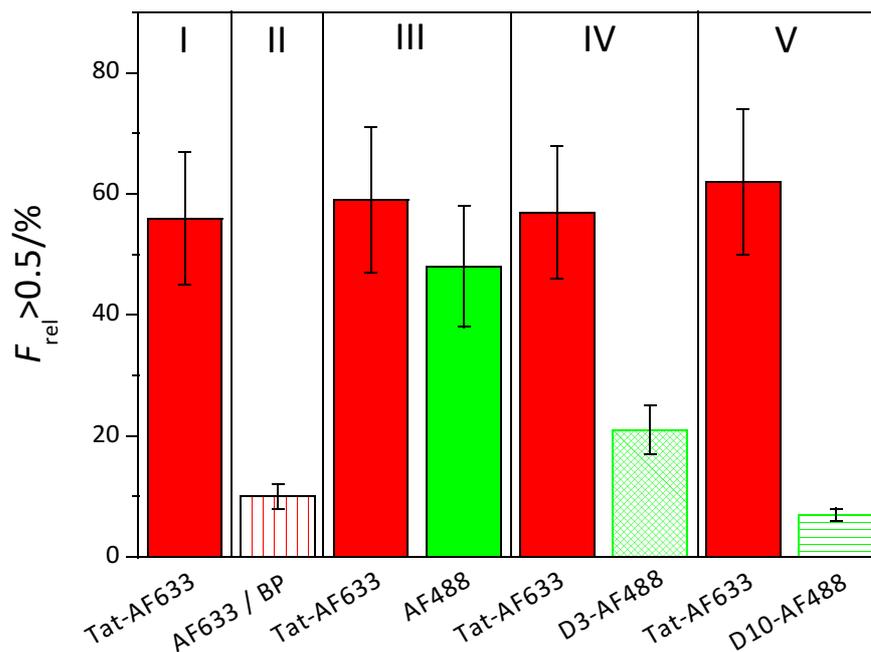


Abbildung 4.48: Prozentualer Anteil der GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren der GUVs für POPC-GUVs in NaCl-haltigem Puffer nach zweistündiger Inkubation mit I: 0,5 μM Tat-AF633 ($n = 309$), II: 14 μM freiem AF633-Farbstoff (Blindprobe) ($n = 217$), III: 0,5 μM Tat-AF633 (rot) in AF488-haltigem Puffer (grün) ($n = 126$), IV: 0,5 μM Tat-AF633 (rot) in D3-AF488-haltigem Puffer (grün) ($n = 182$) und V: 0,5 μM Tat-AF633 (rot) in D10-AF488-haltigem Puffer (grün) ($n = 92$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

bei der Translokation die Membran destabilisiert wird, so dass AF488 die Membran überqueren und in das Innere der GUVs vordringen kann. Der 3 kDa große Farbstoff D3-AF488 kann, wenn Tat-AF633 zugegen ist, noch in $(21 \pm 4)\%$ der GUVs eindringen, der 10 kDa großen Farbstoff D10-AF488 dringt

nur noch in $(7 \pm 1)\%$ der GUVs ein, während Tat-AF633 auch hier in etwa 60% der GUVs eintritt. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass Tat-AF633 sich deutlich anders verhält als der ungelabelte Wildtyp, der keinen Eintritt des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs Pyranin in POPC-GUVs verursachte. Pyranin wurde in den Experimenten mit Tat-AF633 an Pacific Blue DMPE-dotierten GUVs nicht verwendet, da Pyranin ebenfalls mit der Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ angeregt wird.

Weitere Auswertungen sollten klären, zu welchem Zeitpunkt während der Translokation von Tat-AF633 über Lipidmembranen die Farbstoffe AF488 (0,7 kDa) und D3-AF488 (3 kDa) die Membran überqueren. Dazu wurden, wie in Abb. 4.49 gezeigt, Intensitätsprofile konfokalmikroskopischer Aufnahmen von Pacific Blue DMPE-dotierten POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 in AF488-haltigem Puffer analysiert. Es ist sowohl aus der konfokalmikroskopischen Aufnahme als auch aus dem entsprechenden Intensitätsprofil zu erkennen, dass POPC-GUVs, die vollständig mit Tat-AF633 gefüllt sind, auch vollständig mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff

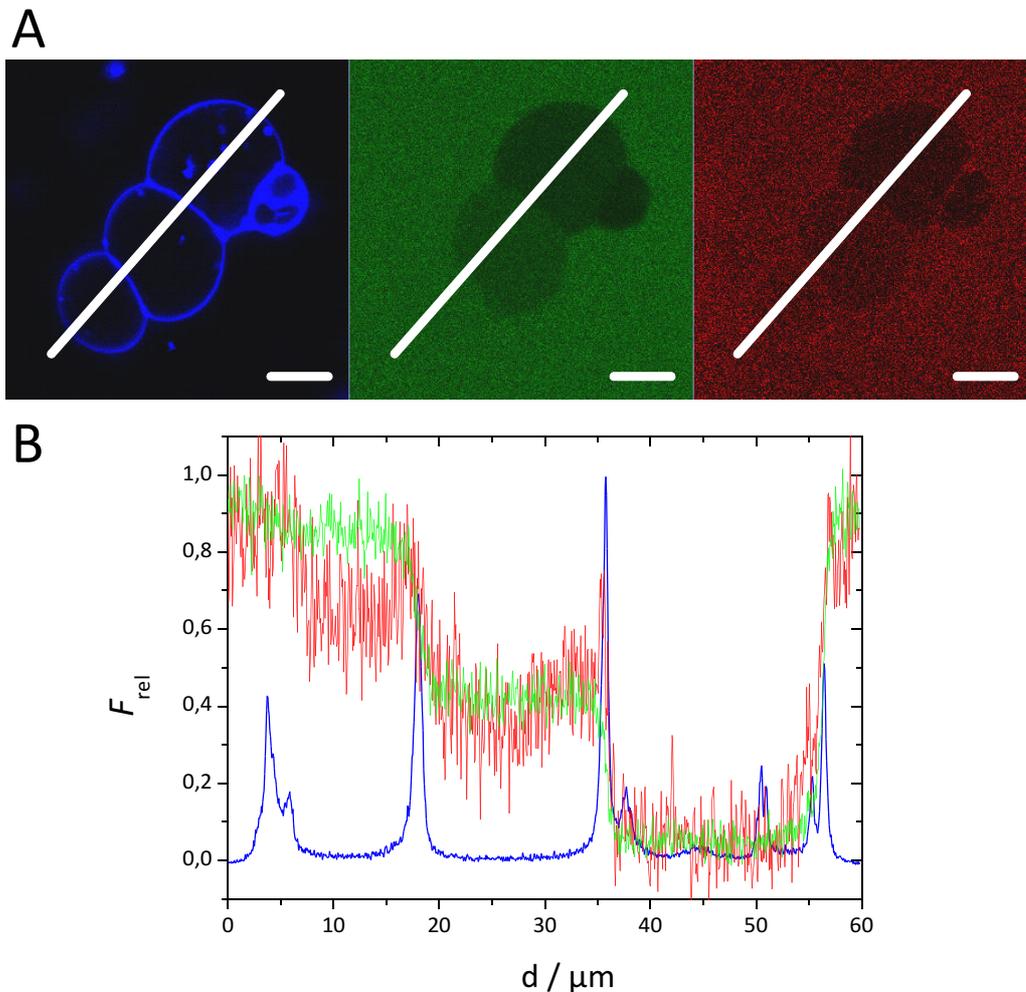


Abbildung 4.49: (A) Konfokalmikroskopische Aufnahme eines Pacific Blue DMPE-dotierten POPC-GUVs (blau) nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 (rot) in AF488-haltigem Puffer (grün). Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$ (B) Intensitätsprofil der relativen Fluoreszenzintensitäten der POPC-GUV-PB-DMPE-Fluoreszenz (blau), der Tat-AF633-Fluoreszenz (rot) und der AF488-Fluoreszenz (grün) entlang der weißen Linie aus (A).

AF488 gefüllt sind (unterer GUV Abb. 4.49 A, Profil: 5-20 μm). Ist die Translokation von Tat-AF633 in den POPC-GUV noch nicht abgeschlossen, so ist dieser GUV auch noch nicht vollständig mit AF488 gefüllt (mittlerer GUV Abb. 4.49 A, Profil: 20-35 μm). Ist Tat-AF633 noch nicht in den GUV eingedrungen, so ist dieser GUV auch nicht mit AF488 gefüllt (oberer GUV Abb. 4.49 A, Profil: 35-55 μm). Diese Profile lassen die Vermutung zu, dass die Translokation von Tat-AF633 und das Eindringen des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs AF488 simultan erfolgen.

Die gleiche Analyse wurde auch an den Daten der analogen Experimente mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff D3-AF488 mit einer molaren Masse von 3 kDa durchgeführt. Hierbei konnte eine Zeitserie herangezogen werden, die Aufschluss darüber gab, zu welchem Zeitpunkt D3-AF488 während der Wechselwirkung von Tat-AF633 mit POPC-GUVs in diese eindringen konnte (Abb. 4.50). Abb. 4.50 A zeigt POPC-GUVs zu Beginn der Inkubation mit 0,5 μM Tat-AF633 in D3-AF488-haltigem Puffer. Die konfokalmikroskopische Aufnahme und das dazugehörige Linienprofil der relativen

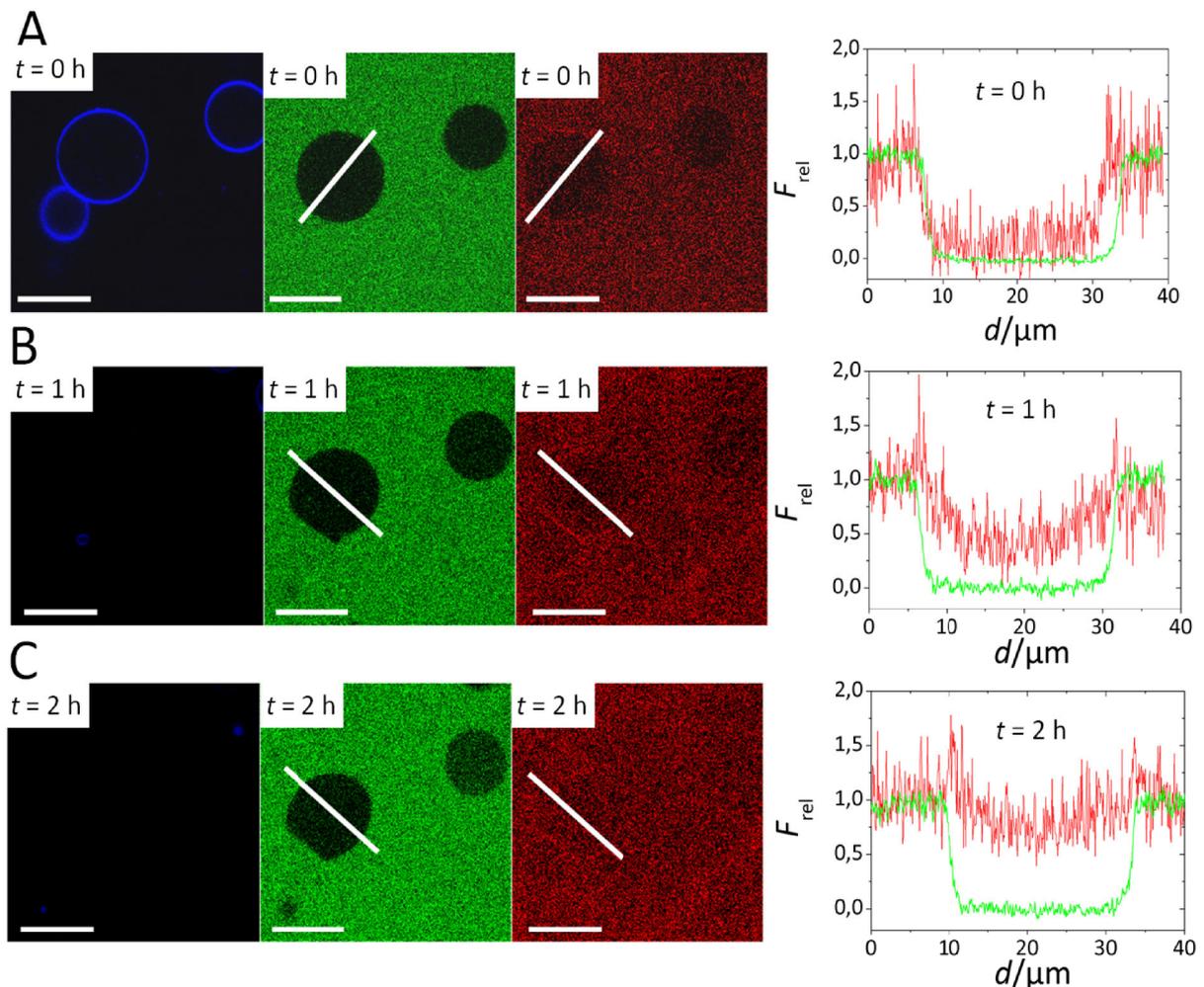


Abbildung 4.50: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Pacific Blue DMPE-dotierten POPC-GUVs (blau) während der Inkubation mit 0,5 μM Tat-AF633 (rot) in D3-AF488-haltigem Puffer (grün) zum Zeitpunkt $t = 0$ h (A), $t = 1$ h (B) und $t = 2$ h (C). Maßstabsbalken: 20 μm . Jeweils rechts: Intensitätsprofile entlang der weißen Linien. Rot: Tat-AF633, grün: D3-AF488. Die Fluoreszenzintensitäten sind jeweils auf die außerhalb der GUVs normiert.

4 Ergebnisse

Fluoreszenzintensitäten entlang der weißen Linie zeigen, dass sich sowohl Tat-AF633, als auch D3-AF488 nur außerhalb der GUVs befinden. Nach einer Stunde Inkubation (Abb. 4.50 B) hat Tat-AF633 bereits begonnen, in den POPC-GUV einzudringen, was sich in der ansteigenden Fluoreszenzintensität innerhalb des GUVs zeigt (siehe Intensitätsprofil). Der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff D3-AF488 ist weiterhin nur außerhalb des GUVs detektierbar. Nach zweistündiger Inkubation ist die Translokation von Tat-AF633 in den GUV abgeschlossen (Abb. 4.50 C). Die relative Fluoreszenzintensität innerhalb des GUVs beträgt annähernd 1, aber D3-AF488 konnte nicht in den GUV eindringen. Das spricht dafür, dass das Eindringen von D3-AF488, was zu etwa 20% stattfindet, nicht gleichzeitig mit der Tat-Translokation stattfindet.

Untersuchungen an POPS-haltigen GUVs

Um zu untersuchen, ob Tat-AF633 ebenfalls in der Lage ist, negativ geladene Membranen zu überqueren, wurden POPS-haltige GUVs mit Tat-AF633 inkubiert. Um auch hier zunächst die Stabilität der GUVs über 2 h zu gewährleisten, wurden Blindproben in NaCl-haltigem Puffer und in salzfreier Glukose-Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Stabilitätstests sind in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 4.51 gezeigt. Abb. 4.51 A1 und A2 zeigen POPC-POPS-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation in AF633-haltigem Puffer. Auch nach 2 h sind fast alle GUVs innen schwarz, also nicht gefüllt mit dem freien Farbstoff AF633. Dieser befindet sich nur außerhalb der GUVs (Abb. 4.51 A2). Das gleiche Ergebnis lieferten auch die Blindproben in Glukose. Wie aus Abb. 4.51 B1 und B2 ersichtlich wird, waren auch hier fast alle GUVs nach 2 h stabil und nicht mit AF633 gefüllt. Die Stabilität der POPS-haltigen GUVs gegenüber dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff AF633 konnte somit bestätigt werden. Eine Aggregation der GUVs konnte hier nur in geringem Umfang festgestellt werden, zu einer Verformung der GUVs kam es nicht.

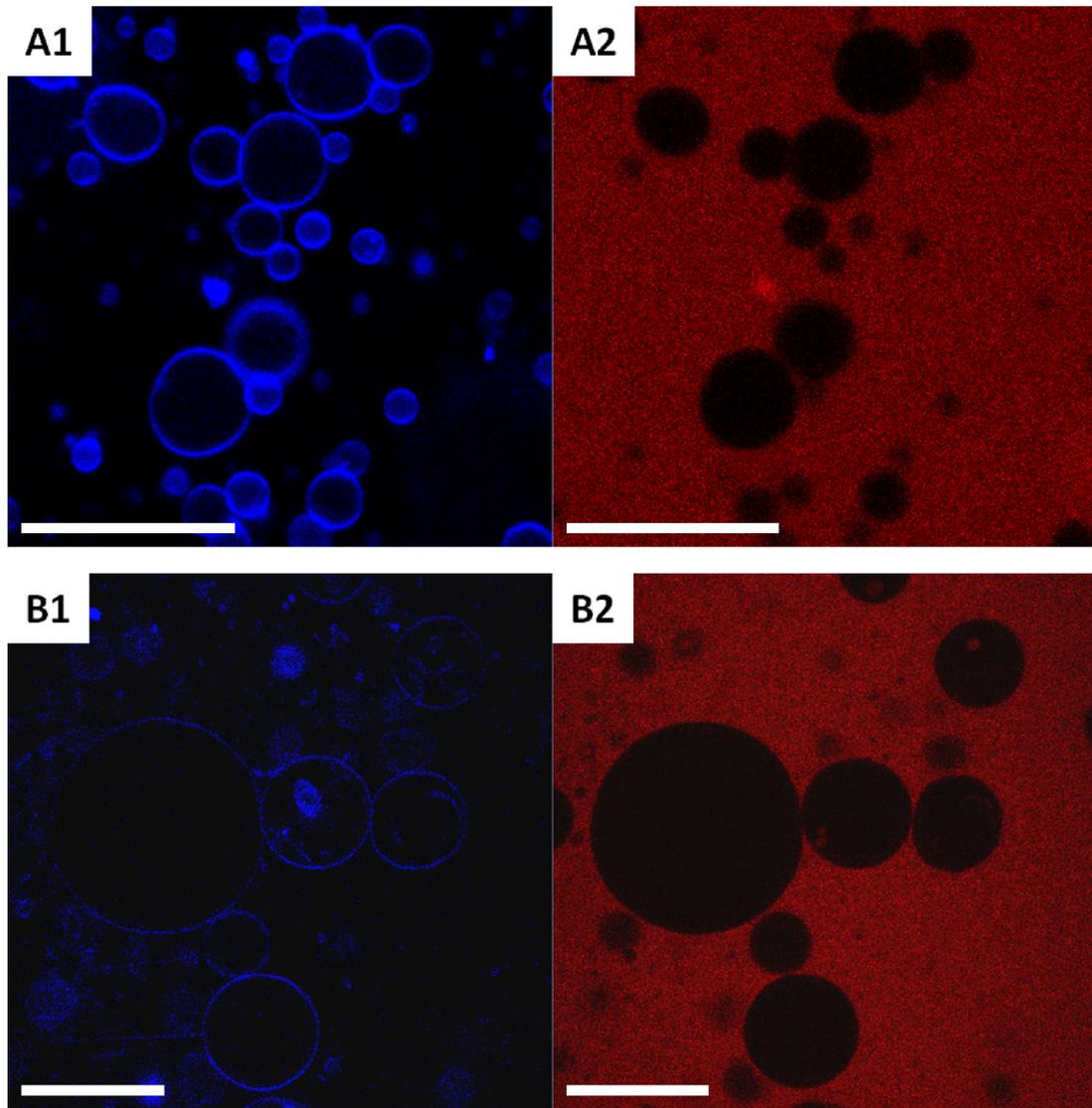


Abbildung 4.51: Konfokalmikroskopische Aufnahmen: (A1 und 2) Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-POPS-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation in AF633-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: 20 μm . (B1 und 2) Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-POPS-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation in AF633-haltiger Glukose-Lösung. Maßstabsbalken: 50 μm .

Nun konnte der Einfluss von Tat-AF633 auf POPS-haltige GUVs untersucht werden. Dazu wurden Pacific Blue DMPE-dotierte POPS-haltige GUVs mit 0,5 μM Tat-AF633 für 2 h inkubiert. Anschließend wurde analysiert, in wie viele GUVs eine Translokation von Tat-AF633 stattgefunden hat, also wie viele GUVs nach 2 h in ihrem Inneren eine höhere relative Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 als 0,5 hatten. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 4.52 zeigen die Ergebnisse, die mit Tat-AF633 an POPS-haltigen GUVs erhalten wurden. In NaCl-haltigem Puffer konnte auch hier eine Translokation von Tat-AF633 beobachtet werden, (65 ± 13)% der GUVs waren nach 2 h mit Tat-AF633 gefüllt. Abb. 4.52 zeigt außerdem, dass die POPS-haltigen GUVs auch nach Inkubation mit Tat-AF633 aggregiert und dadurch verformt sind.

4 Ergebnisse

In Glukose-Lösung dagegen wurde nur ein Anteil von $(13 \pm 3)\%$ GUVs detektiert, die nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 mit dem fluoreszenzmarkierten Protein gefüllt waren. Tat-AF633 war in Glukose-Lösung nach 2 h hauptsächlich außerhalb der GUVs zu finden (Abb. 4.52 B2). Auch eine Aggregation oder Verformung der GUVs wurde in Glukose-Lösung nicht beobachtet (Abb. 4.52 B1).

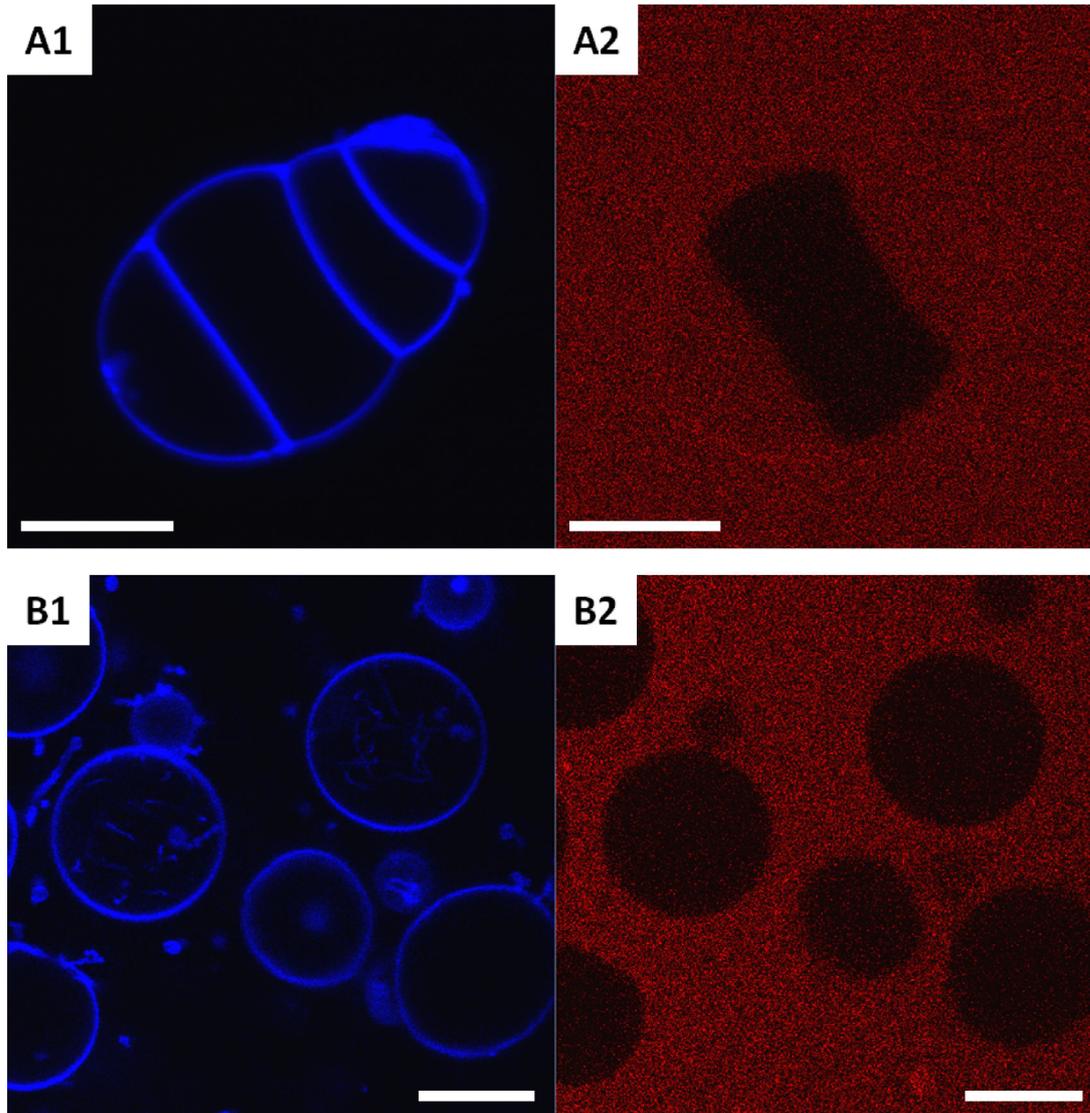


Abbildung 4.52: Konfokalmikroskopische Aufnahmen: (A1 und 2) Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-POPS-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation in mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 in NaCl-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$. (B1 und 2) Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-POPS-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 in salzfreier Glukose-Lösung. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

In Abb. 4.52 A2 konnte eine erhöhte Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 im Bereich der GUV-Membran kaum detektiert werden. Deutlich wurde eine erhöhte Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 erst bei hochaufgelösten Aufnahmen, von denen eine in Abb. 4.53 gezeigt ist. Die erhöhte Intensität der Tat-AF633-Fluoreszenz deutet auf eine Anreicherung des Proteins in der Membran hin. In

salzfreier Glukose-Lösung konnte auch im Falle der POPS-haltigen GUVs keine erhöhte Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 im Bereich der Lipiddoppelschicht beobachtet werden. Um die Anreicherung von Tat-AF633 in GUVs in negativ geladenen Membranen genauer analysieren zu können, wurden nach zweistündiger Inkubation dieser GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 hochaufgelöste (16-fach gemittelte) Aufnahmen gemacht, und diese anschließend mit dem Programm *ImageJ* anhand von Profillinien ausgewertet. Abb. 4.53 A zeigt ein Beispiel für eine solche hochaufgelöste Aufnahme, sie zeigt die Tat-AF633-Fluoreszenz, nachdem Tat-AF633 in den GUV eingedrungen ist. Es ist zu erkennen, dass im Bereich der GUV-Membran die Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 im Vergleich zur Intensität in der Umgebung erhöht ist. Daraus kann geschlossen werden, dass sich Tat-AF633 hier in der Membran angereichert hat. Dies wird zusätzlich aus dem Linienprofil aus Abb. 4.53 B ersichtlich, welches der weißen Linie in Abb. 4.53 A entspricht. Im Bereich der GUV-Membran kann die erhöhte Fluoreszenzintensität erkannt werden, diese konnte zu $F_{\text{rel}} = (1,2 \pm 0,2)$ bestimmt werden.

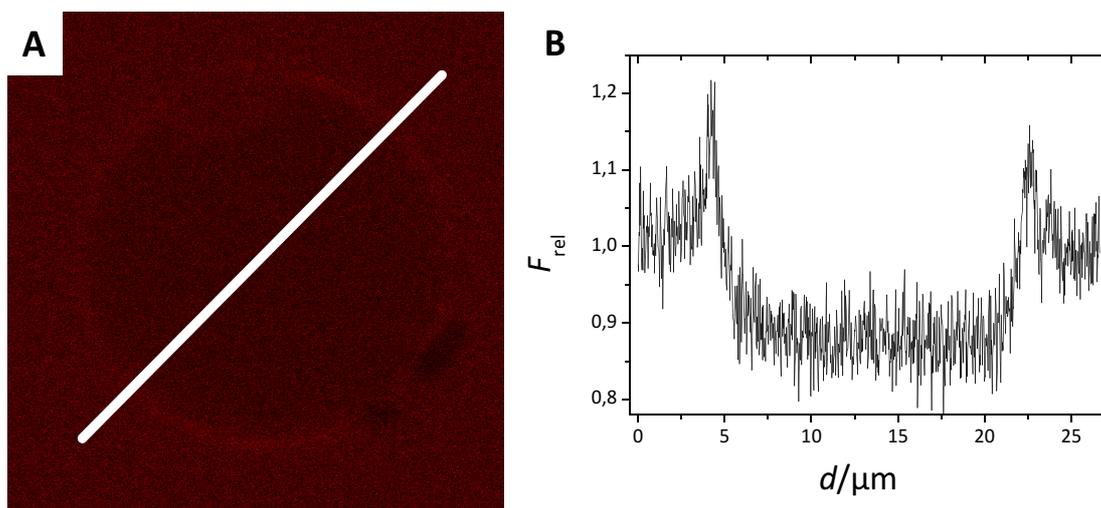


Abbildung 4.53: (A) Konfokalmikroskopische Aufnahme eines mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierten POPC-POPS-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633. Die Aufnahme zeigt nur die Tat-AF633-Fluoreszenz. (B) Intensitätsprofil der Tat-AF633-Fluoreszenz entlang der weißen Linie aus Abb. 4.53 A.

Um weiterhin zu klären, ob auch bei der Translokation von Tat-AF633 wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe durch die POPS-haltigen Membranen treten können, wurden die Messungen mit Tat-AF633 ebenfalls in Gegenwart von AF488, D3-AF488 und D10-AF488 durchgeführt. Hierfür wurden Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-POPS-(9:1)-GUVs in Gegenwart dieser Farbstoffe mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 für 2 h inkubiert und überprüft, wie viele GUVs anschließend mit Tat-AF633 und den entsprechenden Farbstoffen gefüllt waren. Es wurde der molare POPS-Anteil in der Membran auf 10% reduziert, um eine höhere Stabilität der GUVs zu erreichen. In analogen Messungen an GUVs, die 20% POPS enthielten, wurde beobachtet, dass der Großteil der GUVs während der Inkubation von 2 h platzte. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 4.54 A-C zeigen die Ergebnisse dieser

4 Ergebnisse

Untersuchungen. Zunächst wurde das Experiment in AF488-haltigem Puffer durchgeführt. Hier wurden hauptsächlich POPS-haltige GUVs erhalten, die entweder mit Tat-AF633 und AF488 gefüllt waren, oder völlig leer waren (Abb. 4.54 A). Tat-AF633 war in $(66 \pm 13)\%$ der GUVs eingedrungen, AF488 in $(44 \pm 9)\%$ der GUVs. Die Translokation von Tat-AF633 schien also die GUV-Membranen so zu destabilisieren, dass der Farbstoff AF488 mit in die GUVs eindringen konnte. Nach der Inkubation von Pacific Blue DMPE-dotierten POPC-POPS-(9:1)-GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 in D3-AF488-haltigem Puffer wurde ein anderes Ergebnis erhalten. Wie Abb. 4.54 B zeigt, wurden sowohl GUVs gefunden, die Tat-AF633 und D3-AF488 enthielten, als auch GUVs, in die Tat-AF633 eingedrungen war, die aber nicht mit D3-AF488 gefüllt waren. Der Anteil an GUVs, in die D3-AF488 eingetreten war, lag hier bei $(33 \pm 7)\%$, Tat-AF633 war in $(62 \pm 12)\%$ der GUVs eingedrungen. Wurden diese Untersuchungen in D10-AF488-haltigem Puffer durchgeführt, so wurden $(48 \pm 10)\%$ GUVs detektiert, in die Tat-AF633 eingetreten war. Der Farbstoff D10-AF488 selbst war nur in $(21 \pm 4)\%$ der GUVs zu finden (Abb. 4.54 C).

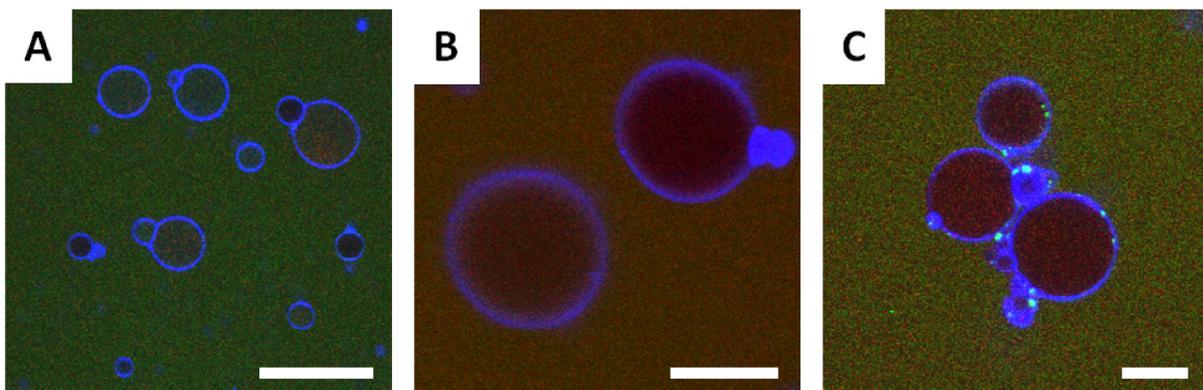


Abbildung 4.54: Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Mit $0,1 \text{ mol}\%$ Pacific Blue DMPE-dotierte POPC-POPS-(9:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 in AF488-haltigem Puffer (A), in D3-AF488-haltigem Puffer (B) und in D10-AF488-haltigem Puffer (C). Overlay der Pacific Blue DMPE-, der AF488- und der Tat-AF633-Fluoreszenz. Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$.

Insgesamt scheint die Translokation von Tat-AF633 zu einer Destabilisierung der POPS-haltigen GUV-Membranen zu führen, so dass Farbstoffmoleküle diese passieren können. Abb. 4.55 zeigt die prozentualen Anteile an GUVs, die jeweils mit Tat-AF633 und den verschiedenen AF488-Farbstoffen gefüllt waren. Es wird deutlich, dass es im Fall von POPS-haltigen GUVs zu einem großen Anteil an GUVs kommt, in die Tat-AF633 eingedrungen ist (Abb. 4.55 I). Der Anteil liegt bei $(80 \pm 16)\%$ im Vergleich zur Blindprobe mit freiem AF633 mit $(10 \pm 2)\%$ gefüllten GUVs (Abb. 4.559 II). Des Weiteren zeigt die Graphik, dass bei der Translokation von Tat-AF633 in die POPS-haltigen GUVs der Farbstoff AF488 in die GUVs eindringen kann, der Anteil an mit AF488-gefüllten GUVs beträgt $(44 \pm 9)\%$ (Abb. 4.55 III). Die größeren Farbstoffe dagegen gelangen nur zu einem geringeren Teil in das Innere der GUVs. D3-AF488 war nach 2 h in $(33 \pm 7)\%$ der GUVs zu finden (Abb. 4.55 IV), D10-AF488 in nur

(21 ± 4)% der GUVs (Abb. 4.55 V). Das lässt darauf schließen, dass die Defekte, die bei der Destabilisierung durch die Translokation von Tat-AF633 gebildet werden, einen maximalen Durchmesser von 4 nm besitzen.¹⁰⁵ In Gegenwart der wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffe war der Anteil an GUVs, in die Tat-AF633 eingedrungen war, leicht vermindert. Während in Abwesenheit eines zusätzlichen Farbstoffs Tat-AF633 in (80 ± 16)% der GUVs eindrang, waren es in Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffs D10-AF488 nur noch (48 ± 10)%.

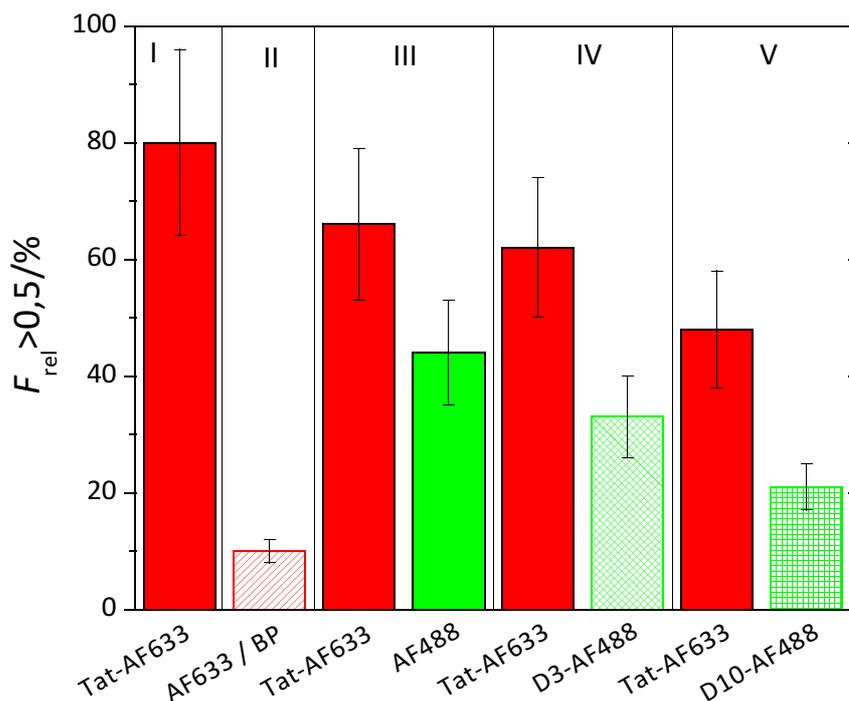


Abbildung 4.55: Prozentualer Anteil der GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren der GUVs für POPC-POPS-(9:1)-GUVs in NaCl-haltigem Puffer nach zweistündiger Inkubation mit I: $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 ($n = 127$), II: $14 \mu\text{M}$ freiem AF633-Farbstoff (Blindprobe) ($n = 112$), III: $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 (rot) in AF488-haltigem Puffer (grün) ($n = 107$), IV: $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 (rot) in D3-AF488-haltigem Puffer (grün) ($n = 133$) und V: $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 (rot) in D10-AF488-haltigem Puffer (grün) ($n = 81$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Untersuchungen an DOPE-haltigen GUVs

Um weiterhin den Einfluss des kegelförmigen Lipids DOPE auf die Translokation von Tat-AF633 in GUVs zu untersuchen, wurden ebenfalls DOPE-haltige GUVs mit Tat-AF633 inkubiert. Zunächst wurde aber auch hier überprüft, welchen Einfluss der freie Farbstoff AF633 auf die DOPE-haltigen GUVs hatte und ob die DOPE-haltigen GUVs in Puffer, aber auch salzfreier Glukose-Lösung über 2 h stabil waren. Die Ergebnisse dieser Stabilitätsmessungen sind in Abb. 4.56 dargestellt. Abb. 4.56 A1 und 2 zeigen konfokalmikroskopische Aufnahmen von Pacific Blue DMPE-dotierten DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit freiem AF633-Farbstoff in salzhaltiger Umgebung. Die Aufnahme

4 Ergebnisse

zeigt deutlich, dass nach 2 h der Farbstoff AF633 in $(27 \pm 5)\%$ der GUVs eingedrungen ist. Außerdem konnte eine erhöhte Fluoreszenzintensität von $F_{\text{rel}} = (1,5 \pm 0,3)$ des AF633-Farbstoffs im Bereich der GUV-Membranen, in die der Farbstoff eingedrungen war, beobachtet werden (Abb. 4.56 A2). In NaCl-haltigem Puffer kam es außerdem zu einer Zusammenlagerung und Verformung der GUVs (Abb. 4.56 A1). In salzfreier Glukose-Lösung konnte weder ein Eintritt des freien AF633-Farbstoffs in die GUVs noch eine erhöhte Fluoreszenzintensität des Farbstoffs in der Lipidmembran detektiert werden (Abb. 4.56 B1 und B2). Eine Aggregation der GUVs wurde ebenfalls nicht beobachtet. Bei der Untersuchung der Translokation von Tat-AF633 über Membranen DOPE-haltiger GUVs muss also berücksichtigt werden, dass bereits der freie Farbstoff AF633 in NaCl-haltigem Puffer zum Teil in die GUVs eindringt und sich in der Membran dieser GUVs anreichert.

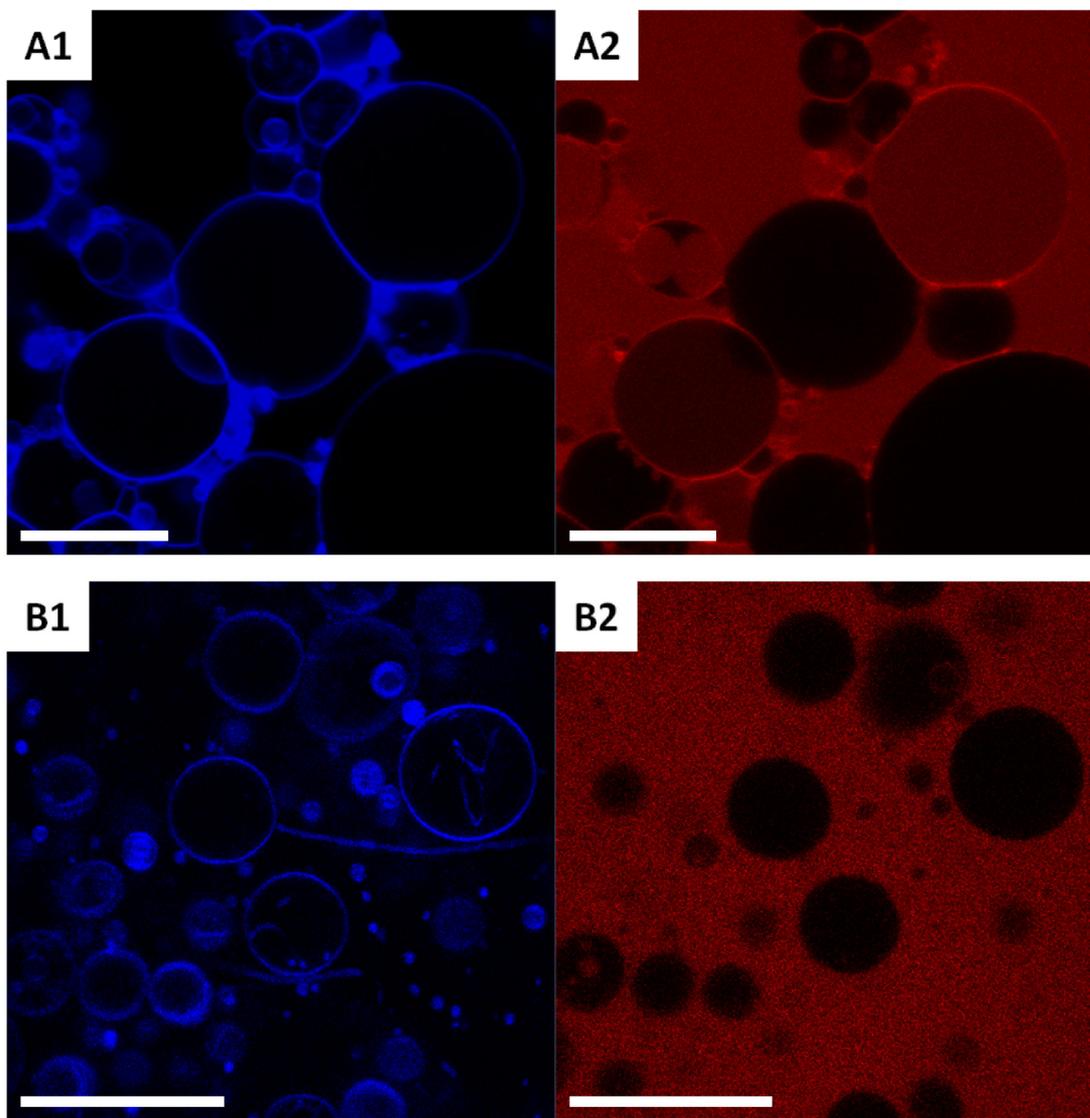


Abbildung 4.56: Konfokalmikroskopische Aufnahmen: (A1 und 2) Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation in AF633-haltigem Puffer. Maßstabsbalken: 20 μm . (B1 und 2) Mit 0,1 mol% Pacific Blue DMPE-dotierte DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs nach zweistündiger Inkubation in AF633-haltiger Glukose-Lösung. Maßstabsbalken: 50 μm .

4 Ergebnisse

Membran von $F_{\text{rel}} = (2,5 \pm 0,9)$ beobachtet, was vermuten lässt, dass eine starke Akkumulation von Tat-AF633 in der Lipiddoppelschicht der GUVs stattgefunden hat. Des Weiteren konnte nach der Inkubation mit Tat-AF633 eine Aggregation und Deformation der GUVs beobachtet werden. Ein ähnliches Ergebnis konnte nach der Inkubation in salzfreier Glukose-Lösung erhalten werden (Abb. 4.57 B1 und B2). Auch in salzfreier Umgebung konnte eine Translokation von Tat-AF633 in die DOPE-haltigen GUVs beobachtet werden, hier waren $(77 \pm 15)\%$ der GUVs nach 2 h mit Tat-AF633 gefüllt. Weiterhin konnte auch in Glukose-Lösung eine erhöhte Fluoreszenzintensität von Tat-AF633 von $F_{\text{rel}} = (1,6 \pm 0,2)$ im Bereich der DOPE-haltigen Membran beobachtet werden, diese deutet auf eine Akkumulation von Tat-AF633 in der GUV-Membran hin. Zu einer Aggregation der GUVs in Glukose-Lösung kam es jedoch nicht. In Abb. 4.58 werden die Ergebnisse mit Tat-AF633 an DOPE-haltigen GUVs denen der Blindproben mit AF633 gegenübergestellt.

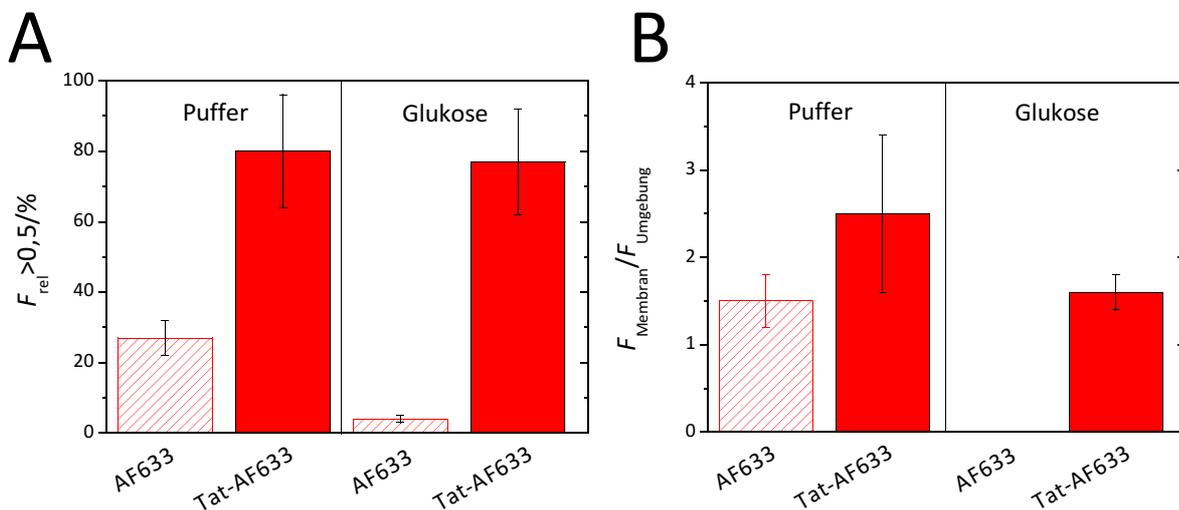


Abbildung 4.58: (A) Prozentualer Anteil der GUVs mit einer relativen Fluoreszenzintensität größer als 0,5 im Inneren der GUVs für DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs in NaCl-haltigem Puffer und in Glukose-Lösung. Vergleich der Blindproben mit freiem AF633 (schraffierte Balken) mit Messungen mit $0,5 \mu\text{M}$ Tat-AF633 (rote Balken). Puffer: $n_{\text{AF633}} = 265$, $n_{\text{Tat-AF633}} = 268$, Glukose: $n_{\text{AF633}} = 189$, $n_{\text{Tat-AF633}} = 234$. **(B)** Vergleich der Akkumulation von freiem AF633 und Tat-AF633 in der Lipidmembran von DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs nach 2 h Inkubation in NaCl-haltigem Puffer und Glukose. Angegeben ist die Fluoreszenzintensität von AF633 (schraffierte Balken) bzw. Tat-AF633 (rote Balken) in der Membranregion, normiert auf die entsprechende Intensität in der Umgebung. n : Anzahl an ausgewerteten GUVs. Puffer: $n_{\text{AF633}} = 14$, $n_{\text{Tat-AF633}} = 24$, Glukose: $n_{\text{AF633}} = 10$, $n_{\text{Tat-AF633}} = 20$. n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Abb. 4.58 A zeigt dabei die Anteile an GUVs, die mit freiem AF633 und Tat-AF633 gefüllt waren. Abb. 4.58 B zeigt die Ergebnisse bezüglich der Akkumulation von freiem AF633 und Tat-AF633 in den DOPE-haltigen Lipidmembranen. Es wird deutlich, dass Tat-AF633 auch in Abwesenheit von Ionen die Fähigkeit besitzt, DOPE-haltigen Membranen zu überqueren. Die Fähigkeit zur Translokation ist im Vergleich mit reinen POPC- oder POPS-haltigen Membranen verstärkt. Dies zeigt sich besonders darin, dass Tat-AF633 auch in salzfreier Glukose-Lösung in die DOPE-haltigen GUVs eindringen kann. Sowohl in Puffer als auch in Glukose kam es zu einer Translokation von Tat-AF633 in etwa 80% der GUVs.

Dabei wurden in Puffer allerdings $(27 \pm 5)\%$ GUVs detektiert, die den freien Farbstoff AF633 enthielten (Blindprobe). Der Anteil der GUVs, die in salzfreier Umgebung mit freiem AF633 gefüllt waren, lag bei nur $(4 \pm 0,8)\%$.

Die Analyse der Akkumulation von freiem AF633 und Tat-AF633 in den DOPE-haltigen Lipidmembranen zeigte, dass sich in salzhaltiger Umgebung der freie Farbstoff AF633 in der Membran anreicherte (Abb. 4.58 B), hier wurde eine auf die Umgebung normierte Fluoreszenzintensität von $(1,5 \pm 0,3)$ gefunden. Für Tat-AF633 wurde in NaCl-haltigem Puffer eine relative Fluoreszenzintensität im Bereich der GUV-Membran von $(2,5 \pm 0,9)$ ermittelt. Es konnte also ein Unterschied zwischen der Blindprobe und der Probe nach Proteininkubation gefunden werden. Allerdings muss bei den Ergebnissen mit Tat-AF633 eine große Streubreite und damit verbunden ein großer Fehler berücksichtigt werden. In salzfreier Umgebung konnte keine erhöhte Intensität des freien Farbstoffs AF633 im Bereich der DOPE-haltigen GUV-Membranen gefunden werden, was eine Anreicherung des Farbstoffs in den Membranen ausschließt. In NaCl-haltigem Puffer dagegen zeigte Tat-AF633 in der DOPE-haltigen Lipidmembranen eine erhöhte relative Fluoreszenzintensität von $(1,6 \pm 0,2)$. Dies beweist eine Akkumulation des Proteins in der Membran. Insgesamt konnte also festgestellt werden, dass der freie Farbstoff AF633 zwar selbst mit den DOPE-haltigen GUVs interagiert, jedoch konnte ebenso eine deutlich stärkere Wechselwirkung zwischen Tat-AF633 und den DOPE-haltigen GUVs beobachtet werden.

4.3.4 Ergebnisse der Untersuchung der Aggregation der GUVs

Bei den bisher gezeigten Untersuchungen zur Porenbildung und Translokation von Tat wurde festgestellt, dass die GUVs verschiedener Lipidzusammensetzungen unter dem Einfluss des vollständigen Wildtyps wt Tat (1-86) in salzhaltiger Umgebung aggregierten und sich dabei verformten. Diese Aggregation und Verformung sollte in einer weiteren Analyse näher betrachtet werden. Dazu wurde die Zirkularität C der GUVs nach zweistündiger Inkubation mit wt Tat (1-86) bestimmt und mit der der Blindproben, also nach zweistündiger Inkubation der GUVs in Proteinfreiem Puffer, verglichen. Mithilfe der Zirkularität kann beschrieben werden, wie rund ein Objekt ist. Ein Kreis besitzt die Zirkularität $C = 1$. Wird dieser Kreis deformiert, sinkt der Wert unter 1. Die Zirkularität wurde hier als Maß für die Aggregation mit einhergehender Verformung herangezogen. Die Zirkularität der GUVs wurde anhand von konfokalmikroskopischen Aufnahmen mittels des Programms *ImageJ* ermittelt. Dazu wurde der Umriss jedes einzelnen GUVs mit einem Zeichentool des Programms nachgezogen und die Zirkularität der nachgezogenen Form über das Programm mittels der folgenden Gleichung bestimmt.

$$C = 4\pi \cdot \frac{A}{U^2}$$

A ist dabei die Fläche und U der Umfang der Form.

Abb. 4.59 und 4.60 zeigen die Verteilung der Zirkularitäten von POPC-, POPS-haltigen, sowie DOPE-haltigen GUVs nach zweistündiger Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86) (rot) im Vergleich zu der Verteilung der Zirkularitäten der Blindproben (blau).

Es wird deutlich, dass sich die Zirkularitäten der POPC-GUVs nach Inkubation mit dem Protein zu kleineren Werten hin verschieben. Während für die Blindprobe der Hauptanteil der GUVs eine Zirkularität von etwa $C = 0,95$ besitzt, hat der größte Anteil der POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation mit wt Tat (1-86) eine Zirkularität zwischen $C = 0,75$ und $0,90$ (Abb. 4.59). DOPE-DOPE-(4:1)-GUVs hatten nach 2 h Inkubation in Puffer hauptsächlich eine Zirkularität zwischen $C = 0,95$ und $1,0$, nach Inkubation der GUVs mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) wurde eine sehr breite Verteilung der Zirkularitäten erhalten, die deutlich zu niedrigeren Werten verschoben war (Abb. 4.59 B). Für POPS-haltige GUVs wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten, nach zweistündiger Inkubation der POPS-haltigen GUVs in Puffer ohne Protein wurden hauptsächlich Zirkularitäten zwischen $C = 0,90$ und $1,0$ erhalten. Nach zweistündiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) waren die Zirkularitäten zu niedrigeren Werten hin verschoben. Der Hauptanteil der POPS-haltigen GUVs hatte nach Proteininkubation eine Zirkularität zwischen $C = 0,75$ und $0,90$ (Abb. 4.59 C).

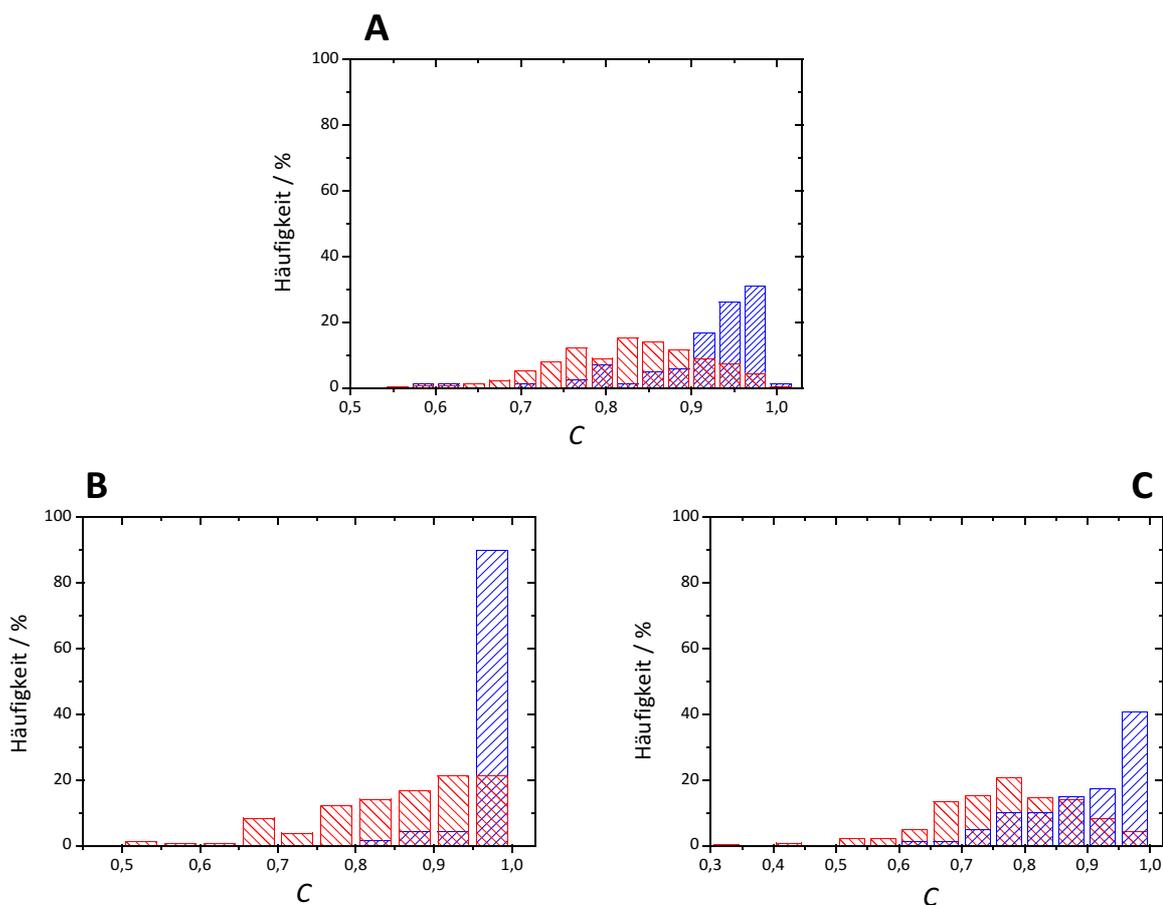


Abbildung 4.59: Zirkularität C als Maß für die Aggregation der GUVs unter Einfluss von wt Tat (1-86) in NaCl-haltigem Puffer. (A) Zirkularitäten der POPC-GUVs inkubiert für 2 h mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) (rot) ($n = 436$) im Vergleich mit denen der Blindprobe (blau) ($n = 84$). (B) Zirkularitäten der DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs inkubiert für 2 h mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) (rot) ($n = 156$) im Vergleich mit denen der Blindprobe (blau) ($n = 119$). (C) Zirkularitäten der POPC-POPS-(4:1)-GUVs inkubiert für 2 h mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) (rot) ($n = 253$) im Vergleich mit denen der Blindprobe (blau) ($n = 81$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Auch für die Messungen mit dem vollständigen Wildtyp in salzfreier Glukose-Lösung wurde die Zirkularität der GUVs für die Blindprobe und nach Proteininkubation bestimmt. Die Verteilung der Zirkularitäten für reine POPC-, DOPE-haltige und POPS-haltige GUVs sind in Abb. 4.60 dargestellt. Abb. 4.60 A zeigt die Verteilung der Werte für POPC-GUVs nach zweistündiger Inkubation der GUVs in Puffer ohne Proteinzugabe. Alle GUVs besaßen Zirkularitäten zwischen $C = 0,95$ und $1,0$. Nach Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) hatte der Hauptanteil der POPC-GUVs weiterhin eine Zirkularität zwischen $C = 0,95$ und $1,0$. Ähnliche Ergebnisse wurden für DOPE-haltige GUVs (Abb. 4.60 B) und POPS-haltige GUVs (Abb. 4.60 C) gefunden. Für die Blindproben wurden hauptsächlich Zirkularitäten zwischen $C = 0,95$ und $1,0$ ermittelt. Nach Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ wt Tat (1-86) war in beiden Fällen kaum eine Verschiebung zu niedrigeren Werten beobachtbar, der Effekt der Aggregation der GUVs durch Tat in salzfreier Umgebung war also nur sehr gering ausgeprägt.

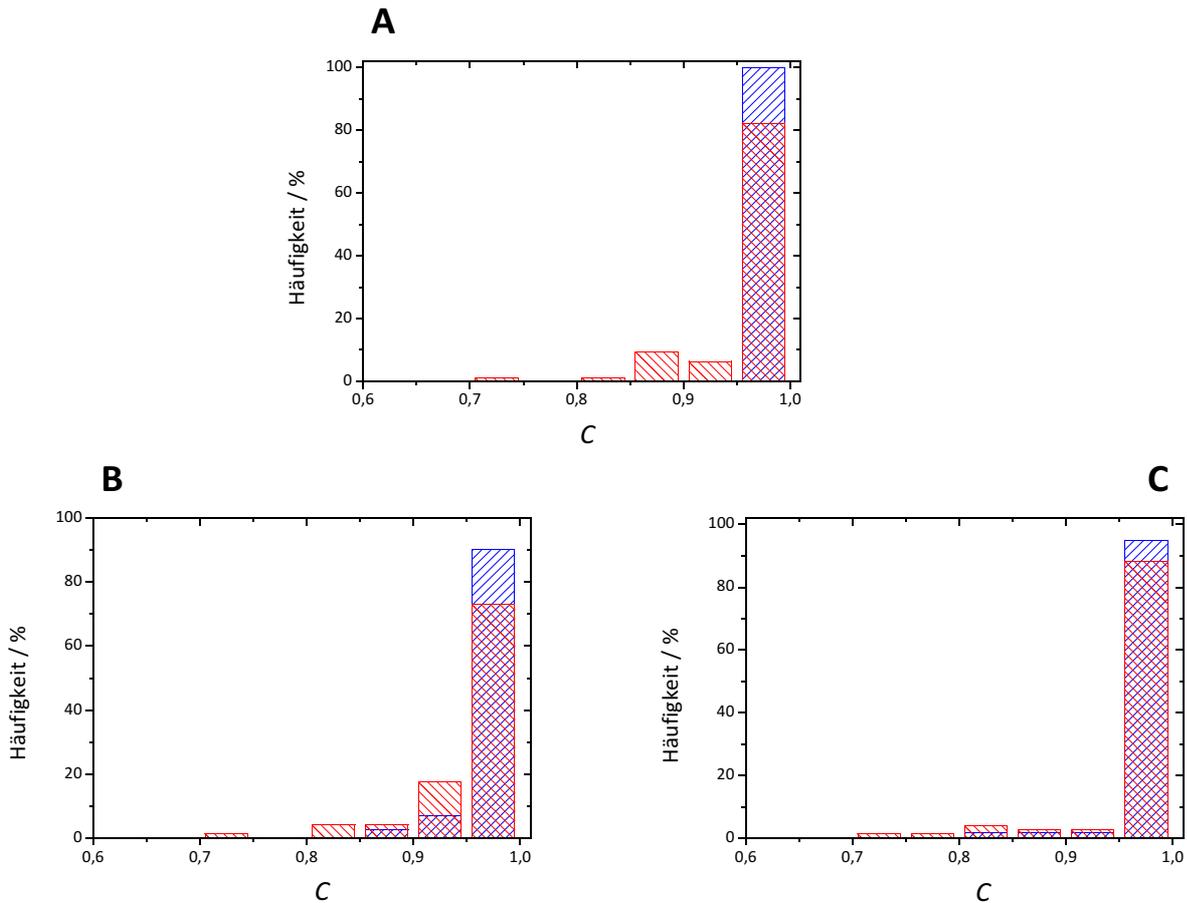


Abbildung 4.60: Zirkularität *C* als Maß für die Aggregation der GUVs unter Einfluss von wt Tat (1-86) in Glukose-Lösung. (A) Zirkularitäten der POPC-GUVs inkubiert für 2 h mit 0,5 μ M wt Tat (1-86) (rot) ($n = 96$) im Vergleich mit denen der Blindprobe (blau) ($n = 89$). (B) Zirkularitäten der DOPC-DOPE-(4:1)-GUVs inkubiert für 2 h mit 0,5 μ M wt Tat (1-86) (rot) ($n = 74$) im Vergleich mit denen der Blindprobe (blau) ($n = 71$). (C) Zirkularitäten der POPC-POPS-(4:1)-GUVs inkubiert für 2 h mit 0,5 μ M wt Tat (1-86) (rot) ($n = 77$) im Vergleich mit denen der Blindprobe (blau) ($n = 60$). n : Anzahl an ausgewerteten GUVs.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die Inkubation der GUVs verschiedener Zusammensetzungen mit dem vollständigen Wildtyp zu einer Aggregation und Verformung der GUVs führt, die sich in einer Verschiebung der Zirkularitäten der GUVs zu niedrigeren Werten hin äußert. Dieser Effekt ist in NaCl-haltigem Puffer deutlich zu erkennen, in Glukose-Lösung ist dieser Effekt nicht detektierbar.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Destabilisierung von planaren Lipidmembranen durch Tat

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie der vollständige Wildtyp von HIV-1 Tat (wt Tat (1-86)) und eine Mutante des Proteins mit verringertem Ladungscluster in der basischen Region des Proteins (Tat ARM-Ala) die Struktur von planaren, festkörperunterstützten Lipidmembranen beeinflusst. Es wurden neben zwitterionischen POPC-Membranen auch negativ geladene POPS-haltige Membranen verwendet. Es konnte mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie gezeigt werden, dass der vollständige Wildtyp wt Tat (1-86) nicht an Lipidmembranen bindet, sondern dass sich in seiner Gegenwart Defekte in festkörperunterstützten Lipidmembranen ausbildeten. Dies konnte sowohl bei reinen POPC-, als auch bei POPS-haltigen Membranen beobachtet werden. Der Grad der Defektbildung der Membranen war dabei abhängig von der Konzentration des Proteins, was eine Korrelation zwischen der Proteininkubation und der Defektbildung zeigt. Die Defektbildung wurde auf eine Destabilisierung der Membranstruktur zurückgeführt, die durch die Wechselwirkung mit dem Tat-Protein induziert wurde. Die Destabilisierung der Membran führte zu einer Dissoziation von Lipiden aus der Membran und damit zur Ausbildung von Defekten. Ein Einfluss der negativen Ladung der Kopfgruppe des Lipids POPS auf das Ausmaß der Destabilisierung der Membran, also den prozentualen Anteil der Membran, der Defekte aufwies, durch wt Tat (1-86) konnte nicht detektiert werden.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkung einer Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster, Tat ARM-Ala, mit festkörperunterstützten Lipidmembranen untersucht. Es konnte ebenfalls eine Defektbildung in den Membranen beobachtet werden, die jedoch deutlich schwächer war, als die, die durch den vollständigen Wildtyp verursacht wurde, so dass nach Inkubation mit Tat ARM-Ala ein geringerer Anteil der Membranen detektiert wurde, der Defekte aufwies.

Ähnliche Ergebnisse an festkörperunterstützten Membranen konnten auch nach der Inkubation mit dem Peptid Melittin erhalten werden, welches wie auch das Tat-Peptid (47-58) zu den *cell penetrating peptides* zählt.^{51,118} Mittels Rasterkraftmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Melittin Defekte in diesen planaren POPC-Membranen ausbildete. Eine SPR-Studie von Papo und Shai erbrachte vergleichbare Ergebnisse. Sie konnten zeigen, dass Melittin Poren in neutralen Membranen bestehend aus PC und Cholesterin im molaren Verhältnis von 10:1 ausbildet, in Gegenwart negativ geladener Membranen (PE:PG (7:3)) kommt es zunächst zu einer Bindung des Peptids an der Membran nach dem *carpet*-Mechanismus mit nachfolgender Zerstörung der Membran.⁵⁰ Melittin ist ebenfalls dafür bekannt, Poren in Vesikeln auszubilden, durch die Fluoreszenzfarbstoffe hindurch

treten können.^{42,45,49} Diese Eigenschaften wurden für das vollständige Tat-Protein wt Tat (1-86) jedoch nicht gefunden, was aufzeigt, dass die Wechselwirkung zwischen dem Tat-Protein und der Membran anderer Natur ist. Auch andere HIV-Proteine, wie das Protein Nef, können festkörperunterstützte Membranen destabilisieren. So störte Nef, welches im N-terminalen Bereich ein dem Melittin ähnliches Strukturelement besitzt, die Membranstruktur, was zu einer Herauslösung von Lipidmaterial aus POPC-Membranen führte. Nef führte weiterhin zum Austritt von Fluoreszenzfarbstoffen aus LUVs.¹¹⁹

Da das Tat-Peptid (47-58) den basischen Bereich des vollständigen Proteins darstellt, wurde zunächst vermutet, dass das Peptid und das Protein ein ähnliches Verhalten gegenüber Lipidmembranen zeigen. Allerdings müssen beim Vergleich des vollständigen Tat-Proteins mit Peptiden wie Melittin oder dem Tat-Peptid auch strukturelle Unterschiede beachtet werden. Die Arginin-reichen Peptide besitzen eine deutlich höhere Ladungsdichte, da sie bei gleicher Anzahl an positiven Ladungen wesentlich kürzer sind und besitzen oft, wie Melittin, eine α -helikale Struktur, die ihnen erlaubt, stabile, transmembrane Poren in Membranen zu bilden.¹²⁰⁻¹²² Das vollständige Tat-Protein besitzt zwar ebenfalls die basische, Arginin-reiche Region mit acht positiven Ladungen, jedoch außerdem hydrophobe Bereiche.²⁶ Die in dieser Arbeit durchgeführten CD-spektroskopischen Messungen beweisen, dass das Tat-Protein keine α -helikalen Strukturelemente aufweist und als vollständig ungeordnet angesehen werden kann. Dies wurde auch in anderen Studien untersucht, dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Tat sehr flexibel ist.^{16,28}

Die Bedeutung des positiven Ladungsclusters konnte durch die Reduktion der Ladung in der basischen Region des Tat-Proteins analysiert werden. Es zeigte sich, dass sich die Anzahl der gebildeten Defekte, also die Destabilisierung der Membran, dadurch verringerte. Dass eine Reduzierung der positiven Ladung in der basischen Region von Tat zu einer verminderten Wechselwirkung mit Membranen führt, fanden auch Vivès et al. heraus.¹²³ Sie untersuchten fluoreszenzmarkierte Tat-Peptide unterschiedlicher Länge und konnten zeigen, dass das Tat-Peptid Tat-37-53, welches nur noch fünf statt acht positive Ladungen enthält, nicht mehr in der Lage ist in HeLa-Zellen einzudringen. Alle anderen Tat-Peptide, Tat (48-60), Tat (43-60) und Tat (37-60), enthielten die vollständige basische Region mit acht positiven Ladungen und konnten innerhalb der untersuchten Zellen fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. In einer ähnlichen Studie zu einem Peptid, abgeleitet vom Antennapedia Homeodomain-Protein, welches auch zu den *cell penetrating peptides* gezählt wird, konnte von Derossi et al. gezeigt werden, dass die Reduktion der positiven Ladungen im Peptid von acht auf fünf dazu führt, dass das Peptid nicht mehr in Zellen eindringen kann.¹²⁴ Die zelluläre Plasmamembran enthält allerdings unter anderem auch negativ geladene Lipide, deren Einfluss berücksichtigt werden muss. Bezüglich der Destabilisierung von planaren Membranen konnte jedoch nur ein Einfluss des negativ geladenen Lipids POPS für die

Wechselwirkung der Tat-Mutante Tat ARM-Ala mit reduziertem Ladungscluster mit Membranen festgestellt werden. Wt Tat (1-86) induzierte Defekte ebenfalls in negativ geladenen Membranen. Tat ARM-Ala interagiert mit festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten, zeigte aber eine geringere Destabilisierung als der Wildtyp mit vollständiger basischer Region. Dabei war die Destabilisierung negativ geladener Membranen stärker als die neutraler Membranen. Es kann daher angenommen werden, dass die basische Domäne des Proteins eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung mit Lipidmembranen spielt, allerdings nicht die alleinige. Dies wird gestützt durch die Annahme, dass nicht nur elektrostatische Wechselwirkungen für die Destabilisierung der Membranen durch Tat verantwortlich sind.

Des Weiteren führte die reduzierte Gesamtladung des Proteins zu Materialablagerungen auf den Membranoberflächen. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um Protein-Lipid-Aggregate handelt, die sich nach Herauslösen von Lipidmaterial aus der Membran durch Tat ARM-Ala gebildet hatten. Für verschiedene *cell penetrating peptides* wurde eine Bindung an Lipide und Membranen beschrieben. Diese ist stärker ausgeprägt bei Membranen, die negativ geladene Lipide enthalten. Auch für das porenbildende Peptid Melittin wurden unterschiedliche Wechselwirkungen mit Membranen zwitterionischer Lipide und Membranen, die negativ geladene Lipide enthalten, gefunden. Seelig et al. konnten zeigen, dass Melittin an Membranen, die das negativ geladene Lipid PG (Phosphatidylglycerol) enthielten, bindet.¹²⁵ Das gleiche Ergebnis lieferte eine ESR-Studie.¹²⁶ Aus der Bindung an negativ geladene Membranen resultiert eine verminderte Fähigkeit des Peptids, Poren in diesen Membranen auszubilden. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Melittin durch die Bindung an negativ geladene Membranen elektrostatisch neutralisiert wurde. Ähnliches konnte auch von van den Bogaart et al. gezeigt werden.¹²⁷ In *Release*-Experimenten mit dem in LUVs eingeschlossenen wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Calcein führte Melittin nur im Fall von DOPC-LUVs zu einem Farbstoffaustritt. Aus LUVs, die das negativ geladene Lipid DOPG enthielten, konnte kein Austritt von Calcein beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten Popplewell et al. Sie beobachteten in Experimenten an SUVs (*small unilamellar vesicles*) keine lytische Aktivität von Melittin gegenüber negativ geladenen Membranen.⁴¹ Dies konnte auch für das Peptid Lacticin Q mittels SPR an LUVs gezeigt werden. Enthielten die LUVs das negativ geladene Lipid PG, war die Bindung des Peptids an die LUVs stärker, dies zeigte sich in einer langsameren Dissoziation des Peptids von negativ geladenen LUVs. Ebenso die Porenbildung durch Lacticin Q in negativ geladenen LUVs war stärker ausgeprägt, in *Release*-Experimenten konnte ein stärkerer und schnellerer Austritt des Fluoreszenzfarbstoff aus den Vesikeln beobachtet werden. Das Peptid Lacticin Q besteht aus 53 Aminosäuren und enthält sowohl basische, positiv geladene Aminosäuren, als auch hydrophobe Bereiche und ähnelt damit strukturell dem vollständigen Tat-Protein eher als den kurzen, fast ausschließlich aus basischen Aminosäuren bestehenden *cell penetrating peptides*.¹²⁸ Dies steht im Einklang mit den hier erhaltenen Ergebnissen.

Auf POPS-haltigen Membranen wurden nach Inkubation mit Tat ARM-Ala deutlich mehr Materialablagerungen gefunden. Durch die erhöhte negative Ladungsdichte an der Membranoberfläche kommt es zu einer stärkeren Haftung der gebildeten Aggregate aus Lipidmaterial und Tat ARM-Ala. Dass nach Inkubation mit dem vollständigen Wildtyp keine Materialablagerungen detektiert werden konnten, lässt den Schluss zu, dass die Destabilisierung nach einem anderen Mechanismus verläuft, und hierbei keine Protein-Lipid-Aggregate gebildet werden, die auf der Oberfläche der Membran haften. Die Reduktion der positiven Ladung im Tat-Protein führte also zu einer stärkeren Belegung der POPS-haltigen Membranen mit Material, also Membranen, die Lipide mit negativ geladener Kopfgruppe enthalten, im Vergleich zu neutralen Membranen, bestehend aus dem zwitterionischen Lipid POPC.

Trotz der geringeren Ladungsdichte besitzt Tat ARM-Ala keine signifikant höhere Hydrophobizität als der Wildtyp wt Tat (1-86) (Abb. 5.1). Die Graphik zeigt den Hydrophobizitätsplot für wt Tat (1-86) und Tat ARM-Ala nach Kyte und Doolittle, aufgetragen ist die Hydrophobizität gegen die Abfolge der Aminosäuren. Werte größer 0 zeigen hydrophobe Bereiche in den Proteinen an. Die beiden Proteine unterscheiden sich um drei positive Ladungen, so dass vermutet werden kann, dass bei der Interaktion mit Lipidmembranen elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle spielen.

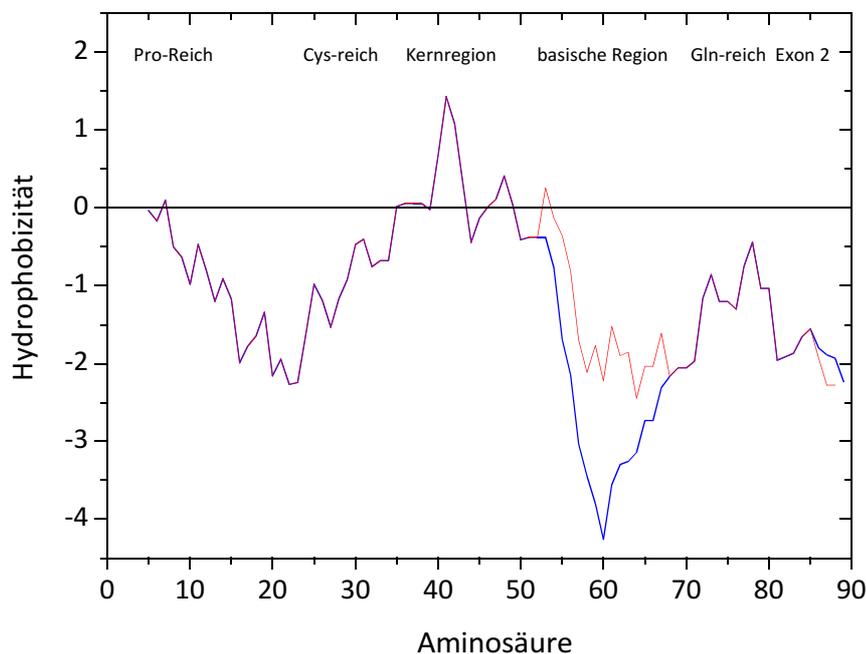


Abbildung 5.1: Hydrophobizitätsplot von wt Tat (1-86) (blau) und Tat ARM-Ala (rot) nach Kyte & Doolittle. Der Plot wurde mit ProtScale des ExPASy Proteomic Servers erstellt.

Bei der Betrachtung der elektrostatischen Wechselwirkung von den beiden Tat-Proteinen mit den POPS-haltigen Membranen müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Da der vollständige Wildtyp insgesamt acht positive Ladungen im basischen Bereich besitzt, kann angenommen werden,

dass dieser stärker mit den Membranen interagiert, was zu einer höheren lokalen Konzentration des Wildtyps auf der Membranoberfläche führt. Diese erhöhte lokale Konzentration könnte zu der verstärkten Destabilisierung durch den Wildtyp im Vergleich zur Mutante in den Membranen führen. Dagegen kann vermutet werden, dass die Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster Tat ARM-Ala aufgrund einer geringeren elektrostatischen Wechselwirkung mit POPS-haltigen Membranen eine größere Dynamik auf der Membranoberfläche besitzt, jedoch in einer geringeren lokalen Konzentration auf der Oberfläche zu finden ist, was wiederum die geringere Destabilisierung im Vergleich zum Wildtyp erklärt. Die stärkere Wechselwirkung von Tat ARM-Ala mit negativ geladenen Membranen im Vergleich zu neutralen Membranen spricht dafür, dass die Dynamik des Proteins auf der Oberfläche eine wichtige Rolle spielt.

Für das Tat-Peptid (47-57) konnten Ziegler et al. zeigen, dass das negativ geladene Lipid POPG den Austritt eines wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs aus Vesikeln verhindert, wohingegen aus reinen POPC-LUVs ein Austritt von Calcein durch Tat beobachtet werden konnte.¹²⁹ Dagegen beobachteten Ciobanasu et al., dass das fluoreszenzmarkierte Tat-Peptid nur in GUVs eindringen kann, wenn diese einen Anteil von negativ geladenem Lipid von 40% besitzen.²⁵ Hier scheint außerdem die Krümmung der Membran eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung zwischen dem Peptid und den Membranen zu spielen. Das Tat-Peptid schien nur in weniger gekrümmten Membranen Poren ausbilden zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des vollständigen Tat-Proteins und einer Mutante mit reduziertem Ladungscluster an planaren festkörperunterstützten Membranen untersucht, diese Membranen sind nicht gekrümmt, so dass der Aspekt der Membrankrümmung hier nicht zum Tragen kommt.

Ein wesentlicher Nachteil von festkörperunterstützten Membranen ist, dass kein zweites wässriges Kompartiment auf der anderen Seite der Membran zugänglich ist. So konnte in den Experimenten mit Tat an diesen Membranen beobachtet werden, dass sich Tat nach der Defektbildung in diesen auf der freigelegten Substratoberfläche befindet. Es wird angenommen, dass das Tat-Protein über seinen positiven Ladungscluster an die Siliziumdioxidoberfläche des Siliziumsubstrates unspezifisch binden kann. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Defektbildung durch den Festkörper unter der Membran hervorgerufen oder verstärkt wurde. Es kann vermutet werden, dass das Verbleiben des Proteins in den Defekten und die Bindung an den Festkörper eine Reorganisation der Membran verhindert, so dass ein Ausheilen der Defekte ausbleibt.

Um die Wechselwirkung von Tat mit Lipidmembranen, die von beiden Seiten zugänglich sind, untersuchen zu können, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit an Lipidvesikeln verschiedener Größe gearbeitet.

5.2 Diskussion der Interaktion von HIV-1 Tat mit Lipidvesikeln

Die Verwendung von Lipidvesikeln ermöglichte die Untersuchung von Membranen, die von zwei wässrigen Kompartimenten umgeben waren, so dass in verschiedenen Assays sowohl Porenbildung, als auch die Translokation von Tat in und über Lipidmembranen untersucht werden konnte. Es wurden Untersuchungen an Membranen verschiedener Lipidzusammensetzungen durchgeführt, um den Einfluss von Lipidstruktur und -ladung auf die Porenbildung und Translokation von Tat zu ermitteln.

5.2.1 Porenbildung durch Tat

Mithilfe von Experimenten an GUVs und LUVs wurde in dieser Arbeit untersucht, ob HIV-1 Tat in der Lage ist, Poren in Lipidmembranen auszubilden, durch die Fluoreszenzfarbstoffe Membranen passieren können und welches Strukturelement im Protein für diese Wechselwirkung wichtig ist. Hierfür wurden an GUVs verschiedener Lipidzusammensetzungen und an reinen POPC-LUVs Untersuchungen zur Porenbildung mit dem vollständigen Wildtyp wt Tat (1-86), dem verkürzten Wildtyp, dem 34 Aminosäuren im N-terminalen Bereich fehlen, und einer Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster durchgeführt. Um den Einfluss verschiedener Lipide auf die Protein-Membran-Wechselwirkung untersuchen zu können, kamen neben POPC unter anderem auch das negativ geladene Lipid POPS und das kegelförmige Lipid DOPE, welches eine Kopfgruppe mit deutlich kleinerem Radius besitzt,¹³⁰ zum Einsatz. Zur Evaluierung der Assays wurde Melittin, welches ein bekanntes Peptid mit porenbildenden Eigenschaften ist^{42,49}, herangezogen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass durch Melittin Poren in den POPC-Membranen gebildet wurden, durch die ein wasserlöslicher Fluoreszenzfarbstoff (hier Pyranin) in die GUVs eindringen konnte. Eine ähnlich starke Wechselwirkung mit POPC-GUVs konnte für den verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86) festgestellt werden, hier waren nach 2 h Inkubation mehr als 60% der GUVs mit Pyranin gefüllt, was darauf hindeutet, dass auch der kurze Wildtyp Poren in Lipidmembranen ausbildet. Die Tat-Mutante Tat ARM-Ala führte zu einem Anteil von gefüllten GUVs von 40%, so dass auch hier eine Wechselwirkung zu einem Farbstoffeintritt in die GUVs führte. Die Messungen zeigten deutlich, dass der vollständige Wildtyp des Tat-Proteins wt Tat (1-86) keine Poren in Lipidmembranen ausbildet. Es wurde also in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass das vollständige Tat-Protein keine Poren in Lipidmembranen ausbildet, jedoch aber der verkürzte Wildtyp, dem der N-terminale Bereich fehlt. Auch die Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster zeigte destabilisierende Effekte auf die Lipiddoppelschichten. In zusätzlichen Untersuchungen mit dem verkürzten Wildtyp, in denen statt des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs Pyranin, Dextran-gekoppelte Alexa Fluor-Farbstoffe mit

Molmassen von 3 und 10 kDa verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass die durch wt Tat (35-86) gebildeten Poren groß genug sind, dass das Protein selbst mit einer Molmasse von 6,2 kDa durch die Poren die Membran überqueren kann.

In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass das *cell penetrating peptide* Tat, welches aus 10-14 Aminosäuren besteht und sich von der basischen Region des Tat-Proteins ableitet, Poren in Lipidmembranen ausbildet und Membranen überqueren kann. So zeigten Ciobanasu et al., dass das Tat-Peptid Poren mit Durchmessern im Nanometerbereich in GUVs ausbildet, die das negativ geladene Lipid PS oder das kegelförmige Lipid PE, welches eine sehr kleine Kopfgruppe besitzt, enthalten.²⁵ Es kam durch das Tat-Peptid zu einem Austritt des Fluoreszenzfarbstoffs AF647 aus den GUVs, der eine molare Masse von etwa 1 kDa besitzt. Ein 3 kDa großer Dextran-gekoppelter Farbstoff trat in Gegenwart von Tat in einem nur geringen Umfang aus, im Falle eines Dextran-gekoppelten Farbstoffs mit einer molaren Masse von 70 kDa kam es nicht zu einem Austritt aus den GUVs. So konnte auf die Größe der gebildeten Poren geschlossen werden. Das Tat-Peptid war fluoreszenzmarkiert, so dass es nach Zugabe zu den GUVs auch innerhalb dieser detektiert werden konnte, was darauf hindeutet, dass es selbst durch die gebildeten Poren gelangen kann. Diese Untersuchungen wurden in Abwesenheit von Ionen, in Glukose-Lösung, durchgeführt, hierbei zeigte das Tat-Peptid nicht die Fähigkeit, auch in reinen POPC-Membranen Poren auszubilden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits 2008 von Mishra et al., veröffentlicht.²³ In einer Studie mit dem Tat-Peptid an GUVs konnten sie zeigen, dass das fluoreszenzmarkierte Peptid Poren in GUVs, die sowohl die Lipide PS, als auch PE enthielten, ausbildete und dabei eine negative Krümmung der Membran hervorrief. Diese induzierte Krümmung war notwendig für die Porenbildung und Überquerung der Membran. In weiteren Untersuchungen fanden Yang et al. heraus, dass das Tat-Peptid in Lipidvesikeln, die die Lipidzusammensetzung von späten Endosomen haben, die also das negativ geladene Lipid Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) enthalten, zu einem Austritt von Fluoreszenzfarbstoffen führt.²¹ In diesen Vesikeln induzierte das Tat-Peptid Fusion, was sich in *lipid mixing* äußerte, und destabilisierte die Membran während der Translokation ins Vesikelinnere. Auch in Studien an Zellen konnte gezeigt werden, dass das Tat-Peptid Membranen überqueren kann. Zellmembranen enthalten auf ihrer Innenseite negativ geladene Lipide wie PS. Thorén et al. fanden heraus, dass fluoreszenzmarkiertes Tat-Peptid in Zellen aufgenommen wird. Bei diesem Prozess spielten die Arginine im Tat-Peptid eine entscheidende Rolle. War ein Arginin durch ein Lysin ersetzt, so wurde das Tat-Peptid nicht mehr in den Zellen aufgenommen⁶⁸ Auch von Suzuki et al. konnte gezeigt werden, dass Arginin-reiche Peptide wie das Tat-Peptid von HeLa-Zellen aufgenommen werden.¹³¹ Die Gruppe um Cardoso konnte beweisen, dass der Eintritt des Tat-Peptids in Zellen nicht über Endozytose verläuft und die Zellmembran auch nicht beschädigt wird. Dies deutet auf eine Translokation des Peptids ohne Porenbildung hin.¹³² Von anderen Arbeitsgruppen wurde die Fähigkeit

des Tat-Peptids in Zellen einzudringen genutzt, um beispielsweise Proteine in Zellen zu transportieren.^{72,75} Auch Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von bis zu 340 nm können vom Tat-Peptid in Zellen eingebracht werden.^{76,133} Curnow et al. zeigten, dass das Tat-Peptid allerdings nicht in der Lage war, ein Protein mit einer molaren Masse von 25 kDa in GUVs einzuschleusen.¹¹⁷

Es konnte also bisher in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass das Tat-Peptid, bestehend aus 10-14 Aminosäuren, in der Lage ist, Poren in Lipiddoppelschichten von artifiziellen Membransystemen auszubilden und in Zellen aufgenommen zu werden. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass der verkürzte Wildtyp des Tat-Proteins, welchem der N-terminale Bereich fehlt und welches insgesamt nur aus 52 Aminosäuren besteht, ebenfalls Poren ausbilden kann, im Gegensatz zum vollständigen Wildtyp des Tat-Proteins, welches insgesamt aus 86 Aminosäuren besteht. Der N-terminale Bereich scheint eine entscheidende Rolle bezüglich der Wechselwirkung des Tat-Proteins mit Lipidmembranen zu spielen. Der N-terminale Bereich des Tat-Proteins enthält die Cystein-reiche Domäne, die in der Lage ist, ein Zinkfingermotiv auszubilden. Dieser Bereich des Proteins ist in Lösung ebenfalls ungeordnet, er kann aber in Gegenwart von Wechselwirkungspartnern des Proteins eine geordnete Struktur annehmen.¹⁶ Yezid et al. fanden heraus, dass das vollständige Tat-Protein in Monoschichten und Lipidmembranen von Vesikeln bei einem endosomalen pH-Wert (< 6,0) inseriert.¹³⁴ Die Fähigkeit zur Insertion führten sie auf das Tryptophan an Position 11 zurück. Anhand dieser Erkenntnis kann vermutet werden, dass auch der vollständige Wildtyp wt Tat (1-86) in der Lage ist, über das Tryptophan an Position 11 in die Membran zu inserieren. Dem verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86) fehlt dieses Tryptophan, so dass angenommen werden kann, dass wt Tat (35-86) nicht auf diese Weise in die Membran eindringen kann.

Insgesamt wird für die Wechselwirkung zwischen dem Tat-Peptid, und auch anderen Peptiden, die zu den *cell penetrating peptides* gezählt werden, und Lipidmembranen der Arginin-reiche Bereich verantwortlich gemacht. Besonders das auch in dieser Arbeit zur Evaluierung des Systems verwendete Peptid Melittin zeigt aufgrund seiner amphiphilen Struktur und seines basischen Bereichs am C-terminalen Ende porenbildende Eigenschaften gegenüber Lipiddoppelschichten. In vielen Studien wurde die Wechselwirkung von Melittin mit Lipidmembranen untersucht. In LUVs bildet Melittin transmembrane Poren aus, durch die Fluoreszenzfarbstoffe austreten können.^{40,42,45,46,48,49} Aber auch in GUVs führt die Inkubation mit Melittin zu Porenbildung und Zerstörung der Lipidmembranen.^{47,135} Auch andere Peptide mit lytischer Aktivität bilden Poren in Lipiddoppelschichten aus und führen so zum Austritt von Fluoreszenzfarbstoffen aus Lipidvesikeln verschiedener Größe. So verursachen die antibiotischen Peptide Maculatin, Citropin und Aurein die Freisetzung von Alexa Fluor 546 aus GUVs, was darauf schließen lässt, dass diese Peptide Poren in den GUV-Membranen ausbilden. In der Membranumgebung nehmen diese Peptide eine α -helicale

Struktur an, welche verantwortlich für die porenbildenden Eigenschaften zu sein scheint, denn diese Peptide stellen keine positiven Ladungscluster dar, da sie nicht Arginin-reich sind.¹³⁶ Ein weiteres bekanntes *cell penetrating peptide* ist Penetratin, dieses besitzt Arginine und Lysine und ist somit mehrfach positiv geladen. Es ist in der Lage, Poren in GUVs auszubilden, jedoch nicht in LUVs. Die Membrankrümmung scheint ein wichtiger Faktor zu sein, eine starke Krümmung, wie sie in LUVs zu finden ist, scheint das Durchtreten der Peptide durch die Membran zu verhindern.^{52,53} Weitere Studien an GUVs zeigten, dass auch das Peptid Magainin 2, welches zu den antimikrobiellen Peptiden gehört und ebenfalls Arginine besitzt, Poren in GUVs ausbildet, was zu einem Austritt des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein führt.^{137,138}

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Ladung in der basischen Region, zwar im Vergleich zum N-terminal gekürzten Wildtyp eine Verminderung der Porenbildung hervorruft, jedoch im Vergleich zum vollständigen Wildtyp eine stärkere Destabilisierung der Membran verursacht. Damit muss geschlossen werden, dass nicht allein die basische Region, und damit die Arginine für die Wechselwirkung des Tat-Proteins mit Lipidmembranen verantwortlich ist, sondern auch der N-terminale Bereich eine entscheidende Rolle spielt. Eine Studie von Vivès et al. zeigte dagegen, dass eine Reduktion der Ladung des basischen Bereichs beim Tat-Peptid Einfluss auf dessen Fähigkeit hat, in Zellen einzudringen.¹²³ Ein Tat-Peptid, welches nur noch fünf statt acht positive Ladungen besaß wurde nicht mehr in HeLa-Zellen aufgenommen. Da dem Tat-Peptid jedoch der N-terminale Bereich fehlt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser ebenfalls die Eigenschaften von Tat gegenüber Membranen beeinflusst.

Bei der Wechselwirkung der verschiedenen *cell penetrating peptides* mit Lipidmembranen spielt auch die Lipidzusammensetzung der Membranen eine Rolle. So ist Melittin nicht in der Lage, Poren in Membranen, die negativ geladene Lipide, wie PS oder PG enthalten, auszubilden. Im Falle der negativ geladenen Membranen findet eine stärkere Bindung des positiv geladenen Peptids Melittin an die Membran statt, es ist mehr Peptid pro Lipid gebunden, so dass Porenbildung verhindert oder reduziert wird.^{41,111,125,127} In einer Studie zu dem antimikrobiellen Peptid Lacticin Q wurde von Yoneyama et al. herausgefunden, dass negativ geladene Lipide in der Membran die Anbindung des Peptids und anschließende Porenbildung beschleunigen.¹²⁸

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit belegen, dass der verkürzte Wildtyp wt Tat (35-86) sowohl in POPS-haltigen GUVs als auch in reinen POPC-GUVs und DOPE-haltigen GUVs Poren ausgebildet. Nach zweistündiger Inkubation mit wt Tat (35-86) waren etwa 90% der POPS-haltigen GUVs mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff Pyranin gefüllt, dagegen waren nur etwa 60% der reinen POPC-GUVs mit Pyranin gefüllt. Da der kurze Wildtyp durch die basische Region einen positiven Ladungscluster besitzt, kann angenommen werden, dass es zwischen wt Tat (35-86) und POPS-haltigen Membranen zu einer elektrostatischen Wechselwirkung kommt. Allerdings scheint

diese elektrostatische Wechselwirkung keiner Bindung zu entsprechen, die eine Porenbildung verhindert. Im Gegenteil scheint diese elektrostatische Wechselwirkung die Bildung von Poren in den Lipiddoppelschichten zu unterstützen. Das negativ geladene Lipid könnte durch die elektrostatische Wechselwirkung mit wt Tat (35-86) die lokale Konzentration des Proteins an der Membranoberfläche erhöhen, so dass Porenbildung begünstigt wird.

Für DOPE-haltige Membranen wurde eine geringere Fähigkeit von wt Tat (35-86) gefunden, Poren auszubilden. Nach 2 h Inkubation der DOPE-haltigen GUVs mit wt Tat (35-86) waren nur etwa 40 % mit Pyranin gefüllt. DOPE ist ein kegelförmiges Lipid, welches eine vergleichsweise kleine Kopfgruppe besitzt, damit führt PE in der Membran zu einer verringerten Packungsdichte. Das Lipid PE bevorzugt positive Krümmungen in Membranen.¹³⁹ In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass das Lipid PE Poren in Membranen stabilisieren kann¹⁴⁰ und die Insertion von Proteinen in Membranen unterstützen kann.¹⁰⁸ Von van Klompenburg et al. wurde gezeigt, dass das Protein Lep (*leader peptidase*) in Monoschichten inseriert. Die Insertion fand bevorzugt in PE-haltigen Monolayern statt und wurde nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen dominiert. Für das Protein war eine hydrophobe Region essentiell für die Fähigkeit, in die Membran einzudringen.¹⁴¹ Eine weitere Studie über den Einfluss verschiedener Lipide auf die Insertion von Proteinen in Membranen zeigte, dass in Abwesenheit von PE die Translokation und Insertion von bakteriellen Proteinen in die Membran stark vermindert ist.¹⁴² Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Shintou et al., sie zeigten, dass sich Wassermoleküle in PE-haltigen Membranen einlagern können. Dies resultierte in einer Anbindung eines α -helicalen amphiphilen Peptids an die Lipiddoppelschicht.¹⁴³ Die Ergebnisse der genannten Studien würden vermuten lassen, dass auch wt Tat (35-86) besonders in PE-haltigen GUVs Poren ausbilden kann, da die Porenbildung durch das kegelförmige Lipid PE begünstigt und stabilisiert werden kann, dadurch dass sich Wassermoleküle in der Membran befinden, die das Eindringen von Proteinen erleichtern können. Jedoch wurde eine geringere Fähigkeit, Poren auszubilden, gefunden. Es kann vermutet werden, dass durch eine stärkere Bindung von wt Tat (35-86) in der Membran die Porenbildung erschwert wird. Ähnliche Ergebnisse für das Protein Bax wurden auch von Basañez et al. gefunden.¹⁴⁴ Das Protein Bax zeigte eine Bindung und Insertion in DOPE-haltige Membranen, die vergleichbar waren mit denen an Membranen anderer Zusammensetzungen. Es führte aber nicht zu einem Austritt des wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs ANTS aus Lipidvesikeln, die DOPE enthielten.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Porenbildung des verkürzten Wildtyps nur in Gegenwart von Ionen stattfindet. In Messungen an GUVs mit wt Tat (35-86) in salzfreier Glukose-Lösung wurde keine signifikante Porenbildung detektiert. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine Abschirmung der Ladungen der Lipidkopfgruppen die Porenbildung durch wt Tat (35-86) in der Membran begünstigt. Ist diese Abschirmung nicht mehr gegeben, könnte wt Tat (35-86) fest an die Membranoberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen gebunden

sein, so dass eine Porenbildung nicht mehr möglich ist. Hier scheint also auch die Dynamik des Proteins auf der Membranoberfläche eine entscheidende Rolle zu spielen. In Studien an GUVs mit dem Tat-Peptid, die ebenfalls in salzfreier Glukose-Lösung durchgeführt wurden, wurde einerseits gar keine Porenbildung, sondern nur ein „Schwimmen“ des Peptids auf der Oberfläche gefunden, und andererseits Porenbildung nur in GUV-Membranen, die PS oder PE enthielten.^{24,25} Auch auf andere Peptide der Gruppe der *cell penetrating peptides* hat die Gegenwart von Ionen einen Einfluss. So konnte beobachtet werden, dass das Peptid Pep-1 in physiologischer Umgebung keine Bindung an Lipidmodellmembranen zeigt. In salzfreier Umgebung jedoch wurde eine Assoziation des Peptids an die Membranoberfläche gefunden.¹⁴⁵ Dagegen wurde von Thorén et al. gezeigt, dass in salzhaltiger Umgebung (KCl-haltiger Puffer) fluoreszenzmarkierte Tat-Peptide in GUVs eindringen können.¹⁴⁶

Ein weiterer Aspekt, der einen Einfluss auf die Porenbildung von wt Tat (35-86) in Lipidmembranen hatte, war die Krümmung der Membranen, bzw. die Größe der untersuchten Lipidvesikel. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Porenbildung sowohl an POPC-GUVs, als auch POPC-LUVs durchgeführt. Letztere weisen aufgrund ihres deutlichen geringeren Durchmessers (Faktor = 100) eine wesentlich höhere Krümmung auf. In GUVs kam es zu einem deutlichen Farbstoffeintritt durch den verkürzten Wildtyp, in *Release*-Experimenten an LUVs konnte nur ein minimaler Austritt des Fluoreszenzfarbstoffs Carboxyfluorescein aus den LUVs nach Zugabe von wt Tat (35-86) beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass eine starke Membrankrümmung eine Porenbildung vermindert. Dies konnte auch in bereits veröffentlichten Studien für das Tat-Peptid und andere Peptide gezeigt werden. Die Gruppe um Nordén fand heraus, dass das Tat-Peptid keine Poren in LUVs mit Durchmessern im Bereich von 100 nm ausbildete, aber in GUVs, deren Durchmesser größer 1 µm waren.^{22,52} Für das Peptid Penetratin wurden von der gleichen Arbeitsgruppe ähnliche Ergebnisse erhalten.⁵³ Fluoreszenzmarkiertes Penetratin war in der Lage, in GUVs einzudringen, es wurden jedoch keine Poren in LUVs ausgebildet, was in einem *Release*-Experiment untersucht worden war. Die Insertion von Peptiden und Proteinen in die Lipidmembranen scheint ein wichtiger Schritt bei der Porenbildung bzw. Überquerung der Membranen zu sein. Diese ist favorisiert, wenn die Membran eine geringere Krümmung aufweist.

Für das Tat-Peptid wurde in Simulationsstudien ein Mechanismus für die Porenbildung in PC-Membranen beschrieben.^{147,148} Hecce und Garcia postulierten 2007 einen Mechanismus zur Translokation des Tat-Peptids über Lipiddoppelschichten bestehend aus DOPC (Abb. 5.2). Arginine und Lysine des Tat-Peptids (rot) binden an die Phosphatgruppen (gelb) der Lipidkopfgruppen der Membran, bevor das Peptid beginnt, in die Membran einzudringen. Bei erhöhter Konzentration an Tat-Peptid, beginnt dieses sich auf der Oberfläche lokal anzureichern und die Phosphatgruppen der Kopfgruppen aus beiden Monoschichten an sich zu ziehen. Infolgedessen wird die Lipiddoppelschicht dünner.

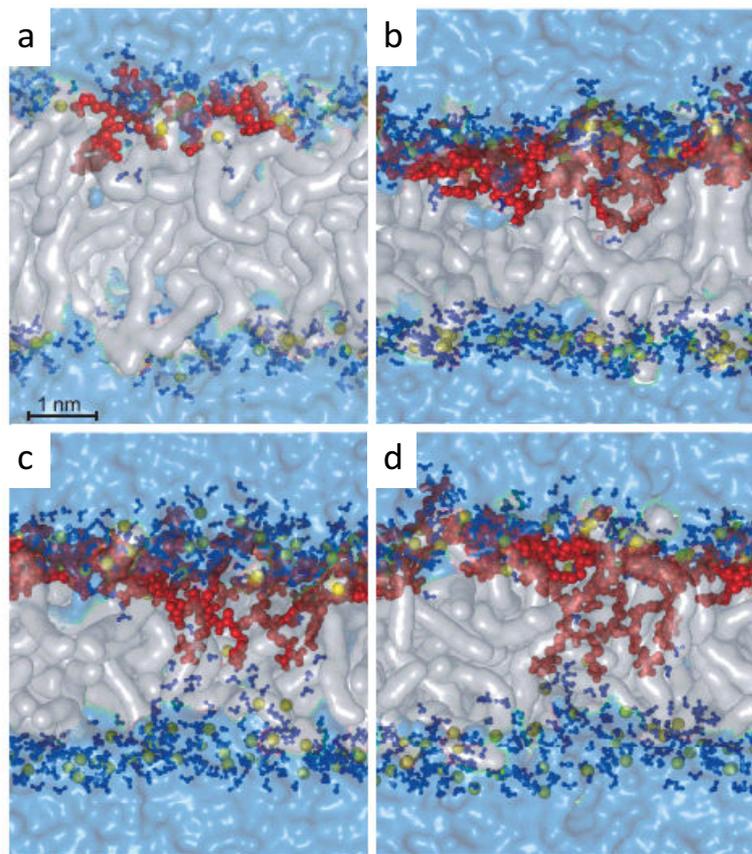


Abbildung 5.2: Simulation der Bindung und Translokation von Tat (47-57) an und durch eine DOPC-Membran nach Herce und Garcia.¹⁴⁷

Bei einem weiteren Eindringen des Tat-Peptids in die Membran konnten auch Wassermoleküle in die Membran gelangen. Anschließend wurde eine Pore gebildet, durch die das Tat-Peptid die Membran überqueren konnte. Bei der gebildeten Pore handelte es sich nicht um eine stabile Pore, wie für viele andere Vertreter der *cell penetrating peptides* angenommen, sondern um eine transiente Pore. Der Mechanismus für die Ausbildung von transienten Poren wurde auch für ein Peptid, bestehend aus neun Arginineinheiten postuliert.¹⁴⁹ Herce und Garcia berücksichtigten in ihrer Studie zu Tat nicht den Einfluss von Ionen in Lösung auf den Translokationsprozess. In einer anderen Simulationsstudie von Yesylevsky et al. wurden Mechanismen für die Wechselwirkung des Tat-Peptids mit Lipiddoppelschichten in An- und Abwesenheit von Gegenionen, hier Chloridionen, untersucht. In beiden Fällen wurde keine Fähigkeit des Tat-Peptids beobachtet, spontan in die Membran einzudringen und Poren auszubilden. Es wurde lediglich beobachtet, dass die Tat-Peptide sich auf der Membranoberfläche gleichmäßig verteilen und bewegen. Nachdem ein Potential appliziert wurde, konnte eine Deformation der Membran und Porenbildung durch das Tat-Peptid beobachtet werden.

Für andere Peptide, wie antimikrobielle Peptide oder Vertreter der *cell penetrating peptides*, werden im Wesentlichen zwei verschiedene Modelle zur Porenbildung diskutiert. Das *barrel-stave*-Modell beschreibt die Bildung einer stabilen transmembranen Poren, in der die Peptide in der Membran eine

Pore wie ein Fass auskleiden. Dabei zeigen die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Peptide in Richtung der Lipidseitenketten, also in das Membraninnere und die hydrophilen Bereiche der Peptide in Richtung der wassergefüllten Pore. Der *carpet*-Mechanismus beschreibt hingegen die Mizellierung der Membran durch ein Peptid. Dabei binden die Peptide zunächst an der Membranoberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen der Lipidkopfgruppen und akkumulieren dort. Die Peptide belegen die Membranoberfläche wie ein Teppich. Anschließend beginnen die Peptide in die Membran einzudringen, der Abbau der Membran folgt.^{63–65,150}

Da der verkürzte Wildtyp, wie in dieser Arbeit gezeigt, so große Poren bildet, dass selbst Farbstoffe mit einer molaren Masse von 10 kDa durch diese hindurch treten können, kann angenommen werden, dass es sich bei den gebildeten Poren um stabile Poren handelt, wie sie durch den *barrel-stave*-Mechanismus beschrieben werden, oder um eine Mizellierung der Membran nach dem *carpet*-Mechanismus.

Ob das vollständige Tat-Protein, welches keine Poren in Membranen ausbildet, die Membran über einen anderen Mechanismus trotzdem überqueren kann, wurde in weiteren Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem Tat-Protein untersucht und wird im folgenden diskutiert.

5.2.2 Translokation von Tat

Tat besitzt essentielle Funktionen bei der Verbreitung des HI-Virus, da es bereits in einem frühen Stadium in einer infizierten Zelle zugegen ist und die Produktion viraler RNA beschleunigen kann. Wäre das Protein in der Lage, Zellmembranen von Wirtszellen, zu überqueren, könnte es in noch nicht infizierte Zellen eindringen, und wäre bereits zugegen, wenn ein Viruspartikel die Zelle befällt. So würde von Beginn an die Transkriptionsrate stark erhöht werden, was eine schnellere Infizierung und Verbreitung des Virus im Körper zur Folge hätte. Um untersuchen zu können, ob Tat Membranen überqueren kann, auch ohne Poren in Membranen auszubilden, wurde in der vorliegenden Arbeit fluoreszenzmarkiertes Protein (Tat-AF633) verwendet.

Es konnte eine Translokation von Tat-AF633 in GUVs der Zusammensetzungen POPC, POPC/POPS (4:1) und DOPC/DOPE (4:1) beobachtet werden. Dabei wurde in salzhaltiger Umgebung kein signifikanter Einfluss der Lipide detektiert. Beachtet werden muss allerdings, dass im Fall von DOPE-haltigen GUVs bereits der freie Farbstoff AF633 in etwa ein Viertel der GUVs eindringen konnte und sich in der Membran anreicherte. Die Translokation von Tat-AF633 trat immer zusammen mit einer Anreicherung des fluoreszenzmarkierten Proteins in der Lipidmembran auf. Nur in Gegenwart von Ionen, konnte die Translokation von Tat-AF633 in reine POPC- und POPS-haltige GUVs beobachtet werden. In DOPE-haltige Vesikel konnte Tat-AF633 auch in salzfreier Glukose-Lösung eindringen, in

Abwesenheit von Ionen wurde also ein Einfluss des kegelförmigen Lipids DOPE, welches eine sehr kleine Kopfgruppe besitzt, beobachtet.

Bereits 1988 zeigten Green et al., dass das synthetisierte Tat-Protein, bestehend aus 86 Aminosäuren in Zellen aufgenommen wurde.¹⁵¹ Die Translokation des Tat-Peptids in Zellen wurde in verschiedenen Studien untersucht. Es wurde gezeigt, dass das Tat-Peptid (AS 48-60) in HeLa-Zellen sowie anderen Zelllinien aufgenommen wird.^{68,70,71,131,152} Dabei zeigte das Tat-Peptid ähnliche Eigenschaften gegenüber Zellen wie Oligoarginine. Die Bedeutung von Argininen für die Aufnahme in Zellen wurde von Mitchell et al. untersucht. Sie fanden heraus, dass Polyarginine wesentlich effizienter in Zellen aufgenommen werden, als Polylysine, die ebenfalls positive Ladungen besitzen.¹⁵³ Thorén et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss von Argininen in Tat- und Penetratin-Peptiden auf die Aufnahme in Zellen.⁶⁸ Dabei konnten sie zeigen, dass beide Peptide in deutlich geringerem Umfang in Zellen aufgenommen wurden, wenn alle Arginine durch Lysine ersetzt wurden. Chugh und Eudes zeigten, dass nur der Austausch eines Arginins durch ein Alanin zu einer verminderten Fähigkeit der Peptide führte, in Zellen einzudringen.¹⁵⁴ Dass die Aufnahme von Arginin-reichen Peptiden in Zellen nicht über den Mechanismus der Endozytose verläuft, wurde bewiesen. Das Tat-Peptid konnte auch in Zellen detektiert werden, wenn die Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose unterdrückt war.¹³² Die gleiche Studie zeigte aber auch, dass Tat in die Zellen eindrang, ohne die Zellmembran zu beschädigen, was darauf hin deutet, dass es die Membran nicht mittels Porenbildung überquert. Dies steht im Einklang mit den hier erhaltenen Ergebnissen für Tat-AF633 an GUVs, es konnte bewiesen werden, dass wt Tat (1-86) keine Poren bildet, fluoreszenzmarkiert war es aber trotzdem in der Lage GUV-Membranen zu überqueren.

Die Fähigkeit des Tat-Peptids (47-58), Zellmembranen überqueren zu können, wurde vielfach genutzt, um Makromoleküle oder Nanopartikel in Zellen einzuschleusen.^{60,72,76,133,155} Nach welchem Mechanismus das Tat-Peptid (48-57) und andere *cell penetrating peptides* in die Zellen eindringen, wird in der Literatur weiterhin diskutiert, allerdings deuten viele Studien auf einen Mechanismus hin, der unabhängig von Endozytose verläuft.^{156,157}

Zellmembranen bestehen aus verschiedenen Lipiden, darunter auch negativ geladene Lipide wie PS oder das Lipid PE, welches eine sehr kleine Kopfgruppe besitzt und in der Membran eine geringere Packungsdichte hervorruft. In Untersuchungen mit dem Tat-Peptid an Lipidmodellmembranen konnte auch festgestellt werden, dass sowohl negativ geladene Lipide, als auch PE eine wichtige Rolle für die Wechselwirkung zwischen Peptid und Lipiddoppelschicht spielen. So wurde nur ein Eindringen des Tat-Peptids in GUVs beobachtet, wenn die GUVs sowohl PS, als auch PE enthielten.^{23,25} In beiden Studien wurde die Translokation von Tat in die GUVs jedoch auf Bildung von Poren in der Lipidmembran zurückgeführt. Dieser Mechanismus wurde auch durch Simulationsstudien bestätigt. Es wurde postuliert, dass das Tat-Peptid eine mit Wasser gefüllte Pore in der Doppelschicht ausbildet,

durch die es die Membran durchqueren kann.¹⁴⁷ Curnow et al. zeigten, dass das fluoreszenzmarkierte Tat-Peptid (AS 48-60) in kleine GUVs mit einem Durchmesser von etwa 5 µm eindringen kann und sich in der Lipidmembran anreichert.¹¹⁷ Dies steht im Einklang mit den hier erhaltenen Ergebnissen. Auch das vollständige fluoreszenzmarkierte Tat-Protein zeigte Translokation über GUV-Membranen nur in Verbindung mit Akkumulation in der Lipiddoppelschicht. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Translokation von Tat-AF633 über die Membran erst erfolgt, wenn eine ausreichende lokale Proteinkonzentration an der Membranoberfläche vorhanden ist. Ein weiterer Hinweis für diese Annahme ist, dass die Translokation von Tat-AF633 erst nach 1 - 1,5 h stattfindet. Diese Verzögerungszeit kann dadurch zustande kommen, dass sich das Protein zunächst an der Membran anreichern muss. Bereits 2000 veröffentlichten Tosi et al. eine Studie, die belegt, dass Tat Oligomere bildet.¹⁵⁸ Des Weiteren wurde beobachtet, dass das vollständige Tat-Protein bei endosomalem pH-Wert ($\text{pH} < 6,0$) in Membranen inseriert. Hierfür wurde das hoch konservierte Tryptophan an Position 11 verantwortlich gemacht, welches ebenfalls in dem hier verwendeten wt Tat (1-86) enthalten ist.¹³⁴ Die Bildung von Oligomeren auf der Oberfläche und die Insertion des Proteins in die Membran führen letztlich zur beobachteten Akkumulation und Translokation, es handelt sich hierbei vermutlich um einen kooperativen Effekt. Dieser äußert sich darin, dass die Insertion des Tat-Proteins in der Membran dazu führt, dass weitere Tat-Proteine an die Membranoberfläche gelangen und Tat-Oligomere ausbilden. Diese sind dann fähig, die Membran zu überqueren. Die beobachtete Verzögerungszeit bis zur Translokation, die dann innerhalb von etwa 90 s abläuft, wurde auch in anderen Studien an *cell penetrating peptides* beobachtet. Yang et al. untersuchten Porenbildung durch das Tat-Peptid (AS 48-60) an Lipidvesikeln mithilfe von *Release*-Experimenten.²¹ Die Vesikel wurden für 30 Minuten mit dem Tat-Peptid inkubiert, bevor der Austritt des Fluoreszenzfarbstoffs beobachtet wurde. In einer weiteren Untersuchung an GUVs mit dem Tat-Peptid (AS 48-57) wurden die GUVs ebenfalls für 30 Minuten mit Tat inkubiert, bevor das Eindringen des fluoreszenzmarkierten Peptids in die GUVs konfokalmikroskopisch detektiert wurde.²⁵ Das heißt, auch für das Tat-Peptid kann angenommen werden, dass es sich zunächst auf der Membranoberfläche anreichern muss, bevor es Poren ausbilden kann. Auch hier könnte ein kooperativer Effekt vermutet werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Translokation von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Zum einen konnte eine Translokation von Tat-AF633 in POPC- und POPS-haltige GUVs nur in salzhaltiger Umgebung beobachtet werden, zum anderen zeigte sich, dass das Lipid DOPE die Translokation erleichterte und zudem auch in salzfreier Glukose-Lösung ermöglichte. Dass die Gegenwart von Ionen und damit die Abschirmung der Ladungen der Kopfgruppen der Lipide die Translokation begünstigt, weist darauf hin, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Membran bei der Translokation eine untergeordnete Rolle spielen. In verschiedenen Studien zur Translokation des Tat-Peptids wurden die Untersuchungen in verschiedenen Medien

durchgeführt. Während Experimente an Zellen ausschließlich in physiologischer Umgebung durchgeführt werden, können Untersuchungen an Modellsystemen auch in salzfreier Zuckerlösung vorgenommen werden. So zeigte das Tat-Peptid (48-57) in Untersuchungen in salzfreier Glukose-Lösung nur ein „Schwimmen“ auf der Membran und keine Translokation und Porenbildung in GUVs, die 15 mol% PS enthielten. Jedoch wurde die Bildung von Poren in GUVs, die einen molaren Anteil an negativ geladenem Lipid größer als 40% oder einen Anteil an PE größer als 20% besaßen, beobachtet.^{24,25} In physiologischem Puffer war die Porenbildung durch das Tat-Peptid stark verringert, was auf die Abschirmung der Ladungen der Kopfgruppen zurückgeführt wurde. Hier wurde also angenommen, dass die Wechselwirkung zwischen dem Tat-Peptid und der Membran hauptsächlich elektrostatischer Natur ist. In anderen Untersuchungen zum Tat-Peptid wurde in Gegenwart von NaCl oder KCl gearbeitet und Translokation von fluoreszenzmarkiertem Tat-Peptid beobachtet. Mishra et al. führten die Translokation des Rhodamin-markierten Tat-Peptids in GUVs auf Porenbildung zurück.²³ Thorén et al. zeigten, dass Carboxyfluorescein-markiertes Tat-Peptid in Gegenwart von KCl in GUVs, die neben PC auch 22% PE und 18% PI enthielten, eindringen konnte.¹⁴⁶ Hier verhinderte die Abschirmung der Ladung auf der Membranoberfläche nicht die Translokation.

Die Translokationsexperimente an GUVs mit Tat-AF633 zeigten weiterhin eine Abhängigkeit des Lipids DOPE. Durch DOPE wurde die Translokation und Akkumulation des Proteins in der Membran gefördert. Eine Abhängigkeit der Translokation des Tat-Peptids von der Lipidzusammensetzung der Membranen wurde in verschiedenen Studien beschrieben. So wurde von Ciobanasu et al. aber auch von Mishra et al. beschrieben, dass ein Übertreten des Tat-Peptids über die Membran nur in GUVs stattfindet, die die Lipide PE und PS enthalten.^{23,25} Eine Translokation in reine PC-GUVs konnte in diesen Studien nicht beobachtet werden. Hier zeigt sich ein entscheidender Unterschied zu den in dieser Arbeit mit dem vollständigen Tat-Protein erhaltenen Ergebnissen. Ein Einfluss des Lipids PE auf die Insertionsfähigkeit von Proteinen in Membranen ist literaturbekannt.¹⁴² Baumgärtner et al. zeigten, dass die Translokation des Proteins C Inhibitor (PCI) über Membranen durch die Anwesenheit des Lipids PE begünstigt wird.¹⁵⁹ PCI bildet keine Poren in Membranen aus, durch die Fluoreszenzfarbstoffe passieren können. Es führt jedoch zu minimalen strukturellen Veränderungen in der Membran, so dass Wasser in die Membran eindringen kann und das Protein die Membran über diesen wässrigen Bereich der Membran überqueren kann. Das Lipid PE unterstützt die Einlagerung von Wasser in die Membran und fördert so die Translokation von PCI über die Membran. Ähnliche Ergebnisse wurden von Shintou et al. veröffentlicht. Durch das Eindringen von Wassermolekülen in die Lipiddoppelschicht, bestehend aus POPC und DOPE, wurde die Insertion eines α -helicalen, amphiphilen Peptids in die Membran begünstigt.¹⁴³ Auch für andere Proteine wurde beschrieben, dass ihre Insertion in die Membran durch PE vermittelt wird. Das Protein Lep (*leader peptidase*) inseriert in PE-haltige Membranen. Dabei spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine

untergeordnete Rolle, für die Insertion ist vielmehr eine hydrophobe Region im Protein verantwortlich.¹⁴¹ In ähnlicher Weise kann man sich die Insertion des vollständigen Tat-Proteins vorstellen, welches ebenfalls hydrophobe Bereiche besitzt,²⁶ die am Translokationsprozess beteiligt zu sein scheinen. Da das negativ geladene Lipid POPS keinen Einfluss auf die Translokation des Proteins in die GUVs hatte, kann davon ausgegangen werden, dass elektrostatische Wechselwirkungen von Tat mit der Membran für die Translokation eine untergeordnete Rolle spielen.

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzmarkierung des Tat-Proteins einen Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins und damit auf die Wechselwirkung des Proteins mit Lipidmembranen hatte. So zeigte Tat-AF633 destabilisierende Effekte auf die GUV-Membranen, so dass Fluoreszenzfarbstoffe nach der Translokation des Proteins ebenfalls die Membran überqueren und in das Innere der GUVs eindringen konnten. In vielen Studien zur Translokation des Tat-Peptids wurde dieses fluoreszenzmarkiert verwendet.^{23,25,117,146} Es ist davon auszugehen, dass die Eigenschaften des Peptids, welches mit 10 - 14 Aminosäuren deutlich kleiner ist als das vollständige Protein mit 86 Aminosäuren, durch die Fluoreszenzmarkierung noch stärker beeinflusst werden. Die zusätzliche negative Ladung, aber auch das hydrophobe Ringsystem des angekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs kann die Struktur des Peptids, wie auch des Proteins verändern. Allerdings muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit das vollständige Protein über einen strukturell wichtigen Cystein-Rest fluoreszenzmarkiert wurde. Im Bereich der Cystein-reichen Region ist Tat in der Lage, ein Zinkfingermotiv zu bilden. Es ist möglich, dass die Fluoreszenzmarkierung diese Fähigkeit vermindert und daher die Struktur des Proteins beeinflusst. Es gibt bisher keine Untersuchungen zur Porenbildung an GUVs mit unmarkiertem Tat-Peptid. Die Porenbildung durch das Tat-Peptid in Membranen von LUVs wird diskutiert. Aus LUVs wurde einerseits Farbstoffaustritt durch das Tat-Peptid (48-57) induziert,²¹ andererseits konnte keine Porenbildung in LUVs beobachtet werden.¹²⁹ Aufgrund der Messungen dieser Arbeit am verkürzten Wildtyp des Tat-Proteins kann aber vermutet werden, dass auch das Tat-Peptid Poren in GUV-Membranen ausbildet, durch die Fluoreszenzfarbstoffe die Membran passieren können.

Die Verwendung von wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener Molmasse gaben in den Untersuchungen dieser Arbeit Aufschluss darüber, wie groß die Defekte in den GUV-Membranen waren, die durch Tat-AF633 gebildet wurden. Dabei wurde festgestellt, dass der Fluoreszenzfarbstoff D10-AF488 mit einer Molmasse von 10 kDa nicht mehr die Membran passieren konnte. Tat-AF633 selbst, mit einer Molmasse von 11,6 kDa, war in der Lage in die GUVs einzudringen. Dieses Ergebnis zeigt, dass Tat-AF633 die Membran nicht über die entstehenden Poren überquert, sondern die Porenbildung eine Folge der Destabilisierung der Membran durch die Translokation und Akkumulation des Proteins in der Membran ist und dass Tat-AF633 über einen anderen Mechanismus die Membran überqueren muss. Für einen Dextran-gekoppelten FITC-Farbstoff mit einer molaren

Masse von 9,4 kDa fanden Bohrer et al. einen hydrodynamischen Durchmesser von 4 nm.¹⁰⁵ Demnach müssten die Poren oder Defekte, die durch die Destabilisierung durch Tat-AF633 in den GUV-Membranen hervorgerufen werden, ebenfalls einen geringeren Durchmesser als 4 nm besitzen. Auch das Tat-Peptid bildet Poren, deren Durchmesser sich im Bereich von 1,3 - 2,0 nm bewegen.²⁵ Durch die Inkubation mit dem Tat-Peptid wurde der Austritt von Fluoreszenzfarbstoffen mit molaren Massen von 1,3 kDa und 3 kDa beobachtet. Es kann vermutet werden, dass das Tat-Peptid selbst mit einer molaren Masse von 2,2 kDa diese Poren nutzen kann, um die Membran zu überqueren. Das porenbildende Peptid Melittin induziert Poren in Membranen, die einen Durchmesser von 2 - 3 nm besitzen, so dass Farbstoffe wie Carboxyfluorescein mit einer Masse von 0,37 kDa und einem Durchmesser von etwa 1 nm durch diese hindurch treten können.^{106,160} Melittin selbst mit einer molaren Masse von 2,8 kDa sollte ebenfalls in der Lage sein, durch die gebildeten Poren Membranen zu passieren. Mithilfe des fluoreszenzmarkierten Tat-Proteins Tat-AF633 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Tat in der Lage ist, die Membran zu überqueren, auch ohne dafür Poren in der Membran zu nutzen. Für diese Eigenschaften gegenüber Membranen können verschiedene Strukturelemente im Protein verantwortlich gemacht werden. Zum einen ist, wie bereits für das Tat-Peptid und andere *cell penetrating peptides* beschrieben,^{19,161,162} die basische Region, die einen positiven Ladungscluster bildet, bedeutend für die Wechselwirkung mit Membranen. Allerdings wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass elektrostatische Wechselwirkungen, die auf die positiven Ladungen zurückgeführt werden, eine untergeordnete Rolle für die Translokation spielen. Zum anderen spielen hydrophobe Bereiche, insbesondere der N-Terminus des Tat-Proteins eine entscheidende Rolle bei der Translokation über Membranen. Für die Translokation benötigt das Tat-Protein eine gewisse lokale Konzentration auf der Membranoberfläche. Daher reichert sich das Protein an der Membran an, es kommt weiterhin zu Bildung von Tat-Oligomeren. Dies führt wiederum zu der beobachteten Akkumulation des Proteins in der Membran. Anschließend kommt es zur Translokation über die Membran. Bei diesem Prozess wird die Membran durch das fluoreszenzmarkierte Tat-Protein destabilisiert, so dass auch Farbstoffe mit einer molaren Masse bis zu 3 kDa die Membran passieren können.

5.2.3 Vesikelaggregation durch Tat

Die Experimente an GUVs mit wt Tat (1-86) zeigten, dass die zweistündige Inkubation mit dem Protein zu einer Aggregation mit einhergehender Deformation der GUVs führte. Als Maß für die Verformung der GUVs wurde die Zirkularität dieser nach zweistündiger Inkubation mit wt Tat (1-86) bestimmt und mit der der Blindprobe verglichen. Dabei zeigte sich, dass in salzhaltiger Umgebung die Zirkularitäten der GUVs nach Inkubation mit wt Tat (1-86) zu niedrigeren Werten hin verschoben waren. In salzfreier

Glukose-Lösung wurde keine Aggregation der GUVs, durch wt Tat (1-86) induziert, beobachtet.

Durch Peptide induzierte Vesikelaggregation wurde in mehreren Studien an LUVs untersucht. Als Maß für die Aggregation wurde die Trübung der Vesikellösung ermittelt. Persson et al. untersuchten die Aggregation von LUVs, die das negativ geladene Lipid DOPG enthielten, induziert durch das Peptid Penetratin. Sie fanden mittels Messungen der Trübung von Vesikellösungen heraus, dass Penetratin zu einer Aggregation der LUVs führte, dass es aber anschließend auch zu einer spontanen Disaggregation kam.¹⁶³ Eine andere Untersuchung kam zu dem Ergebnis, dass auch die Inkubation mit dem antimikrobiellen Peptid MSI-367 zur Aggregation von LUVs führt. Dieses Peptid besitzt neben positiv geladenen Lysinen auch aromatische Aminosäuren, mit denen es in die Membran insertieren kann und so zu einer Aggregation der Vesikel führt.¹⁶⁴ Auch das *cell penetrating peptide* Pep-1 zeigte in Untersuchungen an LUVs, die Fähigkeit, diese zu aggregieren.¹⁶⁵ Dabei war die Aggregation der LUVs etwas stärker ausgeprägt, wenn die Membranen negativ geladene Lipide wie POPG enthielten, die Aggregation fand aber auch bei reinen POPC-LUVs statt.

Lamazière et al. veröffentlichten 2007 eine Untersuchung von verschiedenen Arginin-reichen Peptiden. Darunter zeigten sowohl das Nonapeptid R9, welches aus neun Argininen besteht, als auch das Peptid pAntp die Fähigkeit, LUVs der molaren Zusammensetzung PC/PG (9:1) zu aggregieren. Des Weiteren wurde festgestellt, dass diese Peptide die Membranen von GUVs deformieren können.¹⁶⁶ Eine Studie zur Vesikelaggregation durch das Tat-Peptid²² zeigte, dass auch dieses Peptid zu einer Aggregation von LUVs führt. Allerdings wurde in dieser Studie nur eine Aggregation von PG-haltigen LUVs beschrieben. Die genannten Untersuchungen wurden jeweils in physiologischer Umgebung, also in Gegenwart von Ionen, durchgeführt. Die Simulationsstudie von Yesylevsky¹⁴⁸ kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass es unter dem Einfluss der untersuchten Peptide Penetratin und Tat zu einer Deformation der DPPC-Membran kommt. Die Aggregation von Membranen wurde in dieser Studie allerdings nicht näher analysiert. Aus der Literatur ist also bekannt, dass *cell penetrating peptides* in der Lage sind, Aggregation von Vesikeln und Verformungen von Membranen hervorzurufen. Dabei ist die Aggregation stärker ausgeprägt, wenn die Vesikelmembranen negativ geladene Lipide enthalten. Die untersuchten Peptide besitzen durch den hohen Argininanteil mehrere positive Ladungen, die die Aggregation der Vesikel durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorzurufen scheinen. Auch das vollständige Tat-Protein, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, besitzt mehrere positive Ladungen im basischen Bereich. Jedoch konnte hier keine verstärkte Aggregation von POPS-haltigen GUVs festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass auch hydrophobe Bereiche im Protein an der Wechselwirkung, die zu der Aggregation führt, beteiligt sind. Dies wurde auch von Yezid et al. gezeigt. Das Tryptophan an Position 11 des Tat-Proteins ist für die Insertion des Proteins in Membranen bei endosomalem pH-Wert verantwortlich.¹³⁴ Es wurde außerdem berichtet, dass Tat stabile Oligomere ausbilden kann.¹⁵⁸ Dies könnte im Zusammenspiel mit der Insertion in Membranen

dazu führen, dass sich Membranen über das Protein aneinander lagern, so dass eine Aggregation der GUVs beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass es unter dem Einfluss des vollständigen Tat-Proteins zu einer Aggregation und Deformation der GUVs kommt, die sich in einer Veränderung der Zirkularitäten der GUVs beschreiben lässt. Dieses Aggregationsverhalten des Tat-Proteins wurde in salzhaltiger Umgebung beobachtet, jedoch nicht in salzfreier Lösung, was bedeutet, dass die Ionen bei dieser Wechselwirkung eine entscheidende Rolle spielen. Werden die Ladungen der Lipidkopfgruppen an der Membranoberfläche durch Ionen, wie Cl^- , abgeschirmt sind, findet eine Aggregation statt. Es kann also ausgeschlossen werden, dass es durch eine Bindung des vollständigen Tat-Proteins an die Membranoberfläche zu dieser Aggregation kommt, vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die Insertion von wt Tat (1-86) in die Membran und die Bildung von Tat-Oligomeren letztlich zu einer Aggregation der Membranen führt. Dafür spricht auch, dass das negativ geladene Lipid keinen Einfluss auf die Wechselwirkung hat. Hier scheint außerdem die Dynamik des Proteins auf der Oberfläche der Membran ein wichtiger Faktor für die Wechselwirkung zwischen dem Tat-Protein und den GUV-Membranen zu sein. Das vollständige Tat-Protein bildet keine Poren in Lipidmembranen von GUVs oder LUVs aus, interagiert jedoch trotzdem mit den Membranen, so dass diese aggregieren und sich verformen.

5.2.4 Modell zur Translokation von Tat über Membranen

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse konnte ein Modell für die Translokation des vollständigen Wildtyps des HIV-1 Tat-Proteins wt Tat (1-86) über Lipidmembranen aufgestellt werden. Die konfokalmikroskopischen Experimente mit Tat an GUVs zur Untersuchung der Porenbildung und Translokation lieferten folgende Erkenntnisse:

- wt Tat (1-86) bildet keine Poren in Lipidmembranen aus.
- Fluoreszenzmarkiertes wt Tat (1-86) ist in der Lage, Lipidmembranen zu überqueren.
- Die Translokation von Tat findet nur in Gegenwart von Ionen in der Umgebung oder dem Lipid PE in der Membran statt.
- Die Translokation findet nach einer Verzögerungszeit statt.

Eine weitere entscheidende Erkenntnis ist, dass bei der Translokation von wt Tat (1-86)

elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem basischen Bereich des Proteins, welcher einen positiven Ladungscluster bildet, und den negativen Ladungen der Kopfgruppen der Lipide innerhalb der Membran eine untergeordnete Rolle spielen. Es findet keine Bindung des Proteins an die Membran statt. Dadurch ist es dem Tat-Protein möglich, Membranen verschiedener Zusammensetzungen zu überqueren. Allerdings ist es von großer Bedeutung für die Translokation des Proteins, dass die Ladungen des Proteins selbst durch Ionen abgeschirmt werden.

Es wurden zwei verschiedene Modelle zur Translokation von Tat über Lipiddoppelschichten entwickelt. Zum Einen ein Modell zur Translokation in Gegenwart von Ionen, welches die Abschirmung des positiven Ladungsclusters des Proteins berücksichtigt, zum Anderen ein Modell zur Translokation von Tat über PE-haltige Membranen. Im Fall von PE-haltigen Membranen war Tat in der Lage die Translokation auch in Abwesenheit von Ionen durchzuführen.

Modell zur Translokation in Gegenwart von Ionen

Zunächst kommt es zur Insertion von wt Tat (1-86) in die Membran (1). Wie schon von Yezid et al. postuliert, könnte dabei der Tryptophanrest an Position 11 von zentraler Bedeutung sein.¹³⁴ Durch die Insertion von wt Tat (1-86) in die Membran ist die Ausrichtung des Proteins an der Membran vorgegeben. Im weiteren Verlauf der Wechselwirkung kommt es zu einer Bildung von Tat-Oligomeren an der Membranoberfläche (2). Dies zeigt sich in den Experimenten als Verzögerungszeit. Es kann angenommen werden, dass für die Oligomerisierung von Tat eine gewisse Konzentration von Tat an der Membranoberfläche nötig ist, dadurch kann es zu der Verzögerungszeit kommen. Die Oligomerisierung von Tat wurde bereits von Tosi et al. beschrieben.¹⁵⁸ Vorhandene Anionen (hier: Cl⁻) schirmen die positiven Ladungen der basischen Bereiche der Tat-Proteine gegeneinander ab und ermöglichen so die Bildung der Tat-Oligomeren. Tat ist natürlicherweise ungefaltet und besitzt eine sehr flexible Struktur,^{16,28} was ebenfalls die Oligomerisierung erleichtert. Die gebildeten Tat-Oligomere sind nun fähig, die Membran zu überqueren (3), was durch die abgeschirmten Ladungen begünstigt wird. Durch die Oligomerisierung von Tat an der Oberfläche der Membran, kommt es dort zu einer Anreicherung des Proteins, was sich in den Experimenten mit fluoreszenzmarkiertem Tat-Protein in einer erhöhten Fluoreszenzintensität des Proteins im Bereich der Membranen zeigte.

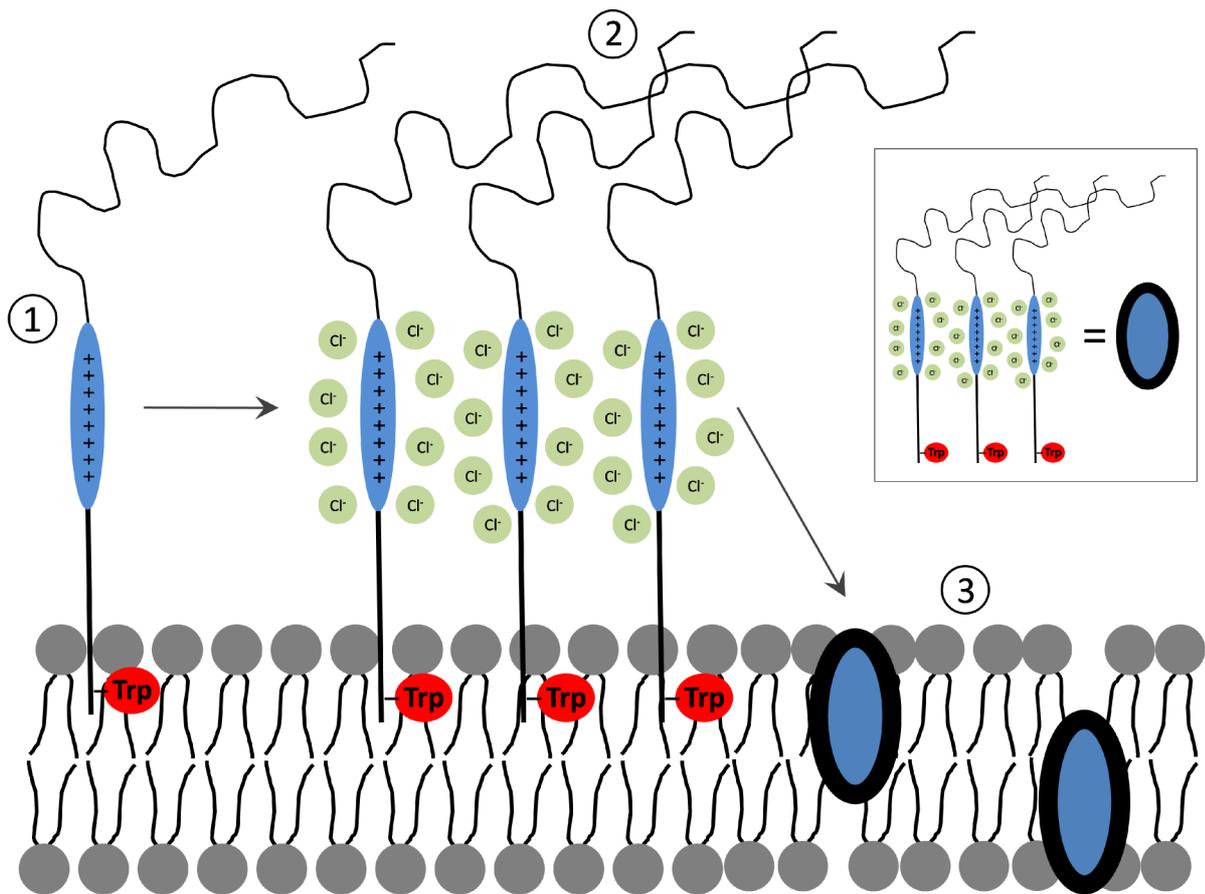


Abbildung 5.3: Modell zur Translokation von Tat (1-86) über Lipidmembranen in Gegenwart von Ionen.

Modell zur Translokation über PE-haltige Membranen in Abwesenheit von Ionen

Enthält die Lipidmembran das Lipid PE, welches durch seine sehr kleine Kopfgruppe zu einer geringeren Packungsdichte der Membran führt,¹³⁰ kommt es auch in Abwesenheit von Ionen zu einer Translokation des Tat-Proteins über die Membran. In PE-haltige Membranen können leicht Wassermoleküle eindringen (1), die die Insertion von Proteinen erleichtern.^{141,159} Daher kann auch wt Tat (1-86) leicht in die PE-haltige Membran insertieren (2). Nach der Insertion des Proteins kommt es zur Translokation, die ebenfalls durch die eingelagerten Wassermoleküle in der Membran begünstigt wird (3). Da in Abwesenheit von Anionen die Bildung der Tat-Oligomere erschwert ist, kommt es nur in sehr geringem Umfang zu einer Anreicherung von wt Tat (1-86) an der Membranoberfläche.

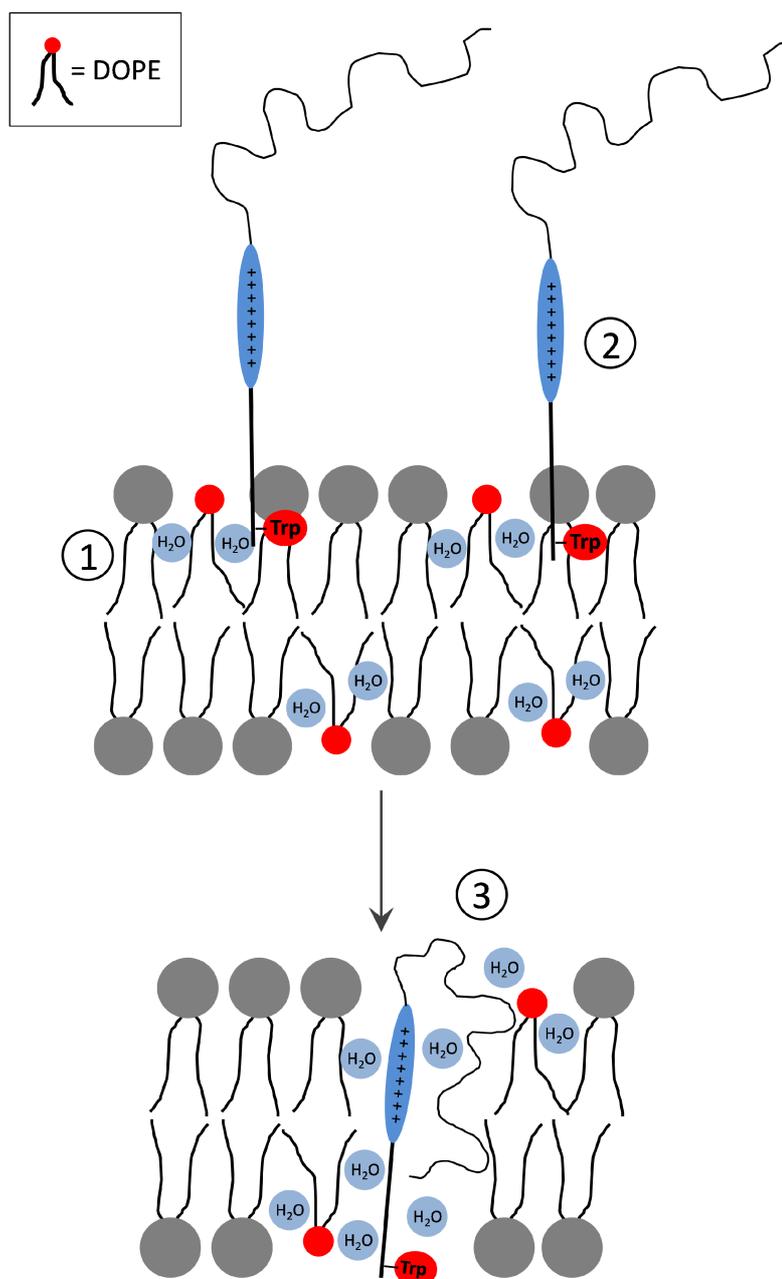


Abbildung 5.4: Modell zur Translokation von Tat (1-86) über PE-haltige Membranen in Abwesenheit von Ionen.

In Untersuchungen an festkörperunterstützten Membranen wurde herausgefunden, dass der vollständige Wildtyp nicht an Membranen bindet, sondern die Struktur der Membran verändert und Defekte in dieser ausbildet. Ähnliches wurde auch für Tat ARM-Ala beobachtet. Weiterhin wurden bei den Untersuchungen des Einflusses des positiven Ladungsclusters und des N-terminalen Bereichs auf die Wechselwirkung von HIV-1 Tat mit Lipidmembranen mit dem verkürzten Wildtyp wt Tat (35-86),

dem im N-terminalen Bereich 34 Aminosäuren fehlen und mit der Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster Tat ARM-Ala folgende Ergebnisse erhalten:

- wt Tat (35-85) bildet Poren in Lipidmembranen.
- wt Tat (1-86) und Tat ARM-Ala destabilisieren festkörperunterstützte Membranen und lösen Lipidmaterial aus diesen heraus.
- Tat ARM-Ala destabilisiert die Membran, so dass diese durchlässig für Farbstoffmoleküle wird.

Diese Erkenntnisse können mit den Modellen zur Translokation von Tat über Lipidmembranen in Einklang gebracht werden.

Der am N-Terminus verkürzte Wildtyp wt Tat (35-86) inseriert nicht wie der lange Wildtyp (1-86) in die Membran, da ihm das Tryptophan an Position 11 fehlt. Dadurch ist der kurze Wildtyp auf der Membranoberfläche flexibler und dynamischer, seine Ausrichtung ist hier nicht vorgegeben. Der kurze Wildtyp besitzt eine höhere Ladungsdichte als der vollständige Wildtyp und zeigt gegenüber Membranen ein ähnliches Verhalten, wie das Tat-Peptid (48-57). Es kann angenommen werden, dass aufgrund des fehlenden N-terminalen Bereichs beim verkürzten Wildtyp (35-86), wie auch beim Tat-Peptid (48-57) der basische Bereich die entscheidende Rolle spielt. So kommt es zur Ausbildung von Poren in den Lipidmembranen, durch die Farbstoffmoleküle die Membranen passieren können. Es ist außerdem anzunehmen, dass der kurze Wildtyp selbst die Membran über die gebildeten Poren passieren kann.

Tat ARM-Ala ist über sein Tryptophan an Position 11 ebenfalls fähig, in die Membran zu inserieren. Es destabilisiert dadurch die Membran, da es dabei Lipide aus der Membran herauslöst, so dass Defekte in den festkörperunterstützten Membranen entstehen. Durch seine geringere Ladungsdichte bildet es leichter Aggregate mit den herausgelösten Lipiden, die dann teilweise auf der Membranoberfläche oder in den Defekten haften bleiben. Diese Eigenschaft führt dazu, dass GUV-Membranen ebenfalls so destabilisiert werden, dass durch sie Farbstoffmoleküle gelangen können.

Wt Tat (1-86) erzeugt ebenfalls Defekte in festkörperunterstützten Membranen. Das Protein inseriert über das Tryptophan an Position 11 in die Membran, bildet dann Oligomere und versucht, die Membran zu durchdringen. Dabei stoßen die Tat-Oligomere auf den Festkörper unter der Membran, wodurch die Struktur der Membran gestört wird, so dass Lipide aus der Membran herausgelöst werden. Es bilden sich Defekte in der Membran, in denen sich Tat-Oligomere befinden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie das vollständige Tat-Protein mit Lipidmembranen interagiert. Fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopische Analysen an festkörperunterstützten Membranen zeigen, dass Tat nicht an die Membran bindet. Es wurde hingegen eine Destabilisierung der Membran durch Tat beobachtet, die sich in Bildung von Defekten äußerte.

Experimente an Lipidvesikeln beweisen, dass der vollständige Wildtyp des Tat-Proteins (1-86), im Gegensatz zum Tat-Peptid (48-57), keine Poren in Lipidmembranen ausbildet, durch die Fluoreszenzfarbstoffe die Membran passieren können. Allerdings konnte mithilfe von fluoreszenzmarkiertem Tat-Protein (Tat-AF633) gezeigt werden, dass dieses selbst in der Lage ist, die Membran zu überqueren. Weiterhin wurde beobachtet, dass es im Zuge der Translokation zu einer Akkumulation des fluoreszenzmarkierten Proteins in den Membranen kam. Tat-AF633 induzierte im Gegensatz zum unmarkierten Tat-Wildtyp Poren in Lipidmembranen von GUVs (*giant unilamellar vesicles*), durch die Farbstoffe mit einer molaren Masse von 3 kDa die Membran passieren konnten. Größere Farbstoffe mit einer molaren Masse von 10 kDa blieben ausgeschlossen. Tat-AF633 mit einer molaren Masse von 11,6 kDa war hingegen in der Lage, die Membran zu überqueren, was beweist, dass es die Membran nicht durch die gebildeten Poren passiert hat. Tat-AF633 zeigte die Fähigkeit, sowohl zwitterionische, als auch negativ geladene Membranen in Gegenwart von Ionen zu überqueren. In Abwesenheit von Ionen fand die Translokation nur bei Membranen statt, die das Lipid DOPE enthielten.

Um zu untersuchen, welche Strukturelemente des Tat-Proteins für die Interaktion mit Lipidmembranen verantwortlich sind, wurde neben dem vollständigen Wildtyp auch ein verkürzter Wildtyp, dem 34 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs fehlen, sowie eine Tat-Mutante mit reduziertem Ladungscluster eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteinvarianten Poren in Lipidmembranen verschiedener Zusammensetzungen Poren induzieren konnten, so dass Fluoreszenzfarbstoffe über die Membran in die GUVs eindringen konnten.

Abschließend kann angenommen werden, dass in Gegenwart von Anionen, die die positiven Ladungen des Proteins gegeneinander abschirmen, Tat Oligomere bildet, die aufgrund einer höheren Hydrophobizität die Membran passieren können. Weiterhin begünstigt DOPE die Translokation, da in diesen Membranen Wassermoleküle eingelagert sind, was die Insertion des Proteins in die Membran erleichtert, so dass Tat auch in nicht oligomerisierter Form diese Membranen passieren kann.

Diese Eigenschaft des Proteins spielt bei der Verbreitung des HI-Virus eine wichtige Rolle, da das Protein somit in der Lage ist, in noch nicht infizierte Zellen einzudringen. So kann die Transkriptionsrate von Beginn an drastisch gesteigert werden, was zu einer schnelleren Infizierung führt. Diese Eigenschaft macht Tat zu einem wichtigen Angriffspunkt bei der Bekämpfung von HIV.

7 Literaturverzeichnis

1. The chronology of AIDS research, *Nature* **326**, 435–436 (1987).
2. UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC 2011, 21.
3. Vogel, M. *et al.* The treatment of patients with HIV, *Dtsch Arztebl Int* **107**, 507-15; quiz 516 (2010).
4. Heeney, J. L. Dagleish, A. G. & Weiss, R. A. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS, *Science (80-)* **313**, 462–466 (2006).
5. Piot, P. Bartos, M. Ghys, P. D. Walker, N. & Schwartländer, B. The global impact of HIV/AIDS, *Nature* **410**, 968–973 (2001).
6. Barre-Sinoussi, F. HIV as the cause of AIDS, *Lancet* **348**, 31–35 (1996).
7. Zündorf, I. & Dingermann, T. Struktur des HI-Virus, *Pharm Unserer Zeit* **3**, 202–207 (2001).
8. Frankel, A. D. & Young, J. A. T. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA, *Annu Rev Biochem* **67**, 1–25 (1998).
9. Fanales-Belsaio, E. Raimondo, M. Suligoj, B. & Butto, S. HIV virology and pathogenic mechanisms of infection: a brief overview, *Ann Ist Super Sanita* **46**, 5–14 (2010).
10. Haseltine, W. A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1, *The FASEB Journal* **5**, 2349–2360 (1991).
11. Anand, K. Schulte, A. Vogel-Bachmayr, K. Scheffzek, K. & Geyer, M. Structural insights into the cyclin T1-Tat-TAR RNA transcription activation complex from EIAV, *Nat Struct Mol Biol* **15 (12)**, 1287–1292 (2008).
12. Herbein, G. Gras, G. Khan, K. & Abbas, W. Macrophage signaling in HIV-1 infection, *Retrovirology* **7**, 1–13 (2010).
13. Siomi, H. Shida, H. Maki, M. & Hatanaka, M. Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization, *J Virol* **64 (4)**, 1803–1807 (1990).
14. Hauber, J. Perkins, A. Heimer, E.P. & Cullen B.R. Trans-activation of human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events, *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6364–6368 (1987).
15. White, M. K. Gorrill, T. S. & Khalili, K. Reciprocal transactivation between HIV-1 and other human viruses, *Virology* **352**, 1–13 (2006).

16. Tahirov, T. *et al.* Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb, *Nature* **465**, 747–753 (2010).
17. Lindgren, M. Hällbrink, M. Prochiantz, A. & Langel, Ü. Cell-penetrating peptides, *TIPS* **21**, 99–103 (2000).
18. Lundberg, P. & Langel, Ü. A brief introduction to cell-penetrating peptides, *J Mol Recognit* **16**, 227–233 (2003).
19. Fischer, R. Fotin-Mleczek, M. Hufnagel, H. & Brock, R. Break on through to the other side—biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides, *ChemBiochem.* **6**, 2126–2142 (2005).
20. Brasseur, R. & Divita, G. Happy birthday cell penetrating peptides: already 20 years, *Biochim Biophys Acta* **1798**, 2177–2181 (2010).
21. Yang, S.-T. Zaitseva, E. Chernomordik, L. V. & Melikov, K. Cell-penetrating peptide induces leaky fusion of liposomes containing late endosome-specific anionic lipid, *Biophys J* **99**, 2525–2533 (2010).
22. Thoren, P. E. G. Persson, D. Lincoln, P. & Norden, B. Membrane destabilizing properties of cell-penetrating peptides, *Biophys Chem* **114**, 169–179 (2005).
23. Mishra, A. Gordon, V. D. Yang, L. Coridan, R. & Wong, G. C. L. HIV Tat forms pores in membranes by inducing saddle-splay curvature: Potential role of bidentate hydrogen bonding, *Angew, Chem. Int. Ed.* **47**, 1–5 (2008).
24. Ciobanasu, C. Harms, E. Tünnemann, G. Cardoso, C. M. & Kubitscheck, U. Cell-penetrating HIV-1 Tat peptide float on model lipid bilayers, *Biochemistry* **48 (22)**, 4728–4737 (2009).
25. Ciobanasu, C. Siebrasse, J. & Kubitscheck, U. Cell-penetrating HIV1 Tat peptides can generate pores in model membranes, *Biophys J* **99**, 153–162 (2010).
26. Bayer, P. *et al.* Structural studies of HIV-1 Tat protein, *J Mol Biol* **247 (4)**, 529–535 (1995).
27. Liang, C. & Wainberg MA. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor?, *AIDS Rev* **4**, 41–49 (2002).
28. Shojania, S. & O'Neil, J. D. HIV-1 Tat is a natively unfolded protein, *J Biol Chem* **281 (13)**, 8347–8356 (2006).
29. Campbell, G. R. & Loret, E. P. What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine?, *Retrovirology* **6 (50)**, 1–13 (2009).

30. Foucault, M. *et al.* UV and X-ray structural studies of a 101-residue long Tat protein from a HIV-1 primary isolate and of its mutated, detoxified, vaccine candidate, *Proteins* **78**, 1441–1456 (2010).
31. Péloponèse, J. M. JR. *et al.* Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants. Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and other continents, *J Biol Chem* **274 (17)**, 11473–11478 (1999).
32. Karn, J. Tackling Tat, *J Mol Biol* **293**, 235–254 (1999).
33. Strebel, K. Viurs-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat and Rev, *AIDS* **17**, 25–34 (2003).
34. Marcello, A. Zoppe, M. & Giacca, M. Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator, *IUBMB Life* **51**, 175–181 (2001).
35. Romani, B. Engelbrecht, S. & Glashoff, R. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1, *J Gen Virol* **91**, 1–12 (2010).
36. Huigen, M. Kamp, W. & Nottet, H. Multiple effects of HIV-1 trans-activator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection, *Eur J Clin Invest* **34**, 57–66 (2004).
37. Jeang, K. T. Xiao, H. & Rich, E. A. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat, *J Biol Chem* **274 (41)**, 28837–28840 (1999).
38. Campbell, G. R. *et al.* The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis, *J Biol Chem* **279 (46)**, 48197–48204 (2004).
39. Raghuraman, H. & Chattopadhyay, A. Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions, *Biosci Rep* **27**, 189–223 (2007).
40. Schwarz, G. Zong, R. & Popescu, T. Kinetics of melittin induced pore formation in the membrane of lipid vesicles, *Biochim Biophys Acta* **1110**, 97–104 (1992).
41. Popplewell, J. F. Swann, M. J. Freeman, N. J. McDonnell, C. & Ford, R. C. Quantifying the effects of melittin on liposomes, *Biochim Biophys Acta* **1768**, 13–20 (2007).
42. Ohki, S. Marcus, E. Sukumaran, D. K. & Arnold, K. Interaction of melittin with lipid membranes, *Biochim Biophys Acta* **1194**, 223–232 (1994).
43. Futaki, S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms, *Adv. Drug Del. Rev.* **57**, 547–558 (2005).
44. Magzoub, M. & Gräslund, A. Cell-penetrating peptides: Small from inception to application, *Quart. Rev. Biophys.* **37 (2)**, 147–195 (2004).

45. Matsuzaki, K. Yoneyama, S. & Miyajima, K. Pore formation and translocation of melittin, *Biophys J* **73**, 831–838 (1997).
46. Klocek, G. Schulthess, T. Shai, Y. & Seelig, J. Thermodynamics of melittin binding to lipid bilayers. Aggregation and pore formation, *Biochemistry* **48**, 2586–2596 (2009).
47. Mally, M. Majhenc, J. Svetina, S. & Zeks, B. The response of giant phospholipid vesicles to pore-formation peptide melittin, *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1179–1189 (2007).
48. Rex, S. & Schwarz, G. Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles, *Biochemistry* **37**, 2336–2345 (1998).
49. Benachir, T. & Lafleur, M. Study of vesicle leakage induced by melittin, *Biochim Biophys Acta* **1235**, 452–460 (1995).
50. Papo, N. & Shai, Y. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides, *Biochemistry* **42**, 458–466 (2003).
51. Steinem, C. Galla, H. J. & Janshoff, A. Interaction of melittin with solid-supported membranes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**, 4580–4585 (2000).
52. Persson, D. *et al.* Vesicle size-dependent translocation of penetratin analogs across lipid membranes, *Biochim Biophys Acta* **1665 (1-2)**, 142–155 (2004).
53. Thoren, P. E. G. Persson, D. Karlsson, M. & Norden, B. The Antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation, *FEBS Lett* **482**, 265–268 (2000).
54. Binder, H. & Lindblom, G. Charge-dependent translocation of the trojan peptide penetratin across lipid membranes, *Biophys J* **85**, 982–995 (2003).
55. Alves ID *et al.* Cell biology meets biophysics to unveil the different mechanisms of penetratin internalization in cells, *Biochim Biophys Acta* **1798**, 2231–2239 (2010).
56. Amand, H.L. Bostrom, C.L. Lincoln, P. Norden, B. & Esbjorner, E.K. Binding of Cell-penetrating Penetratin Peptides to Plasma Membrane Vesicles Correlates Directly with Cellular Uptake, *Biochim Biophys Acta* (2011).
57. Sebbage, V. Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications, *Bioscience Horizons* **2 (1)**, 64–72 (2009).
58. Morris, M. C. Depollier, J. Mery, J. Heitz, F. & Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells, *Nature Biotechnol.* **19**, 1173–1176 (2001).

59. Morris, M. C. Deshayes, S. Heitz, F. & Divita, G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics, *Biol Cell* **100**, 201–217 (2008).
60. Torchilin, V. P. Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery, *Biopolymers* **90 (5)**, 604–610 (2008).
61. Liu, B.R. Huang, Y.W. Chiang, H.J. & Lee, H.J. Cell-penetrating peptide-functionalized quantum dots for intracellular delivery, *J Nanosci Nanotechnol* **10**, 7897–7905 (2010).
62. Sawant R & Torchilin V. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides, *Mol Biosyst* **6**, 628–640 (2010).
63. Sato, H. & Feix, J. B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphiphatic alpha-helical antimicrobial peptides, *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1245–1256 (2006).
64. Oren, Z. & Shai, Y. Mode of action of linear amphiphatic alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* **47**, 451–463 (1998).
65. Reddy, K. V. R. Yedery, R. D. & Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **24**, 536–547 (2004).
66. Derossi, D. Joliot, A.H. Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J Biol Chem* **269**, 10444–10450 (1994).
67. Vendeville, A. *et al.* HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses, *Mol Biol Cell* **15**, 2347–2360 (2004).
68. Thoren, P.E. *et al.* Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells, *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 100–107 (2003).
69. Caesarm C,E, Esbjorner EK, Lincoln P & Norden B. Membrane interactions of cell-penetrating peptides probed by tryptophan fluorescence and dichroism techniques: correlations of structure to cellular uptake, *Biochemistry* **45**, 7682–7692 (2006).
70. Vives, E. Cellular uptake of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions, *J Mol Recognit* **16**, 265–271 (2003).
71. Umezawa, N. Gelman, M. A. Haigis, M. C. Raines, R. T. & Gellman, S. H. Translocation of a beta-peptide across cell membranes, *J Am Chem Soc* **124 (3)**, 368–369 (2002).
72. Yun, C. O. *et al.* Transduction of artificial transcriptional regulatory proteins into human cells, *Nucleic Acids Res.* 1–7 (2008).

73. Chugh, A. Amundsen, E. & Eudes, F. Translocation of cell-penetrating peptides and delivery of their cargoes in triticate microspores, *Plant Cell Rep* **28** (5), 801–810 (2009).
74. Zhao, M. & Weissleder, R. Intracellular cargo delivery using Tat peptide and derivatives, *Med. Res. Rev.* **24** (1), 1–12 (2004).
75. Fawell, S. *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells, *Cell Biology* **91**, 664–668 (1994).
76. Rao, K. S. Reddy, M. K. Horning, J. L. & Labhasetwar, V. TAT-conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs, *Biomaterials* **29** (33), 4429–4438 (2008).
77. Allen, S. Rigby-Singleton, S. M. Harris, H. Davies, M. C. & O'Shea, P. Measuring and visualization single molecular interactions in biology, *Biochem Soc Trans* **31** (5), 1052–1057 (2003).
78. Goksu, E. I. Vanegas, J. M. Blanchette, C. D. Lin, W. C. & Longo, M. L. AFM for structure and dynamics of biomembranes, *Biochim Biophys Acta* **1788**, 254–266 (2009).
79. Engel, A. Lyubchenko, Y. & Müller, D. Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work, *Trends Cell Biol* **9**, 77–80 (1999).
80. Quist, A. P. *et al.* Atomic force microscopy imaging and electrical recording of lipid bilayers supported over microfabricated silicon chip nanopores: lab-on-a-chip system for lipid membranes and ion channels, *Langmuir* **23**, 1375–1380 (2007).
81. Reviakine, I. & Brisson, A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy, *Langmuir* **16**, 1806–1815 (2000).
82. Santos, N. C. & Castanho, M. A. R. B. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy, *Biophys Chem* **107**, 133–149 (2004).
83. Janshoff, A. & Steinem, C. Scanning force microscopy of artificial membranes, *ChemBiochem* **2**, 798–808 (2001).
84. Wayment, J. R. & Harris, J. M. Biotin-avidin binding kinetics measured by single molecule imaging, *Anal Chem* **81**, 336–342 (2009).
85. Rosano, C. Arosio, P. & Bolognesi, M. The X-ray three-dimensional structure of avidin, *Biomol Eng* **16**, 5–12 (1999).
86. Noppl-Simpson, D. A. & Needham, D. Avidin-biotin interactions at vesicles surfaces: Adsorption and binding, cross-bridge formation, and lateral interactions, *Biophys J* **70**, 1391–1401 (1996).

-
87. Masson, L. Mazza, A. & Brousseau, R. Stable immobilization of lipid vesicles for kinetic studies using surface plasmon resonance, *Anal Biochem* **218**, 405–412 (1994).
 88. González, M. *et al.* Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding, *J Biol Chem* **272 (17)**, 11288–11294 (1997).
 89. Fenz, S. F. Merkel, R. & Sengupta, K. Diffusion and intermembrane distance: Case study of avidin and E-Cadherin mediated adhesion, *Langmuir* **25**, 1074–1085 (2009).
 90. Amos, W. B. & White, J. G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research, *Biology of the Cell* **95**, 335–342 (2003).
 91. Kelly, S.M. Jess, T.J. & Price, N.C. How to study proteins by circular dichroism, *Biochim Biophys Acta* **1751**, 119–139 (2005).
 92. Whitmore L. & Wallace B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res*, W668-673 (2004).
 93. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>.
 94. Fridell, R. A. Harding, L. S. Bogerd, H. P. & Cullen, B. R. Identification of a novel human zinc finger protein that specifically interacts with the activation domain of lentiviral Tat proteins, *Virology* **209 (2)**, 347–357 (1995).
 95. Huang, H. W. & Wang, K. T. Structural characterization of the metal binding site in the cysteine-rich region of HIV-1 Tat protein, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **227**, 615–621 (1996).
 96. Kubota, S. Endo, S. I. Maki, M. & Hatanaka, M. Role of cysteine-rich region of HIV Tat protein on its trans-activational ability, *Virus Genes* **2 (2)**, 113–118 (1988).
 97. Frankel, A. D. Chen, L. Cotter, R. J. & Pabo, C. O. Dimerization of the tat protein from human immunodeficiency virus: a cysteine-rich peptide mimics the normal metal-linked dimer interface, *PNAS* **85 (17)**, 6297–6300 (1988).
 98. Royer, C.A. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence, *Chem Rev* **106**, 1769–1784 (2006).
 99. Wallace, B.A. Protein characterisation by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy, *Q Rev Biophys* **42**, 317–370 (2009).
 100. Whitmore, L. & Wallace, B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* **89**, 392–400 (2008).
 101. Li, S. Hu, P. & Malmstadt, N. Confocal Imaging to Quantify Passive Transport across Biomimetic Lipid Membranes, *Anal. Chem* **82**, 7766–7771 (2010).

102. Carvalho, K. Ramos, L. Roy, C. & Picart, C. Giant unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate: characterization and functionality, *Biophys J* **95**, 4348–4360 (2008).
103. Gudheti, M.V. Mlodzianoski, M. & Hess, S.T. Imaging and shape analysis of GUVs as model plasma membranes: effect of trans DOPC on membrane properties, *Biophys J* **93**, 2011–2023 (2007).
104. Kleinig, H. Nuclear Membranes from mammalian liver, *J Cell Biol* **46**, 396–402 (1970).
105. Bohrer, M. P. Influence of molecular configuration on the passage of macromolecules across the glomerular capillary wall, *The Journal of General Physiology* **74**, 583–593 (1979).
106. Ladokhin, A. S. Sizing Membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: Pore formation by melittin, *Biophys J* **72**, 1762–1766 (1997).
107. Mima, J. & Wickner, W. Complex lipid requirements for SNARE- and SNARE chaperone-dependent membrane fusion, *J Biol Chem* **284**, 27114–27122 (2009).
108. Baumgartner, P. *et al.* Phosphatidylethanolamine critically supports internalization of cell-penetrating protein C inhibitor, *J Cell Biol* **179**, 793–804 (2007).
109. van den Brink-van der Laan, E. Dalbey, R.E. Demel, R.A. Killian, J.A. & de Kruijff, B. Effect of nonbilayer lipids on membrane binding and insertion of the catalytic domain of leader peptidase, *Biochemistry* **40**, 9677–9684 (2001).
110. Simon-Plas, F. *et al.* Spontaneous insertion of plant plasma membrane (H⁺)ATPase into a preformed bilayer, *J Membr Biol* **120**, 51–58 (1991).
111. Oren, Z. & Shai, Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of Melittin: Structure-function study, *Biochemistry* **36**, 1826–1835 (1997).
112. van den Bogaart, G. Guzman, J.V. Mika, J.T. & Poolman, B. On the mechanism of pore formation by melittin, *J Biol Chem* **283**, 33854–33857 (2008).
113. Maxfield, F.R. & van Meer, G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells, *Curr Opin Cell Biol* **22**, 422–429 (2010).
114. Xiao, H. Selective CXCR4 antagonism by Tat: Implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 11466–11471 (2000).
115. Katsu, T. Imamura, T. Komagoe, K. Masuda, K. & Mizushima, T. Simultaneous measurements of K⁺ and calcein release from liposomes and the determination of pore size formed in a membrane, *Anal Sci* **23**, 517–522 (2007).

116. Kang, J.H. Shin, S.Y. Jang, S.Y. Lee, M.K. & Hahm, K.S. Release of aqueous contents from phospholipid vesicles induced by cecropin A (1-8)-magainin 2 (1-12) hybrid and its analogues, *J Pept Res* **52**, 45–50 (1998).
117. Curnow, P. Mellor, H. Stephens, D. J. Lorch, M. & Booth, P. J. Translocation of the cell-penetrating Tat peptide across artificial bilayers and into living cells, *Biochem Soc Symp* **72**, 199–209 (2005).
118. Janshoff, A. & Steinem, C. Scanning force microscopy of artificial membranes, *ChemBiochem* **2**, 798–808 (2001).
119. Szilluweit, R. *et al.* HIV-1 Nef perturbs artificial membranes: Investigation of the contribution of the myristoyl anchor, *Biophys J* **96**, 3242–3250 (2009).
120. Terwilliger, T. C. & Eisenberg, D. The structure of melittin, *J Biol Chem* **257 (11)**, 6016–6022 (1982).
121. Sitaram, N. & Nagaraj, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity, *Biochim Biophys Acta* **1462**, 29–54 (1999).
122. Dempsey, C. E. the actions of melittin on membranes, *Biochim Biophys Acta* **1031**, 143–161 (1990).
123. Vives, E. Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J Biol Chem* **272 (25)**, 16010–16017 (1997).
124. Derossi, D. Joliot, A.H. Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J Biol Chem* **269**, 10444–10450 (1994).
125. Beschiaschvili, G. & selig, J. Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes, *Biochemistry* **29**, 52–58 (1990).
126. Kleinschmidt, J. H. Mahaney, J. E. Thomas, D. D. & Marsh, D. Interaction of bee venom melittin with zwitterionic and negatively charged phospholipid bilayers: A spin-label electron spin resonance study, *Biophys J* **72**, 767–778 (1997).
127. van den Bogaart, G. Velasquez Guzman, J. Mika, J. T. & Poolman, B. On the mechanism of pore formation by melittin, *J Biol Chem* **283 (49)**, 33854–33857 (2008).

128. Yoneyama, F. Shioya, K. Zendo, T. Nakayama, J. & Sonomoto, K. Effect of a negatively charged membrane-lactacin Q interaction and resulting pore formation, *Biosci Biotechnol Biochem* **74** (1), 90666-1.
129. Ziegler, A. Blatter, X. L. Seelig, A. & Seelig, J. Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis, *Biochemistry* **42** (30), 9185–9194 (2003).
130. Israelachvili, J.N. & Mitchell, D.J. A model for the packing of lipids in bilayer membranes, *Biochim Biophys Acta* **389**, 13–19 (1975).
131. Suzuki, T. *et al.* Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides, *J Biol Chem* **277** (4), 2437–2443 (2002).
132. Ter-Avetisyan, G. *et al.* Cell entry of arginine-rich peptides is independent of endocytosis, *J Biol Chem* **284** (6), 3370–3378 (2009).
133. Peetla, C. Rao, K. S. & Labhasetwar, V. Relevance of biophysical interactions of nanoparticles with a model membrane in predicting cellular uptake: study with TAT peptide-conjugated nanoparticles, *Mol Pharm* **6** (5), 1311–1320 (2009).
134. Yezid, H. Konate, K. Debaisieux, S. Bonhoure, A. & Beaumelle, B. Mechanism for HIV-1 Tat insertion into the endosome membrane, *J Biol Chem* **284**, 22736–22746 (2009).
135. Lee, M. T. Hung, W. C. Chen, F. Y. & Huang, H. W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphiphatic peptides, *PNAS* **105** (13), 5087–5092 (2008).
136. Ambroggio, E. E. Separovic, F. Bowie, J. H. Fidelio, G. D. & Bagatolli, L. A. Direct visualization of membrane leakage induced by antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein, *Biophys J* **89**, 1874–1881 (2005).
137. Tamba, Y. & Yamazaki, M. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability, *Biochemistry* **44**, 15823–15833 (2005).
138. Tamba, Y. & Yamazaki, M. Magainin 2 induced pore formation in the lipid membrane depends on its concentration in the membrane interface, *J. Phys. Chem.* **113**, 4846–4852 (2009).
139. Stubbs, C.D. & Slater, S.J. The effects of non-lamellar forming lipids on membrane protein-lipid interactions, *Chem Phys Lipids* **81**, 185–195 (1996).
140. Sakuma, Y. Taniguchi, T. & Imai, M. Pore formation in a binary giant vesicle induced by cone-shaped lipids, *Biophys J* **99**, 472–479 (2010).

-
141. van Klompenburg, W. *et al.* Phosphatidylethanolamine mediates insertion of the catalytic domain of leader peptidase in membranes, *FEBS Lett* **431**, 75–79 (1998).
 142. van Dalen, A. & Kruijff, B. de. The role of lipids in membrane insertion and translocation of bacterial proteins, *Biochim Biophys Acta* **1694**, 97–109 (2004).
 143. Shintou, K. Nakano, M. Kamo, T. Kuroda, Y. & Handa, T. Interaction of an amphiphatic peptide with phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine mixed membranes, *Biophys J* **93**, 3900–3906 (2007).
 144. Basanez, G. Bax-type Apoptotic Proteins Porate Pure Lipid Bilayers through a Mechanism Sensitive to Intrinsic Monolayer Curvature, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49360–49365 (2002).
 145. Sharonov, A. & Hochstrasser, R. M. Single-Molecule Imaging of the Association of the Cell-Penetrating Peptide Pep-1 to Model Membranes †, *Biochemistry* **46**, 7963–7972 (2007).
 146. Thoren, P. E. G. *et al.* Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides, *Biochemistry* **43**, 3471–3489 (2004).
 147. Herce, H. D. & Garcia, A. E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes, *PNAS* **104 (52)**, 20805–20810 (2007).
 148. Yesylevskyy, S. Marrink, S. J. & Mark, A. E. Alternative mechanisms for the interaction of the cell-penetrating peptides penetratin and the TAT peptide with lipid bilayers, *Biophys J* **97 (1)**, 40–49 (2009).
 149. Herce, H. D. *et al.* Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides, *Biophys J* **97**, 1917–1925 (2009).
 150. Brodgen, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nature Rev.* **3**, 238–250 (2005).
 151. Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat Trans-activator protein, *Cell* **55**, 1179–1188 (1988).
 152. Richard, J. P. *et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake, *J Biol Chem* **278 (1)**, 585–590 (2003).
 153. Mitchell, D. J. Kim, D. T. Steinman, L. Fathman, C. G. & Rothbard, J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J. Peptide Res.* **56**, 318–325 (2000).

154. Chugh, A. & Eudes, F. Translocation and nuclear accumulation of monomer and dimer of HIV-1 Tat basic domain in triticale mesophyll protoplasts, *Biochim Biophys Acta* **1768**, 419–426 (2007).
155. Liu, J. Zhang, Q. Remsen, E. E. & Wooley, K. L. Nanostructured materials designed for cell binding and transduction, *Biomacromolecules* **2**, 362–368 (2001).
156. Said Hassane, F. Saleh, A.F. Abes, R. Gait, M.J. & Lebleu, B. Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides, *Cell Mol Life Sci* **67**, 715–726 (2010).
157. Schmidt, N. Mishra, A. Lai, G. H. & Wong, G. C. L. Arginine-rich cell-penetrating peptides, *FEBS Lett* (2009).
158. Tosi, G. *et al.* Highly stable oligomerization forms of HIV-1 Tat detected by monoclonal antibodies and requirement of monomeric forms for the transactivating function on the HIV-1 LTR, *Eur. J. Immunol.* **30**, 1120–1126 (2000).
159. Baumgärtner, P. *et al.* Phosphoethanolamine critically supports internalization of cell-penetrating protein C inhibitor, *J Cell Biol* **179**, 793–804 (2007).
160. Arbuzova A & Schwarz G. Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: a quantitative analysis, *Biochim Biophys Acta* **1420**, 139–152 (1999).
161. Futaki, S. Nakase, I. Tadokoro, A. Takeuchi, T. & Jones, A. T. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms, *Biochem Soc Trans* **35 (4)**, 784–787 (2007).
162. Henriques, S. T. Melo, M. N. & Castanho, M. A. R. B. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they?, *Biochem J* **399**, 1–7 (2006).
163. Persson, D. Thorén, P. E. G. Lincoln, P. & Nordén, B. Vesicle Membrane Interactions of Penetratin Analogues, *Biochemistry* **43**, 11045–11055 (2004).
164. Thennarasu, S. *et al.* Limiting an Antimicrobial Peptide to the Lipid–Water Interface Enhances Its Bacterial Membrane Selectivity: A Case Study of MSI-367, *Biochemistry* **49**, 10595–10605 (2010).
165. Henriques, S. T. & Castanho, M. A. R. B. Consequences of Nonlytic Membrane Perturbation to the Translocation of the Cell Penetrating Peptide Pep-1 in Lipidic Vesicles †, *Biochemistry* **43**, 9716–9724 (2004).
166. Lamaziere, A. *et al.* Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides, *PLoS One* **2**, e201 (2007).
167. Szilluweit, R., Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 2009.

8 Anhang

8.1 Symbolverzeichnis

λ	Wellenlänge
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
d	Dicke, Distanz, Durchmesser
c	Konzentration
M	Molare Masse
t	Zeit
F_{rel}	Relative Fluoreszenzintensität
F	Gemessene Fluoreszenzintensität
F_0	Gemessene Fluoreszenzintensität bei $t = 0$ s
F_{max}	Maximale, gemessene Fluoreszenzintensität
V	Volumen
l	Distanz
h	Höhe
U	Spannung
f	Frequenz
C	Zirkularität
θ	Gemessener Drehwert
θ_{mol}	Molarer Drehwert
L	Länge der Küvette

n_r	Anzahl an Aminosäuren im Protein
n	Anzahl
k	Geschwindigkeitskonstante

8.2 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i>
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i>
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
AF633	Alexa Fluor 633
Tat-AF633	Alexa Fluor 633-markiertes Tat-Protein
AF488	Alexa Fluor 488
D3- / D10-AF488	Dextran-gekoppelter Alexa Fluor 488 (3 und 10 kDa)
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>

ITO	Indium-Zinn-Oxid
ROI	Region of interest
CD	Zirkulardichroismus
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-(phospho-L-serin)
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPS	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-(phospho-L-serin)
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOPI	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphochoinositol
Chol	Cholesterin
Bio-Cap-PE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-cap-biotinyl
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

8.3 Chemikalien und Materialien

AF488	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
AF633	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniak (25 %)	Merck, Darmstadt
Avidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bio-Cap-PE	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
<i>Cantilever</i> CSC 38	Mikromash, Tallin (Estland)
<i>Cantilever</i> MSCT	Veeco, Camarillo (USA)

5(6)-Carboxyfluorescein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	VWR International, Darmstadt
Cholesterin	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
D3-AF488	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
D10-AF488	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DOPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
DOPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
DOPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
EDTA	ROTH, Karlsruhe
Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg
Ethanol, reinst	Merck, Darmstadt
Fluoreszenzküvette	Starna GmbH, Pfungstadt
Glukose	VWR International, Darmstadt
Isopropanol, reinst	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Melittin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mucosol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Pacific Blue DMPE	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Polycarbonatmembranen	Avestin, Ottawa (Kanada)
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
POPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Pyranin	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	VWR International, Darmstadt
Siliziumsubstrate	CrysTec, Berlin
Sucrose	ROTH, Karlsruhe
Texas Red DHPE	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS	ROTH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30 %)	VWR International, Darmstadt

8.4 Geräte

UV-Spektrometer

V-650 Spectrophotometer	Jasco, Gotha
-------------------------	--------------

Fluoreszenzspektrometer

FP 6500 Spectrofluorometer	Jasco, Gotha
----------------------------	--------------

CD-Spektrometer

810 Spectrometer	Jasco, Gotha
------------------	--------------

Epifluoreszenzmikroskop

Axiotech Vario Carl Zeiss, Jena

Konfokalmikroskop

LSM 710 Examiner Carl Zeiss, Jena

Rasterkraftmikroskope

Nanowizard I JPK Instruments, Berlin

Nanowizard II, BioAFM JPK Instruments, Berlin

Sonstiges

Osmometer 030 Gonotec GmbH, Berlin

pH-Meter *Calimatic 766* Knick, Berlin

Feinwaage *CP 225D* Sartorius, Göttingen

Lipisofast (Extruder) Avestin, Ottawa (Kanada)

Reinstwasseranlage *Milli Elix 5* Millipore, Eschborn

Tip-Sonifier *Sonoplus HD 2070* Bandelin, Berlin

Vakuumtrockenschrank Binder, Tuttlingen

Wasserbad *E11* Dinkelberg Analytics, Neu-Ulm

Frequenzgenerator *33220A* Agilent, Santa Clara (USA)

Vortexer Heidolph, Schwabach

Zentrifuge *Galaxy Mini* VWR International, Darmstadt

Danksagung

Mein Dank gilt...

... Prof. Dr. Claudia Steinem für die Bereitstellung des interessanten Themas, die gute Betreuung und die stetige Diskussionsbereitschaft.

... Prof. Dr. Ulf Diederichsen für die Übernahme des Koreferats.

... PD Dr. Matthias Geyer, Nadine Czudnochowski und Christian Böskens für die Bereitstellung des Tat-Proteins, die Hilfe beim Umgang mit dem Protein, sowie die stetige Diskussionsbereitschaft.

... den Korrekturlesern meiner Arbeit Christoph, Alex, Dany, und Daniel für die Mühe, die sie sich mit meiner Arbeit gemacht haben.

... Aline, Bastian und Natascha für die Mitarbeit an diesem Projekt.

... der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, den Zusammenhalt, die Motivation, einfach für eine gute Zeit!

... Julia, Dany, Ines und Sabine für die schönen Abende!

... Nicole, Susi, Marta, Frieda, Christoph, Christian, Anne, Tommy, Ace, Hauke, Hansi, Caro, Kiki, Babsie, Anja, Ruth und besonders Benni für eine tolle Freundschaft, Unterstützung in jeder Situation und eine tolle Zeit! Ihr seid die Besten!

... meiner Mutter, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat!

Lebenslauf

Annegret Boll

Geboren am 05.04.1983 in Eutin

Dissertation

03/2008 bis 07/2011 Promotion im Fachbereich Biomolekulare Chemie an
der Georg-August-Universität Göttingen
Thema: *Das vollständige HIV-1 Tat-Protein überquert
Lipidmembranen? Einfluss des positiven
Ladungsclusters und des N-terminalen Bereichs*
1. Betreuer: Prof. Dr. C. Steinem
2. Betreuer: Prof. Dr. U. Diederichsen

Schulbildung und Studium

02/2008 Diplom im Fach Chemie an der Georg-August-
Universität Göttingen (Note: sehr gut)

04/2007 bis 11/2007 Diplomarbeit im Fachbereich Biomolekulare Chemie an
der Georg-August-Universität Göttingen
Thema: *Untersuchung der Wechselwirkungen von HIV-
1 Nef mit artifiziellen Membransystemen*
1. Betreuer: Prof. Dr. C. Steinem
2. Betreuer: Prof. Dr. U. Diederichsen
(Note: sehr gut)

10/2005 bis 02/2008 Studium der Chemie (Diplom) an der Georg-August-
Universität Göttingen

03/2005 Vordiplom im Fach Chemie an der Christian-Albrechts-
Universität Kiel (Note: sehr gut)

10/2002 bis 09/2005 Studium der Chemie (Diplom) an der Christian-
Albrechts-Universität Kiel

06/2002 Abitur am Hoffmann-von-Fallersleben-Schulzentrum,
Lütjenburg (Note: gut)

08/1993 bis 06/2002 Gymnasium Hoffmann-von-Fallersleben-Schulzentrum,
Lütjenburg

08/1989 bis 07/1993 Grundschule in Selent

