

Hybride aus Transmembranpeptiden und Peptidnucleinsäuren als Modellsystem für SNARE-Protein-vermittelte Vesikelfusion**

Antonina S. Lygina, Karsten Meyenberg, Reinhard Jahn und Ulf Diederichsen*

Professor Gerhard Bringmann gewidmet

Die Fusion zweier Membranen gehört zu den grundlegenden Lebensprozessen und bedeutet die Vereinigung zweier getrennter Lipidmembranen zu einer kontinuierlichen Doppelschicht.^[1] Dieser Vorgang wird durch eine spezifische Wechselwirkung von Fusionsproteinen eingeleitet; für die synaptische Übertragung sind z.B. die SNARE-Proteine (SNARE: Soluble *N*-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor) verantwortlich.^[2] Um die Exozytose von synaptischen Vesikeln in präsynaptischen Nervenendigungen zu befördern, wird ein Coiled-Coil-Bündel aus vier Helices gebildet. Dieses setzt sich aus zwei SNARE-Proteinen, die in der Plasmamembran verankert sind (Syntaxin-1A und SNAP-25), und einem SNARE-Protein aus der Membran synaptischer Vesikel (Synaptobrevin oder VAMP) zusammen, sodass die beiden fusionierenden Membranen in räumliche Nähe gebracht werden.^[1] Der detaillierte Mechanismus der SNARE-Protein-vermittelten Fusion von Lipiddoppelschichten ist noch nicht geklärt.^[3] Besonders die Rolle der Transmembranpeptiden (TMDs) von Synaptobrevin (Syb) und Syntaxin-1A (Sx) wird noch nicht genau verstanden. Für eine Fusion ist es nicht ausreichend, die beiden Lipiddoppelschichten einfach räumlich zusammenzuzwingen, vielmehr sind Membrananker in Form langer Lipidketten oder der nativen Transmembranpeptide für eine effiziente Fusion erforderlich.^[4] Für SUVs (Small Unilamellar Vesicles) wird eine sequenzspezifische Vesikel-Vesikel-Fusion bereits durch ein Transmembranpeptid aus der Gruppe der synaptischen SNARE-Proteine^[5] oder ein G-Protein des Vesikulären-Stomatitis-Virus erreicht.^[6,7] Zudem belegt die Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes, dass im vollständig aufgebauten Komplex Wechselwirkungen jeweils zwischen den Linker-Regionen und zwischen den TMDs bestehen, was die Annahme stützt, dass diese Wechselwirkungen an den späten Schritten der Fusion beteiligt sind.^[8] Um den Prozess der verschmelzenden Mem-

branen und die Rolle der TMDs von Fusionsproteinen zu untersuchen, wurden Experimente mit Vesikeln durchgeführt, in denen die Fusionsproteine rekonstituiert wurden.^[9] Zudem wurden künstliche Modellsysteme synthetisiert, die die Aufgaben der SNARE-Proteine im Rahmen der Fusion *in vitro* nachbilden.^[10–16] Artificielle SNARE-Analoga bieten den Vorteil, die komplexe Aggregation bei Bildung des SNARE-Komplexes zu vereinfachen und systematisch sowohl Strukturvariationen als auch unterschiedliche Kombinationen der einzelnen Fragmente im Hinblick auf den Einfluss der einzelnen Komponenten auf den Fusionsprozess untersuchen zu können.

Wir stellen hier ein neues SNARE-Mimetikum vor, das ein Hybrid aus der in natürlichen SNARE-Proteinen vorkommenden TMD/Linker-Einheit und einer Peptidnucleinsäure(PNA)-Erkennungseinheit ist (Abbildung 1). In Bezug auf den SNARE-induzierten Mechanismus der Membranfusion ermöglicht das TMD/PNA-Modell, die Orientierung der Erkennungseinheiten im dimeren Erkennungskomplex derart einzustellen, dass die Komplexe in paralleler oder an-

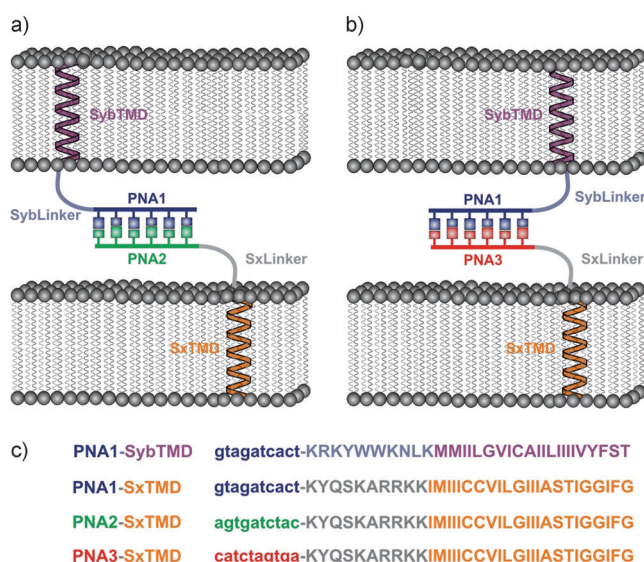


Abbildung 1. Vereinfachte PNA/Peptid-Systeme als SNARE-Modell, bestehend aus den nativen Linkern (hellblau/grau) und TMDs von Synaptobrevin (Syb, violett) und Syntaxin-1A (Sx, orange). PNA-Oligomere wurden als künstliche Erkennungseinheit genutzt, mit der Möglichkeit zur a) antiparallelen (PNA1 (blau) mit PNA2 (grün)) oder b) parallelen (PNA1 (blau) mit PNA3 (rot)) Orientierung der interagierenden Stränge. c) PNA/Peptid-Sequenzen unter Verwendung des gleichen Farbcodes für TMD-, Linker- und PNA-Einheiten.

[*] A. S. Lygina, K. Meyenberg, Prof. Dr. U. Diederichsen
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
E-Mail: udieder@gwdg.de

Prof. Dr. R. Jahn
Abteilung Neurobiologie
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)

[**] Wir danken Heinrich Prinzhorn für DLS-Messungen. Für großzügige Unterstützung im Rahmen des SFB 803 danken wir der DFG.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201101951> zu finden.

tiparalleler Orientierung zusammengeführt werden. Ferner kann die Effizienz der Membranfusion mit identischen (beide aus Sx) oder unterschiedlichen TMD-Einheiten (je eine aus Sx und Syb) verglichen werden. Nicht zuletzt eröffnen die TMD/PNA-SNARE-Analoga auch die Möglichkeit, die Membranfusion auf der Stufe der Hemifusion zu erfassen, die der vollständigen Membranfusion vorausgeht.

Das Design der neuen SNARE-analogen TMD/PNA-Hybride wurde hinsichtlich der TMD/Linker-Domänen an die natürlichen Peptidsequenzen von Syb und Sx angelehnt, während die Erkennungseinheit durch PNA-Oligomere ersetzt wurde. Diese bilden auf der Grundlage der Nucleobasen-Erkennung stabile und gut definierte Doppelstränge.^[17] Das PNA-Erkennungsmotiv ähnelt dem DNA-Doppelstrang, der bereits in SNARE-Analoga eingebracht wurde.^[14] PNA-Oligomere bieten jedoch die Vorteile der Möglichkeit zum gezielten, sequenzabhängigen, parallelen oder antiparallelen Aufbau von Doppelsträngen mit hoher thermischer Stabilität, einer hohen Sequenzselektivität, eines ungeladenen Rückgrats und Proteaseresistenz.^[18] Die TMD/Linker-Peptide der Peptid/PNA-Oligomere wurden mithilfe automatisierter, Mikrowellen-unterstützter Peptidfestphasensynthese (SPPS) nach der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Strategie hergestellt; anschließend wurden die Oligomere in manueller SPPS um die PNA-Motive verlängert (Hintergrundinformationen).

Die Sequenzen der PNA-Oligomere wurden so gewählt, dass die Duplexe jeweils in paralleler und antiparalleler Anordnung mit ausreichender Stabilität der Komplexe gebildet werden. PNA1 (gtgatctact) bildet einen antiparallelen Doppelstrang mit PNA2 (agtgtatctac) mit einer Stabilität von $T_m = 70^\circ\text{C}$ sowie einen parallelen Duplex mit PNA3 (catctagtga) mit $T_m = 46^\circ\text{C}$ (für beide Messungen: $4\ \mu\text{M}$, $100\ \text{mM}$ NaCl, $1\ \text{mM}$ EDTA, $20\ \text{mM}$ HEPES, pH 7.4; EDTA = Ethyldiamintetraacetat, HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure).^[17] Mithilfe von temperaturabhängiger UV-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Verknüpfung der PNA-Oligomere mit den Linker-Peptiden von Syb und Sx einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Stabilität der Duplexe hat (Abbildung S1, Hintergrundinformationen).

Für die Fusionsexperimente wurden Vesikel verwendet, deren hydrodynamischer Durchmesser von $(100 \pm 20)\ \text{nm}$ mithilfe dynamischer Lichtstreuung bestimmt wurde (Herstellung siehe Hintergrundinformationen).^[19] In einem ersten Ansatz wurde die Effizienz des Lipid Mixings über einen Fluoreszenz-Dequenching-Assay bestimmt, der auf resonantem Fluoreszenzenergietransfer (FRET) basiert.^[20] PNA1-SybTMD enthaltende Vesikel wurden mit Nitrobenzofuran (NBD) als Donorfluorophor und Lissaminrhodamin (Rh) als Akzeptorfluorophor versehen, indem die Farbstoffe mit der Kopfgruppe von 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin(DOPE)-Lipidmolekülen verknüpft waren. Die Fusion mit Vesikeln, deren Membranen keinen Farbstoff enthalten, resultierte in der Vermischung der Lipide unter Vergrößerung des Donor-Akzeptor-Abstands und somit in einer Verringerung der FRET-Effizienz und einer erhöhten Donoremission (Abbildung 2a). Tatsächlich wurde beim Mischen von Vesikeln, die einerseits PNA2-SxTMD oder PNA3-SxTMD und

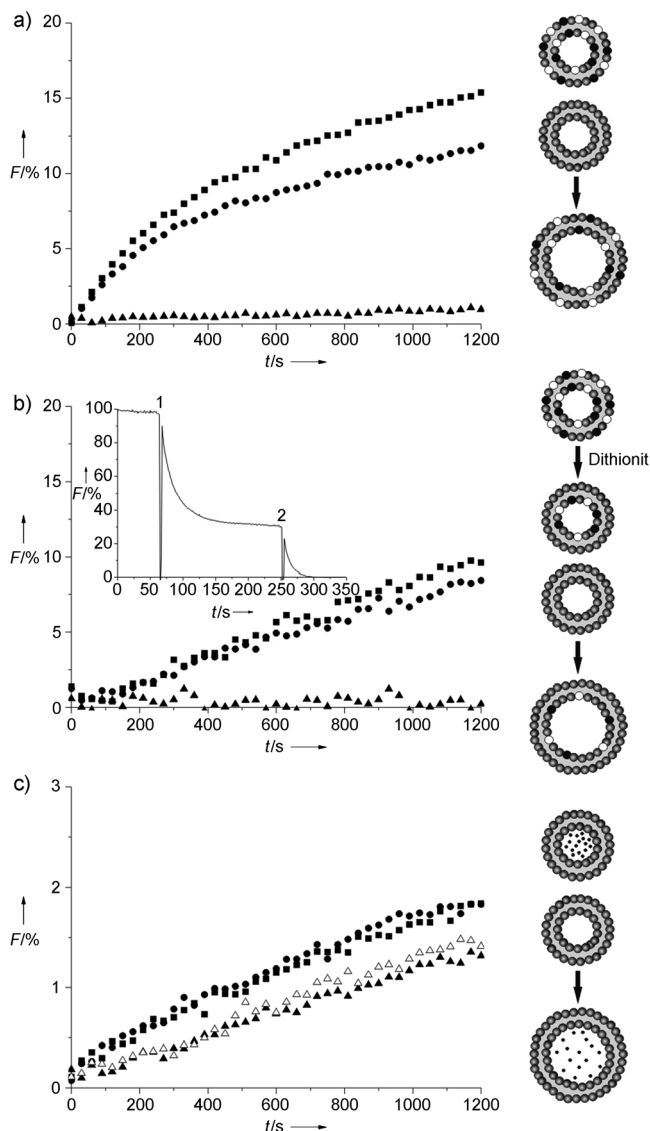


Abbildung 2. Lipid Mixing der äußeren und inneren Lipidschicht von Vesikeln mit TMD/PNA-Modellsystemen. a) Lipid Mixing von NBD/Rh-markierten Vesikeln mit PNA1-SybTMD und nicht markierten Vesikeln mit PNA1-SxTMD (Kontrollexperiment, ▲), PNA2-SxTMD (antiparallele Orientierung, ●) oder PNA3-SxTMD (parallele Orientierung, ■). b) Lipid Mixing der inneren Lipidschicht. NBD/Rh-markierte Vesikel mit PNA1-SybTMD wurden mit Natriumdithionit behandelt und vor einer Verwendung im Lipid-Mixing-Experiment mit Größenausschlusschromatographie gereinigt. Einschub: NBD-Fluoreszenz vor und nach (1) der Zugabe von Natriumdithionit sowie vollständige Eliminierung der Fluoreszenz nach der Zerstörung der Vesikel mit 0.1 % TritonX-100 (2). c) Content Mixing der Vesikel mit TMD/PNA-Modellsystemen. In die Vesikel mit PNA1-SybTMD wurde SRB eingeschlossen; die so erhaltenen Vesikel wurden mit nicht markierten Vesikeln mit PNA1-SxTMD (Kontrollexperiment, ▲), PNA2-SxTMD (antiparallele Orientierung, ●), PNA3-SxTMD (parallele Orientierung, ■), oder nicht markierten Vesikeln ohne jegliches Peptid (Leakage, △) vermischt.

andererseits PNA1-SybTMD enthielten (Bedingungen siehe Hintergrundinformationen), ein signifikanter Anstieg der NBD-Emission beobachtet. Bei paralleler Orientierung der PNA-Oligomere (PNA1/PNA3) wurde eine höhere Lipid-

Mixing-Effizienz als beim antiparallel wechselwirkenden Komplex (PNA1/PNA2) beobachtet. Die Bevorzugung der parallelen gegenüber antiparallelen Orientierung spiegelt die Ausrichtung im natürlichen SNARE-Erkennungskomplex wider. In einem Kontrollexperiment mit PNA1-SxTMD in beiden Vesikeln wurde kein Anstieg der NBD-Emission beobachtet, da PNA1 keine selbstkomplementären Doppelstränge bildet.

Die vollständige Fusion von Membrandoppelschichten erfordert ein Vermischen der Lipide in der inneren und äußeren Schicht. Um auch das Mischen der inneren Membranschicht zu überprüfen, wurden die Lipid-Mixing-Experimente nach der Behandlung der Vesikel mit Natriumdithionit wiederholt (Abbildung 2b). Die NBD-Fluoreszenz der äußeren Lipidschicht wird mit Natriumdithionit selektiv ausgeschaltet,^[21] während die Emission der inneren Schicht erhalten bleibt, da Dithionit die Membran nicht passieren kann. Rechnerisch wurde bei 100 nm großen Vesikeln eine Abnahme der NBD-Fluoreszenz um 56 % erwartet.^[22] Tatsächlich wurde für unser System bei Zugabe von Natriumdithionit eine Abnahme der Fluoreszenz um 60 % beobachtet (Abbildung 2b). Ein effizientes Lipid Mixing wurde auch anhand des FRET-Effekts für Dithionit-behandelte Vesikel mit PNA-Doppelstrang-Erkennung in paralleler und antiparalleler Orientierung beobachtet (Abbildung 2b).

Da ein FRET-Effekt bei Dithionit-behandelten Vesikeln auf der Wechselwirkung von NBD-Fluorophoren der inneren Lipidschicht beruht, wurde klar, dass sich nicht nur die äußeren Lipidschichten (Hemifusion), sondern auch die Lipide der inneren Schichten mischen (vollständige Fusion). Allerdings unterscheiden sich die Kinetiken des Lipid-Mixing-Ansatzes beider Schichten (Abbildung 2a) und des Lipid Mixings der inneren Lipidschicht (Abbildung 2b) deutlich. Die durch unser TMD/PNA-Modellsystem vermittelte Membranfusion scheint den Lipid-Mixing-Resultaten zufolge zumindest teilweise auf der Stufe der Hemifusion terminiert zu werden, sodass lediglich ein Mischen der äußeren Membran beobachtet wird. Für das Lipid Mixing der inneren Schicht waren Effizienz und Kinetik bei paralleler und antiparalleler Orientierung der PNA-Duplexe ähnlich.

Um die Hypothese einer teilweisen Hemifusion zu stützen, wurden Content-Mixing-Experimente durchgeführt (Abbildung 2c), in denen die Fluoreszenz-Selbstlöschung von Sulforhodamin B (SRB) bei hohen Konzentrationen (> 10 mM) genutzt wurde.^[23] Zwei Vesikelpopulationen wurden vorbereitet, von denen eine eingeschlossenes SRB und die andere keine Markierung enthielt. Eine Fusion dieser Vesikel sollte zum Anstieg der Fluoreszenz durch Verdünnung der SRB-Farbstoffmoleküle führen (Abbildung 2c). Für Content Mixing wurde lediglich eine sehr geringe Effizienz festgestellt und kein Unterschied für die parallele und antiparallele Orientierung des PNA-Erkennungsmotivs beobachtet. Die Ergebnisse der Lipid-Mixing- und Content-Mixing-Experimente legen nahe, dass sich der Fusionsprozess durch die den Fusionsprozess vermittelnden TMD/PNA-SNARE-Analoga teilweise auf der Stufe der Hemifusion anhalten lässt.

Die Lipid-Mixing-Experimente wurden zudem genutzt, um den Einfluss und die Beteiligung der TMDs am Fusions-

prozess zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die TMD/PNA-vermittelte Vesikelfusion von PNA-Komplexen mit identischen (Sx) und unterschiedlichen TMDs (Sx und Syb) verglichen. Sofern die TMDs einen Einfluss auf den Fusionsprozess haben, sollten Unterschiede in der Effizienz zu beobachten sein. Lipid-Mixing-Experimente wurden sowohl für parallele (PNA1-SxTMD oder PNA1-SybTMD mit der komplementären PNA3-SxTMD; Abbildung 3a) als auch für

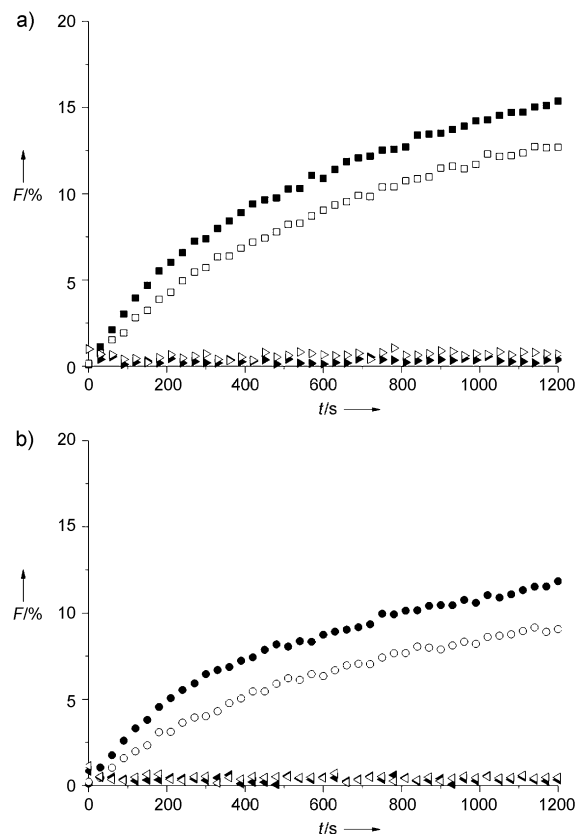


Abbildung 3. Lipid Mixing von Vesikeln mit PNA/Peptid-Modellsystemen. Unmarkierte Vesikel wurden mit NBD/Rh-markierten Vesikeln vermischt. a) Parallele Orientierung der PNA-Oligomere im PNA/Peptid-Modellsystem: PNA3-SxTMD/PNA1-SybTMD (■), PNA3-SxTMD/PNA1-SybTMD (►) nach der Behandlung der Vesikel mit 5 % Ei-Lysophosphatidylcholin (LPC); PNA3-SxTMD/PNA1-SxTMD (□), PNA3-SxTMD/PNA1-SxTMD (▷) nach der Behandlung der Vesikel mit 5 % LPC; b) Antiparallele Orientierung der PNA-Oligomere im PNA/Peptid-Modellsystem: PNA2-SxTMD/PNA1-SybTMD (●), PNA2-SxTMD/PNA1-SybTMD (◄) nach der Behandlung der markierten Vesikel mit 5 % LPC; PNA2-SxTMD/PNA1-SxTMD (○), PNA2-SxTMD/PNA1-SxTMD (◄) nach der Behandlung der markierten Vesikel mit 5 % LPC. Für die Bedingungen siehe Hintergrundinformationen.

antiparallele Erkennung (PNA1-SxTMD oder PNA1-SybTMD mit der komplementären PNA2-SxTMD; Abbildung 3b) durchgeführt. In beiden Orientierungen wurde bei Verwendung von identischen Sx-TMDs eine geringere Effizienz des Lipid Mixings gegenüber jener des natürlichen, gemischten Syx-Sb-TMD-Paars beobachtet. Offensichtlich fungiert die TMD nicht ausschließlich als Membrananker, sondern leistet auch einen Beitrag zum Fusionsprozess.

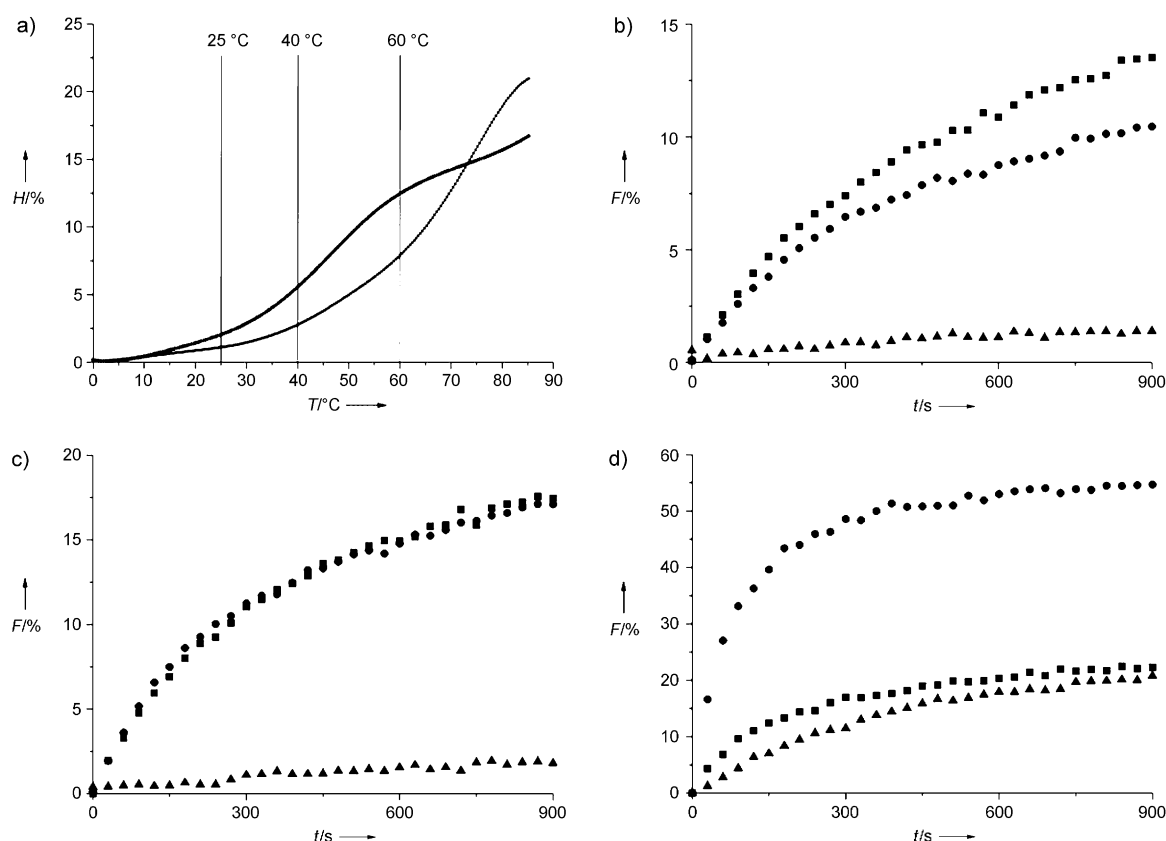


Abbildung 4. Lipid-Mixing-Experimente in Abhängigkeit von der Temperatur. a) Schmelzkurven parallel (PNA1/PNA3, schwarz) und antiparallel (PNA1/PNA2, grau) orientierter PNA-Duplexe. NBD/Rh-markierte Vesikel (PNA1-SybTMD) wurden mit unmarkierten Vesikeln PNA1-SxTMD (Kontrollexperiment, ▲), PNA2-SxTMD (antiparallele Orientierung, ●), PNA3-SxTMD (parallele Orientierung, ■) vermischt. Das Lipid-Mixing-Experiment wurde bei b) 25, c) 40 und d) 60 °C durchgeführt. Generell ist zudem ein Ansteigen der Lipid-Mixing-Effizienz mit zunehmender Temperatur zu beobachten.^[26,27]

Die Zugabe von Lysophosphatidylcholin (LPC) zu Vesikelmembranen führt zu einer positiven Membrankrümmung, wodurch eine Bildung des Hemifusionsintermediats und damit die Fusion von Membranen in Zellen und Modellsystemen inhibiert werden.^[16,24,25] In einem Kontrollexperiment wurde eine TMD/PNA-Vesikelfusion in Gegenwart von 5 Mol-% LPC (Abbildung 3) durchgeführt; dabei wurde erwartungsgemäß kein Lipid Mixing beobachtet.

Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass sowohl eine parallele als auch eine antiparallele Anordnung von PNA-Strängen die Fusion induziert, wobei die parallele Orientierung eine etwas höhere Effizienz aufweist. Um die Rolle der Doppelstrangerkennung genauer zu beleuchten, wurden die unterschiedlichen Duplexstabilitäten der parallel und antiparallel paarenden PNA-Komplexe genutzt.^[17] Weitere Lipid-Mixing-Experimente wurden daher bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Bereich ausgeführt, der den Doppelstrang, den Einzelstrang sowie den Übergangsbereich charakterisiert (Abbildung 4).

Bei 25 °C bilden die Erkennungsmotive PNA1/PNA2 und PNA1/PNA3 in beiden Orientierungen stabile Duplexe, und eine höhere Effizienz für die Fusion unter Erkennung mit paralleler Orientierung wird beobachtet. Dies ist ein Hinweis auf die Bevorzugung der parallelen Anordnung für die Induktion der Vesikelfusion. Bei 40 °C wird eine vergleichbare

Effizienz in den Lipid-Mixing-Experimenten beider Anordnungen erhalten, da die PNAs in paralleler Orientierung (PNA1/PNA3) in der Nähe zur Schmelztemperatur von $T_m = 46$ °C teilweise entpaart vorliegen; der Doppelstrang der antiparallel gepaarten PNAs (PNA1/PNA2) bleibt jedoch nahezu intakt ($T_m = 70$ °C). Bei 60 °C wurde ein Lipid Mixing nur noch für die antiparallele Orientierung der PNAs beobachtet, während eine Erkennung in paralleler Anordnung nicht möglich war und in diesem Experiment lediglich zu unspezifischem Lipid Mixing führte. Damit spiegeln die Lipid-Mixing-Experimente mit den PNA/Peptid-SNARE-Analoga bei verschiedenen Temperaturen sehr gut die Abhängigkeit der Fusion von der Schmelztemperatur der PNA-Duplexe wider. Die durch die TMD/PNA-SNARE-Analoga vermittelte Membranfusion erfordert eine PNA/PNA-Erkennung, sodass der Fusionsprozess durch Temperaturvariation modulierbar ist.

Ein neues, vereinfachtes Modellsystem für SNARE-Protein-induzierte Membranfusion wurde vorgestellt. Als Transmembran- und Linkerdomäne wurden die natürlichen Sequenzen von zwei membranverankerten SNARE-Proteinen übernommen und mit entsprechenden PNA-Erkennungseinheiten verknüpft. Die Bildung von PNA/PNA-Doppelsträngen über komplementäre Basenpaarung ermöglicht die Untersuchung des Fusionsprozesses mit Anordnung

der TMDs auf der gleichen oder auf unterschiedlichen Seiten des Erkennungsmotivs. Die für einen funktionalen SNARE-Komplex erforderlichen vier α -Helices erschweren die Analyse des abschließenden Fusionschrittes, auch wegen der Bildung von Teilkomplexen;^[2] demgegenüber verringert das auf lediglich zwei TMD-Helices basierende Modellsystem die Komplexität. Die dem SNARE-Komplex analoge, parallele Ausrichtung des Erkennungsmotivs erwies sich als effektiver für die Fusion. Die neuen PNA/Peptid-Hybride ermöglichen eine Steuerung der Vesikelfusion über die Doppelstrangstabilität und damit über die Sequenz der PNA und die Temperatur. Insbesondere anhand der Content-Mixing-Experimente wurde eine Möglichkeit aufgezeigt, die PNA/Peptid-Hybride zu verwenden, um einen signifikanten Anteil an Vesikeln auf der Stufe der Hemifusion zu generieren. Einen interessanten Hinweis auf den Mechanismus des SNARE-vermittelten Fusionsprozesses liefert die Tatsache, dass die Fusions-effizienz bei Verwendung unterschiedlicher TMDs höher ist als bei Einsatz identischer TMDs. Weitere Modifikationen der PNA/Peptid-Chimären versprechen Einblicke in den Mechanismus der SNARE-induzierten Membranfusion; systematische Modifikationen des Linker-Bereichs, der TMDs und der Erkennungseinheit werden derzeit untersucht.

Eingegangen am 19. März 2011

Online veröffentlicht am 22. Juli 2011

Stichwörter: Hemifusion · Membranproteine · Peptidnucleinsäuren · Transmembrandomäne · Vesikel

- [1] L. V. Chernomordik, M. M. Kozlov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 675–683.
- [2] R. Jahn, R. Scheller, *Nat. Rev.* **2006**, *7*, 631–643.
- [3] A. T. Brunger, K. Weninger, M. Bowen, S. Chu, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 903–928.
- [4] J. A. McNew, T. Weber, F. Parlati, R. J. Johnston, T. J. Melia, T. H. Söllner, J. E. Rothman, *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 105–117.
- [5] D. Langosch, M. J. Crane, B. Brosig, A. Hellwig, L. K. Tamm, J. Reed, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 709–721.
- [6] D. Langosch, B. Brosig, R. Pipkorn, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32016–32021.
- [7] S. M. Dennison, N. Greenfield, J. Lenard, R. B. Lentz, *Biochemistry* **2002**, *41*, 14925–14934.
- [8] A. Stein, G. Weber, M. C. Wahl, R. Jahn, *Nature* **2009**, *460*, 525–528.
- [9] a) W. Wickner, R. Schekman, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 658–664; b) S. C. Harrison, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 690–698.
- [10] A. Richard, V. Marchi-Artzner, M. N. Lalloz, M. J. Brienne, F. Artzner, T. Gulik-Krzywicki, M. A. Guedeau-Boudeville, J. M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15279–15284.
- [11] Y. Gong, Y. Luo, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14430–14431.
- [12] M. Ma, A. Paredes, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14456–14458.
- [13] M. Ma, Y. Gong, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16919–16926.
- [14] G. Stengel, R. Zahn, F. Höök, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9584–9585.
- [15] Y. H. M. Chan, B. van Lengerich, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 979–984.
- [16] H. R. Marsden, N. A. Elbers, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Kros, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2366–2369; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2330–2333.
- [17] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Norden, *Nature* **1994**, *368*, 561–563.
- [18] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Q. Rev. Biophys.* **1996**, *29*, 369–394.
- [19] P. E. Schneggenburger, S. Müller, B. Worbs, C. Steinem, U. Diederichsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8020–8028.
- [20] D. K. Struck, D. Hoekstra, R. E. Pagano, *Biochemistry* **1981**, *20*, 4093–4099.
- [21] J. C. McIntyre, R. G. Sleight, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11819–11827.
- [22] M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1985**, *812*, 55–65.
- [23] R. E. Jastimi, M. Lafleur, *Biospectroscopy* **1999**, *5*, 133–140.
- [24] S. S. Vogel, E. A. Leikina, L. V. Chernomordik, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25764–25768.
- [25] P. L. Yeagle, F. T. Smith, J. E. Young, T. D. Flanagan, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1820–1827.
- [26] J. van der Bosch, C. Schudt, D. Pette, *Exp. Cell Res.* **1973**, *82*, 433–438.
- [27] S. Zellmer, G. Cevc, P. Risse, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1994**, *1196*, 101–113.