

Rasterkraftmikroskopie
der Grenzflächen-Assoziation
von Human Annexin V an Glimmer

Boryana Unterbeck

Rasterkraftmikroskopie
der Grenzflächen-Assoziation
von Human Annexin V an Glimmer

Dissertation
Zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Universität Bielefeld

von
Boryana Unterbeck

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2009

Vorsitzender: Prof. Dr. D. Kuck
1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Neumann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Heberle

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
2 Materialien und Methoden	6
2.1 Materialien und Arbeitstechniken.....	6
2.1.1 Annexin V-Lösungen.....	6
2.1.2 Glimmer.....	8
2.1.3 Präparation von Annexin V auf Lipid-Doppelschichten.....	8
2.1.4 Präparation von Annexin V direkt auf Glimmeroberfläche.....	10
2.2 Methoden.....	10
2.2.1 Das verwendete Rasterkraftmikroskop.....	10
2.2.2 Die Kraftsensoren.....	11
2.2.3 Abbildungsparameter.....	12
3 Ergebnisse	13
3.1 Festkörpergestützte Phospholipid-Doppelschichten.....	13
3.2 Tapping Mode-Aufnahmen von Lipid-Doppelschichten, auf denen Annexin V-Moleküle über Ca^{2+} kristallisiert sind.....	14
3.3 Rasterkraftmikroskopie von Annexin V an Glimmeroberfläche.....	17
3.3.1 Bestimmung des experimentellen Belegungsgrades f	28
4 Datenanalyse und Diskussion	31
4.1 Das Langmuir-Modell.....	31
4.1.1 Berechnung der Konzentration $[A_b]_{\text{max}}$ von maximal gebundenem Annexin V.....	31
4.1.2 Globale Annexin V-Bindung an Glimmeroberfläche.....	32
4.1.3 Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration auf die Proteinadsorption.....	36
4.2 Ionen-Elektrostatik der ternären Annexin V-Glimmer-Adsorptionskomplexe.....	41
4.2.1 Chemische Thermodynamik der Adsorption.....	41
4.2.2 I_c -Abhängigkeit der $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ -Werte.....	43

4.2.3 Abhängigkeit des effektiven Ladungszahlprodukts $ z_+ z_- ^{eff}$ von der Ca^{2+} -Totalkonzentration.....	47
5 Zusammenfassung	51
6 Literaturverzeichnis	54
7 Anhang	60
A1 Tabelle 3 (3A, 3B, 3C): Berechnete Zahlenwerte für die freie Annexin V-Konzentration ($[A] / \mu M$) und das Verhältnis ($f / (1 - f)$) bei verschiedenen Ionenstärken.....	60
A2 Gleichgewichtskonstante und Ionenstärke.....	63
A3 Debye-Hückel-Parameter.....	64
A3.1 Debyelänge und Parameteräquivalenzen.....	64
A3.2 Zahlenwerte.....	66
A3.3 Kontaktabstand a	67
8 Abkürzungsverzeichnis	68
9 Danksagung	69

1 Einleitung

Das intrazelluläre Protein Annexin V kommt in fast allen Lebewesen vor. Immer wieder flammt ein reges Interesse an seinen biologischen Funktionen auf. Es zählt zur Annexinfamilie, d.h., einer Gruppe strukturell homologer eukaryotischer Proteine, deren charakteristische biochemische Eigenschaft die Ca^{2+} -abhängige Bindung an anionische Phospholipidmembranen ist (Swairjo und Seaton, 1994). Die Annexine sind an einer Vielzahl von Zellprozessen beteiligt, zum Beispiel an Membranfusionen (Oshry et al., 1991), Antikoagulation (Reutelingsperger et al., 1988), Inhibierung der Phospholipase A_2 (Buckland und Wilton, 1998) sowie der Protein Kinase C (Dubois et al., 1998), Exo- und Endocytose (Creutz, 1992, Emans et al., 1993).

Die dreidimensionale Struktur des Humanen Annexin V (relative Molmasse $M_r = 35.800$) wurde 1990 durch hochauflösende Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Huber et al., 1990a,b). Es besteht aus vier α -helikalen Domänen, römisch mit I bis IV bezeichnet, die eine zentrale hydrophile Pore mit einem fluktuierenden mittleren Durchmesser von röntgenographisch nur 0.1 nm umgeben. Diese planare, zirkuläre Anordnung der Domänen hat ein konvex-konkaves Profil (Abb. 1). Die Abmessungen der Länge, Breite und Höhe betragen $6.4 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$ als Ebene, deren Flächennormale parallel zur Pore ist und deren Höhe 3 nm ist. Die Calciumbindungsstellen sind auf der konvexen Seite des Proteins lokalisiert, während sich sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus auf der konkaven Seite befinden (Andree et al., 1993).

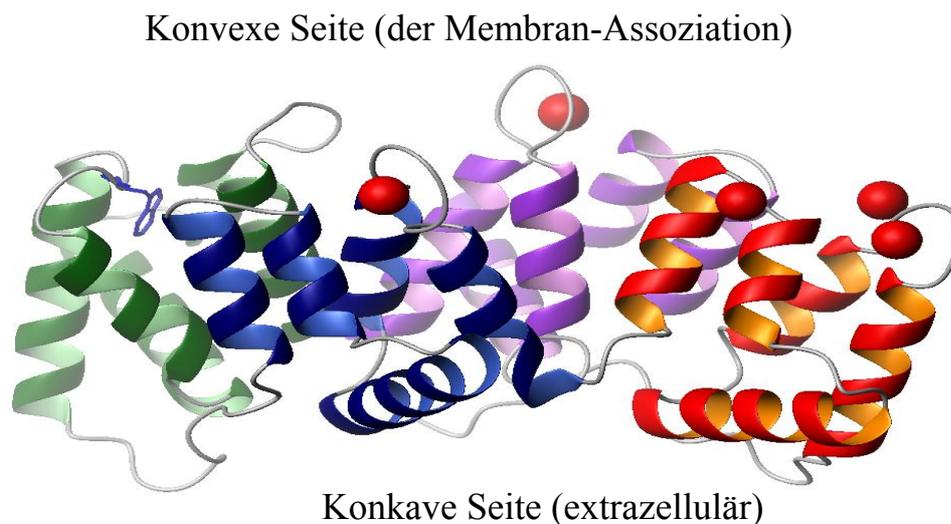


Abb. 1: Bändermodell des Annexin V mit den vier homologen Domänen. Die konvexe Seite des Moleküls hat fünf Ca^{2+} -Bindungsstellen. Die \bullet Ca^{2+} -Ionen vermitteln den Kontakt zu den Membran-Lipiden (Huber et al. 1992).

Human Annexin V hat einige intrinsisch gebundene Ca^{2+} -Ionen. Als freies Protein, in Abwesenheit von Lipiden, bindet Annexin V zusätzliche Ca^{2+} -Ionen mit Gleichgewichtsdissoziationskonstanten im millimolaren Bereich (Schlaepfer et al., 1987). In Anwesenheit von anionischen Lipiden ist die Affinität für Ca^{2+} -Ionen stark erhöht.

Die Ca^{2+} -abhängige Bindung des Annexin V an die Lipid-Doppelschichten ist durch Gleichgewichtsdissoziationskonstanten bis in den nanomolaren Bereich charakterisiert (Tait und Gibson, 1992). Bei der peripheren Oberflächenanlagerung entstehen ternäre Komplexe. Darin „verbrücken“ die Ca^{2+} -Ionen mehrere anionische Gruppen des Proteins mit mehreren anionischen Phosphatidylserinmolekülen (Swairjo et al., 1995).

Die Bindung von Ca^{2+} an Annexin V sowohl im Ternärkomplex, als auch ohne Lipid bei hohen Calciumkonzentrationen (im millimolaren Bereich), verursacht wahrscheinlich mehrere lokale Konformationsänderungen. Zum Beispiel bewegt sich die Aminosäure Tryptophan (Trp 187) vom Inneren des Proteins an die Oberfläche (Sopkova et al., 1993). Dies verändert die Fluoreszenz-Emission (Pigault und Gerard, 1984, Sopkova et al., 1994).

Die Eigenschaft des Proteins, an anionische Lipide wie Phosphatidylserin (PS) zu binden (und nur schwach an Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin), wird diagnostisch in der Medizin eingesetzt, zum Beispiel zur frühzeitigen Erkennung von sterbenden Zellen. Normalerweise enthält die Außenseite von Zellen nur einige anionische Lipide. In einer frühen Apoptosephase (während der die Zellmembran noch intakt ist) wird PS von der inneren Lipidschicht zur äußeren Lipidschicht der Membran-Doppelschicht transportiert. Bereits vor dem Auftreten morphologischer Veränderungen im Zuge der Apoptose lässt sich die PS-Asymmetrie durch das Auftreten von Annexin V an der äußeren Zellmembran analysieren (Cardo-Vila et al., 2003, Hawkins et al., 2002).

Die zentrale Pore von Annexin V, deren Durchmesser konformativ fluktuiert, ist mit anionischen Aminosäureresten ausgekleidet und mit Wassermolekülen gefüllt. Die fluktuativ kurzzeitoffene Konformation des Proteins stellt einen konformativ-flexiblen Kanal für Kationen dar (Huber et al., 1992, Gerke und Moss, 1997, Liemann et al., 1996, Neumann et al., 2000). Der Oberflächenkomplex Ca^{2+} /Annexin V bildet, im Kontakt mit Phospholipid-Doppelschichten, zwei Kanaltypen für den Transport von K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} -, und Mg^{2+} -Ionen. In Abhängigkeit von der Annexin V-Konzentration bilden sich membrandurchspannende Proteinkomplexe (Trimere) mit „großen“ Kanalereignissen von Typ (I) (Leitwert 30 pS). Diese Komplexe treten überwiegend bei hohen Annexin V-

Konzentrationen auf $[AN] \geq \bar{K} = 5 \text{ nM}$ bei 296 K (23 °C). Die Typ (II)-Kanalereignisse (Leitwert 3 pS) sind kleiner und treten vorwiegend bei niedrigen Annexin V-Konzentrationen $[AN] \leq \bar{K}$ auf; sie beruhen auf dem außen adsorbierten Monomer (Neumann et al., 2000).

Elektronenmikroskopie (Voges et al., 1994, Mosser et al., 1991) und Rasterkraftmikroskopie (Reviakine et al., 1998, Reviakine et al., 2000) zeigen, dass das auf den Lipidschichten gebundene Annexin V eine zweidimensionale Kristallstruktur ausbildet. Die Protein-Moleküle binden als Trimere über die Ca^{2+} -Bindungsstellen an die Membran. Dabei zeigen sich eine hexagonale (p6)-Symmetrie und eine (p3)-Anordnung. Der weniger kompakte Zustand (p6) kommt bei niedriger Protein-Oberflächendichte an festkörpergestützten Phospholipid-Doppelschichten vor [engl.: solid supported phospholipid bilayers, (SPBs)] und wird bei einem Gehalt an DOPS von 5-95 % (Masse) beobachtet. Die mehr kompakte, aber weniger symmetrische (p3) Phase kann nur bei genügend hohem Anteil an DOPS (mehr als 40 % Masse) erreicht werden (Reviakine et al., 2001).

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit sind die thermodynamischen Konstanten der einzelnen Ca^{2+} - und Annexin V-Bindungsprozesse an Glimmer. Dazu werden verschiedene Parameter variiert wie Annexin V-Konzentration, Ca^{2+} -Konzentration und Ionenstärke der Lösung. Der Protein-Belegungsgrad wird direkt mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie ermittelt. Die physikalisch-chemische Analyse ergibt die globalen Dissoziationsgleichgewichtskonstanten der Glimmer/Annexin V/ Ca^{2+} Ternärkomplexe. Die weitere Analyse führt zu Zahlenwerten der einzelnen Binärkomplexe. Die erhaltenen Ergebnisse dienen als Basis für weitere analytische Anwendungen und Perspektiven wie für die industrielle Herstellung von Oberflächenschichten des Annexin V, die in der Biosensorik von anionischen Lipidbereichen zur Anwendung denkbar sind.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Arbeitstechniken

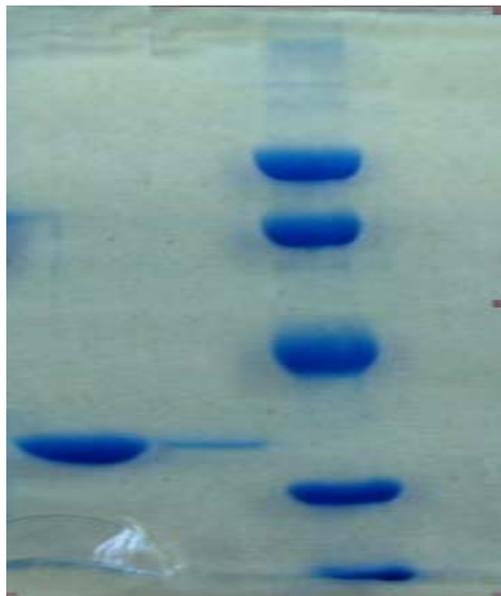
2.1.1 Annexin V-Lösungen

Eine etwa 6.21 μM Lösung von Human-Annexin V in 0.66 mM HEPES, 0.02 % NaN_3 , pH 7.4 war eine freundliche Spende von Frau Dr. Katja Tönsing, Universität Bielefeld. Das rekombinante Humane Annexin V wurde als Wildtyp in *E. coli*-Bakterien exprimiert. Zur Aufreinigung des isolierten Proteins erfolgte zunächst eine Anreicherung des Proteins durch Bindung an PS-Vesikel und schließlich eine Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie (Burger et al., 1993).

Die Konzentration von Annexin V, im Folgenden kurz Annexin genannt, wird spektroskopisch durch Messung der Absorption A_{280} bei der Wellenlänge $\lambda = 280 \text{ nm}$ bestimmt. Rein formal ist bei dieser Wellenlänge die Absorbanz $A_{280} = 6$, entsprechend einer 279 μM (10 mg mL^{-1}) Annexin-Lösung (Funakoshi et al., 1987). Der Extinktionskoeffizient ist $\epsilon_{280} = 21.508 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$). Eine Quantifizierung des Proteins mit 2,2-Dichinoly-4,4-Dicarbonsäure (BCA-Reagenz, Pierce Europe b.v., Holland) entsprechend der Anleitung des Herstellers (Smith et al., 1985) liefert die gleichen Ergebnisse wie die A_{280} -Messungen.

Die durchgeführte SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ergibt eine Bande, die der relativen Molmasse ($M_r = 35.800$) zugeordnet werden kann. Eichung durch Standardproben (Abb. 2). Bei SDS-PAGE werden folgende Pufferlösungen eingesetzt: Probenpuffer: 0.5 M Tris, 20 % (v/v) Glycerin, 2.5 % (w/v) SDS, 10 mM DTE, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8, eingestellt mit HCl. Trenngelpuffer (10 %): 10 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid, 1.5 M Tris, 0.99 % (w/v) SDS, 0.08 % (v/v) TEMED, 0.3 % (w/v) AMPS, pH 8.8, eingestellt mit HCl. Trenngelpuffer (7.5 %): 7.5 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid, 1.5 M Tris, 0.99 % (w/v) SDS, 0.08 % (v/v) TEMED, 0.3 % (w/v) AMPS, pH 8.8, eingestellt mit HCl. Trenngelpuffer (12.5 %): 12.5 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid, 1.5 M Tris, 0.99 % (w/v) SDS, 0.08 % (v/v) TEMED, 0.3 % (w/v) AMPS, pH 8.8, eingestellt mit HCl. Trenngelpuffer (15 %): 15 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid, 1.5 M Tris, 0.99 % (w/v) SDS, 0.08 %

(v/v) TEMED, 0.3 % (w/v) AMPS, pH 8.8, eingestellt mit HCl. Sammelgelpuffer: 4 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid, 0.5 M Tris, 0.95 % (w/v) SDS, 0.19 % (v/v) TEMED, 2.8 % (w/v) AMPS, pH 6.8, eingestellt mit HCl. Elektrodenpuffer: 0.025 M Tris, 0.192 M Glycerin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3. Färbelösung: 0.05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250, 7 % (v/v) Essigsäure.



Phosphorylase (94.000 Da)

Albumin (67.000 Da)

Ovalbumin (43.000 Da)

Carbonic Anhydrase (30.000 Da)

Trypsin Inhibitor (20.100 Da)

Annexin V, Test II

Annexin V, Test I

LMW Marker

Abb. 2: SDS-PAGE von Annexin V.

Aufgetragene Proben: Annexin V, Test II: 70 μ M Annexinlösung in Probenpuffer.

Annexin V, Test I: 10 μ M Annexinlösung in Probenpuffer. Beide Annexin V-Lösungen sind mit Probenpuffer im Verhältnis (v/v) 1:1 verdünnt und 45 min bei 310 K (37 °C) inkubiert.

Marker LMW 17-0446-01 von der Firma Pharmacia Biotech.

2.1.2 Glimmer

Um Proteine rasterkraftmikroskopisch zu untersuchen, müssen diese auf einer möglichst flachen Oberfläche immobilisiert werden. Die Größe der während der Messungen auf die Moleküle ausgeübten Kräfte zeigen, ob eine schwache (unspezifische) Immobilisierung vorliegt, oder ob die Objekte fester an die Oberfläche gebunden sind.

Neben der Oberflächenchemie eines Substrates ist vor allem die Rauigkeit von Bedeutung. Hochauflösende AFM-Abbildungen sind nur möglich, wenn die Rauigkeit der Oberfläche kleiner als die typische Rauigkeit der zu untersuchenden Moleküle ist (d.h. kleiner als etwa 1 nm). Als Substrat hat sich bei den Experimenten Glimmer (engl.: mica) bewährt. Das ist ein Schichtsilikat, welches sich leicht entlang definierter Ebenen spalten lässt, so dass atomar flache, negativ geladene Oberflächen entstehen (Müller et al., 1997).

2.1.3 Präparation von Annexin V auf Lipid-Doppelschichten

Synthetische 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-Phospho-L-Serin (DOPS) und 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin (DOPC) von Avanti Polar Lipids, Birmingham, U.S.A werden für die Vesikelherstellung eingesetzt (Tabelle 1).

Als Pufferlösungen werden 150 mM NaCl, 10 mM Hepes (Puffer A), pH 7.4, T = 293 K (20 °C) und 150 mM NaCl, 10 mM Hepes, 20 mM CaCl₂ (Puffer B), pH 7.4, T = 293 K (20 °C) verwendet.

Zur Erzeugung festkörpergestützten Lipid-Doppelschichten wird die Vesikelspreittechnik angewendet. Die Technik beruht auf der Adsorption von Vesikeln an einer entsprechend präparierten Oberfläche mit anschließender Deformation und Spreiten zu einer Lipid-Doppelschicht.

Unilamellare Phospholipidvesikel werden mit der Methode der Extrusion (Mayer et al., 1986) durch Polycarbonatmembranen definierter Porengröße hergestellt. Dazu werden die Phospholipide im molaren Verhältnis DOPS : DOPC von 1 : 2 in Chloroform gemischt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur und Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Der Lipidfilm wird in Puffer A resuspendiert (Endkonzentration: 10 mg Phospholipid / mL Suspension). Nach fünf Einfrier-Auftau-Zyklen (Einfrieren in flüssigem Stickstoff, Auftauen in etwa 50 °C warmen Wasser), wird die Lipidsuspension in der Extrusionsapparatur (LiposoFast-Extruder, Avestin/Milch,

Deutschland) elfmal durch 400 nm Polycarbonatmembranfilter gepresst und direkt weiterverwendet.

Festkörpergestützte Phospholipid-Doppelschichten, die 34 % (Masse) DOPS enthalten, werden aus 100 μL extrudierter Vesikelsuspension (Lipidtotalkonzentration $[L_T] = 20 \mu\text{M}$) auf frisch abgezogenes Glimmer Plättchen (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) präpariert und 30-60 min inkubiert bei 293 K (20 °C). Annexin V wird in der Konzentration von 1.2 μM nach dem Waschen der Vesikel mit Puffer A zugegeben und wieder für 30 min inkubiert. Die Ca^{2+} -Konzentration liegt im Bereich $1.5 \leq [\text{Ca}]/\text{mM} \leq 2$.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Phospholipide

Abkürzung	Name, Strukturformel und Eigenschaften des Lipids	
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin 	
	$M_r = 810.03$	Kette: 18:1 / 18:1
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin 	
	$M_r = 786.15$	Kette: 18:1 / 18:1

2.1.4 Präparation von Annexin V direkt auf Glimmeroberfläche

Die verwendeten Pufferlösungen enthalten: Puffer 1: 150 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7.4, T = 293 K (20 °C); Abbildepuffer 1: 150 mM NaCl, 10 mM Hepes, 20 mM CaCl₂, pH 7.4, T = 293 K (20 °C); Puffer 2: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7.4, T = 293 K (20 °C); Abbildepuffer 2: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes, 10 mM CaCl₂, pH 7.4, T = 293 K (20 °C); Puffer 3: 50 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7.4, T = 293 K (20 °C); Abbildepuffer 3: 50 mM NaCl, 10 mM Hepes, 10 mM CaCl₂, pH 7.4, T = 293 K (20 °C). Alle Pufferlösungen sind mit NaOH eingestellt.

Als festes Substrat dient ein frisch mit Tesafilm abgezogenes 2 cm × 2 cm Glimmer Plättchen (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland). Bestimmte Mengen von dem CaCl₂-haltigen Abbildepuffer werden zu Puffer 1, 2 oder 3 zugegeben, so dass bei Gesamtvolumen des Tropfens $V_{Tr} = 10^{-4} \text{ dm}^3$, die Calciumtotalkonzentrationen $[Ca_T] = 1 \text{ mM}$, $[Ca_T] = 2 \text{ mM}$ und $[Ca_T] = 3 \text{ mM}$ betragen (Radmacher et. al., 1994). Anschließend daran werden bestimmte Mengen an Annexin-Lösungen zugegeben und 30 min bei T = 293 K (20 °C) inkubiert. Die Totalkonzentration $[A_T]$ an Annexin V variiert zwischen 0.1 und 0.6 μM.

2.2 Methoden

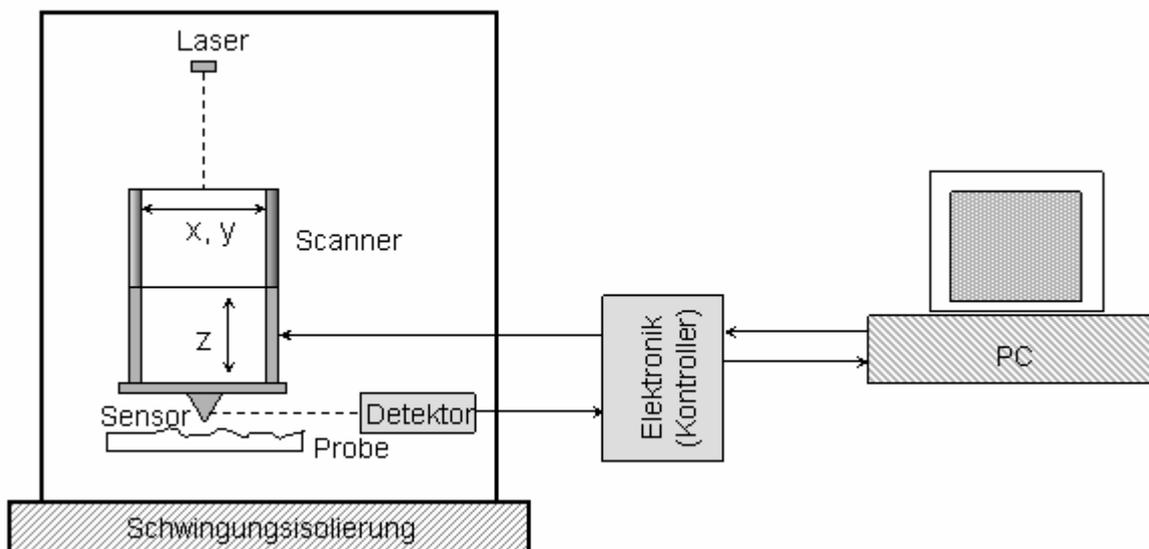
2.2.1 Das verwendete Rasterkraftmikroskop

Alle Experimente in dieser Arbeit sind mit einem Bioscope AFM der Firma Digital Instruments (Santa Barbara, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Das erste Rasterkraftmikroskop (engl.: Atomic Force Microscope, AFM, oder auch Scanning Force Microscope, SFM) geht auf Binnig, Quate und Gerber zurück (Binnig et al., 1986). Der Aufbau besteht aus sehr feiner, teilweise „atomar-spitzen“ Sonde. Die ist an einem Federbalken befestigt und wird mittels des Piezoelements über die Oberfläche einer Probe gerastert. Bei dem Bioscope AFM befindet sich die Piezostellglieder oberhalb der Federbalkenbefestigung. Es wird die Verbiegung des Federbalkens optisch gemessen. Dazu wird ein Laserstrahl auf die Rückseite des Sensors (engl.: Cantilever) fokussiert und

der Reflex über einen Spiegel auf einen Quadrantenphotodetektor gelenkt (Meyer und Amer, 1990, Meyer und Amer, 1988).

Im dynamischen Modus (Nichtkontaktmodus, engl.: Non-Contact Mode, Tapping Mode) wird der Federbalken über einen Erregerpiezo und einen Frequenzgenerator zu Schwingungen angeregt und die mittlere Amplitude bzw. Phase zwischen Anregung und Verbiegung gemessen, während im statischen Modus (engl.: Contact Mode) die Verbiegung des Federbalkens gemessen wird. Die gemessenen Werte werden mit Sollwerten (engl.: setpoint) verglichen und der Probe-Sonde-Abstand über das Höhenstellglied des Rasterpiezoelementes (z-Piezo) angepasst. Man nimmt die z-Spannung am Piezo-Translator Zeile für Zeile auf und erhält einen Satz von Höhenlinien, aus denen mit Hilfe von Computersoftware ein farbkodiertes Höhenbild erzeugt wird (Schema 1).



Schema 1: Schema der Messapparatur. Das Bioscope AFM besteht aus einem Scanner mit piezokeramischen Stellelementen, welche den Sensor bewegen, einer optischen Detektionseinheit zur Bestimmung der Cantilever-Auslenkung und einer Elektronik (Kontroller) zur Datenaufnahme und Regelung.

2.2.2 Die Kraftsensoren

Für Messungen bei physiologischen Bedingungen der Salzkonzentration und des pH-Wertes kommen Siliciumnitrid-Sensoren von Olympus Corporation (Tokyo, Japan) zum

Einsatz. Auf einem Chip des Cantilevers sind beidseitig zwei V-förmige Microlever (A, B) mit unterschiedlichen Dimensionen und Federkonstanten montiert. Die Spitzen besitzen ebenfalls die Form einer Pyramide, die an ihrem Ende noch einmal geschärft ist (Spitzenradius $< 20 \mu\text{m}$). Die Herstellerangaben für die verwendeten Sensoren sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tab. 2 : Herstellerangaben für die verwendeten Cantilever

Dimensionen	Microlever A	Microlever B
Länge [μm]	200	100
Breite [μm]	27.9	13.4
Dicke [μm]	0.4	0.4
Federkonstante [N/m]	0.02	0.08
Resonanzfrequenz [kHz]	11	34

2.2.3 Abbildungsparameter

Die rasterkraftmikroskopischen Abbildungen in dieser Arbeit wurden im flüssigen Tapping Mode aufgenommen. Vor der Annäherung an die Probe wurden Scan-Bereich und Offset des AFM auf Null gesetzt sowie eine minimale Scan-Geschwindigkeit gewählt, um eine mögliche Deformation der Probe oder eine Kontamination des Sensors zu vermeiden. Die Amplitude der Spannungsauslenkung der Spitze (Amplitude Setpoint) betrug meistens 0.2 Volt bei etwa 8 kHz Frequenz. Die Parameter mussten von Fall zu Fall optimiert werden, um ein größtmögliches Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten und damit hochauflösende Messungen zu ermöglichen. Typische Einstellungen für die elektronischen Regler waren 0.25 Integral und 3.0 Proportional bei einer Scan-Geschwindigkeit von 1 Zeile/s. Die Aufnahmen wurden stets mit 512 Punkten pro Zeile getätigt.

3 Ergebnisse

3.1 Festkörpergestützte Phospholipid-Doppelschichten

Um die Struktur von Annexin V-Molekülen auf Lipid-Doppelschichten zu detektieren, wurden zunächst die Lipid-Membranen auf Glimmer immobilisiert und abgebildet (Abb. 3).

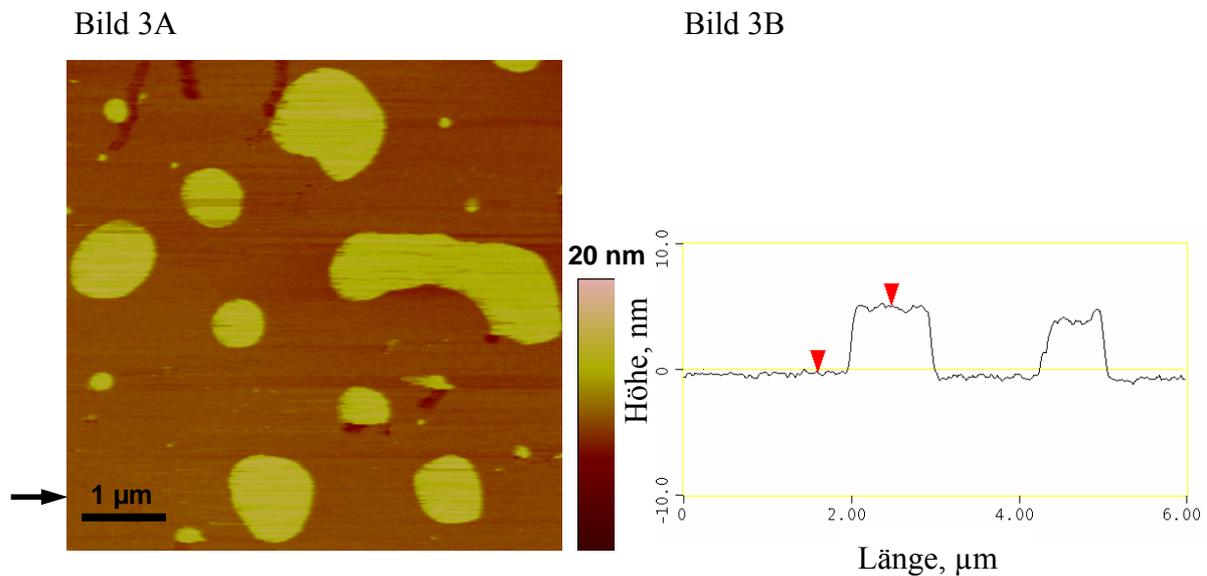


Abb. 3: AFM-Aufnahme von festkörpergestützten Lipid-Doppelschichten auf Glimmer. Das Bild 3A ist in 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4, T = 293 K (20 °C) entstanden. Die Lipid-Doppelschichten sind aus Suspensionen unilamellarer Vesikel präpariert. Die Lipide sind im molaren Verhältnis DOPS : DOPC von 1 : 2. Der mittlere Vesikeldurchmesser $\bar{d}_{ves} = 400(\pm 100) \text{ nm}$. Die Lipid-Totalkonzentration ist $[L_T] = 20 \mu\text{M}$. Bild 3B stellt das Höhenprofil von Bild 3A dar, siehe die Pfeilmarkierungen.

Der Abstand zwischen den beiden roten Markern im Bild 3B ist $H_{Fl} = 5.3(\pm 0.3) \text{ nm}$ ($n = 20$). Dieser Wert entspricht der mittleren Dicke der Lipid-Doppelschicht $H_M = 5.0(\pm 0.5) \text{ nm}$. Bei Vesikelspreitung zu einer etwa kreisförmigen Bizelle (Lipid-Doppelschicht), verteilt sich die Vesikeloberfläche $O_{ves} = \pi \cdot \bar{d}_{ves}^2$ auf die Kreisfläche $O_K = \pi \cdot \bar{\phi}_K^2 / 4$, sodass $\bar{\phi}_K = 2 \cdot \bar{d}_{ves}$. Für $\bar{d}_{ves} = 400(\pm 100) \text{ nm}$ ist $\bar{\phi}_K = 0.8(\pm 0.3) \mu\text{m}$.

Der mittlere Kreisdurchmesser der Flecken in Abbildung 3 ist $\bar{d}_{Fl} = 1.0(\pm 0.2) \mu m$. Der Wert $\bar{d}_{Fl} = 1.0(\pm 0.2) \mu m$ liegt in der Varianz von $\bar{\phi}_K = 0.8(\pm 0.3) \mu m$. Zusammen mit der mittleren Höhe $H_{Fl} = 5.3(\pm 0.3) nm$ sind diese Werte konsistent mit der Wertung, dass die Flecken tatsächlich Lipid-Doppelschicht-Bizellen sind.

3.2 Tapping Mode-Aufnahmen von Lipid-Doppelschichten, auf denen Annexin V-Moleküle über Ca^{2+} kristallisiert sind

In Abbildung 4 ist ersichtlich, dass bei vorsichtiger Annäherung der AFM-Spitze und geringer Kraftwirkung die geordneten Muster von Annexin V-Kristalle beobachtet werden. Die trimere Organisation weist eine hexagonale (p6)-Symmetrie auf. Jedes einzelnes Hexagon umschließt ein hexagonales Loch. Die fleckenartige Substruktur geht auf die vier Domänen des Annexin V-Moleküls zurück. Diese sind nicht in einer Ebene auf Lipid-Membranen positioniert, sondern zeigen unterschiedliche Höhen (Reviakine et al., 2000). Auch wenn die Domänen nicht exakt aufgelöst werden konnten, steht die bekannte Annexin V-Struktur doch in Einklang mit den AFM-Aufnahmen.

Für die Annexin V-Kristalle-tragenden Lipid-Doppelschichten ist eine mittlere Höhe von insgesamt $7.7(\pm 0.7) nm$ ($n = 20$) bestimmt worden (Abb. 4, Bild 4B). Die Höhe der Annexin V-Struktur auf den Schichten kann also mit $2.4(\pm 0.4) nm$ angegeben werden. Der ermittelte Wert ist etwas geringer als die bekannte Proteinhöhe von 3 nm (Huber et al., 1990a), steht aber wiederum in Einklang mit Reviakine et al., 1998, wo ein Wert von $2.6(\pm 0.2) nm$ gefunden wurde. Es erscheint möglich, dass die Annexine durch die AFM-Spitze in die Membran gedrückt wurden.

Bild 4A

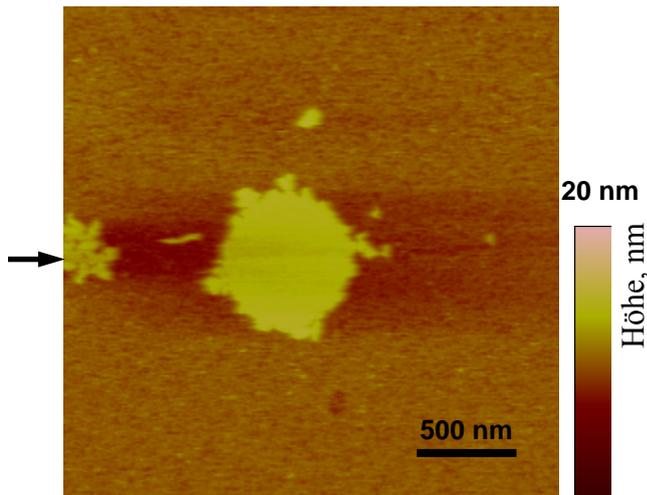


Bild 4B

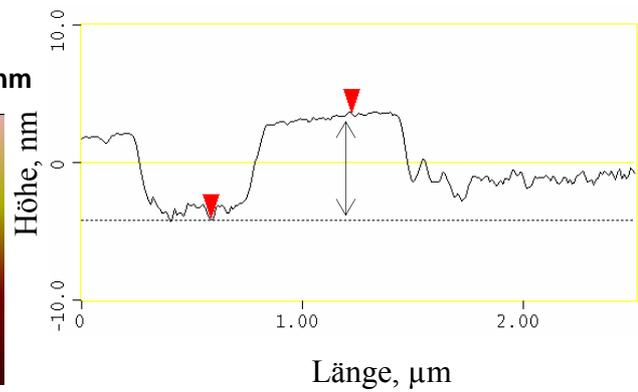


Bild 4C

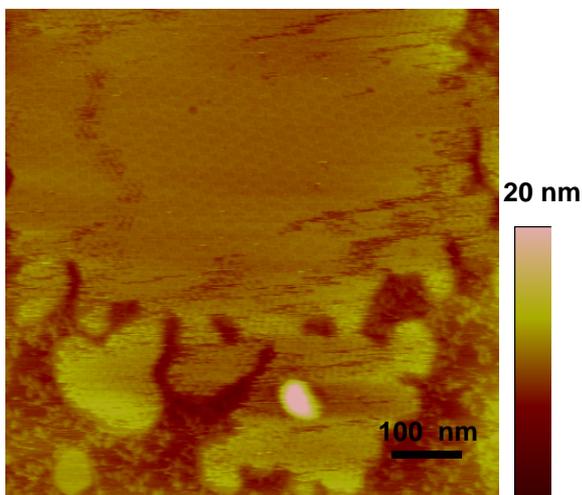


Bild 4D

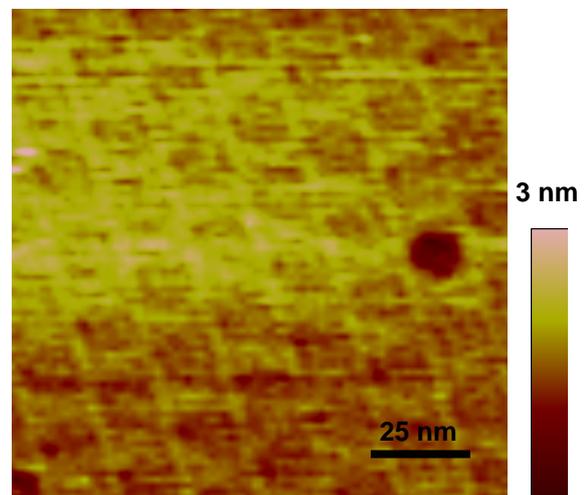


Bild 4E

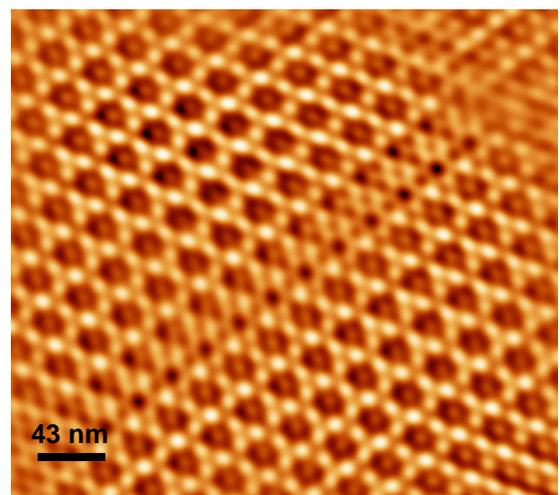


Abb. 4: AFM-Aufnahmen von Annexin V-Kristallen auf Lipid-Doppelschichten in 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4, T = 293 K (20 °C). Annexin V-Totalkonzentration [A_T] = 1.2 μM.

Bild 4A zeigt die auf Glimmer immobilisierten Lipid-Doppelschichten, auf denen die Annexine kristallisiert sind. Bild 4B ist das Höhenprofil von Bild 4A bei dem Niveau markiert mit dem Pfeil. Bild 4C stellt vergrößerte Aufnahme von Bild 4A dar. In Bild 4D sind die Annexin V-Kristallen zu erkennen. Das Bild ist einem Tiefpassfilter unterworfen worden. Bild 4E zeigt FFT-gefilterte Darstellung, wo die trimere Gruppierung der Annexine besonders deutlich ist. Die Bildgröße ist 344 × 312 nm.

Die trimere Gruppierung von Annexin V an festkörpergestützten Lipid-Doppelschichten ist also in dieser Arbeit rasterkraftmikroskopisch nachgewiesen worden.

Das vorrangige Ziel weiterhin ist zu prüfen, ob eine direkte Assoziation (ohne Lipid-Membran) des Proteins auf geladener Oberfläche möglich ist.

Die Zahlenwerte der Bizell-Doppelschichthöhe von 5 nm , des Kreisflächendurchmessers von $1\text{ }\mu\text{m}$, zusammen mit der Höhe der Annexin-Doppelschicht-Komplexe von etwa 8 nm begründen die Brauchbarkeit der AFM-Tapping Mode zur quantitativen Bestimmung von Lipid-Bizellen und von assoziierten Annexin-Molekülen.

Überraschend war der Befund, dass Annexin V auch direkt an die Glimmeroberfläche (ohne Lipid-Zwischenlage) assoziieren kann.

3.3 Rasterkraftmikroskopie von Annexin V an Glimmeroberfläche

Da Annexin also auch direkt an Glimmer bindet, wird im folgenden Arbeitsteil die direkte Proteinbelegung auf der Oberfläche rasterkraftmikroskopisch bestimmt.

Die direkte Assoziation von Annexin V an negativ geladener Glimmeroberfläche ist stark von der Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen abhängig. Abbildungen 5 bis 12, ab Seite 18, zeigen die Proteinanlagerung in Abhängigkeit von Annexin V-Totalkonzentration $[A_T]$, der Ca^{2+} -Konzentration $[Ca_T]$ und Ionenstärke der Lösung (I_c).

Die Ionenstärke I_c ist gegeben durch $I_c = 0.5 \sum_j z_j^2 \cdot c_j$, wobei z_j und c_j die Ladungszahl und Konzentration der Ionenspecies j sind; siehe auch Anhang A2.

Um die Bildung von Protein-Multischichten zu vermeiden, werden hier ausreichend große Bindungsflächen und geringe Annexin V $[A_T]$ Konzentration verwendet. Alle „Titrationsbilder“ stellen stets die ungefilterte Aufnahme dar, wie sie in Pufferlösung (10 mM Hepes, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)) entstanden sind:

(1.1) 1 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl -Abb.5 (Bild 5A bis 5F),

(1.2) 2 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl - Abb. 6 (Bild 6A bis 6F),

(1.3) 3 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl -Abb. 7 (Bild 7A bis 7F);

(2.1) 1 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl -Abb. 8 (Bild 8A bis 8F),

(2.2) 2 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl -Abb. 9 (Bild 9A bis 9F),

(2.3) 3 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl -Abb. 10 (Bild 10A bis 10F);

(3.1) 1 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl -Abb. 11 (Bild 11A bis 11F),

(3.2) Die Aufnahmen unter der Bedingung 2 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl werden wegen der aufgetretenen Messfehler für die Datenanalyse nicht berücksichtigt;

(3.3) 3 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl -Abb. 12 (Bild 12A bis 12F).

Eine etwaige Schräglage der Probe wurde mittels eines Planefit 3. Ordnung aus den Bildern entfernt.

Abb. 5: AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.
 $I_c = 0.053 M$ (1 mM $CaCl_2$, 50 mM $NaCl$, 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 K$ (20 °C)).
Die Höhenskala umspannt stets 8 nm.

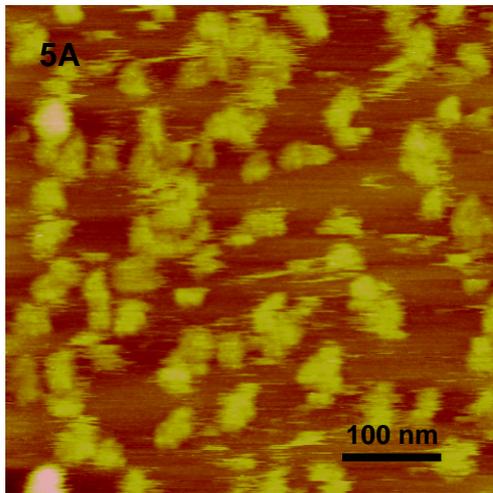


Bild 5A: $[A_T] = 0.1 \mu M$

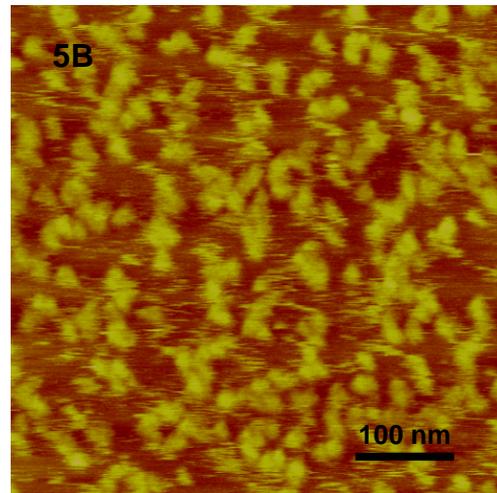


Bild 5B: $[A_T] = 0.2 \mu M$

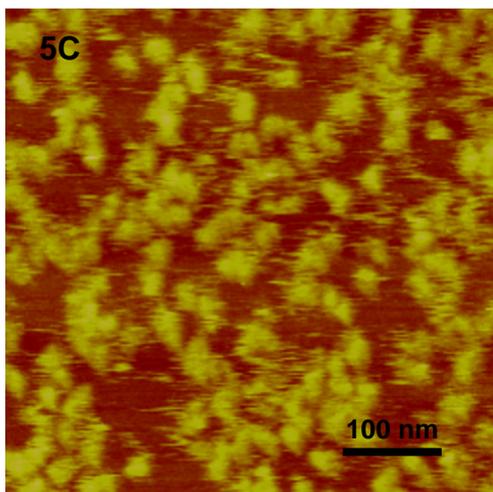


Bild 5C: $[A_T] = 0.3 \mu M$

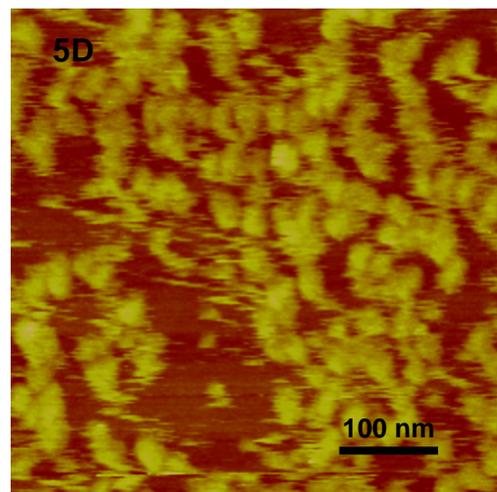


Bild 5D: $[A_T] = 0.4 \mu M$

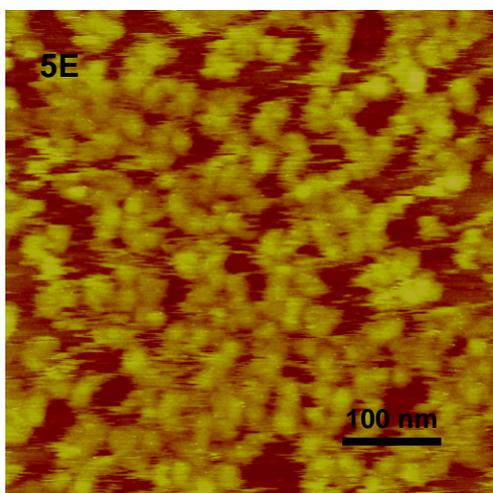


Bild 5E: $[A_T] = 0.5 \mu M$

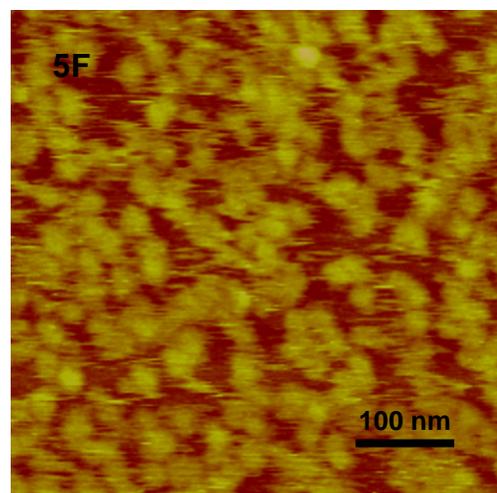


Bild 5F: $[A_T] = 0.6 \mu M$

Abb. 6: AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.
 $I_c = 0.056 M$ (2 mM $CaCl_2$, 50 mM $NaCl$, 10 mM $Hepes$, pH 7.4, $T = 293 K$ (20 °C)).
Die Höhenskala umspannt stets 8 nm.

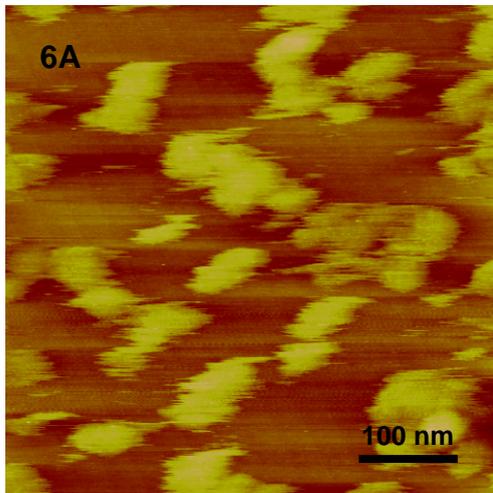


Bild 6A: $[A_T] = 0.1 \mu M$

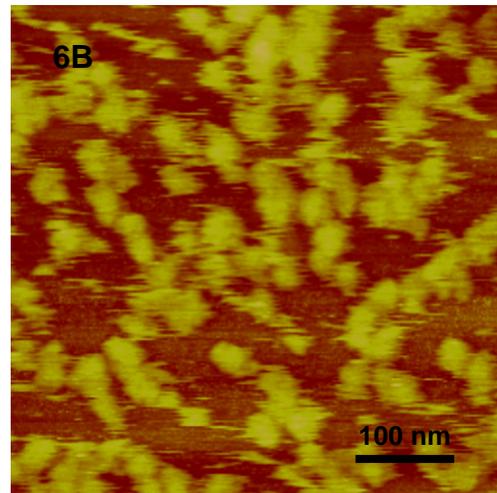


Bild 6B: $[A_T] = 0.2 \mu M$

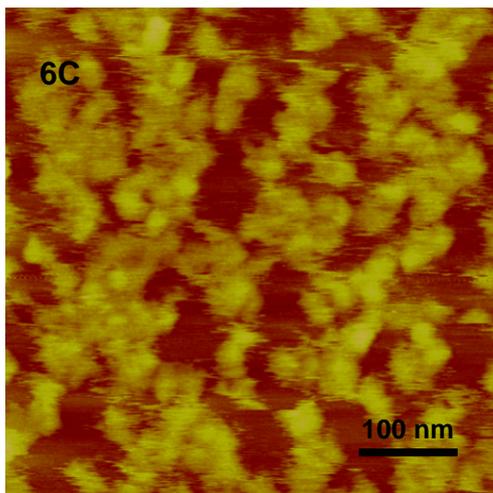


Bild 6C: $[A_T] = 0.3 \mu M$

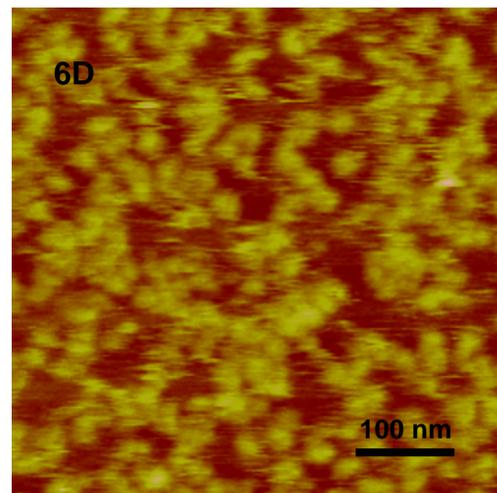


Bild 6D: $[A_T] = 0.4 \mu M$

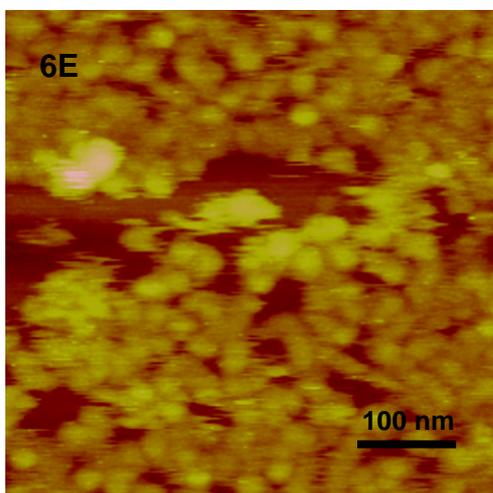


Bild 6E: $[A_T] = 0.5 \mu M$

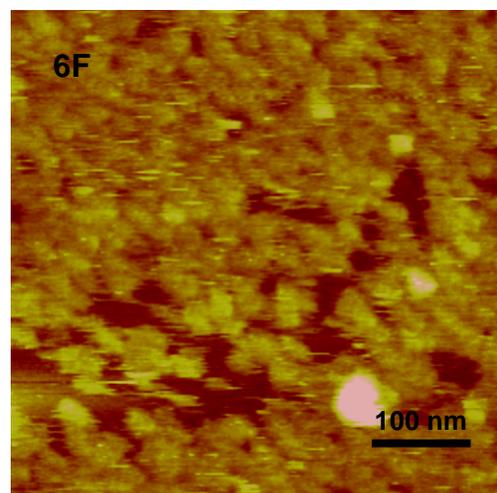


Bild 6F: $[A_T] = 0.6 \mu M$

Abb. 7: AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.
 $I_c = 0.059 M$ (3 mM $CaCl_2$, 50 mM $NaCl$, 10 mM $Hepes$, pH 7.4, $T = 293 K$ (20 °C)).
Die Höhenskala umspannt stets 8 nm.

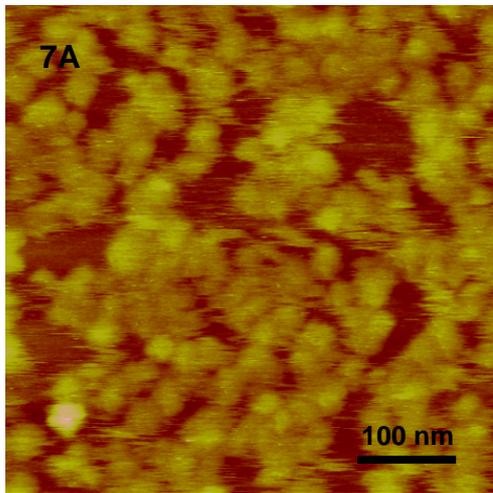


Bild 7A: $[A_T] = 0.1 \mu M$

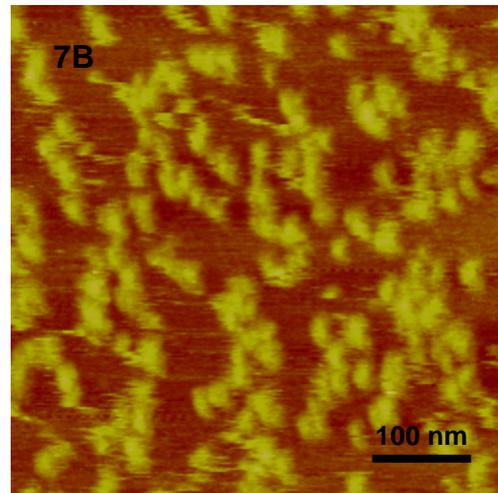


Bild 7B: $[A_T] = 0.2 \mu M$

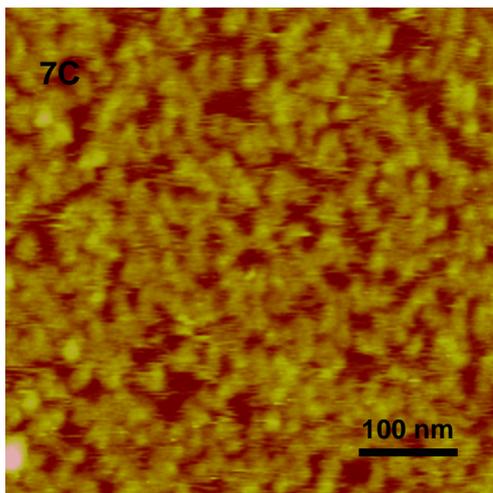


Bild 7C: $[A_T] = 0.3 \mu M$

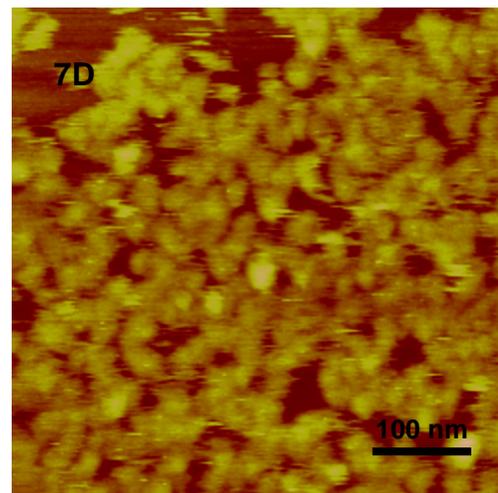


Bild 7D: $[A_T] = 0.4 \mu M$

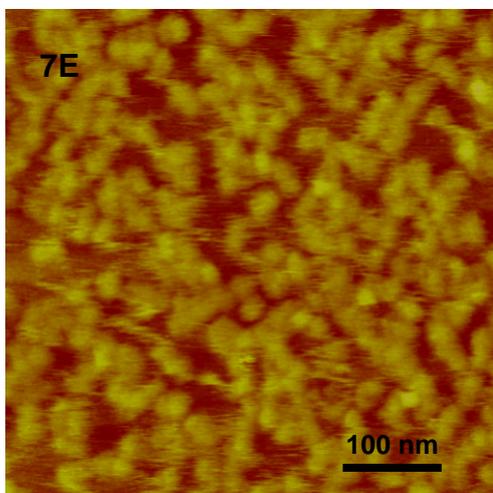


Bild 7E: $[A_T] = 0.5 \mu M$

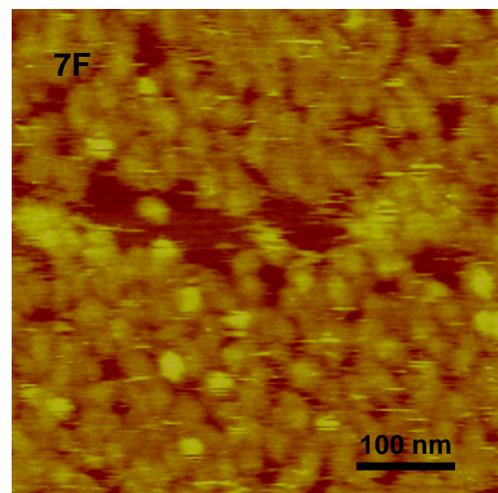


Bild 7F: $[A_T] = 0.6 \mu M$

Abb. 8: AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.
 $I_c = 0.103 M$ (1 mM $CaCl_2$, 100 mM $NaCl$, 10 mM $Hepes$, pH 7.4, $T = 293 K$ (20 °C)).
Die Höhenskala umspannt stets 8 nm.

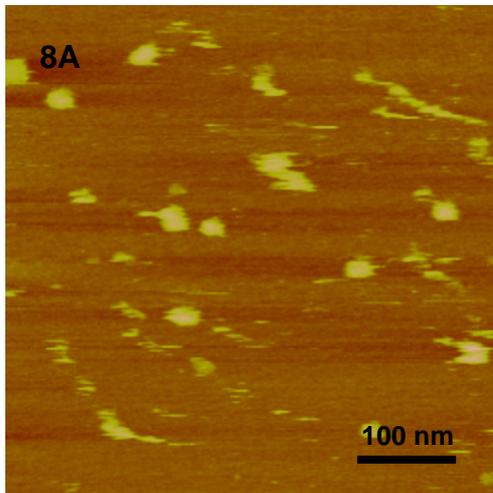


Bild 8A: $[A_T] = 0.1 \mu M$

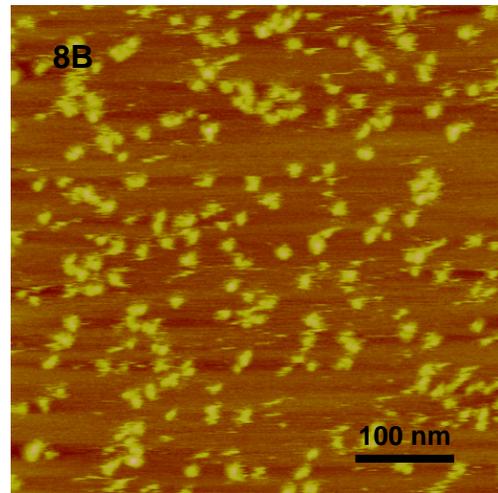


Bild 8B: $[A_T] = 0.2 \mu M$

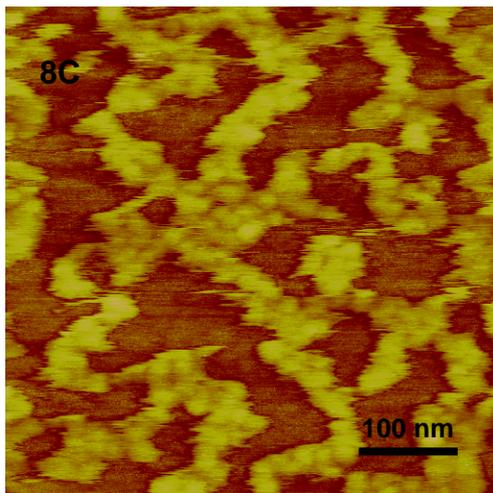


Bild 8C: $[A_T] = 0.3 \mu M$

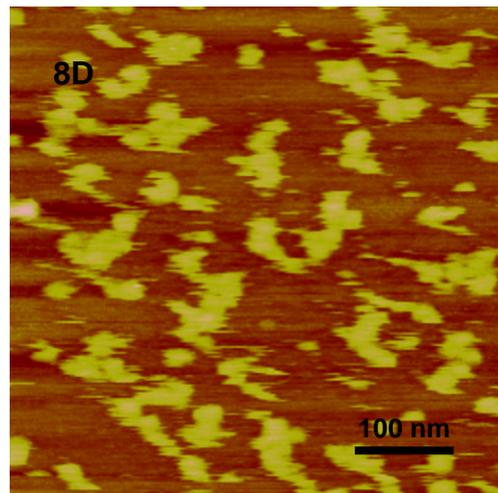


Bild 8D: $[A_T] = 0.4 \mu M$

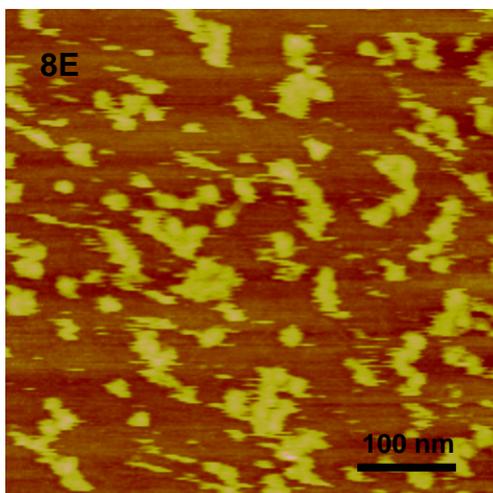


Bild 8E: $[A_T] = 0.5 \mu M$

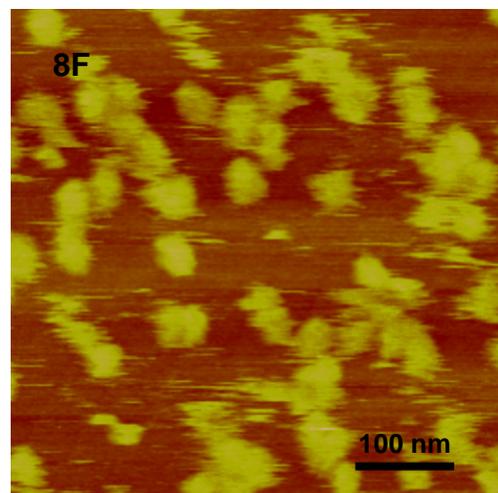


Bild 8F: $[A_T] = 0.6 \mu M$

Abb. 9: AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.

$I_c = 0.106 M$ (2 mM $CaCl_2$, 100 mM $NaCl$, 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 K$ (20 °C)).

Die Höhenskala umspannt stets 8 nm.

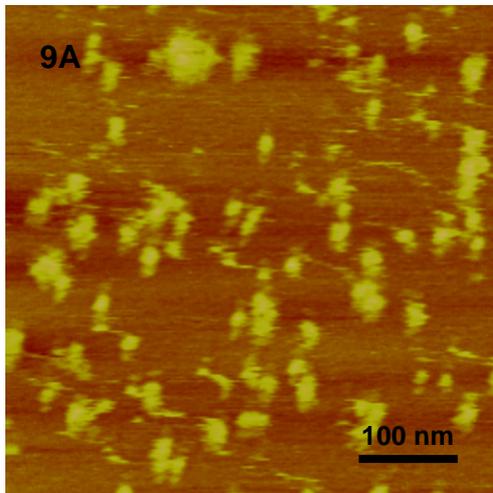


Bild 9A: $[A_T] = 0.1 \mu M$

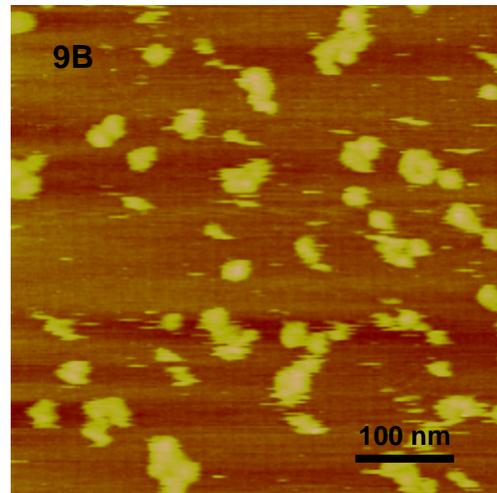


Bild 9B: $[A_T] = 0.2 \mu M$

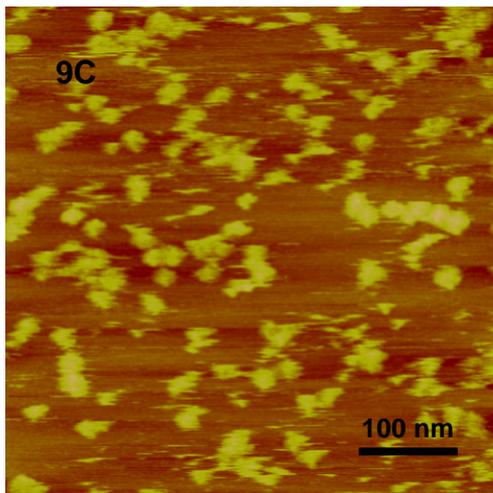


Bild 9C: $[A_T] = 0.3 \mu M$

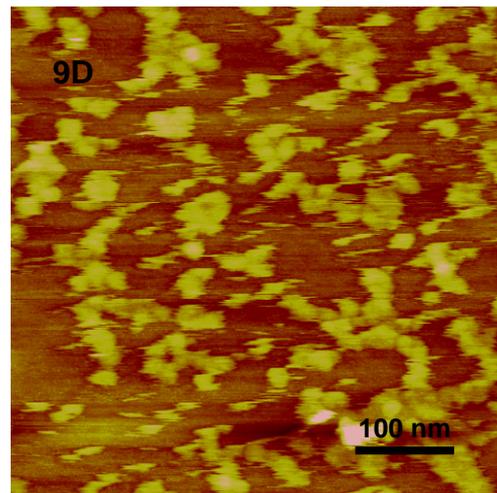


Bild 9D: $[A_T] = 0.4 \mu M$

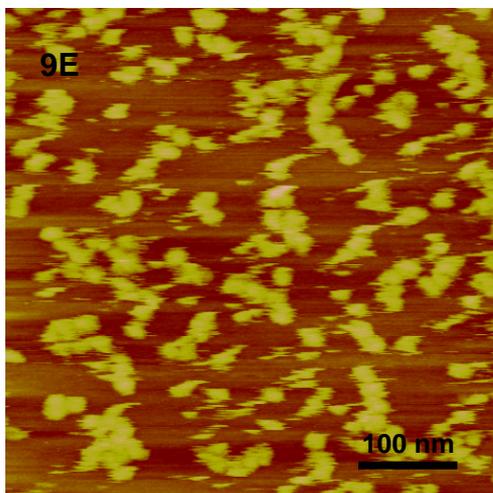


Bild 9E: $[A_T] = 0.5 \mu M$

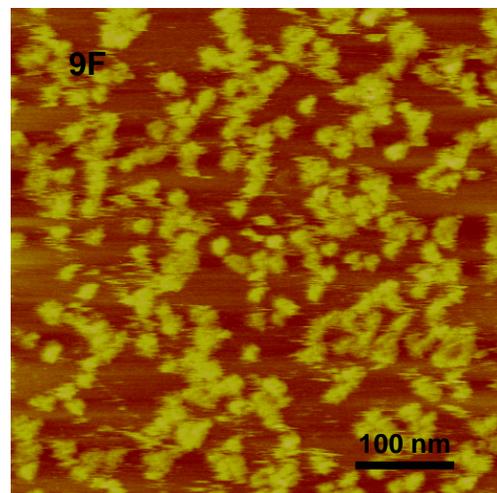


Bild 9F: $[A_T] = 0.6 \mu M$

Abb. 10: AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.

$I_c = 0.109 M$ (3 mM $CaCl_2$, 100 mM $NaCl$, 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 K$ (20 °C)).

Die Höhenskala umspannt stets 8 nm.

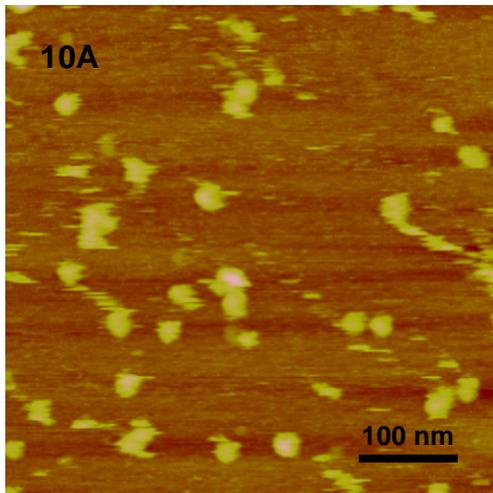


Bild 10A: $[A_T] = 0.1 \mu M$

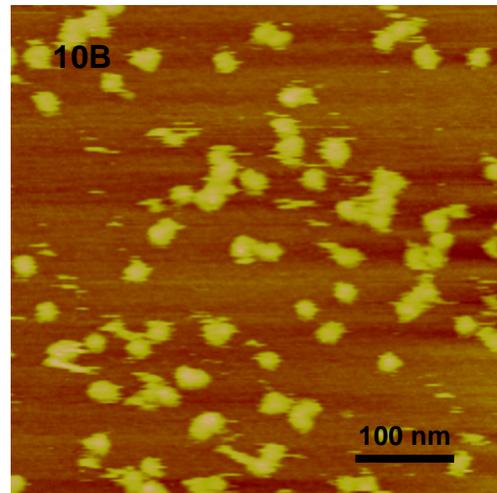


Bild 10B: $[A_T] = 0.2 \mu M$

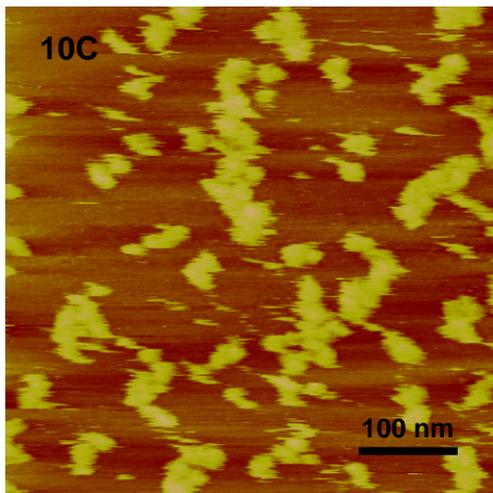


Bild 10C: $[A_T] = 0.3 \mu M$

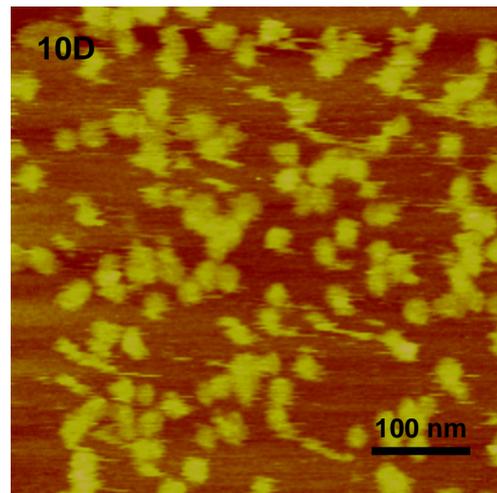


Bild 10D: $[A_T] = 0.4 \mu M$

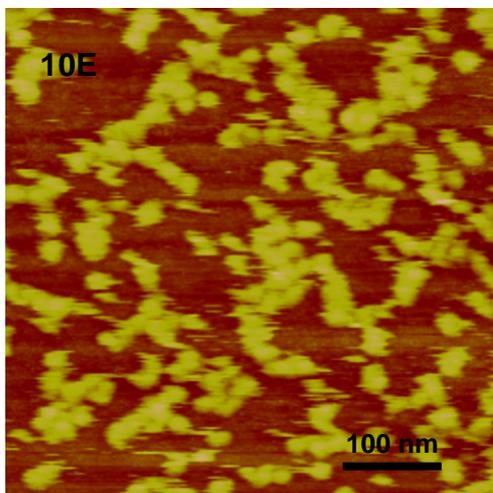


Bild 10E: $[A_T] = 0.5 \mu M$

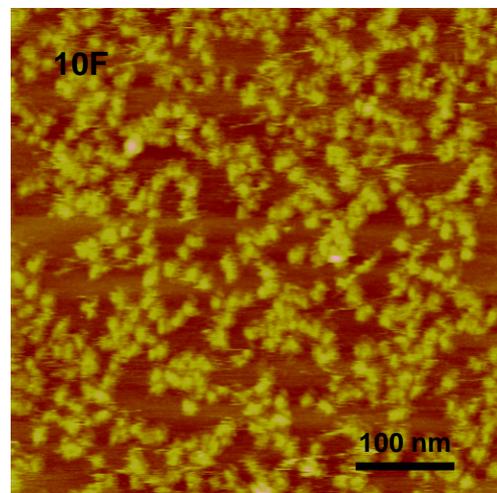


Bild 10F: $[A_T] = 0.6 \mu M$

Abb. 11: AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.
 $I_c = 0.153 M$ (1 mM $CaCl_2$, 150 mM $NaCl$, 10 mM $Hepes$, pH 7.4, $T = 293 K$ (20 °C)).
Die Höhenskala umspannt stets 8 nm.

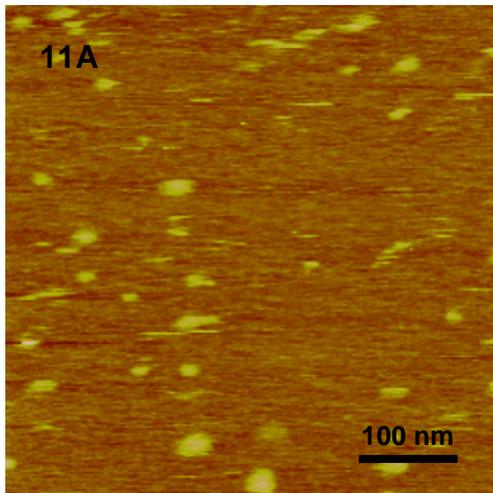


Bild 11A: $[A_T] = 0.1 \mu M$

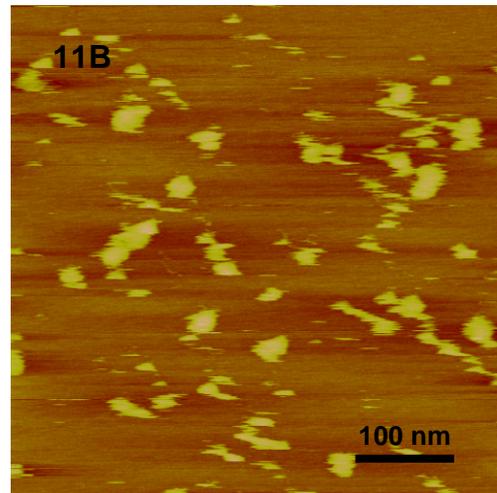


Bild 11B: $[A_T] = 0.2 \mu M$

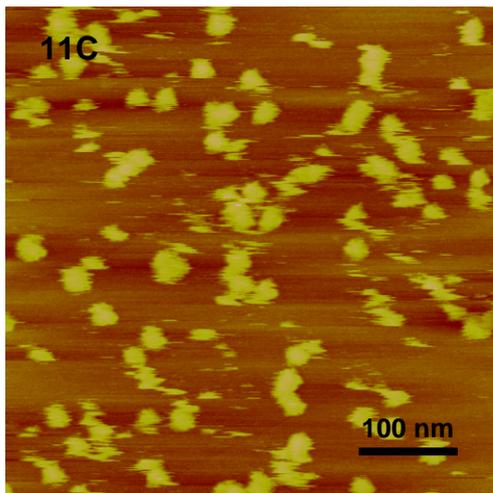


Bild 11C: $[A_T] = 0.3 \mu M$

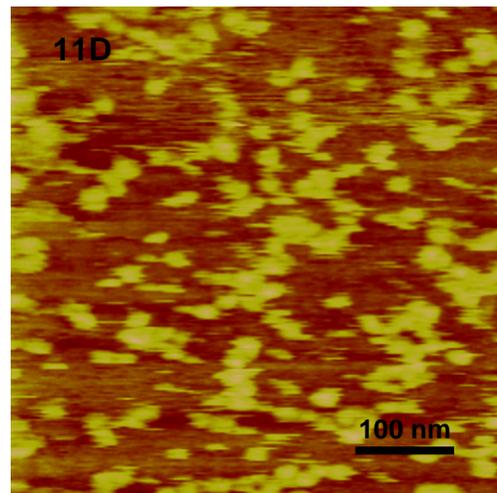


Bild 11D: $[A_T] = 0.4 \mu M$

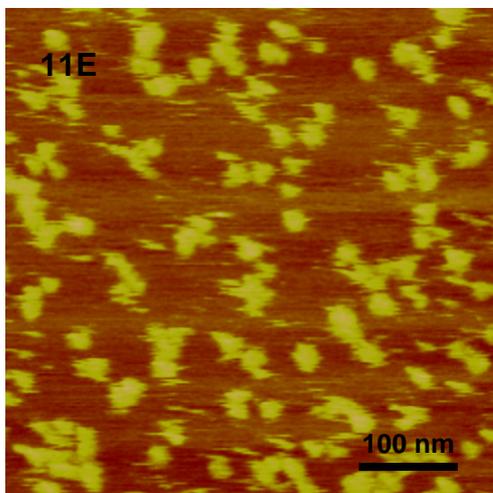


Bild 11E: $[A_T] = 0.5 \mu M$

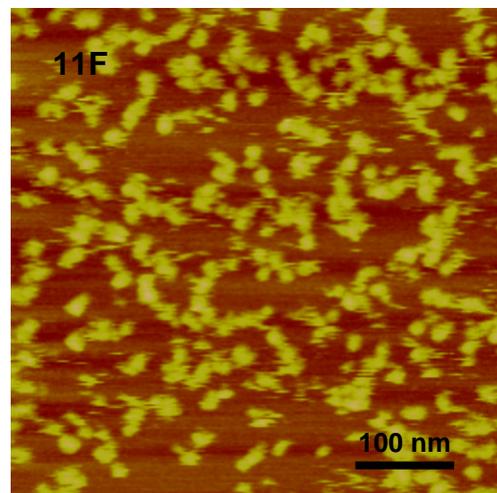


Bild 11F: $[A_T] = 0.6 \mu M$

Abb. 12: AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.

$I_c = 0.159 M$ (3 mM $CaCl_2$, 150 mM $NaCl$, 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 K$ (20 °C)).

Die Höhenskala umspannt stets 8 nm.

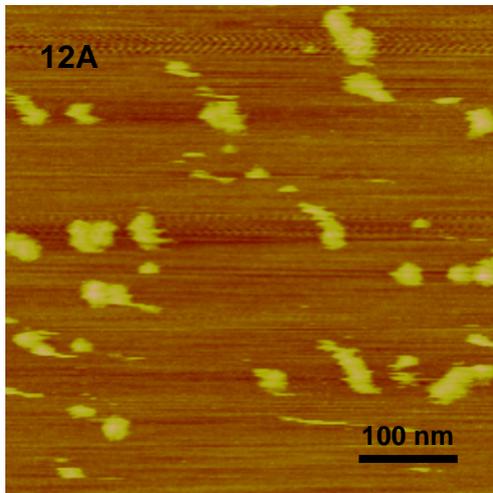


Bild 12A: $[A_T] = 0.1 \mu M$

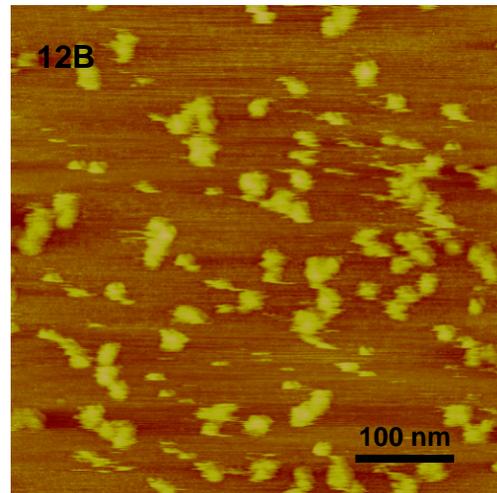


Bild 12B: $[A_T] = 0.2 \mu M$

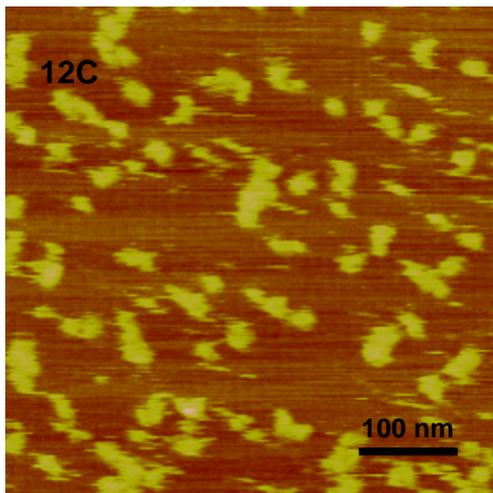


Bild 12C: $[A_T] = 0.3 \mu M$

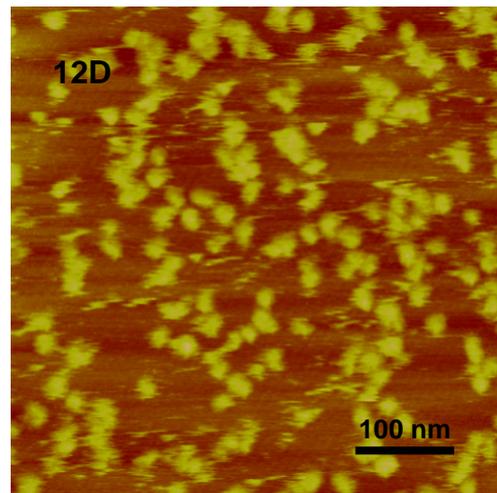


Bild 12D: $[A_T] = 0.4 \mu M$

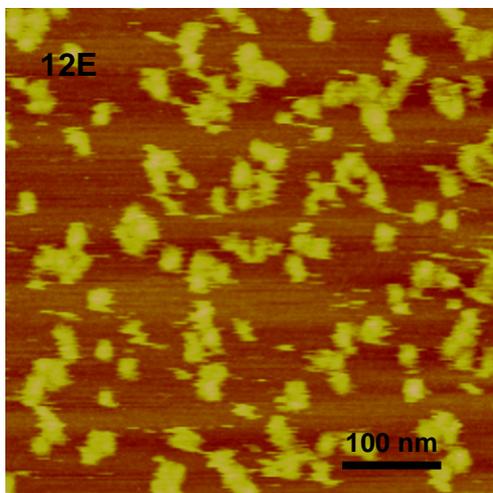


Bild 12E: $[A_T] = 0.5 \mu M$

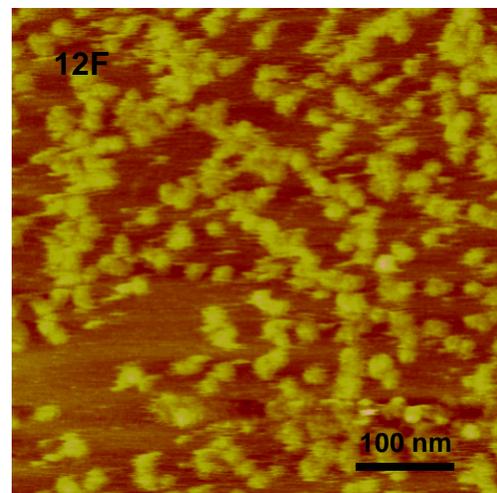


Bild 12F: $[A_T] = 0.6 \mu M$

Man sieht, dass ansteigende Mengen von Annexin V die Proteinbindung erhöhen. Die maximale Belegung ist stark von der Ionenstärke der Lösung abhängig. Es ist auffallend, dass bei steigender Konzentration der Calcium-Ionen und bei niedriger Natriumchlorid-Konzentration mehrere Annexin V-Moleküle direkt nebeneinander liegen. Es ist nicht klar, ob das ein Scan-Artefakt ist.

Die Höhe der Farbflecken beträgt im Mittel $\Delta H_A = 3.0(\pm 0.5) \text{ nm}$. Siehe beispielhaft die Schnittprofile (engl.: cross section) durch die AFM-Aufnahmen in Abbildung 13 (Bild A, B, C). Die Länge eines einzelnen Farbfleckens ist im Mittel $\Delta L_A = 10(\pm 3) \text{ nm}$. Die Abmessungen entsprechen dem Abstand zwischen den beiden roten Marker in der Abbildung 13, Bild A, B und C. Fleckhöhe und mittlere Länge sind damit angenähert konsistent mit Einzelmolekülen der Höhe 3 nm und Basisauflage-Länge von 6.4 nm .

Eines der Hauptprobleme besteht darin, weiche Probensysteme unverzerrt sichtbar zu machen, wobei grobe „Deformationen“ bei der Messung zu vermeiden sind. Alle in dieser Arbeit dargestellten Bilder sind bei minimaler Kraftwirkung des Sensors aufgenommen.

Die Analyse der erhaltenen AFM-Aufnahmen, die die Annexin V-Bindung an Glimmeroberfläche dokumentierten, erfolgte mit *Nanoscope 5.12r5*-Software. Zur Ermittlung der Proteinbelegung auf der Oberfläche wurde eine *Grain Size*-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die Glimmeroberfläche als Hintergrund definiert und die Stellen, die mit Protein belegt waren, wurden als unterscheidbare Bereiche markiert.

Die Bestimmung dieser Bereiche bezog sich auf die Höhe der Bilder-Daten.

Man erhielt die Auswertung als Bild, das in einem binären Modus, oder in einem normalen Modus dargestellt wurde. Im binären Modus wurden die Protein-Bereiche in der Farbe weiß dargestellt und besaßen einen schwarzen Hintergrund. Im normalen Modus wurden die Protein-Bereiche in der Scan-Farbe gelb dargestellt und besaßen ebenfalls einen schwarzen Hintergrund. Für die Auswertung wurde die Darstellung der Bilder im Binär-Modus gewählt.

Mit *Grain Size*-Analyse wurde die mittlere Protein-Größe, die gesamte Anzahl der Proteine und die Standardabweichung von der Protein-Größe kalkuliert.

Mit Hilfe von diesen Parametern erfolgte die Berechnung des experimentellen Belegungsgrades f über die gesamte repräsentative Ausschnittsfläche.

Bild A

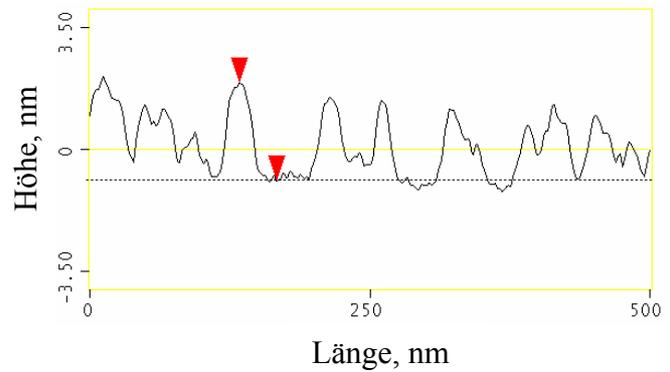
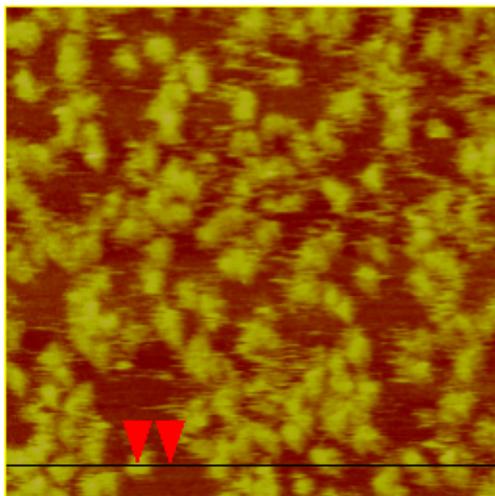


Bild B

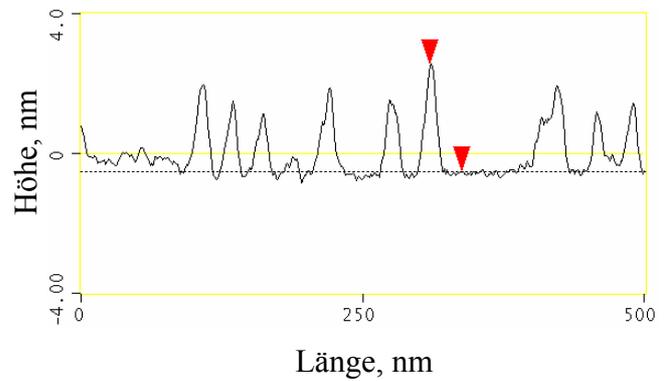
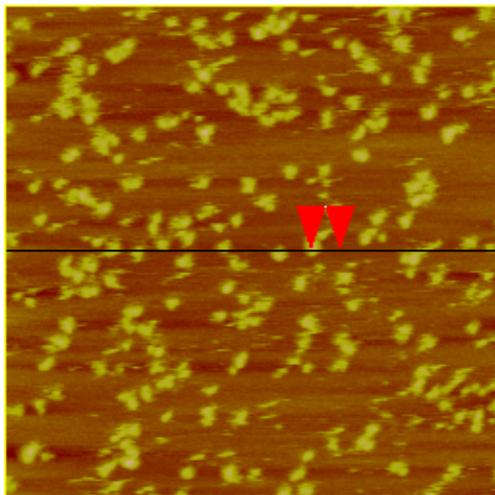


Bild C

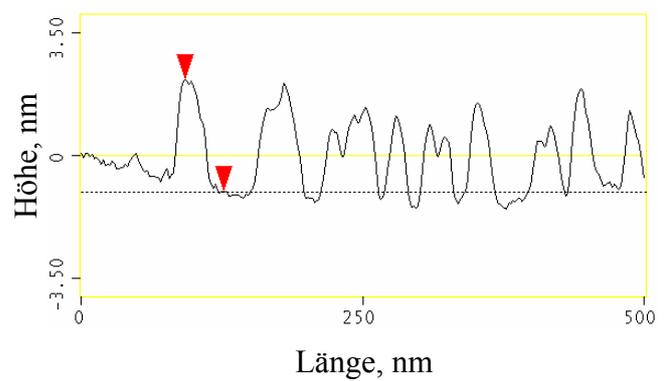
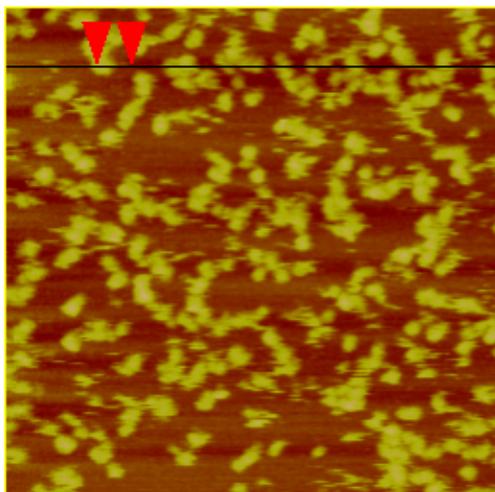


Abb. 13: Höhenprofile der AFM-Aufnahmen von Annexin V an Glimmeroberfläche.

Bild A: 1 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), $[A_T] = 0.3 \text{ } \mu\text{M}$. Bild B: 1 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), $[A_T] = 0.2 \text{ } \mu\text{M}$. Bild C: 1 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), $[A_T] = 0.6 \text{ } \mu\text{M}$.

3.3.1 Bestimmung des experimentellen Belegungsgrades f

Für die Annexin V-Adsorption an Glimmeroberflächen, definiert man einen Belegungsgrad f ($0 \leq f \leq 1$) als Verhältnis des gebundenen Annexin V $[A_b]$ zum maximal gebundenen Annexin V $[A_b]_{\max}$, pro hier $0.25 \mu\text{m}^2$ repräsentative Ausschnittsfläche:

$$f = \frac{[A_b]}{[A_b]_{\max}} = \left(\frac{\sum f_i}{0.25 \mu\text{m}^2} \right)_{\text{Ausschnitt}} \quad (1)$$

Wie schon qualitativ in den Bildern ersichtlich, steigt die experimentelle Bedeckungsdichte (f) mit der Totalkonzentration $[A_T]$ des Proteins an. Die Daten-Korrelationen, f gegen $[A_T]$, sind in den Figuren 1A, 1B und 1C dargestellt.

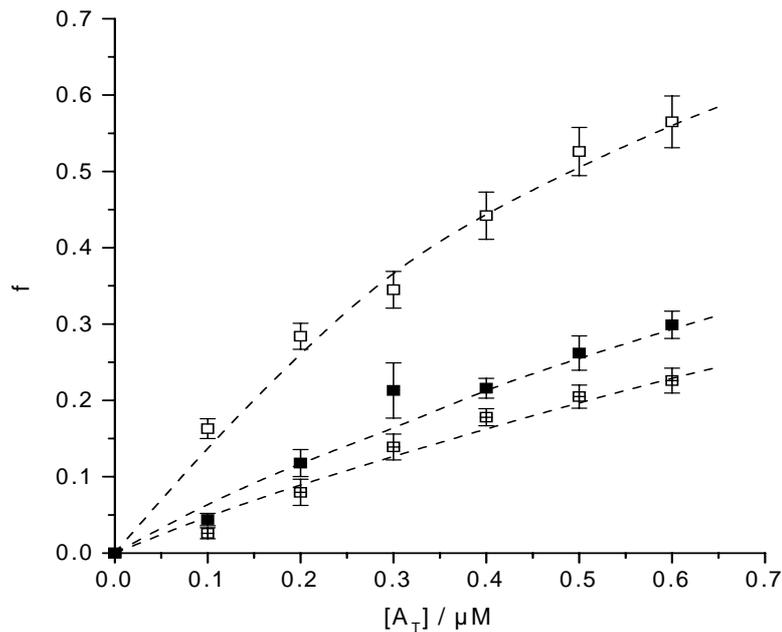


Fig. 1A: Belegungsgrad f als Funktion der Annexin V-Totalkonzentration $[A_T]$ bei folgenden Ionenstärken I_c / M :

(□) 0.053 (1 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl , 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)),

(■) 0.103 (1 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl , 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)),

(⊞) 0.153 (1 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl , 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)).

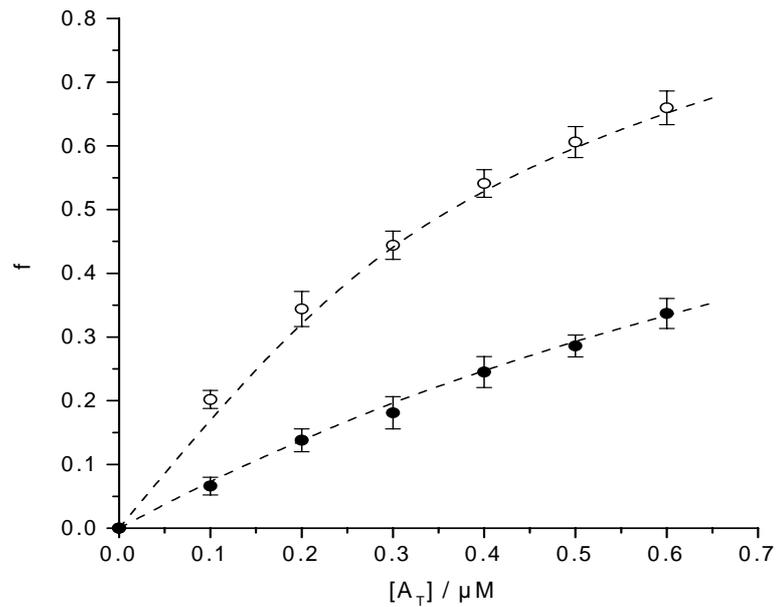


Fig. 1B: Belegungsgrad f als Funktion der Annexin V-Totalkonzentration $[A_T]$ bei folgenden Ionenstärken I_c / M :

- (○) 0.056 (2 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl , 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)),
- (●) 0.106 (2 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl , 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)).

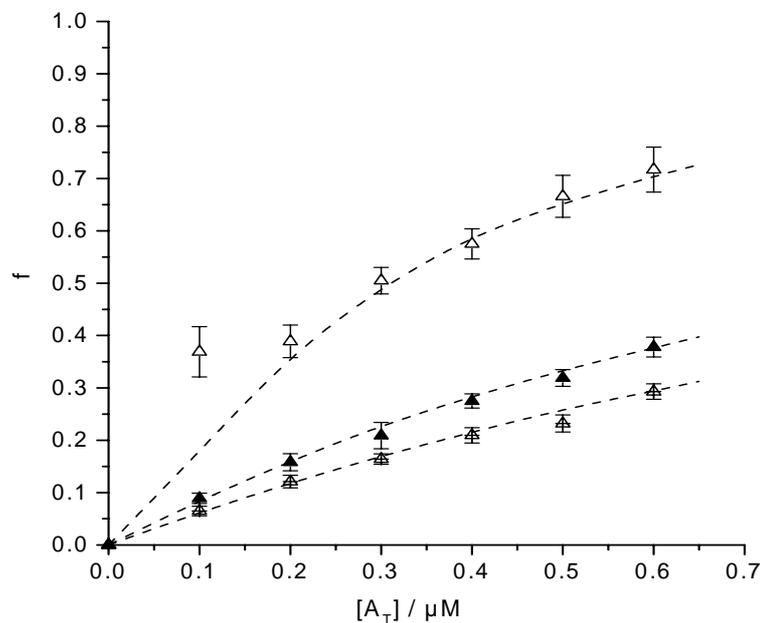


Fig. 1C: Belegungsgrad f als Funktion der Annexin V-Totalkonzentration $[A_T]$ bei folgenden Ionenstärken I_c / M :

- (△) 0.059 (3 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl , 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)),
- (▲) 0.109 (3 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl , 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)),
- (◐) 0.159 (3 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl , 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)).

Deutlich erkennbar ist, dass der Belegungsgrad mit steigender Ca^{2+} -Konzentration zunimmt, aber mit abnehmender Ionenstärke abnimmt. Hier ist die maximale Belegungsdichte $f = 0.717$ auf der Oberfläche bei Ionenstärke $I_c = 0.059 M$ und Annexin V-Totalkonzentration $[A_T] = 0.6 \mu M$ erreicht. Insgesamt sieht man, dass die Bindungskurven qualitativ wie einfache Langmuir-Isothermen aussehen. Die gestrichelten Anpassungslinien entsprechen dem theoretisch-idealen Verlauf. Trotz anscheinender Clusterung der Annexine ist keine Kooperativität auflösbar.

Die folgende theoretische Datenanalyse zielt die Quantifizierung des Calcium-Ionen-Effekts bei verschiedenen Salz-Konzentrationen und die Ermittlung der thermodynamischen Einzelkonstanten.

4 Datenanalyse und Diskussion

4.1 Das Langmuir-Modell

Wie bereits erwähnt, sind die Primärdaten der Annexin V-Assoziation auf der Glimmeroberfläche physikalisch-chemisch mit dem einfachen Langmuir-Modell beschreibbar.

Der Belegungsgrad f ist bei der 1:1 Stöchiometrie der Langmuir-Adsorption über das Massenwirkungsgesetz definiert als:

$$f = \frac{[A_b]}{[A_b]_{\max}} = \frac{[A]}{[A] + \overline{K_A}^{(Ca)}(I_c)} = \frac{[A_T] - f \cdot [A_b]_{\max}}{[A_T] - f \cdot [A_b]_{\max} + \overline{K_A}^{(Ca)}(I_c)} . \quad (2)$$

In Gleichung (2) ist $\overline{K_A}^{(Ca)}(I_c)$ die globale, Ca^{2+} - und I_c -abhängige Dissoziationsgleichgewichtskonstante für Annexin V Bindung an Glimmer; siehe Gleichung (9). Die freie Annexin V-Konzentration $[A]$ wird aus dem Massenerhalt berechnet:

$$[A] = [A_T] - f \cdot [A_b]_{\max} . \quad (3)$$

4.1.1 Berechnung der Konzentration $[A_b]_{\max}$ von maximal gebundenem Annexin V

Die Auflage-Fläche F_A eines Annexin V-Moleküls ist die Glimmerbesetzungsfläche. Sie wird mit den Abmessungen der Röntgenstrukturdaten (Länge $L_A = 6.4 \text{ nm}$ und Breite $B_A = 4 \text{ nm}$) berechnet:

$$F_A = L_A \cdot B_A = 6.4 \text{ nm} \cdot 4 \text{ nm} = 25.6 \text{ nm}^2 = 2.56 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2 . \quad (4)$$

Die Adsorption bezieht sich hier auf eine Glimmer-Gesamtoberfläche von $F_{G\text{lim}} = 4 \text{ cm}^2$ und das Gesamtvolumen des Tropfens $V_{Tr} = 10^{-4} \text{ dm}^3$, der das gelöste Annexin enthält.

Einsetzen in Gleichung (5) ergibt die maximale Anzahl N_A^{\max} der Annexin V-Moleküle, die diese Fläche bedecken:

$$N_A^{\max} = \frac{(\sum F_A)^{\max}}{F_A} = \frac{F_{Glim}}{F_A} = \frac{4 \text{ cm}^2}{2.56 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2} = 1.56(\pm 0.16) \cdot 10^{13} \text{ (Moleküle)}. \quad (5)$$

Die Stoffmenge n_b^{\max} wird mit Hilfe der Loschmidt-Avogadro-Konstanten N_{LA} berechnet:

$$n_b^{\max} = \frac{N_A^{\max}}{N_{LA}} = \frac{1.56 \cdot 10^{13}}{6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}} = 2.59(\pm 0.26) \cdot 10^{-11} \text{ mol}. \quad (6)$$

Eine (hypothetisch) voll besetzte experimentelle Fläche entspricht nun der maximalen Annexin V-Konzentration von:

$$[A_b]^{\max} = \frac{n_b^{\max}}{V_{Tr}} = \frac{2.59 \cdot 10^{-11} \text{ mol}}{10^{-4} \text{ dm}^3} = 2.59 \cdot 10^{-7} \text{ M} = 0.259(\pm 0.026) \mu\text{M}. \quad (7)$$

Diese theoretische (fiktive) Größe dient als Basis für die Berechnung der freien Konzentration $[A]$ an Annexin V nach Gleichung (3).

4.1.2 Globale Annexin V-Bindung an Glimmeroberfläche

Für den einfachsten Fall einer 1:1 Bindungsstöchiometrie zwischen Annexin V (A) und einem definierten Clusterbereich ($B + BCa$) von Bindungsstellen B und BCa auf der Glimmeroberfläche machen wir, analog zu Frantescu et al. (2005), den globalen Reaktionsansatz:



Für dieses Globalschema ist die Ca^{2+} - und I_c -abhängige globale Dissoziationsgleichgewichtskonstante $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ gegeben durch:

$$\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c) = [A] \cdot \frac{[B] + [BCa]}{[AB] + [BACa]} = [A] \cdot \frac{1-f}{f} = [A]_{f=0.5}, \quad (9)$$

wobei $f = ([AB] + [BACa]) / ([AB] + [BACa])^{\max} = [A_b] / [A_b]^{\max}$ ist. Es ist instruktiv, dass die Globalkonstante $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c) = [A]_{f=0.5}$, der Konzentration von freiem $([A])$ entspricht, bei der die Hälfte der Bindungsstellen auf der Oberfläche besetzt sind.

Die Bestimmung von $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ bei verschiedenen Ca^{2+} - und NaCl -Konzentrationen kann in einfacher Weise graphisch erfolgen. Dazu wird $\log\left(\frac{f}{1-f}\right)$ gegen $\log([A] / \mu\text{M})$ nach Gleichung (10) aufgetragen:

$$\log\left(\frac{f}{1-f}\right) = \log\left[\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c) / \mu\text{M}\right] + \log([A] / \mu\text{M}). \quad (10)$$

Die berechneten $([A] / \mu\text{M})$ -Werte und das Verhältnis $(f / (1-f))$ sind in Tabelle 3 (3A, 3B, 3C) aufgelistet; siehe Anhang A1.

Dem Langmuirschen Modell entsprechend resultiert, gemäß Gleichung (10), eine Gerade mit der Steigung $s = \frac{d \log(f / (1-f))}{d \log([A] / \mu\text{M})} = 1$. Der Schnittpunkt der Gerade mit der Abszisse

beim Nullwert auf der Ordinate ist der jeweilige $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ -Zahlenwert (Fig. 2A, 2B, 2C).

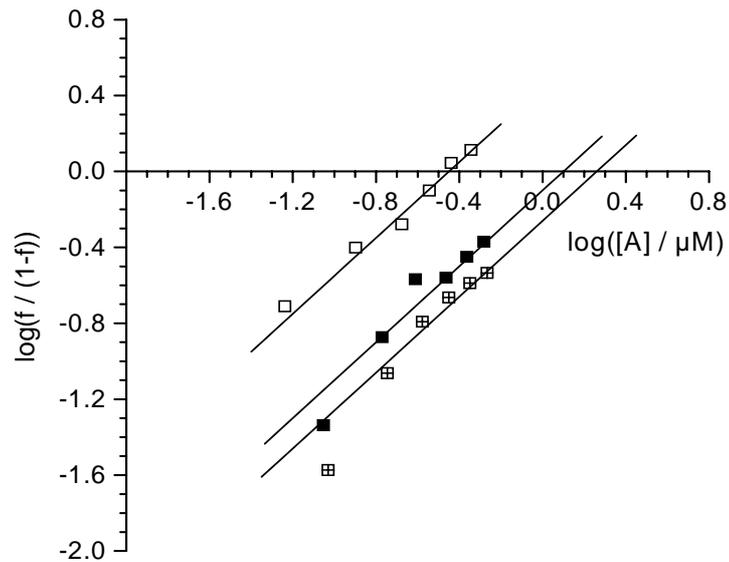


Fig. 2A: Graphische Bestimmung von $\overline{K_A^{(Ca)}}(I_c)$ aus der doppel-logarithmischen Auftragung nach Gleichung (10) für folgende Ionenstärken I_c / M :

(□) 0.053 (1 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl , 10 mM Hepes , pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)),

(■) 0.103 (1 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl , 10 mM Hepes , pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)),

(⊞) 0.153 (1 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl , 10 mM Hepes , pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)).

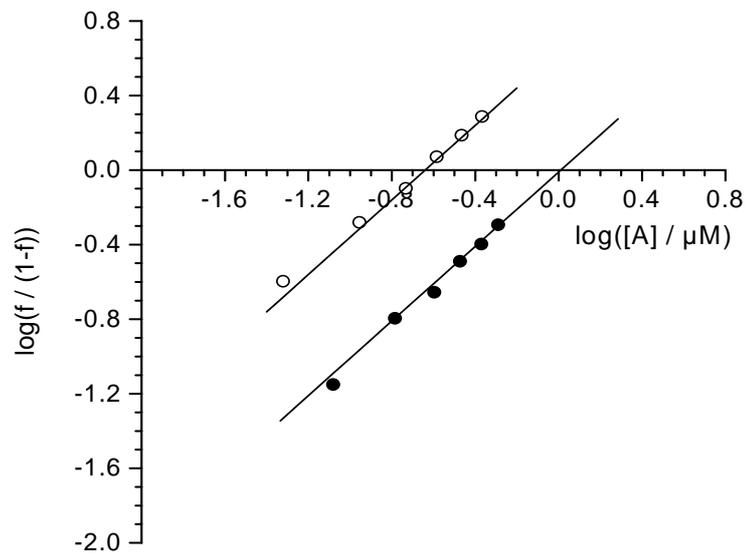


Fig. 2B: Graphische Bestimmung von $\overline{K_A^{(Ca)}}(I_c)$ aus der doppel-logarithmischen Auftragung nach Gleichung (10) für folgende Ionenstärken I_c / M :

(○) 0.056 (2 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl , 10 mM Hepes , pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)),

(●) 0.106 (2 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl , 10 mM Hepes , pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ (20 °C)).

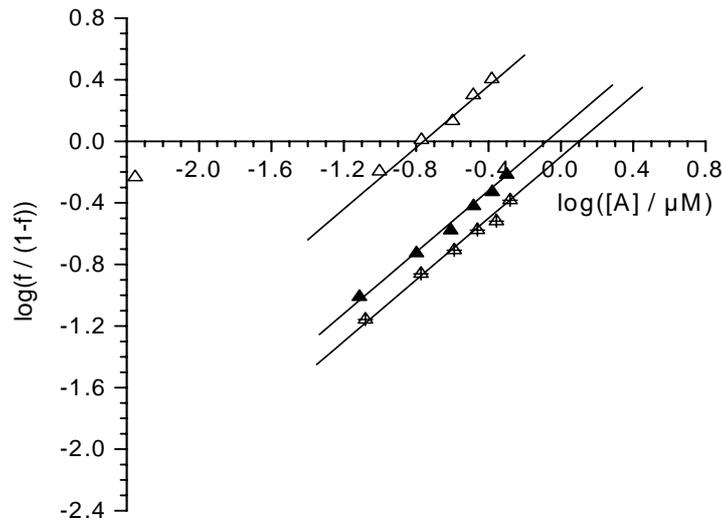


Fig. 2C: Graphische Bestimmung von $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ aus der doppel-logarithmischen Auftragung nach Gleichung (10) für folgende Ionenstärken I_c / M :
 (△) 0.059 (3 mM $CaCl_2$, 50 mM $NaCl$, 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293$ K (20 °C)),
 (▲) 0.109 (3 mM $CaCl_2$, 100 mM $NaCl$, 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293$ K (20 °C)),
 (⊠) 0.159 (3 mM $CaCl_2$, 150 mM $NaCl$, 10 mM *Hepes*, pH 7.4, $T = 293$ K (20 °C)).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tab. 4: Zahlenwerte für die einzelnen globalen Dissoziationsgleichgewichtskonstanten $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ bei $T = 293$ K (20 °C), 10 mM *Hepes*, pH 7.4.

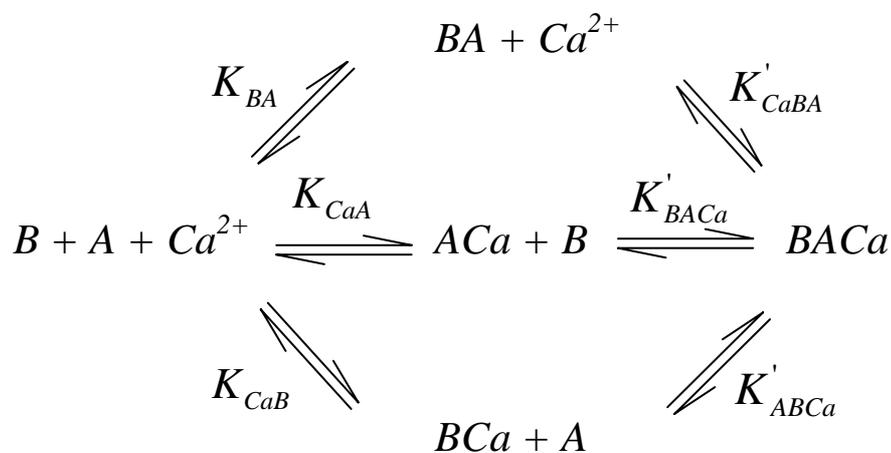
Experimentelle Bedingungen	$\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c) / \mu M$
1 mM $CaCl_2$, 50 mM $NaCl$	0.355(± 0.053)
1 mM $CaCl_2$, 100 mM $NaCl$	1.259(± 0.189)
1 mM $CaCl_2$, 150 mM $NaCl$	1.8197(± 0.2729)
2 mM $CaCl_2$, 50 mM $NaCl$	0.229(± 0.034)
2 mM $CaCl_2$, 100 mM $NaCl$	1.023(± 0.153)
3 mM $CaCl_2$, 50 mM $NaCl$	0.174(± 0.026)
3 mM $CaCl_2$, 100 mM $NaCl$	0.832(± 0.125)
3 mM $CaCl_2$, 150 mM $NaCl$	1.259(± 0.189)

Es ist ersichtlich, dass Annexin V mit relativ hoher Affinität an die Glimmeroberfläche bindet. Zudem, ansteigende Ionenstärke ergibt höhere $\overline{K_A^{(Ca)}}(I_c)$ -Zahlenwerte, d.h., ionische Abschirmung reduziert die Bindungsstärke ganz erheblich.

4.1.3 Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration auf die Proteinadsorption

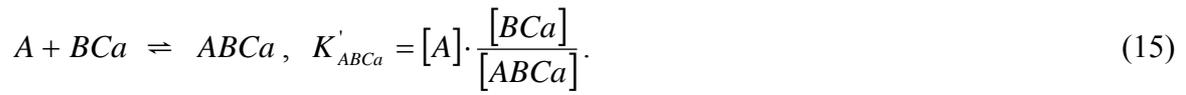
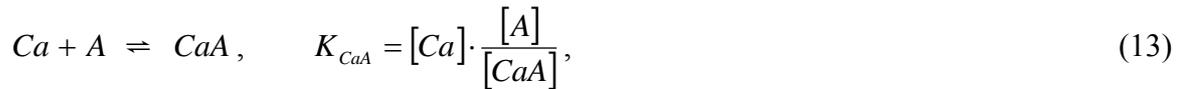
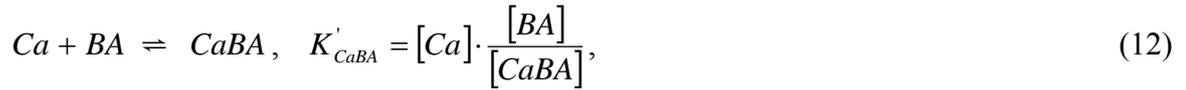
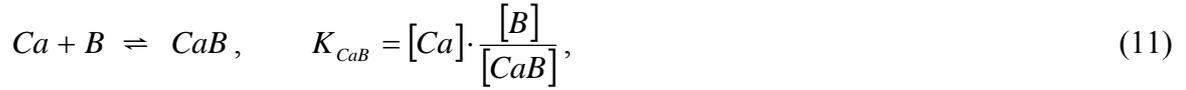
Die Daten zeigen, dass die zugefügten Ca^{2+} -Ionen sowohl mit dem BA -Komplex, als auch mit Annexin V (A) und den negativ geladenen Oberflächen-Bindungsstellen (B) reagieren. Schema 2 ist das Gesamtschema der Bindungsgleichgewichte für die einzelnen binären Komplexe und das ternäre System Glimmer/Annexin V/Calcium.

Der Diagrammzyklus besteht aus zwei Unterzyklen, die alle zum ternären $BACa$ -Komplex führen.



Schema 2: Zyklisches Gesamtreaktionsschema für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Annexin V (A) und an B-Bindungsstellen auf der Glimmeroberfläche.

Für das Schema 2 sind die einzelnen Bindungsgleichgewichte und die zugehörigen Dissoziationsgleichgewichtskonstanten gegeben durch:



Der in Gleichung (9) gegebene Ausdruck für die Globalkonstante kann nun weiter aufgeschlüsselt werden:

$$\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c) = [A] \cdot \frac{[B] + [BCa]}{[AB] + [BACa]} = [A] \cdot \frac{[B] \cdot (1 + [BCa]/[B])}{[AB] \cdot (1 + [BACa]/[AB])} = K_{BA} \cdot \frac{(1 + [Ca]/K_{CaB})}{(1 + [Ca]/K'_{CaBA})}.$$

Umformen liefert die übersichtliche Form:

$$\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c) = K_{BA} \cdot \frac{K'_{CaBA}}{K_{CaB}} \cdot \frac{([Ca] + K_{CaB})}{([Ca] + K'_{CaBA})}. \quad (16)$$

Offensichtlich ergeben sich drei praktische Grenzfälle:

(1) Für $[Ca_T] = 0$, d.h., kein zusätzliches Ca^{2+} , folgt aus Gleichung (16), dass

$$\overline{K}_A^{(0)}(I_c) = K_{BA}(I_c). \quad (17)$$

Siehe Gleichung (14).

(2) Für hohe Ca^{2+} -Konzentrationen, $[Ca_T] \gg K_{CaB}, K'_{CaBA}$, folgt

$$\overline{K}_A^{(\infty)}(I_c) = K_{BA} \cdot \frac{K'_{CaBA}}{K_{CaB}} = K_A^{(0)}(I_c) \cdot \frac{K'_{CaBA}}{K_{CaB}}. \quad (18)$$

(3) Für den Bereich $[Ca] \ll K_{CaB}$, folgt aus Gleichung (16), dass

$$\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c) = K_{BA} \cdot K'_{CaBA} \cdot \frac{1}{[Ca] + K'_{CaBA}}. \quad (19)$$

In Figur 3 sieht man, dass für alle drei Ionenstärken, der Verlauf von $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ mit Gleichung (19) konform ist. $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ fällt ab mit steigender Ca^{2+} -Konzentration. Das heißt, dass in diesem $[Ca]$ -Bereich muss $K_{CaB} > [Ca]$ gelten.

Die quantitative Abschätzung zeigt, dass im mM-Konzentrationsbereich, $[Ca] = [Ca_T] - [CaB] - [CaA] - [CaAB] \approx [Ca_T]$ mit guter Näherung $[Ca] = [Ca_T]$ ergibt. D.h., hier ist die Konzentration $[Ca]$ an freien Ca^{2+} durch die Gesamtkonzentration $[Ca_T]$ gegeben.

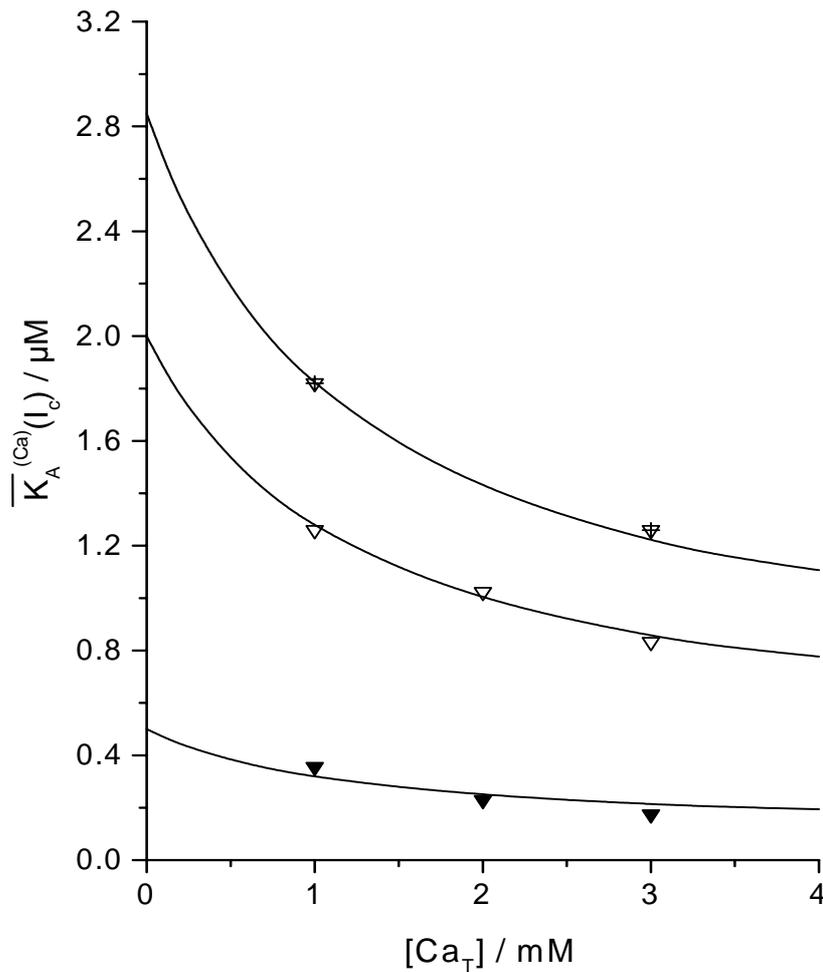


Fig. 3: Globale Dissoziationsgleichgewichtskonstante $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ für $[NaCl] / mM = (\blacktriangledown)$ 50, (∇) 100 und (∇) 150 als Funktion der totalen Calciumkonzentration $[Ca_T]$. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassungen nach Gleichung (16) an.

Die Anpassungsanalyse der drei Kurvenverläufe in Figur 3, gemäß Gleichung (16), ergibt die zwei Gleichgewichtskonstanten $K_{CaB} = 6.0(\pm 0.9) mM$, $K'_{CaBA} = 1.2(\pm 0.2) mM$. Des Weiteren, zeigt Figur 3 an, dass $K'_{CaBA} < K_{CaB}$ sein muss; siehe Gleichung (16).

Man sieht, dass wie schon qualitativ aus den Kurvenverläufen zu entnehmen, tatsächlich $K_{CaB} > K'_{CaBA}$ ist.

Die Ergebnisse in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen ($[\text{Ca}_T] = 0$) und bei sehr hohen Mengen an Ca^{2+} -Ionen ($[\text{Ca}_T] \gg 30 \text{ mM}$) bei $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), 10 mM Hepes , $\text{pH } 7.4$ sind in Tabelle 5 dargestellt; siehe Gleichungen (17) und (18).

Tab. 5: Die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen ($[\text{Ca}_T] = 0$) und bei sehr hohen Mengen an Ca^{2+} -Ionen ($[\text{Ca}_T] \gg 30 \text{ mM}$) bei $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), 10 mM Hepes , $\text{pH } 7.4$.

$[\text{Ca}_T] = 0$	$[\text{Ca}_T] \gg 30 \text{ mM}$
$\overline{K}_A^{(0)}([\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}) = 0.50(\pm 0.05) \mu\text{M}$	$\overline{K}_A^{(\infty)}([\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}) = 0.11(\pm 0.02) \mu\text{M}$
$\overline{K}_A^{(0)}([\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}) = 2.0(\pm 0.3) \mu\text{M}$	$\overline{K}_A^{(\infty)}([\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}) = 0.44(\pm 0.07) \mu\text{M}$
$\overline{K}_A^{(0)}([\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}) = 2.85(\pm 0.35) \mu\text{M}$	$\overline{K}_A^{(\infty)}([\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}) = 0.62(\pm 0.09) \mu\text{M}$

Aus dem äußeren Zyklus des gesamten Reaktionsschemas (Schema 2) resultiert die Beziehung:

$$\left(K_{BA} / K'_{ABCa}\right) \cdot \left(K'_{CaBA} / K_{CaB}\right) = 1. \quad (20)$$

Umstellen und einsetzen in Gleichung (20) führt zu der gesuchten Gleichgewichtskonstante K'_{ABCa} für den $BACa$ -Komplex:

$$K'_{ABCa} = K_{BA} \cdot K'_{CaBA} / K_{CaB}. \quad (21)$$

Wie aus der Tabelle 6 zu ersehen ist, sind die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten in Abhängigkeit von den NaCl -Konzentrationen für den Binärkomplex BA größer als die zugehörigen Konstanten für den Ternärkomplex, d.h. der Ternärkomplex ist mehr stabil als die jeweiligen Binärkomplexe.

Tab. 6: Die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für das System Glimmeroberfläche, Annexin V, Ca^{2+} -Ionen in 10 mM Hepes, pH 7.4, $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$).

Binärkomplex	Ternärkomplex
$K_{BA}([\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}) = 0.50(\pm 0.05) \mu\text{M}$	$K'_{ABCa}([\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}) = 0.10(\pm 0.02) \mu\text{M}$
$K_{BA}([\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}) = 2.0(\pm 0.3) \mu\text{M}$	$K'_{ABCa}([\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}) = 0.40(\pm 0.06) \mu\text{M}$
$K_{BA}([\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}) = 2.85(\pm 0.35) \mu\text{M}$	$K'_{ABCa}([\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}) = 0.57(\pm 0.09) \mu\text{M}$

4.2 Ionen-Elektrostatik der ternären Annexin V-Glimmer-Adsorptionskomplexe

Die quantitative theoretische Analyse der Primärdaten-Korrelationen in Figur 3, Figur 4 und Figur 5 zeigt an, dass das freie Annexin V, das global anionisch ist, sich bei der Adsorption an Glimmer so verhält wie ein ionischer Dipol. Die Daten-Korrelationen sind dabei konsistent mit dem Konzept, dass die Kontaktstelle des Annexins das positive Zentrum des Makrodipols ist. Die hochaffinen (Ca_v) und niederaffin gebundenen Ca^{2+} -Ionen der Kontaktstelle (Ca_v)Ca ergeben die (relativ hohe) Ladungszahl $z_+^{\text{eff}} : A [(\text{Ca}_v) \text{Ca}]^{z_+^{\text{eff}}}$. Die Adsorptionsbindungspartner sind die anionischen Bereiche ($B\dots$) z_-^{eff} an der Glimmeroberfläche, mit der effektiven Ladungszahl z_-^{eff} . Die komplexen interionischen Wechselwirkungen, die sich in den einzelnen Korrelationen der experimentellen Globalgleichgewichtskonstanten $\overline{K_A^{(Ca)}}(I_c)$ widerspiegeln, lassen sich im Rahmen eines Punktladungsmodells nach Debye-Hückel quantitativ aufschlüsseln.

4.2.1 Chemische Thermodynamik der Adsorption

Zur Beschreibung der Abhängigkeit der experimentellen $\overline{K_A^{(Ca)}}(I_c)$ -Werte

- von der Ca^{2+} -Totalkonzentration und
- von der Ionenstärke I_c

werden, datenkonform, die Gleichungen $(BACa + AB) = A + (B + BCa)$, Gleichung (8) und $CaA = Ca + A$, Gleichung (13) in geeigneter Weise umgeschrieben. Die Komplexdissoziation, die der Größe $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ zugeordnet ist, lautet demnach global:

$$[A(Ca_v)Ca(B\dots)]^{z_K^{eff}} = A[(Ca_v)Ca]^{z_+^{eff}} + (B\dots)^{z_-^{eff}}, \quad (22)$$

wobei z_K^{eff} die effektive Ladungszahl des ternären Adsorptionskomplexes $[A(Ca_v)Ca(B\dots)]^{z_K^{eff}}$ ist. Während externe Ca^{2+} -Ionen, $[Ca_T]$, diesen Komplex stabilisieren, wirkt die Zugabe von NaCl, durch Erhöhung der Ionenstärke I_c , destabilisierend.

Zur quantitativen Aufschlüsselung der $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ -Korrelationen wird der klassische Aktivitätskoeffizienten-Ansatz gemacht. Die Zuordnungen und einzelnen Ableitungen der Formeln werden im Anhang A2 erläutert.

Analog zur Gleichung (A1) des Anhangs,

$$K^\ominus(0) = |K_c(I_c)| \cdot Y$$

wird für jede der drei experimentellen Ca^{2+} -Totalkonzentrationen $[Ca_T]$ und für $[Ca_T] = 0$, aus Figur 3, der Ansatz

$$\overline{K}_A^{(Ca)}(0) = \overline{K}_A^{(Ca)}(I_c) \cdot Y^{(Ca)} \quad (23)$$

gemacht. Dabei bezieht sich $\overline{K}_A^{(Ca)}(0)$ jeweils auf $I_c = 0$.

Zur theoretischen Deutung und zur praktischen Anwendung für die Ermittlung der systemcharakteristischen Parameter wird die logarithmische Form der Gleichung (23) benutzt:

$$\log\left(\frac{\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)}{M}\right) = \log\left(\frac{\overline{K}_A^{(Ca)}(0)}{M}\right) - \log Y^{(Ca)}. \quad (24)$$

4.2.2 I_c -Abhängigkeit der $\overline{K_A^{(Ca)}}(I_c)$ -Werte

Der Y -Faktor wird im Rahmen unseres Punktladungsmodells als 1:1 Stöchiometrie (alle $|v_j|=1$, siehe Anhang A2) mit den Effektivladungszahlen z_j^{eff} in einfacher Weise aufgeschlüsselt:

$$Y^{(Ca)} = \frac{y_+ \cdot y_-}{y_K} \quad (25)$$

Die individuellen Aktivitätskoeffizienten y_j beziehen sich auf die Spezies j , y_+ auf $A[(Ca_v)Ca]^{z_+^{eff}}$, y_- auf $(B\dots)^{z_-^{eff}}$, y_K auf den Ternärkomplex $[A(Ca_v)Ca(B\dots)]^{z_K^{eff}}$.

Dabei gilt der Ladungserhalt:

$$z_K^{eff} = z_+^{eff} + z_-^{eff} \quad (26)$$

Im Anhang A3 wird gezeigt, dass für jede Spezies j gilt:

$$\log y_j = -\frac{z_j^2 \cdot A^* \cdot (I_c / M)^{1/2}}{1 + B^* \cdot a \cdot (I_c / M)^{1/2}} + C^* \cdot (I_c / M) \quad (27)$$

Dabei sind A^* , B^* und C^* für gegebenes Lösungsmedium und gegebene Temperatur konstante Zahlenwerte, die für jedes j gelten. In Gleichung (27) ist a der Kontaktabstand der Ladungszentren des Punktladungsansatzes. Siehe Gleichung (A2) des Anhangs.

Mit Hilfe von Gleichung (A2) gilt, dass:

$$\log Y = \sum_j \log y_j \sim \sum_j z_j^2 = 2 \cdot |z_+ z_-|.$$

Des Weiteren gilt, dass:

$$\sum_j z_j^2 = z_+^2 + z_-^2 - (z_+ + z_-)^2 = -2 \cdot z_+ \cdot z_- = 2 \cdot |z_+ z_-| \quad (28)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (27) und Gleichung (28) in Gleichung (26) mit $z_+ = z_+^{eff}$, $z_- = z_-^{eff}$, in Gleichung (25) mit $\log Y = \log y_+ + \log y_- - \log y_K$, und weiteres Einsetzen in Gleichung (24) folgt die Beziehung:

$$\log\left(\frac{\overline{K_A}^{(Ca)}(I_c)}{M}\right) = \log\left(\frac{\overline{K_A}^{(Ca)}(0)}{M}\right) + \frac{2 \cdot |z_+ z_-|^{eff} \cdot A^* \cdot (I_c / M)^{1/2}}{1 + B^* \cdot a \cdot (I_c / M)^{1/2}} - C^* \cdot (I_c / M). \quad (29)$$

Für $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) und $\varepsilon_r = \varepsilon_r(H_2O, 293 \text{ K}) = 80.1$ gelten die Werte: $A^* = 0.5065$, $B^* = 3.278 \text{ nm}^{-1}$. Die Anpassung der Daten in Figur 3 liefert unter anderem drei Werte für $\overline{K_A}^{(0)}([NaCl])$. Die Anpassung der Daten nach Gleichung (29), siehe Figur 4, ergibt $C^* = 1.5$, vier Werte für $|z_+ z_-|^{eff}$, vier Werte für $B' = B^* \cdot a$ und damit vier Werte für $a = B' / B^*$, sowie vier (extrapolierte) Werte für $\overline{K_A}^{(Ca)}(0)$, jeweils für die vier Ca^{2+} -Totalkonzentrationen. Siehe Tabelle 7.

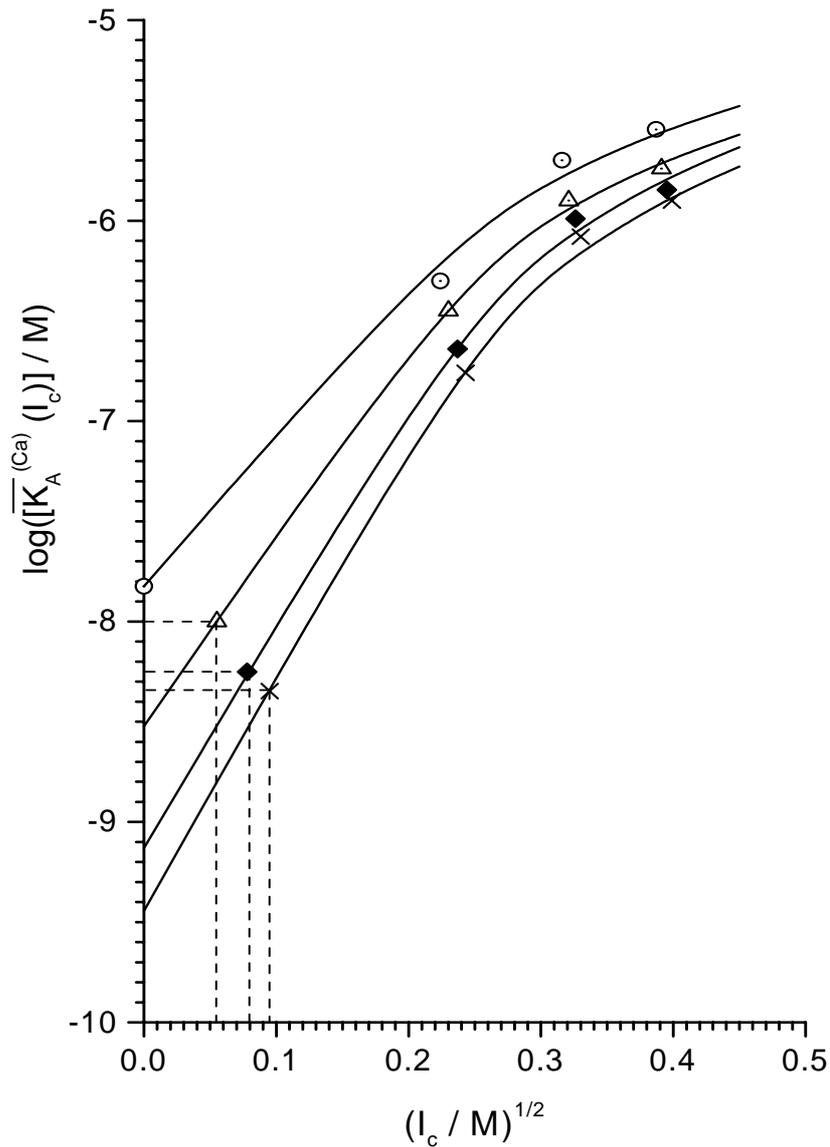


Fig. 4: Logarithmus von $\overline{K}_A^{(Ca)}(I_c)$ als Funktion der Wurzel der Ionenstärke I_c , erzeugt durch vier verschiedene Ca_T - und drei NaCl-Konzentrationen: 50, 100, 150 mM für $(\odot) [Ca_T] = 0 \text{ mM}$, $(\triangle) [Ca_T] = 1 \text{ mM}$, $(\blacklozenge) [Ca_T] = 2 \text{ mM}$, $(\times) [Ca_T] = 3 \text{ mM}$.

Im Anhang A3.3 wird berechnet, dass für paarweise Ca^{2+} - $2B^-$ Wechselwirkung mit nominal $|z_+ \cdot z_-| = 2 \cdot (2 \cdot 1) = 4$ der Kontaktabstand $a = 1.42 \text{ nm}$ ist. In Tabelle 7 sieht man, dass die Datenanpassung in Figur 4 den Bereich $0.61 \leq a/nm \leq 0.86$ ergibt. Wenn wir als Mittelwert $\bar{a} = 0.8(\pm 0.1) \text{ nm}$ einsetzen, ergibt sich ein mittleres Ladungszahlprodukt von $|z_+ z_-| = \bar{a}/f = 2.25 = 1.5 \cdot 1.5$. Das heißt, $|z_+|^{eff} = 1.5$ und

$|z_-|^{eff} = 1.5$ oder ein Ca^{2+} an Annexin in der Kontaktstelle wirkt nur effektiv mit $|z_+|^{eff} = 1.5$ und nicht mit $|z_+|^{eff} = 2$.

Tab. 7: Effektives Ladungszahlprodukt $|z_+ z_-|^{eff}$, Anpassungsparameter B' , der Kontaktabstand a der Punktladungen an Annexin V- und Glimmeroberfläche, und die globale Dissoziationsgleichgewichtskonstante $\overline{K}_A^{(Ca)}(0)$ bei verschiedenen Ca^{2+} -Totalkonzentrationen.

$[\text{Ca}_T] / \text{mM}$	$ z_+ z_- ^{eff}$	B'	$a / \text{nm} = B' / (B^* \cdot \text{nm})$	$ z_+ ^{eff} \cdot z_- ^{eff}$	$\overline{K}_A^{(Ca)}(0) / \text{nM}$
0	11.2	2	0.61	$3.4 \cdot 3.4$	$15(\pm 2)$
1	15.6	2.65	0.81	$3.95 \cdot 3.95$	$3.0(\pm 0.5)$
2	18.6	2.75	0.84	$4.3 \cdot 4.3$	$0.74(\pm 0.11)$
3	19.9	2.83	0.86	$4.5 \cdot 4.5$	$0.36(\pm 0.05)$

Da $|z_+ z_-|^{eff} = |z_+|^{eff} \cdot |z_-|^{eff}$ ist, bedeuten die Zahlen in Tabelle 7, dass im Mittel 2 Ca^{2+} -Ionen mit 4 bis 5 B' -Bindungsstellen auf der Glimmeroberfläche elektrostatisch im Kontakt sind.

Aus Figur 4 kann man noch $\overline{K}_A^{(Ca)}([\text{NaCl}] = 0)$ für die verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen ermitteln (gestrichelte Extrapolationslinien auf die Ordinate). Für $[\text{NaCl}] = 0$ wird I_c allein durch CaCl_2 bestimmt. Siehe Tabelle 8.

Tab. 8: Extrapolierte Zahlenwerte, Figur 4, für $\overline{K}_A^{(Ca)}([\text{NaCl}] = 0)$ bei verschiedenen Ca^{2+} -Totalkonzentrationen und $I_c = \frac{1}{2} \{4 \cdot [\text{CaCl}_2] + 1 \cdot 2 \cdot [\text{CaCl}_2]\} = 3 \cdot [\text{CaCl}_2]$.

$[\text{Ca}_T] / \text{mM}$	I_c / M	$(I_c / \text{M})^{1/2}$	$\overline{K}_A^{(Ca)}([\text{NaCl}] = 0) / \text{nM}$
0	0	0	$15(\pm 2)$
1	0.003	0.055	$10.0(\pm 1.5)$
2	0.006	0.078	$5.6(\pm 0.8)$
3	0.009	0.095	$4.5(\pm 0.7)$

Formal gilt die Entsprechung $\overline{K_A^{(0)}}([NaCl]=0) = \overline{K_A^{(0)}}(0) = 15(\pm 2) nM$.

Die Zahlenwerte von $\overline{K_A^{(Ca)}}(0)$, im Bereich von 10 nM, quantifizieren die hochaffine Bindung von Annexin V an die Glimmeroberfläche. In der Literatur (Tait et al., 1989, Tait and Gibson, 1992), findet man $K_A(I_c)$ -Werte für die Annexinbindung an anionische Lipid-Membranen für zwei Ionenstärken sind $K_A(I_c = 0.15 M) = 0.036 nM$, $K_A(I_c = 0.5 M) = 1.2 nM$. Diese $K_A(I_c)$ -Werte sind also in der Größenordnung (1-10 nM) vergleichbar mit den $\overline{K_A^{(Ca)}}(0)$ -Werte für die Adsorption von Annexin V an Glimmer.

4.2.3 Abhängigkeit des effektiven Ladungszahlprodukts $|z_+ z_-|^{eff}$ von der Ca^{2+} -Totalkonzentration

In Figur 5 ist ersichtlich, dass $|z_+ z_-|^{eff}$ mit steigender Ca^{2+} -Totalkonzentration ansteigt. Der Anstieg deutet an, dass Ca^{2+} -Ionen relativ zu $[Ca_T]=0$ zusätzlich an das System A (Ca_v) und (B...) binden. Die Bindungsreaktionen sind:



Die Bindung nach Gleichung (30) erhöht z_+^{eff} , die Bindung nach Gleichung (31) erniedrigt z_-^{eff} . Beides ist im Produkt $|z_+ z_-|^{eff}$ enthalten. Wenn wir die durch zusätzlich gebundenes Ca^{2+} bewirkte Erhöhung des Ladungszahlprodukts, $|z_+ z_-|^{eff} = |z_+|^{eff} \cdot |z_-|^{eff}$, auf die Punktladungen z_+^{eff} und z_-^{eff} beziehen, ist die Gleichgewichtskonstante K_{Ca}^* eine „Mischkonstante“ für die beiden Reaktionen nach Gleichung (30) und Gleichung (31).

Die Daten zeigen, dass wegen der geringen Annexin-Konzentration $[A_T] \leq 1 \mu M$, auch das gesamte zusätzlich (zu (Ca_v)) gebundene Ca^{2+} nach

$[Ca_b] = [A(Ca_v)Ca] + [A(Ca_v)Ca(B\dots)] \leq 10 \mu M$ klein gegenüber $[Ca_T] \geq 1 mM$ ist.

Daher verwenden wir die Approximation $[Ca_T] = [Ca_b] + [Ca] = [Ca]$.

Die Auftragung $|z_+ z_-|^{eff}$ gegen $[Ca_T]$ in Figur 5 impliziert, dass die Differenz

$$\Delta |z_+ z_-|^{eff} = |z_+ z_-|^{eff} - |z_+ z_-|_0^{eff}, \quad (32)$$

wobei $|z_+ z_-|_0^{eff}$ sich auf $[Ca_T] = 0$ bezieht, proportional zu $[Ca_b]$ ist.

Mit dem Massenwirkungsansatz $[Ca_b] = [Ca_b]_{max} \cdot [Ca] / ([Ca] + K_{Ca}^*)$ und der Äquivalenz

$$\frac{\Delta |z_+ z_-|^{eff}}{\Delta |z_+ z_-|_{max}^{eff}} = \frac{[Ca_b]}{[Ca_b]_{max}} = \frac{[Ca]}{[Ca] + K_{Ca}^*}, \quad (33)$$

und der Approximation $[Ca] = [Ca_T]$ folgt die Beziehung:

$$\Delta |z_+ z_-|^{eff} = \Delta |z_+ z_-|_{max}^{eff} \cdot \frac{[Ca_T]}{[Ca_T] + K_{Ca}^*}, \quad (34)$$

wobei $\Delta |z_+ z_-|_{max}^{eff} = |z_+ z_-|_{max}^{eff} - |z_+ z_-|_0^{eff}$ und $|z_+ z_-|_{max}^{eff}$ sich auf $[Ca_T] \rightarrow \infty$ bezieht.

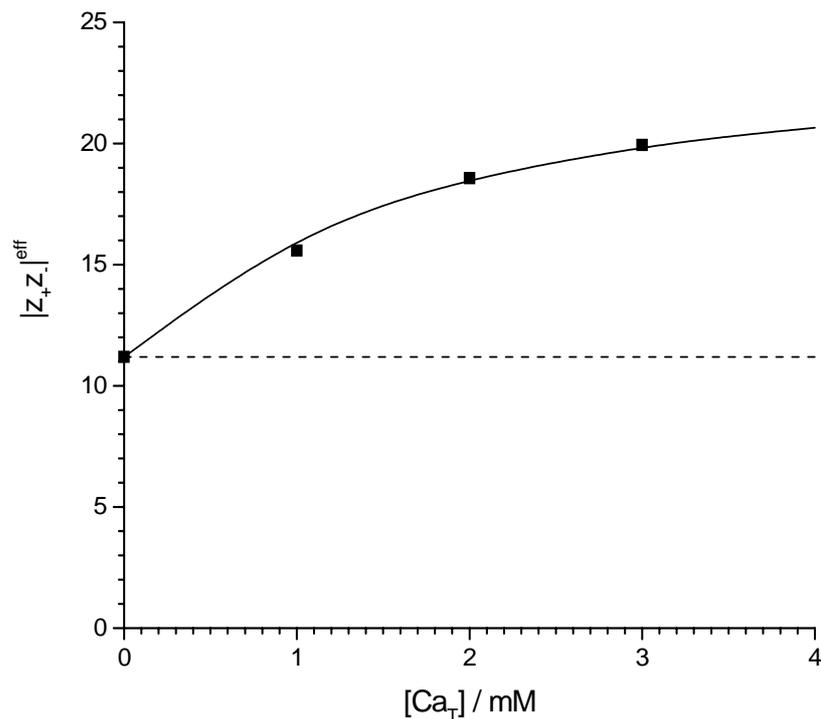


Fig. 5: Effektives Ladungszahlprodukt $|z_+ z_-|^{eff}$ als Funktion der Ca^{2+} -Totalkonzentration.

Die Kurvenanalyse nach Gleichung (34) ergibt: $K_{Ca}^* = 1.5(\pm 0.2) \text{ mM}$ bei $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), 10 mM Hepes, $\text{pH } 7.4$ und $|z_+ z_-|_{\max}^{eff} = 24$.

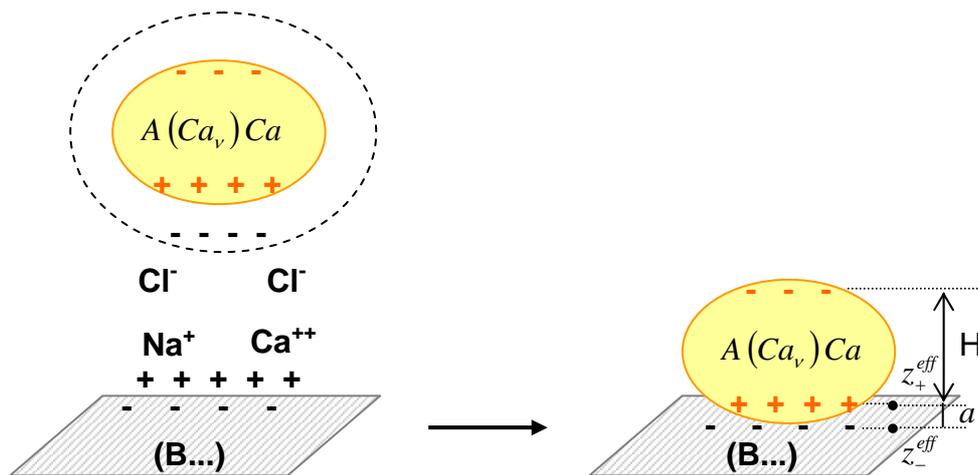
Wir sehen, dass im mM Ca^{2+} -Konzentrationsbereich, die Abschätzung $K_{CaA} \approx 2(\pm 1) \text{ mM}$ nach Gleichung (13) näher am Zahlenwert für $K_{Ca}^* = 1.5(\pm 0.2) \text{ mM}$ liegt als $K_{CaB} = 6.0(\pm 0.9) \text{ mM}$ nach Gleichung (11). Das bedeutet, dass der Ionenabschirmungseffekt und die Ca^{2+} -Bindung im Wesentlichen das Annexin V betreffen.

Der Schlüssel für die Identifizierung der Annexin V/Glimmer-Wechselwirkung (beide Reaktionspartner - negativ geladen) sind die intrinsischen Ca^{2+} -Ionen (Ca_v) des Annexins. Nach der Kristallstruktur von Annexin V-Monomeren (Voges et al., 1994), wird die Adsorption des anionischen Proteins durch die drei bis fünf Calcium-Zentren vermittelt, die sich auf der konvexen Seite des Annexin V-Monomers befinden und mit

der polaren Glimmeroberfläche wechselwirken. Die zugefügten Calcium-Ionen aus der Lösung verstärken diese Bindung.

Der isoelektrische Punkt von Annexin V liegt bei 4.8 (Römisch and Paques, 1991); folglich ist das Molekül bei physiologischen pH-Werten stark anionisch. Die elektrostatischen Bedingungen begünstigen eine hoch ausgeprägte Affinität zu Ca^{2+} . Durch das gebundene Ca^{2+} $[(\text{Ca}_v)\text{Ca}]$ wird die effektive Ladungszahl (z_+^{eff}) von Annexin V noch stärker positiv. Das global anionische Molekül bindet mit dieser „positiven Polseite“ an Glimmer (effektive Ladungszahl z_-^{eff}).

Die Bildung des Ternärkomplexes BACa wird durch die Bindung von zusätzlichen Ca^{2+} an Annexin V verstärkt (Schema 3).



Schema 3: Modell der Annexin V-Adsorption auf Glimmeroberfläche. Die zugefügten Ca^{2+} -Ionen binden an die negative Seite des Moleküls und verstärken den Ternärkomplex. Die Kontaktstellen im Komplex sind dipolar. Relativ zur Dicke $H = 3 \text{ nm}$ des Annexins erscheint der experimentelle Mittelwert $\bar{a} = 0.8(\pm 0.1) \text{ nm}$ die Ca^{2+} - B^- Wechselwirkung in der Kontaktstelle realistisch wiederzugeben.

5 Zusammenfassung

Die Thematik der Dissertation zielte anfänglich auf die Quantifizierung der Ca^{2+} -Ionenvermittelten Verankerung des Human Annexin V auf festkörpergestützte Lipid-Membranen mit Glimmer als fester Matrixfläche. Die Protein-Ca-Membran Ternärkomplexe bilden bekanntlich in den elektrischen Feldern der Membran zwei Typen von spannungsgesteuerten Ionenkanälen aus.

Bisher ist die zellbiologische Funktionszuordnung des Annexin V nicht geklärt. Zellbiologisch wird das Erscheinen von Annexin und Phosphatidylserin auf der äußeren Seite der Plasmamembran als Indikator für den Beginn von Zelltod (Apoptose) gewertet. Erhärtet ist lediglich, dass das Protein Annexin V *in vitro* den Ionentransport von Lipoproteinmembranen feldabhängig regulieren kann, die tatsächliche Bedeutung für *in vivo* bleibt nach wie vor noch zu ergründen.

Bei den experimentellen Vorarbeiten zur Erzeugung von Lipid-Membranen auf Glimmerplättchen wurde rasterkraftmikroskopisch (Tapping Mode) bestätigt, dass Annexin V die bekannten hexagonalen 2-D Kristallmuster an der Oberfläche von Glimmer-gestützten Lipid-Membranen ausbildet. Überraschend aber war dann der Befund, dass auch ohne die Lipidmembranschicht Annexin V direkt an die Glimmerplatten assoziieren kann. Dabei verstärken zugesetzte Ca^{2+} -Ionen die Grenzflächenadsorption spezifisch in chemischen Ca-Ternärkomplexen, während Salze wie NaCl entgegengesetzt wirken. Steigende Salzkonzentration reduziert die Komplexbildung.

Die primären rasterkraftmikroskopischen Daten der Annexin-Bindung lassen sich als einfache Langmuir-Isothermen darstellen, wobei der Bindungsgrad f als Funktion der Annexin-Konzentration $[A]$ im Rahmen der experimentellen Streubreite einer einfachen 1:1 Stöchiometrie zu gehorchen scheinen. Zur Analyse der primären f -Datenkorrelationen wird ein chemisches Globalschema zur Bestimmung der Ca^{2+} -abhängigen Globalgleichgewichtskonstante vorgeschlagen, die ihrerseits noch von der NaCl-Konzentration abhängig ist. Die Analyse der Ca/NaCl-Abhängigkeiten liefert unter anderem auch die Gleichgewichtskonstanten für die binären Komplexe Annexin/Glimmer, auch die für die Abwesenheit zusätzlicher Ca^{2+} -Ionen.

Mit den Zahlenwerten bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen lassen sich dann sowohl die jeweiligen Gleichgewichtskonstanten für die Binärkomplexe Ca/Glimmer und Ca/Annexin

als auch für den Ternärkomplex Annexin/Ca/Glimmer ermitteln. Da die (experimentellen) Globalkonstanten für das Annexin-Glimmer-System im Bereich von 0.5 μM bis 2.0 μM liegen, ist die (für die hypothetisch ionenfreie Lösung ermittelte) thermodynamische (Aktivitäts-)Gleichgewichtskonstante für die Annexin-Glimmer-Assoziation mit $15(\pm 2) \text{ nM}$ als hochaffin zu werten. Gemessen an der Tatsache, dass sowohl Annexin als auch die Glimmeroberfläche netto-negativ anionisch sind, Annexin von Glimmer also elektrostatisch abgestoßen werden sollte, war die starke Adsorption von Annexin an Glimmergrenzflächen zunächst verwunderlich.

Die adsorptionsverstärkende Wirkung der Ca^{2+} -Ionen im Ternärkomplex wird als spezifischer Kontaktvermittler gedeutet. Der durch NaCl dominierte Salzeffekt lässt sich im Rahmen eines Debye-Hückel-Ansatzes auf (unspezifische) ionische Abschirmungen zurückführen. Die aus den Ionenstärke-Abhängigkeiten ermittelten hohen Ladungszahlprodukte deuten an, dass die Stabilität der Ternärkomplexe durch große elektrostatische Anteile bedingt ist.

Die Resultate der Auswertung des Aktivitätskoeffizientenprodukts sind konsistent mit dem Konzept, dass Annexin als elektrischer Multipol anzusehen ist. Dabei bilden die stark gebundenen intrinsischen Ca^{2+} -Ionen des Annexins die positiven Ladungszentren und tragen wesentlich zu dem relativ hohen Punktladungsäquivalent bei. Die Kontaktstelle des Annexins zum Glimmer muss damit als positiv qualifiziert werden. Die effektive positive Ladungszahl wird durch Zugabe von Ca^{2+} größer (und der negative Teil des Annexindipols entsprechend kleiner) bis zu einer scheinbaren Sättigung.

Der experimentell ermittelte Kontaktabstand des positiven Ladungszentrums des Annexins zum negativen Ladungszentrum der Glimmer-Kontaktstelle ist mit 0.8 nm erheblich kleiner als der geschätzte geometrische Abstand von ca. 2 nm des negativen Zentrums des global anionischen Annexins zu den anionischen Bindungsorten des Glimmers. Nach dem Coulomb-Kraftgesetz mit reziproker Abstandsabhängigkeit dominiert daher die kurzreichende dipole Anziehung gegenüber der weiterreichenden multiplen monopolar-anionischen Abstoßung.

Die Analyse der Abhängigkeit des Ladungszahlproduktes von der Ca^{2+} -Konzentration ergibt eine gute Abschätzung für eine weitere binäre Gleichgewichtskonstante, $K_{CaA} = 1.2 \text{ mM}$, für die Bindung des Ca^{2+} an Annexin. Dieses Ca^{2+} bindet an äußere anionische Gruppen des Annexins, also zusätzlich zu den chelatartig hochaffin gebundenen Ca^{2+} -Ionen, die sich in der direkten Kontaktstelle zum Glimmer befinden.

Zusammenfassend, in der Dissertation ist es gelungen, aus den zunächst schwierig zu deutenden Primärdaten, die wesentlichen Individualkonstanten des ternären Systems Annexin/Ca/Glimmer zu ermitteln. Mit den quantitativen Systemparametern, die hier durch eine physikalisch-chemische Analyse erarbeitet wurden, lassen sich nun gezielt sowohl die Besetzungsdichte des Annexins auf den Glimmerplättchen einstellen als auch die Bindungsfestigkeit (durch die Ca^{2+} -Konzentration und die NaCl-Konzentration) vorgeben. Die Ergebnisse der Dissertation sind auch interessant für eine eventuelle Verwendung als Glimmer-gestütztes Annexin, zum Beispiel als Chip in der Biosensorik für membrangebundenes Phosphatidylserin.

6 Literaturverzeichnis

Andree H. A. M., Willems G. M., Hauptmann R., Maurer-Fogy I., Stuart M. C. A., Hermens W. Th. Frederik P. M., Reutelingsperger C. P. M.
Aggregation of phospholipids vesicles by a chimeric protein with the N-terminus of annexin I and the core of annexin V.
Biochem. 32 (1993), 4634-4640

Biele W.
Untersuchung der calciumvermittelten Bindung des Proteins Annexin V an Lipid-Vesikel.
Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie (1996)

Binnig G, Quate C. F, Gerber C.
Atomic force Microscope.
Phys. Rev. Lett. 56 (1986), 930-933

Brisson A., Bergsma-Schutter W., Oling F., Lambert O., Reviakine I.
Two-dimensional crystallization of proteins on lipid monolayers at the air-water interface and transfer to an electron microscopy grid.
Journal of Crystal Growth 196 (1999), 456-470

Brisson A., Mosser G.
Structure of soluble and membrane-bound human Annexin V.
J. Mol. Biol. 220 (1991), 199-203

Buckland A. G., Wilton D. C.
Inhibition of human cytosolic phospholipase A₂ by human annexin V.
Biochem. J. 329 (1998), 369-372

Burger A., Berendes R., Voges D., Huber R., Demange P.
A rapid and efficient purification method for recombinant annexin V for biophysical studies.
FEBS Lett. 329 (1993), 25-28

Cardo-Vila M., Arap W., Pasqualini R.
Alpha v beta 5 integrin-dependent programmed cell death triggered by a peptide mimic of annexin V.
V. Mol. Cell 11 (2003), 1151-1162

Concha N. O., Head J. F., Kaetzel M. A., Dedman J. R., Seaton B. A.
Annexin V forms calcium-dependent trimeric units on phospholipids vesicles.
FEBS 314 (1992), 159-162

Creutz C. E.
The annexins and exocytosis.
Science 258 (1992), 924-931

- Dubois T., Mira J., Feliens D., Solito E., Russo-Marie F., Oudinet.
Annexin Vinhibits protein kinase C activity via a mechanism of phospholipid sequestration.
Biochem. J. 330 (1998), 1277-1282
- Emans N., Gorvel J-P., Walter C., Gerke V., Kellner R., Griffiths G., Gruenberg J.
Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles.
J. Cell Biol. 120 (1993), 1357-1369
- Frantescu A.
DNA/Ca –Adsorption an Lipidmembranoberflächen für den effizienten elektroporativen Gen-Transfer in Gewebezellen.
Dissertation, Universität Bielefeld (2005)
- Frantescu A., Toensing K., Neumann E.
Interfacial ternary complex DNA/Ca/lipids at anionic vesicle surfaces.
Bioelectrochemistry 68 (2006), 158-170
- Funakoshi T., Heimark R. L., Hendrickson L. E., McMullen B. A., Fujikawa K.
Human placental anticoagulant protein: isolation and characterization.
Biochem. 26 (1987), 5572-5578
- Gerke V., Moss S. E.
Annexins and membrane dynamics.
Biochim. Biophys. Acta 1357 (1997), 129-154
- Hawkins T. E., Das D., Young B., Moss S. E.
DT40 cells lacking the Ca²⁺-binding protein annexin 5 are resistant to Ca²⁺-dependent apoptosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 8054-8059
- Huber, R., Römisch, J., Paques, E.-P.
The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes.
EMBO 9 (1990a), 3867-3874
- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Römisch, J., Paques, E.-P.
The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution.
FEBS Lett. 275 (1990b), 15-21
- Huber R., Berendes R., Burger A., Schneider M., Karshikov A., Luecke H.
Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins.
J. Mol. Biol. 223 (1992), 683-704
- Kastl K., Menke M., Lüthgens E., Faiß S., Gerke V., Janshoff A., Steinem C.
Partially reversible adsorption of annexin A1 on POPC/POPS bilayers investigated by QCM measurements, SFM, and DMC simulations.
ChemBioChem. 7 (2006), 106-115

- Kortüm G.
Lehrbuch der Elektrochemie
5. Aufl. (1972), Verlag Chemie, Weinheim
- Liemann S. and Huber R.
Three-dimensional structure of annexins.
CMLS, Cell. Mol. Life sci. 53 (1997), 516-521
- Liemann S., Benz J., Burger A., Voges D., Hofmann A., Huber R., Göttig P.
Structural and functional characterisation of the voltage sensor in the ion channel human annexin V.
J. Mol. Biol. 258 (1996), 555-561
- Lüthgens E., and Janshoff A.
Equilibrium coverage fluctuations: a new proach to quantify reversible adsorption of proteins.
ChemPhysChem. 6 (2005), 444-448
- Mayer L. D., Hope M. J., Cullis P. R.
Vesicles of variable size produced by rapid extrusion procedure.
Biochem. Biophys. Acta 885 (1986), 161-168
- Meers P., Mealy T.
Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan 187.
Biochem. 33 (1994), 5829-5837
- Meyer G. and Amer N. M.
Novel optical approach to atomic force microscopy.
Appl. Phys. Lett. 53(12) (1988), 1045-1047
- Meyer G. and Amer N. M.
Simultaneous measurement of lateral and normal force with an optical-beam-deflection atomic force microscope.
Appl. Phys. Lett. 57 (1990), 2089-2091
- Mosser G., Ravanat C., Freyssinet J. M., Brisson A.
Sub-domain structure of lipid-bound annexin V resolved by electron image analysis.
J. Mol. Biol. 217 (1991), 241-245
- Müller D., Amrein M., Engel A.
Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy.
J. Struct. Biol. 119 (1997), 172-188
- Neumann E., Siemens P. M., Toensing K.
Electroporative fast pore-flickering of the annexin V-lipid surface complex, a novel gating concept for ion transport.
Biophys. Chem. 86 (2000), 203-220

- Nolte H-J., Rosenberry T., and Neumann E.
Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands.
Biochem. 19 (1980), 3705-3711
- Oshry L., Meers P., Mealy T., Tauber A. I.
Annexin-mediated membrane fusion of human neutrophil plasma membranes and phospholipids vesicles.
Biochim. Biophys. Acta 1066 (1991), 239-244
- Pigault C., Gerard D.
Influence of the location of tryptophanyl residues in proteins on their photosensitivity.
Photochem. Photobiol. 40 (1984), 291-296
- Radmacher M., Fritz M., Hansma G. H., Hansma K. P.
Direct observation of enzyme activity with atomic force microscope.
Science 265 (1994), 1577-1579
- Ravanat C., Torbet J., Freyssinet J-M.
A neutron solution scattering study of annexin V and its binding to lipid vesicles.
J. Mol. Biol. 226 (1992), 1271-1278
- Raynal P., Pollard HB.
Annexins, the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins.
Biochim. Biophys. Acta 1197 (1994), 63-93
- Rescher U. and Gerke V.
Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions.
Journal of Cell Science 117 (2004), 2631-2639
- Reutelingsperger C. P. M., Kop J. M. M., Hornstra G., Hemker H. C.
Purification and characterization of a novel protein from bovine aorta that inhibits coagulation.
Eur. J. Biochem. 173 (1988), 171-178
- Reviakine I., Bergsma-Schutter W., Brisson A.
Growth of protein 2-D crystals on supported planar lipid bilayers imaged in situ by AFM.
J. Struct. Biol. 121 (1998), 356-361
- Reviakine I., Bergsma-Schutter W., Mazeret-Dubut C., Govorukhina N., Brisson A.
Surface topography of the p3 and p6 annexin V crystal forms determined by Atomic Force Microscopy.
J. Struct. Biol. 131 (2000), 234-239
- Reviakine I., Bergsma-Schutter W., Morozov A., and Brisson A.
Two-dimensional crystallization of annexin A5 on phospholipid bilayers and monolayers: a solid-solid phase transition between crystal forms.
Langmuir 17 (2001), 1680-1686

- Römisch, J., Paques, E.
Annexins: Ca-binding proteins of multifunctional importance?
Med. Microbiol. and Immunology. 180 (1991), 109-126
- Schlaepfer D. D., Mehlman T., Burgess W. H., Haigler H. T.
Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium- and phospholipid-binding protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 6078-6082
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C.
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal. Biochem. 150 (1985), 76-85
- Sopkova J., Gallay J., Vincent M., Pancosca P., Lewit-Bentley A.
The dynamic behaviour of annexin V as a function of calcium ion binding: a circular dichroism, UV absorption, steady-state and time-resolved fluorescence study.
Biochem. 33 (1994), 4490-4499
- Sopkova J., Renouard M., Lewit-Bentley A.
The crystal structure of a new high-calcium form of annexin V.
J. Mol. Biol. 234 (1993), 816-825
- Swairjo M. A., Roberts M. F., Campos M-F., Dedman J. R., Seaton B. A.
Annexin V binding to the outer leaflet of small unilamellar vesicles leads to altered inner-leaflet properties: ³¹P- and ¹H-NMR studies.
Biochem. 33 (1994), 10944-10950
- Swairjo, M. A., Seaton, B. A.
Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective.
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23 (1994), 193-213
- Swairjo M. A., Concha M. O., Kaetzel M. A., Dedman J. R., Seaton B. A.
Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipids head group recognition in the membrane-binding protein annexin V.
Nature Struct. Biol. 2 (1995), 968-974
- Tait, J. F., Gibson, D.
Phospholipid binding of Annexin V : effects of calcium and membrane phosphatidylserine content.
Arch. Biochem. Biophys. 298 (1992), 187-191
- Tait J. F., Gibson D., Fujikawa K.
Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the Lipocortin family.
J. Biol. Chem. 264 (1989), 7944-7949
- Toensing K., Kakorin S., Neumann E., Liemann S., Huber R.
Annexin V and vesicle membrane electroporation.
Biophys. J. 26 (1997), 307-318

Voges D., Berendes R., Burger A., Demange P., Baumeister W., Huber R.
Three dimensional structure of membrane bound Annexin V: a correlative electron
microscopy-X-ray crystallography study.
J. Mol. Biol. 238 (1994), 199-213

Wedler G.
Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 5. Auflage.
Wiley-VCH, 2004, 220-225, 341-345

Youde M., Campos B., Mealy T. R., Commodore L., Head J. F., Dedman J. R., Seaton B.
A.
Interfacial basic cluster in annexin V couples phospholipids binding and trimer formation
on membrane surfaces.
J. Biol. Chem. 278 (2003), 2437-2443

7 Anhang

A1 Tabelle 3 (3A, 3B, 3C): Berechnete Zahlenwerte für die freie Annexin V-Konzentration ($[A] / \mu M$) und das Verhältnis ($f / (1 - f)$) bei verschiedenen Ionenstärken.

Tabelle 3A

f	$\frac{f}{1-f}$	$[A_T] / \mu M$	$[A_b]^{max} / \mu M$	$[A] / \mu M$
$I_c = 0.053 M$				
0	0	0	0.259	0
0.163	0.195	0.1	0.259	0.058
0.284	0.397	0.2	0.259	0.126
0.345	0.527	0.3	0.259	0.211
0.442	0.792	0.4	0.259	0.286
0.526	1.1097	0.5	0.259	0.364
0.565	1.299	0.6	0.259	0.454
$I_c = 0.056 M$				
0	0	0	0.259	0
0.202	0.253	0.1	0.259	0.048
0.344	0.524	0.2	0.259	0.111
0.444	0.799	0.3	0.259	0.185
0.541	1.179	0.4	0.259	0.2598
0.606	1.538	0.5	0.259	0.343
0.6598	1.9395	0.6	0.259	0.429
$I_c = 0.059 M$				
0	0	0	0.259	0
0.369	0.585	0.1	0.259	0.004
0.389	0.637	0.2	0.259	0.099
0.505	1.020	0.3	0.259	0.169
0.575	1.353	0.4	0.259	0.251
0.666	1.994	0.5	0.259	0.328
0.717	2.534	0.6	0.259	0.414

Tabelle 3B

f	$\frac{f}{1-f}$	$[A_T] / \mu M$	$[A_b]^{\max} / \mu M$	$[A] / \mu M$
$I_c = 0.103 M$				
0	0	0	0.259	0
0.044	0.046	0.1	0.259	0.089
0.118	0.134	0.2	0.259	0.169
0.213	0.271	0.3	0.259	0.245
0.216	0.276	0.4	0.259	0.344
0.262	0.355	0.5	0.259	0.432
0.299	0.427	0.6	0.259	0.523
$I_c = 0.106 M$				
0	0	0	0.259	0
0.066	0.071	0.1	0.259	0.083
0.138	0.160	0.2	0.259	0.164
0.181	0.221	0.3	0.259	0.253
0.245	0.325	0.4	0.259	0.337
0.286	0.401	0.5	0.259	0.426
0.337	0.508	0.6	0.259	0.513
$I_c = 0.109 M$				
0	0	0	0.259	0
0.089	0.098	0.1	0.259	0.077
0.158	0.188	0.2	0.259	0.159
0.209	0.264	0.3	0.259	0.246
0.275	0.379	0.4	0.259	0.329
0.319	0.468	0.5	0.259	0.417
0.378	0.608	0.6	0.259	0.502

Tabelle 3C

f	$\frac{f}{1-f}$	$[A_T] / \mu M$	$[A_b]^{\max} / \mu M$	$[A] / \mu M$
$I_c = 0.153 M$				
0	0	0	0.259	0
0.026	0.027	0.1	0.259	0.093
0.0796	0.087	0.2	0.259	0.1796
0.139	0.161	0.3	0.259	0.264
0.178	0.217	0.4	0.259	0.354
0.205	0.258	0.5	0.259	0.448
0.226	0.292	0.6	0.259	0.542
$I_c = 0.159 M$				
0	0	0	0.259	0
0.065	0.0695	0.1	0.259	0.083
0.121	0.138	0.2	0.259	0.169
0.164	0.196	0.3	0.259	0.258
0.2095	0.265	0.4	0.259	0.346
0.232	0.302	0.5	0.259	0.4399
0.293	0.414	0.6	0.259	0.524

A2 Gleichgewichtskonstante und Ionenstärke

Die thermodynamische Gleichgewichtskonstante K^\ominus einer Reaktion (Edukte \rightleftharpoons Produkte) ist gegeben durch:

$$K^\ominus = \prod_j a_j^{\nu_j} = |K| \cdot Y. \quad (\text{A1})$$

Im molaren Aktivitätsverhältnis (Aktivitätsprodukt) $\prod_j a_j^{\nu_j}$ ist $a_j = c_j \cdot y_j / c^\ominus$ die molare Aktivität (szahl), c_j die molare Konzentration (in mol/dm³) und y_j der thermodynamische Aktivitätskoeffizient der (ionischen) Spezies j. Die stöchiometrischen Koeffizienten ν_j zählen positiv für die Produkte, aber negativ für die Edukte.

Die klassische Massenwirkungskonstante $K_c = \prod_j c_j^{\nu_j}$ ist (als „Konzentrationsverhältnis“) die scheinbare Gleichgewichtskonstante. $|K_c| = K_c / \prod_j c_j^{\ominus \nu_j}$ ist der Zahlenwert von K_c . $Y = \prod_j y_j^{\nu_j}$ ist das Aktivitätskoeffizientenprodukt und $c^\ominus = 1 \text{ M} = 1 \text{ mol} / \text{dm}^3$.

Die Ionenstärke I_c ist definiert als $I_c = \frac{1}{2} \sum_j z_j^2 \cdot c_j$, wobei Kationen und Anionen je hälftig zählen. Mit j sind alle beweglichen Ionen erfasst, hier Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Hepes⁺, der Salze NaCl, CaCl₂ und Hepes.

A3 Debye-Hückel-Parameter

A3.1 Debyelänge und Parameteräquivalenzen

Die Gleichung (24) und Gleichung (29) des Haupttextes enthalten den Aktivitätskoeffiziententerm $\log Y$. In unserem Modell der effektiven Punktladungen $z_+^{eff} \cdot e_0$ und $z_-^{eff} \cdot e_0$, wobei $e_0 = 1.6 \cdot 10^{-19}$ As die positive Elementarladung ist, deren Zentren den Abstand a haben, ist $\log Y$ gegeben durch:

$$\log Y = \frac{-2 \cdot |z_+ z_-|^{eff} \cdot A^* \cdot (I_c / M)^{1/2}}{1 + B^* \cdot a \cdot (I_c / M)^{1/2}} + C^* \cdot (I_c / M). \quad (\text{A2})$$

Die Debye-Hückel-Theorie der interionischen Wechselwirkungen, siehe z. B. G. Wedler, Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 5. Auflage, Wiley-VCH, 2004, S. 220-225 und 341-345, liefert zunächst:

$$\log Y = \frac{-2 \cdot |z_+ z_-| \cdot A \cdot I_c^{1/2}}{1 + B \cdot a \cdot I_c^{1/2}} = \frac{-2 \cdot |z_+ z_-| \cdot A' \cdot (1/r_D)}{1 + a \cdot (1/r_D)}. \quad (\text{A3})$$

Der Vergleich der Auswertungsgleichung, Gleichung (A2) mit $B' = B^* \cdot a$, mit der Debye-Hückel Gleichung, Gleichung (A3), zeigt die Termäquivalenzen:

$$\frac{A^* \cdot (I_c / M)^{1/2}}{1 + B^* \cdot a \cdot (I_c / M)^{1/2}} = \frac{A \cdot I_c^{1/2}}{1 + B \cdot a \cdot I_c^{1/2}} = \frac{A' \cdot (1/r_D)}{1 + a \cdot (1/r_D)}. \quad (\text{A4})$$

Da $I_c^{1/2} = (I_c / M)^{1/2} \cdot M^{1/2}$, $M = \text{mol} / \text{dm}^3$, $M^{1/2} = (\text{mol} / \text{dm}^3)^{1/2} = (\text{mol} / \text{dm})^{1/2} \cdot \text{dm}^{-1}$, gilt für die Einzelterme:

$$A \cdot I_c^{1/2} = A^* \cdot (I_c / M)^{1/2},$$

$$B \cdot I_c^{1/2} = B^* \cdot (I_c / M)^{1/2}.$$

Der lineare Term $C^* \cdot (I_c / M)$ in Gleichung (A2) folgt aus einem zusätzlichen Term

$$C \cdot I_c = C^* \cdot (I_c / M), \quad \text{wobei} \quad C^* = \prod C_j = \frac{C_+ \cdot C_-}{C_K}. \quad \text{Siehe Gleichung (27) des}$$

Haupttextes.

In Gleichung (A3) und Gleichung (A4), ist die Debyelänge gegeben durch den Abschirmungsparameter

$$1/r_D = \left(\frac{2 \cdot e_0^2 \cdot N_{LA}}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k_B \cdot T} \right)^{1/2} \cdot I_c^{1/2} = B \cdot I_c^{1/2} = B^* \cdot (I_c / M)^{1/2}. \quad (\text{A5})$$

Dabei sind $N_{LA} = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ die Loschmidt-Avogadro-Konstante, $k_B = R / N_{LA} = 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ VAs} / K$ die Boltzmann-Konstante, $R = 8.3145 \text{ VAs} / K \text{ mol}$ die Gaskonstante, $\varepsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-13} \text{ As} / V \text{ dm}$ die Vakuum-Permittivität, ε_r die Dielektrizitätszahl und T die absolute (Kelvin) Temperatur.

A3.2 Zahlenwerte

In der Äquivalenz $A \cdot I_c^{1/2} = A' \cdot (1/r_D)$ ist

$$A' = \frac{e_0^2}{2.303 \cdot 8\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k_B \cdot T} = \frac{A \cdot I_c^{1/2}}{(1/r_D)} = \frac{A}{B} \quad (\text{A6})$$

und

$$B = \frac{(1/r_D)}{I_c^{1/2}} = \left(\frac{2 \cdot e_0^2 \cdot N_{LA}}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k_B \cdot T} \right)^{1/2}. \quad (\text{A7})$$

Für $T = 293 \text{ K}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), $\varepsilon_r = 80.1$ folgt:

$$B = 3.278 \cdot 10^8 \text{ (dm/mol)}^{1/2},$$

$$B^* = 3.278 \cdot 10^8 \text{ dm}^{-1} = 3.278 \text{ nm}^{-1},$$

$$1/r_D = B \cdot I_c^{1/2} = 3.278 \cdot 10^8 \left(\frac{\text{dm}}{\text{mol}} \right)^{1/2} \cdot I_c^{1/2},$$

$$A' = 1.55 \cdot 10^{-9} \text{ dm} = 0.155 \text{ nm}.$$

Weitere Debye-Hückel-Beziehungen sind:

$$A = \frac{e_0^2 \cdot (2 \cdot e_0^2 \cdot N_{LA} / \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k_B \cdot T)^{1/2}}{2.303 \cdot 8\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k_B \cdot T} = A^* \cdot (1/M)^{1/2}, \quad (\text{A8})$$

$$A^* (293 \text{ K}, \varepsilon_r = 80.1) = 0.5065.$$

A3.3 Kontaktabstand a

Gleichung (27) des Haupttextes resultiert aus:

$$\log y_j = -\frac{z_j^2 \cdot A' \cdot (1/r_D)}{1 + a \cdot (1/r_D)} + C \cdot I_c. \quad (\text{A9})$$

Ursprünglich ist der Kontaktabstand $a = (r_+ + r_-)$ die Distanz zwischen den Zentren zweier Kugelionen mit dem Radius r_+ und r_- . Nach Bjerrum erfolgt Ionenpaarbildung, wenn die Dipolenergie $|z_+ z_-| \cdot e_0^2 / (4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot a)$ größer oder gleich der thermischen Bewegungsenergie $2 \cdot k_B \cdot T$ der Partner ist.

Der Kontakt(Paarungs)-Abstand ist:

$$a = \frac{|z_+ z_-| \cdot e_0^2}{4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot 2 \cdot k_B \cdot T} = |z_+ z_-| \cdot f, \quad (\text{A10})$$

$$f = \frac{e_0^2}{4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot 2 \cdot k_B \cdot T} = 3.55 \cdot 10^{-9} \text{ dm} = 0.355 \text{ nm}.$$

Man sieht auch, dass $f = A' \cdot 2.303$ ist.

Im Haupttext ist erläutert, dass mit $\bar{a} = 0.8(\pm 0.1) \text{ nm}$ das Ladungszahlprodukt $|z_+ z_-| = 2.25$ ist.

8 Abkürzungsverzeichnis

$[A_T]$	Totalkonzentration von Annexin V
AFM	Atomic Force Microscope, Rasterkraftmikroskop
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
B	Bindungsstelle
$[Ca_T]$	Totalkonzentration von Ca^{2+}
Da	Dalton, Einheit des Molekulargewichtes: $1 \text{ Da} = 1 \text{ u} = 1.661 \times 10^{-27} \text{ kg}$
\bar{d}	mittlerer Vesikeldurchmesser
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin
DTE	1,4-Dithioerythritol
f	Belegungsgrad
FFT	Fast Fourier Transform: Filter zur Bildbearbeitung
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
$\overline{K_A}^{(Ca)}(I_c)$	globale Dissoziationsgleichgewichtskonstante für Annexin V-Bindung
K_{BA}, K_{CaB}, K_{CaA}	Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für die Binärkomplex
K'_{ABCa}, K'_{CaBA}	Dissoziationsgleichgewichtskonstanten für Ternärkomplexbildung
Mica	Glimmer: Schichtsilikat, beliebtes Probensubstrat
M_r	relative Molmasse
PC	Phosphatidylcholin
PS	Phosphatidylserin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFM	Scanning Force Microscope: andere Bezeichnung für ein AFM
SPBs	solid supported phospholipid bilayers
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Hydroxymethylaminomethan
Trp	Tryptophan
z_+^{eff}	effektive Ladungszahl des Annexin V-Moleküls
z_-^{eff}	effektive Ladungszahl der Glimmerbindungsstellen
$ z_+ z_- ^{eff}$	der Absolutwert des effektiven Ladungszahlprodukts

9 Danksagung

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Neumann am Lehrstuhl für Physikalische und Biophysikalische Chemie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften von Herrn Prof. Dr. D. Anselmetti in der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld.

Herrn Prof. Dr. E. Neumann möchte ich herzlich für die Überlassung des spannenden Themas danken. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik war eine wertvolle Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse und Erstellung dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich noch für die Möglichkeiten zur Teilnahme an Tagungen und Kongressen bedanken.

Herrn Prof. Dr. D. Anselmetti gilt mein Dank für die Bereitstellung des AFM-Geräts und sein stetes Interesse während der Durchführung der vorgestellten Experimente.

Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften für die immer wieder gerne in Anspruch genommene Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Frau Dr. Katja Tönsing bin ich für die Zurverfügungstellung des Annexin V, die Bereitschaft für Diskussionen und Ihren Rat in chemischen Fragen zu besonderem Dank verpflichtet.

Ich möchte mich noch ganz herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Physikalische und Biophysikalische Chemie, ins besondere bei den technischen Assistenten, für die Hilfsbereitschaft, gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein abschließender Dank geht an meiner Familie, meinen Eltern und Schwiegereltern, die mich immer nach allen Kräften unterstützt haben.