

Wechselwirkung von Annexin A1 mit Modellmembranen und S100A11

*Eine Quarzmikrowaagenstudie zur Untersuchung der
Membranbindungs- und -aggregationseigenschaften von Annexin A1*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Katja Franziska Kastl
aus Kötzting

2005

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2002 bis Januar 2005 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. C. Steinem am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Januar 2005.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2005

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1. Prüfer: | Prof. Dr. C. Steinem |
| 2. Prüfer: | Prof. Dr. A. Götferich |
| 3. Prüfer: | Prof. Dr. O. Wolfbeis |
| Prüfungsvorsitzender: | Prof. Dr. M. Liefländer |

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Annexine	1
1.1.1	Aufbau und Struktur von Annexin A1	1
1.1.2	Wechselwirkung von Annexin A1 mit Phospholipidmembranen	6
1.2	S100-Proteine.....	9
1.3	Annexin-S100-Protein-Wechselwirkungen.....	11
1.4	Mögliche Funktionen von Annexin A1	13
1.4.1	Annexin A1 und Entzündung.....	13
1.4.2	Annexin A1 in endozytotischen Prozessen und Membran-dynamik	13
2	Zielstellung.....	17
3	Materialien und Methoden.....	18
3.1	Abkürzungsverzeichnis der am häufigsten verwendeten Puffersysteme	18
3.2	Präparation artifizieller Modellmembransysteme.....	19
3.2.1	Präparation multilamellarer und unilamellarer Vesikel	19
3.2.2	Herstellung festkörperunterstützter Membranen	20
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	22
3.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	22
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
3.3.3	Proteinexpression in <i>E.coli</i> -Bakterien	24
3.3.4	Aufreinigung von rekombinantem Schweine-Annexin A1 aus <i>E.coli</i>	24
3.3.5	Aufreinigung von rekombinantem Schweine-S100A11 aus <i>E.coli</i>	25
3.3.6	Aufreinigung von Annexin A1 aus Schweinelunge.....	26
3.3.7	Aufreinigung des (Annexin A2) ₂ -(S100A10) ₂ -Heterotetramerkomplexes (AnxA2t) aus Schweinemucosa	28
3.3.8	Trennung des Annexin A2t-Komplexes in seine Untereinheiten Annexin A2 und S100A10	28
3.3.9	Limitierte Proteolyse von Annexin A1	29
3.3.10	Western Blot Analyse	29
3.3.11	S100A11-Bindung an immobilisiertes Annexin	30
3.3.12	Vesikelbindungstests.....	30
3.3.13	Tryptischer Verdau von membran-gebundenem Annexin A1	31
3.4	Messmethoden	32
3.4.1	Rasterkraftmikroskopie.....	32

3.4.2	Impedanzspektroskopie.....	34
3.4.3	Die Quarzmikrowaage-Technik.....	37
4	Ergebnisse und Diskussion.....	61
4.1	Isolierung und Charakterisierung von Proteinen.....	61
4.1.1	Expression und Aufreinigung von Annexin A1 _{n-ac} aus <i>E.coli</i>	61
4.1.2	Aufreinigung von Annexin A1 _{ac} aus Schweinelunge	66
4.1.3	Expression und Isolierung von Schweine-S100A11 aus E.coli	72
4.1.4	Aufreinigung des (Annexin A2) ₂ (S100A10) ₂ -Heterotetramerkomplexes aus Schweinemucosa.....	74
4.1.5	Trennung des (Annexin A2) ₂ (S100A10) ₂ -Heterotetramerkomplexes in seine beiden Untereinheiten	76
4.1.6	Diskussion.....	78
4.2	Modelle zur Auswertung der Bindungskinetik von Teilchen an Oberflächen	83
4.3	Einfluss von Ca²⁺-Ionen auf die Adsorption und Desorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen – Charakterisierung der primären Membranbindung	88
4.3.1	Charakterisierung der verwendeten festkörperunterstützten Membranen auf Goldoberflächen mittels Impedanzspektroskopie.....	89
4.3.2	Mikrogravimetrische Untersuchung der Ca ²⁺ -abhängigen Bindung von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen.....	90
4.3.3	Topographische Untersuchung von membran-gebundenem Annexin A1 mittels Rasterkraftmikroskopie (SFM)	92
4.3.4	QCM-Studie zur Untersuchung der Kinetik der Ca ²⁺ -abhängigen Adsorption und Desorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen	95
4.3.5	Diskussion.....	104
4.4	Untersuchung der Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung.....	114
4.4.1	Bindung von S100A11 an immobilisiertes Annexin	115
4.4.2	Untersuchung der Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung mittels Vesikelkoppellettierungsassays	116
4.4.3	Untersuchung des Einflusses von S100A11 auf den tryptischen Verdau von membran-gebundenem Annexin A1	120
4.4.4	Untersuchung der Wechselwirkung von S100A11 mit membran-gebundenem Annexin A1 mittels der Quarzmikrowaage-Technik.....	123
4.4.5	Untersuchung der Wechselwirkung von S100A10 mit membran-gebundenem Annexin A2m mittels der Quarzmikrowaage-Technik.....	127
4.4.6	Diskussion.....	128

4.5 Membranaggregationseigenschaften von Annexin A1 – Charakterisierung der sekundären Membranbindung	139
4.5.1 Untersuchung der sekundären Membran-Wechselwirkung.....	139
4.5.2 Einfluss der Annexin A1-Belegung auf die Membranaggregation.....	141
4.5.3 Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Membranaggregation	143
4.5.4 Einfluss der Ladung auf die Vesikeladsorption	144
4.5.5 Diskussion.....	147
5 Zusammenfassung.....	157
6 Literaturverzeichnis	159
7 Anhang	170
7.1 Bestimmung des Vesikeldurchmessers	170
7.2 Berücksichtigung der Elektrostatik bei der Größe der Vesikel	170
7.3 Chemikalien und Reagenzien.....	172
7.4 Materialien.....	173
7.5 Geräte.....	174
7.6 Abkürzungsverzeichnis	175
7.7 Symbolverzeichnis.....	177

1 EINLEITUNG

1.1 Annexine

Annexine sind eine Familie strukturell ähnlicher Proteine, die Ca^{2+} -abhängig an Membranen binden. Mehr als 160 Annexine wurden bisher in mehr als 65 verschiedenen Organismen von Vertebraten, Invertebraten bis zu Pilzen und sogar Pflanzen gefunden. Über die Funktionen dieser Proteine ist bisher wenig bekannt. Aufgrund ihres Vermögens, an Zellmembranen zu binden, werden ihnen Funktionen in verschiedenen membranodynamischen Prozessen zugeschrieben. Sie sollen unter anderem an der Regulation der Membranorganisation und des Membrantransports, an endo- und exozytotischen Prozessen, an der Membran/Zytoskelett-Verknüpfung und an der Regulation von Ionenströmen über Membranen beteiligt sein. Als während der 1980er Jahre immer mehr calciumabhängige und Phospholipid-bindende Proteine in das Interesse der Forschung traten, bezeichnete man diese ganz unterschiedlich, wie etwa als Lipocortin, Calpactin, Endonexin, Calelectrin, Synexin und noch einige mehr. Erst 1990 entwickelten Crumpton und Dedman eine neue Nomenklatur für diese Proteine und nannten sie aufgrund ihrer gemeinsamen Eigenschaft, calciumabhängig an Membranen zu binden, nach dem griechischen Wort „annex“, was soviel heißt wie „verbinden“, Annexine.⁵ Im Folgenden soll die Annexin-Proteinfamilie am Beispiel von Annexin A1, früher auch unter anderen Namen wie Lipocortin I, Calpactin II, p35 oder Chromobindin 9 bekannt, vorgestellt werden, da sich diese Arbeit hauptsächlich auf dieses Mitglied der Annexine fokussiert.

1.1.1 Aufbau und Struktur von Annexin A1

Der typische molekulare Aufbau der Annexine besteht aus einer C-terminalen Domäne, auch *core*-Domäne genannt, und einer N-terminalen Domäne, auch N-Terminus genannt (Abbildung 1 A). Die Kerndomäne wurde ursprünglich über ihre Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau definiert und ist in allen Annexinen konserviert. Sequenzanalysen zeigen, dass die Kerndomäne aus vier oder acht (Annexin A6) sich wiederholenden Einheiten (Annexin-Repeats) mit je einer Länge von 70 bis 80 Aminosäuren besteht. Die Repeats zeigen sowohl eine starke Homologie untereinander, als auch innerhalb der Annexinfamilie auf. Jeder Annexin-Repeat weist einen besonders

stark konservierten Bereich von 17 Aminosäuren auf, der als Endonexin-Fold bezeichnet wird und sich durch die charakteristische Aminosäurefolge GXGTDE auszeichnet.⁶ Die Kerndomäne beinhaltet die Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen und vermittelt die für alle Annexine beschriebene Bindung von Phospholipiden.

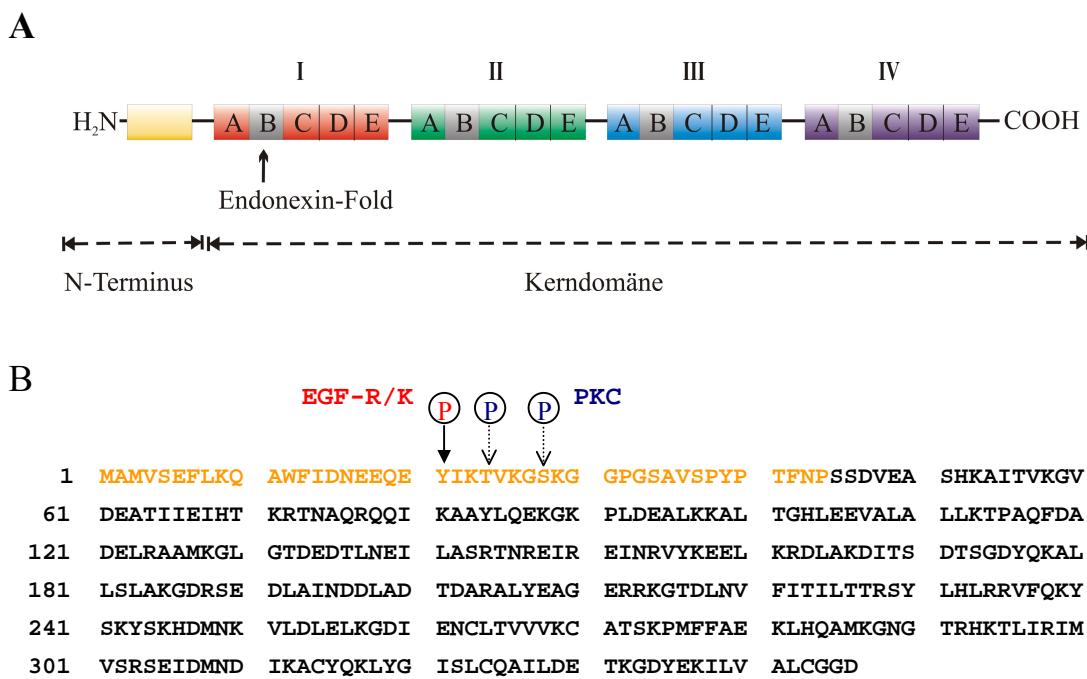


Abbildung 1: A Schema des Aufbaus von Annexinen aus dem N-Terminus und der Kerndomäne mit ihren vier sich wiederholenden Untereinheiten (Annexin-Repeats I bis IV), die jeweils aus fünf α -Helices (A, B, C, D und E) bestehen. In jedem Annexin-Repeat befindet sich ein hochkonserviertes Strukturmotiv, der sogenannte Endonexin-Fold. B Aminosäuresequenz von porcinem Annexin A1 mit den Phosphorylierungsstellen Tyr-21 für die EGF-Rezeptor/Kinase (EGF-R/K) sowie Thr-24 und Ser-28 für die Proteinkinase C (PKC). Die Aminosäuren des N-Terminus (1-44) sind in Gelb, die der Kerndomäne in Schwarz dargestellt.

Die Sequenz und Länge der N-terminalen Domäne ist im Gegensatz zur Kerndomäne variabel. Ihre Länge reicht von einigen wenigen (Annexin A5) bis zu mehr als 100 Aminosäuren (Annexin A7 und A11). Der N-Terminus soll für die Regulation der spezifischen Eigenschaften und Funktionen der einzelnen Annexine verantwortlich sein, da er proteolytisch gespalten werden kann, sowie Phosphorylierungsstellen und meist Bindungsstellen für spezifische Liganden aufweist.²⁻⁴

Der Proteolyse von N-terminalen Peptiden von Annexinen wird eine entscheidende regulative Bedeutung zugeschrieben. Beim Vergleich der Sequenzen verschiedener Annexine wurde festgestellt, dass sich bevorzugt in den N-Termini selbst und am Übergang zur Kerndomäne spezifische, proteolytische Signalsequenzen zum einen für lysosomale Proteolyse, zum anderen für schnellen intrazellulären Abbau befinden.⁷ In

der N-terminalen Domäne von Schweine-Annexin A1, welche die ersten 44 der insgesamt 346 Aminosäuren umfasst (Sequenz Abbildung 1 B), befinden sich Schnittstellen für verschiedene Proteasen. So spaltet etwa Trypsin nach Lys-9, Lys-26 und Lys-29, Calpain nach Lys-26, Plasmin nach Lys-29 und Cathepsin D nach Trp-12. Es konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung von N-terminalen Peptiden die biochemischen Eigenschaften von Annexin A1 verändert. So ist die Ca^{2+} -Sensitivität von Δ^{1-26} Annexin A1 bei der Bindung an Phospholipide um etwa einen Faktor 6 erhöht.⁸

Des Weiteren werden die Eigenschaften von Annexinen durch bestimmte Phosphorylierungen in den N-Termini beeinflusst. Proteinkinase C phosphoryliert Annexin A1 in der N-terminalen Domäne an Thr-24 und Ser-28, wodurch seine Ca^{2+} -Sensitivität für die Phospholipidwechselwirkung erhöht wird.⁸ Außerdem gehört Annexin A1 zu den Hauptsubstraten der epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal grow factor*, EGF)-Rezeptor/Kinase und wird von dieser spezifisch an Tyr-21 speziell an den multivesikulären Körpern (*multivesicular bodies*, MVBs) phosphoryliert.⁹ Dadurch erhöht sich die Proteolysesensitivität des Proteins um etwa den Faktor 20, weshalb dieser Modifikation eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Proteolyse zugeschrieben wird.¹⁰

Eine weitere in eukaryotischen Systemen häufig auftretende posttranskriptionale Modifizierung neben der Phosphorylierung und der Glycosylierung ist die N-terminale Acetylierung, welche schon während der Translation des Proteins an den Ribosomen stattfindet.¹¹ So liegt bei vielen Annexinen die N-terminale Aminosäure acetyliert vor, im Falle von Annexin A1 ist dies die Aminosäure Ala-2, da das N-terminale Met-1 des Startcodons abgespalten wird.

Nähere Informationen über den Aufbau von Annexinen ergaben sich durch die Auflösung ihrer Kristallstruktur. Das humane Annexin A5 war das erste Annexin, dessen dreidimensionale Struktur gelöst wurde.¹² Nacheinander folgten dann die Strukturaufklärungen von anderen Annexinen, wie z.B. Annexin A3¹³, Annexin A6¹⁴, Annexin A12¹⁵ und Annexin A1^{16,17}, sowie die N-terminal verkürzten Formen von Annexin A1¹⁸, Annexin A7¹⁹ und Annexin A2²⁰, die alle aufgrund der starken Sequenzhomologie erwartungsgemäß eine sehr ähnliche Topologie aufweisen. Die dreidimensionale Struktur von Annexinen wird im Folgenden anhand der Kristallstruktur von Annexin A1 dargestellt.

Die Kristallstruktur von Annexin A1 (Abbildung 2) in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen zeigt, dass die Kerndomäne in vier Subdomänen (I bis IV) aufgeteilt wird, von denen jede aus jeweils fünf α -Helices (A-, B-, C-, D- und E-Helix) aufgebaut ist. Die Helices A und B,

sowie D und E bilden je zwei parallele Faltungsstrukturen (helix–loop–helix), während die Helix C senkrecht zu ihnen angeordnet ist und die beiden Strukturen miteinander verbindet.

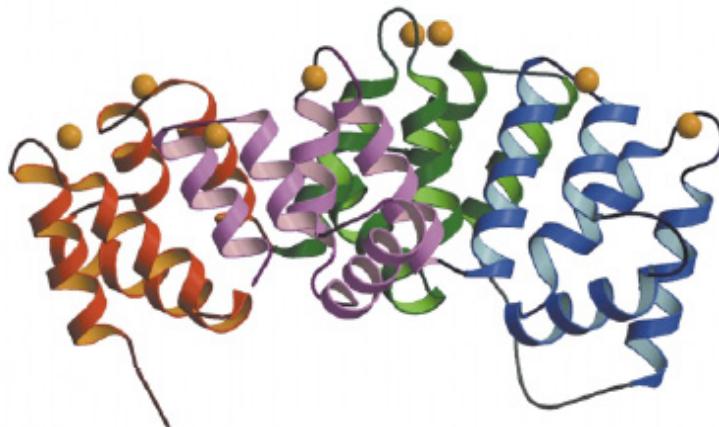


Abbildung 2: Kristallstruktur von Annexin A1 mit Ca^{2+} -Bindungsstellen (gelbe Kugeln), kristallisiert in Gegenwart von 100 mM Calciumacetat. Die Subdomänen der Kerndomäne sind unterschiedlich farbig (I : rot, II : grün, III : blau, IV : violett) dargestellt. Der N-Terminus, der auf der konvexen Seite der gebogenen Kerndomäne liegt, konnte nicht eindeutig lokalisiert werden und ist deshalb nicht dargestellt.¹⁷ (Proteindatenbank-Nummer: 1MCX)

So ergibt sich für die Kerndomäne eine Gesamtstruktur, die man als gebogene Scheibe beschreiben kann, an deren konvexen Seite die Ca^{2+} -Bindungsstellen (gelbe Kugeln) platziert sind. An der konkaven Seite befinden sich die C-terminalen Aminosäuren und der N-Terminus (in Abbildung 2 nicht dargestellt) des Proteins. Im Gegensatz zu den sonst bekannten Ca^{2+} -Bindungsstellen vom EF-Hand-Typ liegen hier Bindungsstellen vom Typ II und Typ III vor.¹² Während bei N-terminal verkürztem Δ^{1-32} Annexin A1 bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 10 mM nur sechs Ca^{2+} -Bindungsstellen in der Kristallstruktur besetzt sind, wurden bei vollständigem Annexin A1 in 100 mM Calciumacetat acht Ca^{2+} -Ionen pro Annexin-Molekül detektiert.¹⁸ Die Ca^{2+} -Bindungsstellen von intaktem Annexin A1 befinden sich zum einen in den Loops zwischen Helix A und B (AB-Sites) der Subdomänen I, II, III und IV. Sie werden als Typ II-Bindungsstellen bezeichnet und besitzen die Koordinationszahl 7, wobei hier hauptsächlich Aminosäuren des Endonexin-Folds koordiniert werden. Zum anderen befinden sich Calciumbindungsstellen vom Typ III in den Loops zwischen Helix D und E (DE-Site) der Subdomänen I, III und IV, die ebenfalls siebenfach koordiniert sind.^{17,18} Im Loop zwischen Helix A und B der Untereinheit II befindet sich noch eine zweite Ca^{2+} -Bindungsstelle, die achtfach koordiniert ist (AB'-Sites). Die Koordination der Ca^{2+} -Ionen erfolgt über Carbonyl-Sauerstoffatome, saure Aminosäureseitengruppen und Wassermoleküle. Die beiden Ca^{2+} -Bindungsstellentypen zeichnen sich durch

unterschiedliche Ca^{2+} -Affinitäten aus, wobei im Vergleich zu den Affinitäten von EF-Hand Ca^{2+} -bindenden Proteinen die Affinität der Annexine zu Ca^{2+} -Ionen in Abwesenheit von Phospholipiden im Allgemeinen sehr niedrig ist. Die Typ II- Ca^{2+} -Bindungsstellen besitzen eine Dissoziationskonstante, die im Bereich von mehreren 100 μM liegt. Die Typ III-Bindungsstellen zeigen eine noch geringere Affinität zu Ca^{2+} -Ionen, die etwa im millimolaren Bereich liegt.²¹ In Gegenwart von Phospholipiden steigt jedoch die Affinität zu Ca^{2+} -Ionen um etwa den Faktor 100.

Die Struktur des N-Terminus in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen ist bisher ungelöst, da die Aminosäuren 1 bis 40 der N-terminalen Domäne in der Kristallstruktur ungeordnet vorliegen.¹⁷

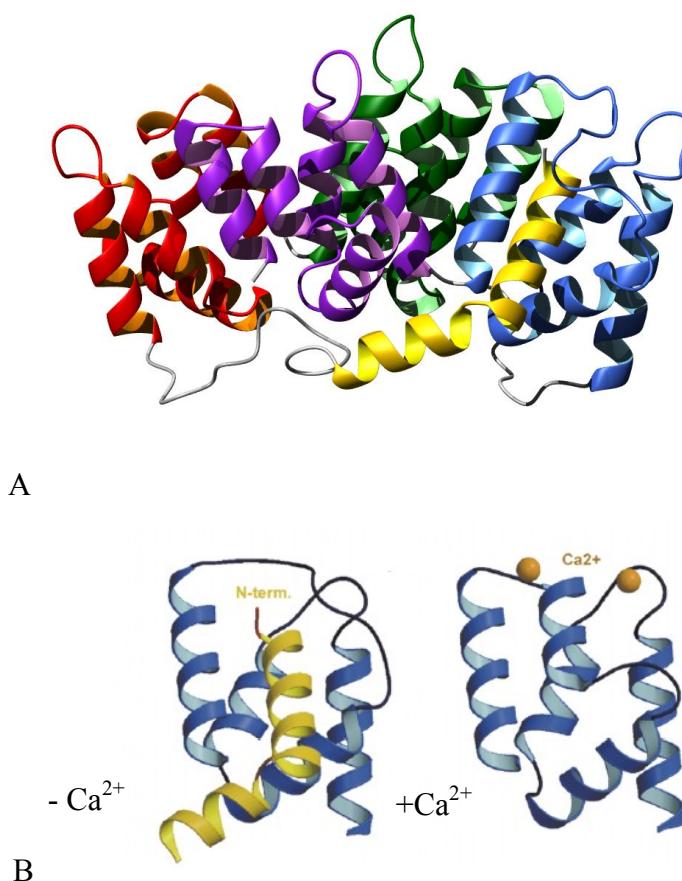


Abbildung 3: A Kristallstruktur von Annexin A1 in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen. Der N-Terminus (gelb) ist in die Kerndomäne eingelagert und verdrängt dort die Helix D in der Subdomäne III.¹⁶ B Vergleich der Kristallstruktur von Subdomäne III in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen.¹⁷

In Ca^{2+} -freien Kristallen wurde interessanterweise beobachtet, dass die N-terminale Sequenz eine α -helikale Anordnung einnimmt und jeweils die Aminosäuren 2 bis 17 sowie 18 bis 26 eine α -Helix bilden. Die Helix der Aminosäuren 2 bis 17 ist in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen in den dicht gepackten Kern eingelagert und verdrängt dort Helix D in Subdomäne III, sodass diese ihre helikale Struktur auflöst

(Abbildung 3). Die Helix aus den Aminosäuren 18 bis 26 wechselwirkt mit der Oberfläche von Subdomäne IV. Die übrige Struktur der Kerndomäne bleibt jedoch nahezu unverändert gegenüber seiner Ca^{2+} -beladenen Form.¹⁶

Die dreidimensionalen Strukturen von vollständigen Annexinen sind bisher nur für Annexine mit sehr kurzen N-Termini gelöst, sodass bisher noch nicht bekannt ist, inwiefern diese Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des N-Terminus auch bei weiteren Annexinen auftritt und etwa eine allgemeine regulatorische Funktion der Annexine beinhaltet.

1.1.2 Wechselwirkung von Annexin A1 mit Phospholipidmembranen

Annexine wurden biochemisch als lösliche, monomere Proteine beschrieben, die Ca^{2+} -abhängig und peripher hauptsächlich mit negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG) oder Phosphatidylinositol (PI) wechselwirken. Außerdem zeigen einige Annexine, so auch Annexin A1, die Fähigkeit, *in vitro* sekretorische Granulae und Lipidvesikel zu aggregieren.²²⁻²⁵ Die Bindung und Aggregation von artifiziellen Phospholipiden und Zellmembranextrakten wurde bereits in zahlreichen Studien in der Literatur beschrieben, wobei sich herausgestellt hat, dass sich die einzelnen Annexine stark in ihren Affinitäten zu artifiziellen Membranen unterscheiden und Annexin A2 wie auch Annexin A1 die niedrigsten Ca^{2+} -Konzentrationen (ca. 4 bis 100 μM) für die halbmaximale Membranbindung benötigen. Bislang gibt es noch keine Kristallstrukturen von Annexinen zusammen mit Phospholipiden und Ca^{2+} -Ionen, um die Phospholipidbindungsstelle in den Annexinen zu charakterisieren. Einen Hinweis jedoch gab die Struktur von Annexin A5 zusammen mit der Phospholipidkopfgruppe Glycerophosphoserin, in der die Phosphorylgruppe ein Wassermolekül in einer Koordinationsstelle des Ca^{2+} -Ions in einer Typ II-Bindungsstelle verdrängt. Außerdem wurde die Wechselwirkung einer γ -Carboxylatgruppe des Serins und eines weiteren Ca^{2+} -Ions im AB-Loop, der AB'-Site, nachgewiesen.²⁶ So wird angenommen, dass die Interaktion von Annexinen mit Membranen über die konvexe Seite der Proteinkerndomäne stattfindet und die Ca^{2+} -Ionen dabei eine Brückenfunktion einnehmen. Weitere strukturelle Informationen über die Annexin-Phospholipid-Interaktion ergaben sich durch molekulare Simulationen der Bindung von Phosphatidylserin und Annexin A5 von Montaville et al.²⁷ Es wurde eine PS-Bindungsstelle im Repeat 1 von Annexin A5 identifiziert, die von einer Sequenz gebildet wird, die in allen Annexinen hochkonserviert ist und nur in den Repeats 1 oder 2 vorkommt. So soll die Bindung von Annexin A5 an PS-haltige Membranen über

mindestens zwei Ca^{2+} -Ionen und zwei PS-Kopfgruppen in Repeat 1 vermittelt werden, die kooperativ binden und durch Wechselwirkung mit Aminosäureresten stabilisiert werden. Die Typ III- Ca^{2+} -Bindungsstellen tragen aufgrund ihrer geringen Affinität zu Ca^{2+} -Ionen nach Montaville et al. nicht zum eigentlichen Bindungsprozess bei und sollen erst bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen eine Rolle bei der Membranbindung spielen.²⁷ Dies wurde durch Experimente in lebenden HeLa-Zellen bestätigt, in denen nur eine Assoziation von Annexin A1 mit intakten Typ II- Ca^{2+} -Bindungsstellen vor allem in Repeat 1 beobachtet werden konnte.²⁸ Die selektive Ausschaltung einzelner Ca^{2+} -Bindungsstellen wurde hierfür durch ortspezifische Mutagenese (*site directed mutagenesis*) erzielt. Außerdem wurde auf ähnliche Weise der Typ II-Bindungsstelle in Repeat 2 eine essentielle Rolle bei der Membranbindung zugeteilt.²⁹

Um weitere Informationen über die strukturellen und biochemischen Eigenschaften der Annexin-Membran-Wechselwirkung zu erhalten, wurde neben Studien an zellulären Systemen die Wechselwirkung von Annexinen mit verschiedenen Modellmembransystemen betrachtet. Zur Untersuchung der Phospholipidbindung von Annexin A1 wurden verschiedene artifizielle Membransysteme wie Vesikel^{8,23,30-32}, Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche³³⁻³⁵ oder festkörperunterstützte Membranen^{30,33,36} herangezogen. Es wurden Experimente zur Phospholipidwechselwirkung von Annexin A1 mittels Energietransfer-Messungen mit fluoreszenzmarkiertem Protein und/oder Phospholipiden durchgeführt^{1,23,25,32} und konformative Änderungen des Proteins nach der Membranbindung nachgewiesen.³⁷ Zur Quantifizierung der Affinität von Annexin A1 zu Phospholipiden und die Beeinflussung durch die Ca^{2+} -Konzentration wurden anfangs hauptsächlich Vesikelpelletierungstests verwendet, in denen Annexin A1 mit Phospholipidvesikeln in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen inkubiert, anschließend pelletiert, die Annexin A1- Ca^{2+} -Vesikelaggregate mittels Elektrophorese analysiert und die Proteinmengen densitometrisch quantifiziert wurden.^{24,25} Für Annexin A1, wie auch für die Annexine A2, A4, A6 und A7, ist es jedoch in Vesikelbindungstests schwierig, die Affinität einer Annexin-Membran-Wechselwirkung zu quantifizieren, da diese Proteine nicht nur an Membranen binden, sondern diese auch aggregieren können. Die Annexin A1-vermittelte Aggregation von Vesikeln kann nur unter bestimmten Bedingungen, wie etwa niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen und geringen Proteinkonzentrationen, unterdrückt werden. Jedoch war es möglich, die einfache Annexin A1-Bindung unter Ausschluss der Membranaggregation mittels der Filmwaage-Technik an planare Phospholipid-Monoschichten^{34,35}, mittels der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)³³ an Phospholipidvesikel, die auf einer Dextransoberfläche immobilisiert waren, oder

mittels der Quarzmikrowaage-Technik (QCM)³⁶ an planaren, festkörperunterstützten Membranen zu quantifizieren.

Da einigen Annexinen, wie etwa dem Annexin A2, membranorganisatorische Eigenschaften zugeschrieben und in Zusammenhang mit Rafts gebracht werden² ist die Topographie von membran-gebundenen Annexinen von Interesse. Mittels Rasterkraftmikroskopie konnte beobachtet werden, dass Annexin A1 Ca^{2+} -abhängig in einer monomolekularen Schicht bevorzugt an die PS-Domänen in festkörperunterstützten DPPC/DPPS-Membranen bindet.³⁸ Lambert et al. fanden durch Cryoelektronenmikroskopie von Annexin A1-abhängig aggregierten Vesikeln heraus, dass die Membranverknüpfung über Proteinpatches vermittelt wird.³⁹ Die genaue Organisation und Dynamik der Ca^{2+} -abhängigen Bindung von Annexin A1 an homogene, fluide Membranen ist jedoch bislang noch unzureichend geklärt.

Die Annexin A1-vermittelte Membranaggregation wurde häufig durch Lichtstreuungsexperimente an Vesikeln untersucht.²⁹⁻³² Durch spezifische N-terminale Deletionen und Aminosäureaustausch im N-Terminus von Annexin A1, sowie durch die Verwendung von Annexin-Chimären konnte dem N-Terminus eine entscheidende Rolle bei der Membranaggregation zugeschrieben werden^{8,30,37,40,41}, wobei hierfür vor allem die Aminosäuren Lys-26 und Lys-29 essentiell zu sein scheinen.⁴² Ergebnisse von Andree et al. aus Ellipsometrie-Studien, in denen die Vesikeladsorption an membran-gebundene Annexin A5-Kern/A1-N-Terminus-Chimäre verfolgt wurde, konnten diese Vermutung bekräftigen.³⁰ Weiterhin wurde die Membranaggregation von Annexin A1 auf ähnliche Weise mittels SPR-Technik untersucht, wobei Annexin A1 an oberflächengebundene Vesikel immobilisiert wurde und die Vesikeladsorption daran verfolgt wurde.³³ Die Ergebnisse aus diesen Studien lassen einen hydrophoben Charakter der Membranaggregation vermuten, jedoch gibt es noch viele Unklarheiten bezüglich der sekundären Membran-Wechselwirkung von Annexin A1.

Man geht davon aus, dass Annexin A1 in seiner monomeren Form Vesikel aggregieren kann, aber es wird auch die Aggregation über Oligomere, speziell über Annexin A1-Dimere diskutiert. Für Annexin A1 wurde eine Dimerisierung über einen Glutamatrest im N-Terminus durch Transglutaminase in A431-Zellen und Plazenta beschrieben.^{43,44} Es wird diskutiert, dass eine Membranaggregation des dimeren Annexin A1 durch jeweils eine Protein-Membran-Wechselwirkung über die Ca^{2+} -Bindungsstellen vermittelt werden könnte.³⁹

Weiterhin wird die Membranaggregation einiger Annexine über Annexin-Ligand-Komplexe beschrieben. Als Liganden für die Komplexbildung mit einigen Annexinen wurden mehrere Mitglieder der S100-Proteinfamilie identifiziert.

1.2 S100-Proteine

S100-Proteine sind eine Familie strukturell ähnlicher, relativ kleiner, saurer, Ca^{2+} -bindender Proteine mit einer molekularen Masse von 9 bis 12 kDa, von denen bisher 21 Mitglieder bekannt sind und die nur in Vertebraten vorkommen. Den Namen haben diese strukturell sehr ähnlichen Proteine aufgrund ihrer Löslichkeit in 100 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung erhalten. So wurde für die zuvor unter ganz unterschiedlichen Namen bekannten Proteine wie Calgizzarin, p11, Calcyclin oder Calgranulin aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften eine einheitliche Nomenklatur eingeführt.

Die einzelnen Mitglieder weisen ein spezifisches Verteilungsmuster in Geweben und Zelltypen auf, wo sie in eine Vielzahl von zellulären Reaktionen involviert sein sollen.⁴⁵⁻⁴⁸ S100-Proteine werden intrazellulär mit der Regulation von Protein-Phosphorylierungen, Enzymaktivitäten, der Dynamik der Zytoskelettkomponenten, Transkriptionsfaktoren, Ca^{2+} -Homeostase sowie Zellproliferation und -differenzierung in Zusammenhang gebracht. Extrazelluläre S100-Proteine sollen bei neuronalen Zellen eine Rolle spielen und die Aktivität von Zellen im Entzündungsprozess beeinflussen.⁴⁷ Für S100A11 wurde beschrieben, dass es die Aktin-aktivierte Myosin ATPase-Aktivität inhibiert und nur Ca^{2+} -abhängig über Tubulin-Filamente in der Zelle translokalisiert werden kann. Somit wird es in Zusammenhang mit der Zytoskelettbildung und -organisation gebracht.^{47,49,50}

Der Aufbau und die Struktur von S100-Proteinen wird im Folgenden am Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten S100A11 erklärt, das vor der einheitlichen Nomenklatur auch als Calgizzarin oder S100C bezeichnet wurde. Der molekulare Aufbau der S100-Proteine ist konserviert und setzt sich aus vier Bereichen (Abbildung 4, I bis IV) zusammen.

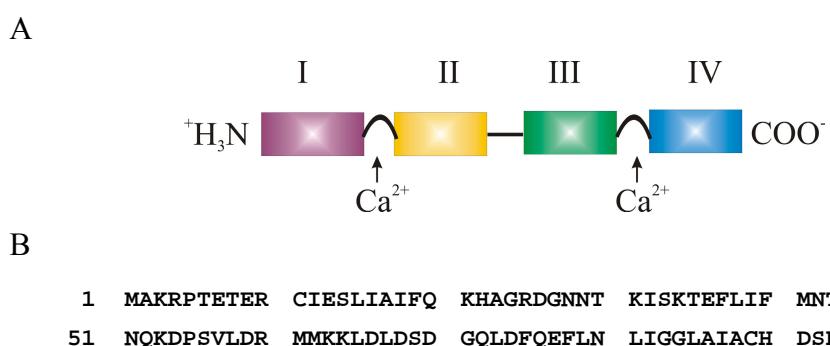


Abbildung 4: A Aufbau von S100-Proteinen aus vier Bereichen (I, II, III, IV). Zwischen den Bereichen I und II bzw. III und IV befindet sich jeweils eine Ca^{2+} -Bindungsstelle. Die Bereiche II und III sind über eine Linkerregion verbunden. B Aminosäuresequenz von Schweine-S100A11.

S100-Proteine besitzen jeweils zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen vom EF-Hand-Typ (Typ I), die über eine Linkerregion verbunden sind. Die EF-Hand-Bindungsstelle lässt sich strukturell durch ein Helix-Loop-Helix-Motiv beschreiben, wobei die beiden α -Helices (I und II bzw. III und IV) nahezu senkrecht zueinander angeordnet sind und sich das Ca^{2+} -Ion in der Loopregion zwischen den Helices befindet (Abbildung 5).

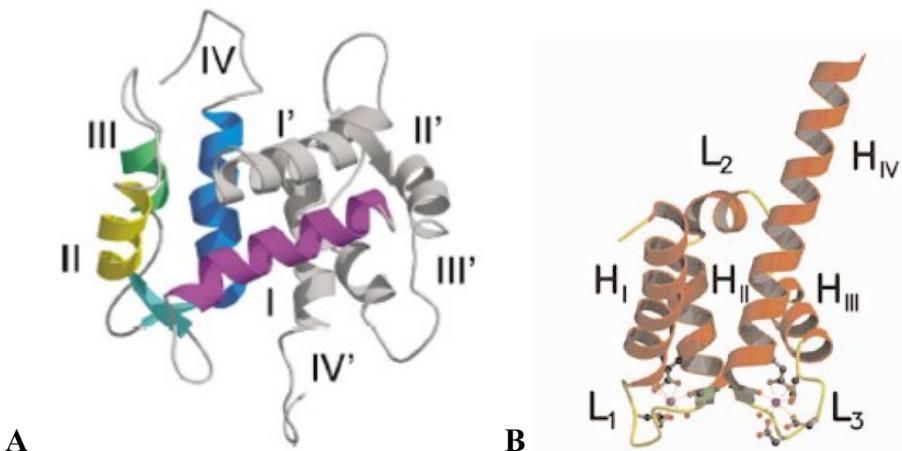


Abbildung 5: **A** Struktur eines Apo-S100A11-Dimers in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen. Zur besseren Übersicht ist nur ein Monomer (Helices I bis IV) farbig, das andere Monomer (I' bis IV') in Grau dargestellt.⁵¹ **B** Struktur eines S100A11-Monomers (Helices H_I bis H_{IV}, Loops L₁ und L₃, Linkerregion L₂) mit Ca^{2+} -Bindungsstellen (violett).⁵²

Die Ca^{2+} -Bindungsstelle im C-terminalen Bereich besitzt eine hohe Sequenzhomologie innerhalb der Proteinfamilie und wird als kanonische Bindungsstelle bezeichnet. Sie besitzt zudem eine höhere Ca^{2+} -Affinität als die im N-terminalen Bereich lokalisierte Bindungsstelle, die spezifisch für die einzelnen Mitglieder ist.⁴⁷ Die Affinität von S100A11 zu Ca^{2+} -Ionen wurde mittels radioaktiver Markierung bestimmt. Die Ca^{2+} -Konzentration $c_{1/2}$ für die halbmaximale Bindung liegt im Bereich 10^{-4} M. Es wurde jedoch beobachtet, dass diese Affinität in Gegenwart eines hydrophoben Fluoreszenzliganden um den Faktor 10 ansteigt.⁴⁸

Während im Ca^{2+} -freien Zustand die Proteine hauptsächlich eine polare Oberfläche aufweisen, führt die Beladung mit Ca^{2+} -Ionen zu einer Konformationsänderung, wobei hydrophobe Aminosäurereste an die Oberfläche treten. Im Falle von S100A11 findet die Konformationsänderung hauptsächlich in den Bereichen der Linkerregion und der Helices III und IV statt (Abbildung 5 B).^{47,48,51,52} Nur im Falle des S100A10-Dimers tritt diese calciumabhängige Strukturänderung nicht auf, da aufgrund von Deletionen und Aminosäuresubstitutionen das Protein keine Ca^{2+} -Ionen mehr binden kann und es so dauerhaft in der „ Ca^{2+} -beladenen“ Form vorkommt.²

S100-Proteine liegen meist als Homo- oder Heterodimere vor, sodass ein Proteindimer vier Ca^{2+} -Bindungsstellen besitzt. Aufgrund ihrer antiparallel gepackten dimeren Form

können S100-Proteine zwei gleiche oder unterschiedliche Targetproteine binden. Gesteuert wird diese Interaktion durch die Ca^{2+} -Konzentration, da in den meisten Fällen nur durch die Ca^{2+} -Beladung und die damit zusammenhängende Konformationsänderung die Bindungsstellen im S100-Protein aktiv sind.⁴⁷ Auf diese Weise wird auch die Wechselwirkung von einigen S100-Proteinen mit Annexinen beschrieben.

1.3 Annexin-S100-Protein-Wechselwirkungen

Bislang wurden Wechselwirkungen zwischen Annexin A11 und S100A6⁵³, Annexin A1 und S100A11⁵⁴ und Annexin A2 mit S100A10⁵⁵ beschrieben, wobei es sich bei letzterer um die am besten charakterisierte Wechselwirkung handelt. So bildet Annexin A2 zusammen mit S100A10 einen stabilen heterotetrameren Komplex, der aus zwei Annexinen und einem S100A10-Dimer besteht.⁵⁶ Die Bindung erfolgt zwischen den hydrophoben Bereichen der amphiphatischen Helix der N-terminalen Domäne von Annexin A2 (Abbildung 6 B) mit hydrophoben Bereichen des S100A10.⁵⁷

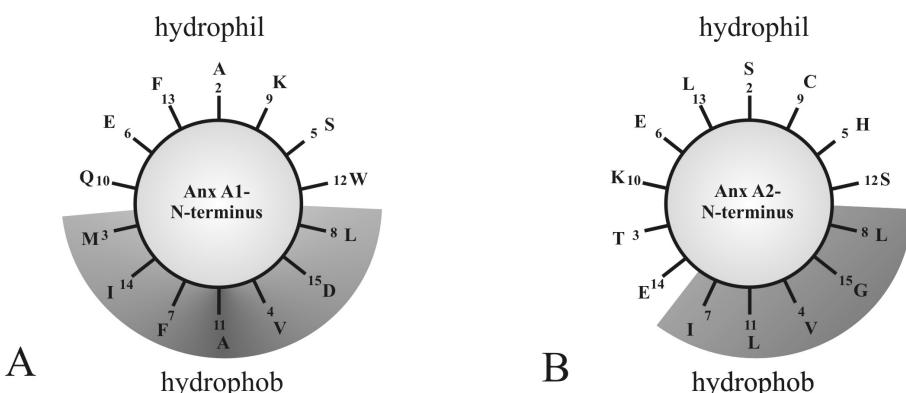


Abbildung 6: Präsentation der N-terminalen 15 Aminosäuren von **A** Annexin A1 und **B** Annexin A2 in Form von Helixrädern im Einbuchstabencode. Der Bereich mit hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren auf einer Seite der Helix ist jeweils schattiert dargestellt.^{54,58}

Da der N-Terminus von Annexin A1 ebenfalls eine amphiphatische Helix ausbildet (Abbildung 6 A), wird vermutet, dass Annexin A1, das mit Annexin A2 näher verwandt ist als mit anderen Annexinen, und S100A11, das wiederum dem S100A10 strukturell am ähnlichsten ist, eine analoge Wechselwirkung miteinander eingehen. So beobachteten Maillard et al. die Ca^{2+} -abhängige Bindung eines 10 kDa-Proteins, welches als S100A11 identifiziert werden konnte, mit der N-terminalen Domäne von Annexin A1 mittels eines in *E.coli* exprimierten Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase (GST) und den Aminosäuren 2 bis 46 von humanem Annexin A1 (GST-

AINT; AINT = Annexin I N-Terminus). Sie zeigten ebenfalls, dass S100A11 in Zellextrakten spezifisch mit Annexin A1 reversibel Ca^{2+} -abhängig assoziiert. Dabei stellten sie fest, dass die Aminosäuren 1 bis 12 von Annexin A1 entscheidend für die Wechselwirkung sind.⁵⁴

Seemann et al. zeigten, dass für die Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung die Aminosäuren 91 bis 99 von S100A11 entscheidend sind und zusätzlich die N-terminale Acetylierung von Annexin A1 für diese Assoziation nötig ist. So konnte nur ein N-terminal acetyliertes Peptid aus den Aminosäuren Ac2-18 von Annexin A1 die Ca^{2+} -abhängige Kopellettierung von S100A11 mit Annexin A1_{ac} und Vesikeln inhibieren, während das nicht-acetylierte Peptid keine inhibitorische Wirkung aufweist.⁵⁹

Weitere Hinweise auf eine dem Annexin A2-Heterotetramerkomplex ähnliche Wechselwirkung zwischen Annexin A1 und S100A11 liefern Strukturanalysen. Obwohl die Kristallstruktur des kompletten heterotetrameren Komplexes von Annexin A2 mit S100A10 bislang noch nicht gelöst ist, lieferten Rety et al. Informationen darüber aus der Struktur von S100A10 mit einem Peptid, das den Aminosäuren 1 bis 13 von Annexin A2 entspricht.⁶⁰ Es wechselwirken jeweils zwei Peptidmoleküle mit einem S100A10-Dimer, wobei jedoch nicht ein Peptid an ein S100A10-Monomer bindet, sondern jeweils beide Monomere in die Bindung eines Peptids involviert sind. Eine strukturell analoge Wechselwirkung wurde zwischen S100A11 und einem Peptid aus den Aminosäuren 2 bis 14 des Annexin A1 (Ac2-14) beobachtet (Abbildung 7).^{52,57}

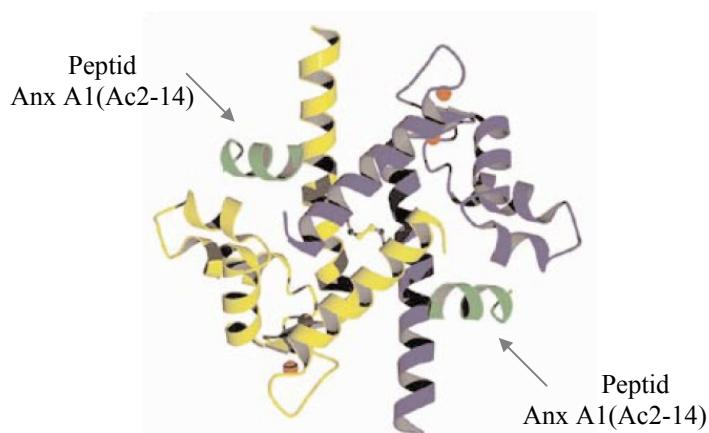


Abbildung 7: Struktur des Komplexes eines S100A11-Dimers mit zwei Peptidmolekülen (grün) des Annexin A1-N-Terminus (Ac2-14). Zur besseren Übersicht ist ein S100A11-Monomer gelb, das andere violett, die Ca^{2+} -Ionen rot dargestellt.⁵²

Aus der Struktur wird deutlich, dass das Peptid, welches eine amphiphatische α -Helix ausbildet, hauptsächlich mit der Helix I' des einen Monomers und mit der Helix IV und der Linkerregion des anderen Monomers wechselwirkt. Dabei wurde im Vergleich zu

Apo-S100A11 eine Konformationsänderung zum einen in der Linkerregion, die eine helikale Form einnimmt, und zum anderen in der Helix IV beobachtet, deren zuvor ungeordnete C-terminale Aminosäuren die Helix IV erweitern.⁵²

1.4 Mögliche Funktionen von Annexin A1

Annexine sind ubiquitäre Proteine, jedoch treten nicht alle Mitglieder gleichzeitig auf, sondern verteilen sich auf unterschiedliche Gewebe. Annexin A1 wird vor allem in Lunge, Plazenta und gefunden.⁶¹ Obwohl Annexine an sich intrazelluläre Proteine sind und keine Signalsequenz zur Sekretion besitzen, werden einigen Annexinen auch extrazelluläre Funktionen zugeschrieben.²

1.4.1 Annexin A1 und Entzündung

Annexin A1 soll sowohl an intrazellulären als auch an extrazellulären Prozessen beteiligt sein. So wurde herausgefunden, dass es eine extrazelluläre Rolle bei Entzündungsprozessen spielt, wobei dies kontrovers diskutiert wird. Da Glucocorticoide die Expression und Sekretion von Annexin A1 in verschiedenen Zelltypen induzieren kann, wurde es lange als zellulärer Mediator der entzündungshemmenden Glucocorticoide gehandelt. Außerdem wurde die entzündungshemmende Wirkung von Annexin A1 auf seine Fähigkeit, Phospholipase A2 (PLA2) zu inhibieren und somit die Produktion von Eikosanoiden zu vermindern, bezogen. Allerdings wurde mit der Zeit mehr und mehr deutlich, dass seine anti-inflammatorische Wirkung in Zusammenhang mit der Neutrophilwanderung durch die Gefäße und den Transport der Neutrophile zum entzündeten Gewebe zu bringen ist. So soll Annexin A1 die Transmigration von Neutrophilen durch die Endothelschicht inhibieren.^{2,62-64}

1.4.2 Annexin A1 in endozytotischen Prozessen und Membrandynamik

Annexin A1 wird intrazellulär vor allem in der Nähe der Plasmamembran und Membranen von endozytotischen Organellen gefunden, wodurch ihm die Beteiligung an bestimmten Schritten der Endozytose zugeschrieben wird.^{2,3,58}

1.4.2.1 Membrandynamik

Innerhalb einer Zelle werden Moleküle grundsätzlich entlang des biosynthetisch/sekretorischen oder des endozytotischen Wegs transportiert. Der

biosynthetisch/sekretorische Weg verläuft vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran, der endozytische Weg führt von der Plasmamembran über endosomale Kompartimente zu den Lysosomen. Die einzelnen Organellen einer Zelle stehen über den Austausch von sekretorischen Vesikeln in Kontakt. Diese Transportprozesse regulieren nicht nur die Inhalte der Organellen, sondern auch deren Größe durch den Membrantransport.

Bei der Endozytose handelt es sich um die regulierte Aufnahme und Verteilung von Stoffen in Zellen. Während lipophile kleine Moleküle durch Membranen bedingt diffundieren können, werden niedermolekulare, polare Moleküle meist über spezifische Transportproteine ausgetauscht. Die Aufnahme von Makromolekülen wie Proteine, Polynukleotide oder Polysaccharide erfolgt jedoch über Endozytose. Größere Partikel wie Mikroorganismen oder Zelltrümmer gelangen über Makropinozytose oder Phagozytose ins Zellinnere. Zur Aufnahme eines Stoffes wird dieser nach und nach von einem Teil der Plasmamembran durch Einstülpung umhüllt. Die gebildeten intrazellulären Vesikel mit dem zu transportierenden Inhalt werden von der Plasmamembran abgeschnürt und in der Zelle weitertransportiert, bis sie schließlich ihren Bestimmungsort erreichen und dort mit dem entsprechenden Organell fusionieren.⁶⁵

Abbildung 8 zeigt einen Überblick über die einzelnen Abläufe in der Endozytose und die jeweils daran beteiligten Proteine.

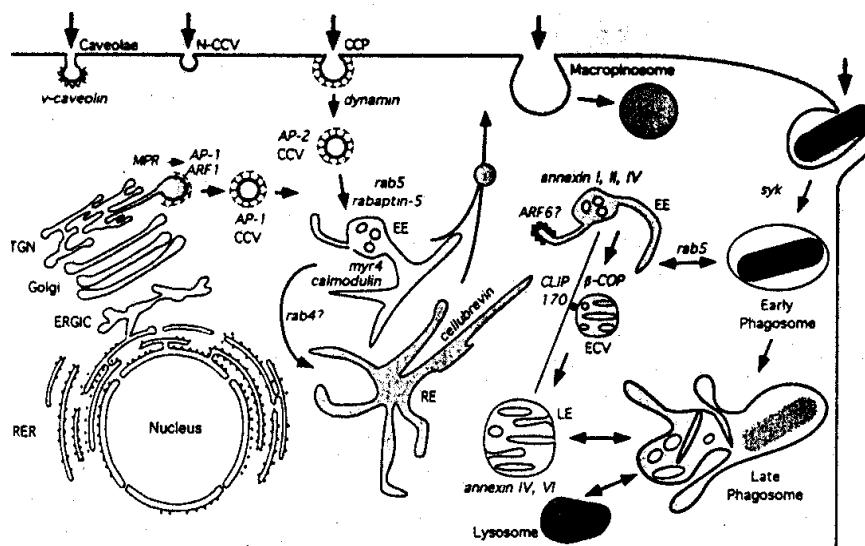


Abbildung 8: Modell der intrazellulären Organisation endozytischer Transportwege.⁶⁶

Es sind Internalisierungen über verschiedene mechanistisch unterscheidbare Prozesse bekannt, wie die clathrinabhängige rezeptorvermittelte Endozytose, die

clathrinunabhängige Endozytose und die Potozytose, bei der die Aufnahme über Caveolae erfolgt.

Der bislang am besten charakterisierte Vorgang, Makromoleküle in die Zelle über Endozytose aufzunehmen, erfolgt über die Einstülpung von Clathrin-ummantelten Membranteilen, den „clathrin-coated pits“ (CCP), und der Abschnürung von „clathrin-coated vesicles“ (CCV). Vermittelt wird dieser Vorgang durch in den CCPs und CCVs angereicherte Rezeptoren wie dem Low Density Lipoprotein (LDL)-, dem Transferrin- und dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor. Über ein Internalisierungssignal binden Adaptorproteine (Adaptine, AP) an die cytosolische Seite des Rezeptors, koppeln zugleich an Clathrinmoleküle und vermitteln so die Bindung von Clathrin an die Membran.

Entlang des endozytotischen Wegs gelangen die Vesikel zuerst zu den frühen Endosomen (early endosomes, EE), fusionieren mit ihnen und entladen so ihren Inhalt. Nach einer Sortierung in den frühen Endosomen werden einige Stoffe wie etwa einige Rezeptoren über Recyclingendosomen (RE) zur Plasmamembran zurücktransportiert. Der weitere Transport im endozytotischen Weg von den frühen Endosomen zu den späten Endosomen (late endosomes, LE) wird durch multivesikuläre Körper (MVBs), auch endosomale Carrier Vesikel (ECVs) genannt, vermittelt. Die Stoffe werden weiter zu den Lysosomen transportiert, in denen sich Abbauenzyme befinden.⁶⁵

Die biosynthetischen Reifungs- und Transportschritte, welche die Fusion der vom Trans-Golgi-Netzwerk abgeschnürten Vesikel mit der Plasmamembran beinhaltet, nennt man Exozytose. Proteine, die im Endoplasmatischen Retikulum produziert worden sind, können über den allgemeinen Weg der konstitutiven Sekretion über sekretorische Vesikel zur Plasmamembran gelangen. In spezialisierten Zellen findet man daneben auch eine regulierte Sekretion, bei der die sekretorischen Vesikel erst nach einem Signal zur Freisetzung mit der Plasmamembran fusionieren.⁶⁵

Die Voraussetzungen für einen zielgerichteten Transport sind eine strenge Regulation und eine hohe Spezifität sowohl bei der Abschnürung von Vesikeln von der Donormembran als auch bei der Fusion mit der Akzeptormembran sowie des Transports der Vesikel, damit die Protein- und Lipidzusammensetzung der einzelnen Kompartimente gewährleistet ist. Die spezifische Wechselwirkung von Proteinen auf den bestimmten Vesikeln mit Proteinen der Zielmembran führte zur sogenannten SNARE-Hypothese. Diese besagt, dass SNARE (SNAP-Rezeptor)-Proteine auf den Vesikeln, sogenannte v-SNAREs, mit t-SNAREs auf der Zielmembran interagieren. Diese Proteinkomplexbildung erlaubt die Anlagerung von SNAPS (soluble NSF attached proteins), welche wiederum NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) aus dem Zytosol rekrutieren. Die katalytische Aktivität des NSF, einer ATPase,

bewirkt den Zerfall des SNARE-Komplexes und leitet so wahrscheinlich die eigentliche Membranfusion ein.^{67,68} Allerdings ist bis heute der Prozess der kontrollierten Vesikelaggregation und der –fusion noch unzureichend geklärt.

Im vesikulären Transport soll außerdem das auf Aktin bzw. Mikrotubuli basierende Zytoskelett unterschiedliche Funktionen innehaben. Mikrotubuli scheinen für die spezifische Lokalisation der Organellen verantwortlich zu sein und erleichtern den gerichteten Transport von Vesikeln zwischen den einzelnen Organellen.⁶⁹ In einigen Zellen wurde auch eine Beteiligung des Aktins an frühen endozytotischen Prozessen nachgewiesen, wobei hier eine Funktion bei der Bildung endozytotischer Vesikel diskutiert wird. Dem kortikalen Zytoskelett, einem Aktinnetzwerk unterhalb der Plasmamembran, wird eine regulative Funktion bei der Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran zugeschrieben.⁷⁰

1.4.2.2 Annexin A1 in der Endozytose

Aufgrund seiner intrazellulären Lokalisation, seiner Fähigkeit mit F-Aktin zu assoziieren sowie seiner Wechselwirkung mit S100A11 wird für Annexin A1 eine Teilnahme an Transportprozessen des endozytotischen Wegs diskutiert. Annexin A1 wurde hauptsächlich an der Plasmamembran sowie auf frühen und späten Endosomen nachgewiesen.^{54,58,59,71,72} Es wurde beobachtet, dass Annexin A1 in BHK-P3-Zellen streng Ca^{2+} -abhängig an frühe Endosomen bindet und dort assoziiert mit S100A11 vorliegt, wobei gezeigt werden konnte, dass Annexin A1 für die dortige Lokalisation von S100A11 essentiell ist. Die N-terminale Domäne ist für die endosomale Lokalisation von Annexin A1 von Bedeutung, denn während intaktes Annexin A1 hauptsächlich an frühen Endosomen gefunden wurde, konnte N-terminal verkürztes Δ^{1-26} Annexin A1 an späten Endosomen nachgewiesen werden.⁷¹ Annexin A1, das in NIH-3T3-Zellen das Hauptsubstrat der EGF-Rezeptor/Kinase ist, wird vermutlich im Verlauf der Rezeptorinternalisierung in den spätendosomalen multivesikulären Körpern (multivesicular bodies, MVBs) phosphoryliert.⁹ Haigler et al. wiesen nach, dass durch diese Phosphorylierung die Proteolysesensitivität der N-terminalen Domäne stark erhöht ist.¹⁰ So wird vermutet, dass in diesem Schritt durch die Phosphorylierung wahrscheinlich die Proteolyse induziert wird.

2 ZIELSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wechselwirkung von Annexin A1 mit artifiziellen Membranen quantifiziert werden. Da Annexin A1 in der Lage ist, Membranen zu aggregieren, war es von Interesse, die beiden Membranbindungsprozesse getrennt voneinander zu betrachten.

So sollte die Bindung von Annexin A1 an Membranen bezüglich ihrer Ca^{2+} -Abhängigkeit und ihrer Reversibilität untersucht werden, um Erkenntnisse über die Dynamik der Annexin A1-Membran-Wechselwirkung zu erlangen. Außerdem sollte die Organisation von membran-gebundenem Annexin A1 aufgeklärt werden.

Im Hinblick auf die Annexin A1-vermittelte Membranaggregation sollte vor allem der Charakter der sekundären Membranbindung analysiert werden. Da postuliert wird, dass die Membranaggregation über die N-terminale Domäne von Annexin A1 vermittelt wird, sollte die Rolle des N-Terminus bei der Membranaggregation näher aufgeklärt werden.

Basierend auf Studien von Seemann et al.^{58,59,72} war es weiterhin von Interesse, die Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung bezüglich ihrer Spezifität, Affinität und Ca^{2+} -Abhängigkeit zu analysieren. Außerdem sollte der Zusammenhang dieser Protein-Protein-Wechselwirkung und der Annexin A1-Membranbindung geklärt werden.

Ziel war es, neue Erkenntnisse über die biochemischen Eigenschaften des Annexin A1 zu erhalten und einen Beitrag zur Aufklärung der Funktion seines Liganden S100A11 zu leisten.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Abkürzungsverzeichnis der am häufigsten verwendeten Puffersysteme

Tabelle 1: Zusammensetzung der Puffersysteme.

Abkürzung	Tris/HCl / mM	NaCl / mM	CaCl ₂ / mM	EGTA / mM	NaN ₃ / mM	DTT / mM	pH-Wert
TBS	20	150	-	-	-	-	7.4
TBS _{Ca}	20	150	0,5	-	-	-	7.4
TBS _{EGTA}	20	150	-	25	-	-	7.4
Puffer P	20	100	-	-	1	-	7.4
Puffer E ₁	20	100	-	1	1	-	7.4
Puffer E ₁₀	20	100	-	10	1	-	7.4
Puffer E ₁ ^{DTT}	20	100	-	1	1	1	7.4
Puffer E _{0,1} ^{DTT}	20	100	-	0,1	1	1	7.4
Puffer Ca ₁	20	100	1	-	1	-	7.4
Puffer Ca ₁₀	20	100	10	-	1	-	7.4
Puffer Ca _{0,5}	20	100	0,5	-	1	-	7.4
Puffer Ca _{0,1}	20	100	0,1	-	1	-	7.4
Puffer Ca _{0,05}	20	100	0,05	-	1	-	7.4
Puffer Ca _{0,01}	20	100	0,01	-	1	-	7.4
Puffer Ca ₁ ⁵⁰⁰	20	500	1	-	1	-	7.4
Puffer Ca ₁ ¹⁰	20	10	1	-	1	-	7.4
Puffer Ca ₁ ⁰	20	-	1	-	1	-	7.4

3.2 Präparation artifizieller Modellmembransysteme

3.2.1 Präparation multilamellarer und unilamellarer Vesikel

Die einzelnen Lipide wurden genau eingewogen und separat in Chloroform gelöst. Die Konzentration der Lösungen lag bei 10 mg/ml für POPC und Asolectin, bei 10 bzw. 2 mg/ml für POPS, POPG und Biotin-X-DHPE. Anschließend wurden die Lipid-Lösungen im gewünschten Molverhältnis in Reagenzgläser pipettiert. Die Gesamtlipidmenge pro Reagenzglas betrug entweder 0,25, 0,5, 1 oder 2 mg. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C im Stickstoffstrom verdampft, sodass sich am Boden des Glases ein dünner Lipidfilm bildete. Die Filme wurden bei 40 °C im Vakuum drei bis fünf Stunden von restlichem Lösungsmittel befreit. Die Reagenzgläser wurden mit Parafilm verschlossen und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Die Herstellung multilamellarer Vesikel (MLV) erfolgt oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipids. Der Lipidfilm wurde zuerst in Puffer E₁ (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM NaN₃) 20 bis 30 Minuten gequollen und anschließend 30 Sekunden lang geschüttelt. Nach jeweils fünf Minuten wurde der Schüttelvorgang noch dreimal wiederholt.

Zur Überführung in unilamellare Vesikel (LUV, *large unilamellar vesicles*) wurden die MLV in einen Miniextruder (LiposoFast, Avestin) gegeben und 31-mal durch eine Polycarbonatmembran mit 100 nm Porengröße (Avestin) gedrückt. Für Messungen in Puffersystemen mit variierendem NaCl-Gehalt wurden die Vesikel in dem oben angegebenen Puffer mit entsprechendem Salzgehalt präpariert. Vesikel zur Herstellung von festkörperunterstützten Membranen auf Glimmer-Oberflächen wurden in calciumhaltigem Puffer Ca₁ (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃) präpariert.

Der Durchmesser der unilamellaren Vesikel wurde mittels quasielastischer Lichtstreuung (Zetasizer 1000/3000, Malvern Instruments, U.K.) in Puffer Ca₁ ermittelt.* Die präparierten Vesikel hatten einen mittleren Durchmesser von (120 ± 40) nm (siehe Anhang 7.1).

* Die Messungen wurden von PD Dr. Nils Kröger vom Institut für Biochemie, Genetik und Molekularbiologie, Universität Regensburg, durchgeführt.

3.2.2 Herstellung festkörperunterstützter Membranen

3.2.2.1 Präparation von festkörperunterstützten Membranen auf Goldoberflächen

Bedampfen der Quarze

Hochpolierte 5 MHz-AT-cut-Quarzscheiben (KVG, Neckarbischofsheim) mit einem Durchmesser von 14 mm und einer Dicke von 0,33 mm wurden in einer Mucasol-Lösung (0,5 % (v/v) in Reinstwasser) 15 Minuten bei 70 °C im Ultraschallbad gereinigt und anschließend in fließendem Reinstwasser gespült. Die Quarze wurden noch zweimal in Reinstwasser je 15 Minuten bei 70 °C beschallt, nach jeder Beschallung gründlich gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden sie fünf bis zehn Minuten im Argonplasma (Harrick) gereinigt. Die Beschichtung der Quarze mit Chrom und Gold wurde in einer Aufdampfanlage vom Typ BAE 250 Coating Systems der Firma Balzers durchgeführt. Pro Aufdampschritt wurden 18 Quarze auf einen Halter gelegt, mit einer Schablone abgedeckt und mit der Schablonenseite nach unten in die Aufdampfanlage eingespannt. Anschließend wurde ein Hochvakuum von 10^{-8} bis 10^{-9} bar erzeugt. Durch thermische Verdampfung wurden zuerst 20 nm Chrom und dann 100 nm Gold auf eine Fläche von $0,3 \text{ cm}^2$ auf die Quarze gedampft. Das Aufdampfmaterial wurde in elektrisch beheizbare Wolframschiffchen gelegt, die mechanisch anzusteuern waren. So konnten Chrom und Gold direkt nacheinander aufgedampft werden. Die Schichtdicke wurde durch einen in die Apparatur eingebauten Schwingquarz gemessen. Um die Rückseite zu bedampfen, wurden die Quarze in der Schablone umgedreht, sodass die Elektrodenzuleitung um 180° versetzt war. Anschließend wurde der Aufdampfvorgang wiederholt.

Regeneration der Quarze

Nach Gebrauch der Quarze wurden sie in ca. 70 °C heißer Piranha-Lösung (Schwefelsäure konz. und Wasserstoffperoxid 30 % im Verhältnis 3:1 (v/v)) ein bis zwei Minuten gereinigt. Anschließend wurden sie in fließendem Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Auf diese Weise konnten die Quarze bis zu dreimal verwendet werden.

Ablösen der Gold- und Chromschicht

Zum Ablösen der Goldschicht wurden die Quarze in eine 0,25 M I₂ / 0,5 M KI-Lösung getaucht. Nach etwa fünf Minuten war kein Gold mehr auf den Quarzen zu sehen, und

die Quarzscheiben wurden mit Reinstwasser gespült. Um die Chromschicht zu entfernen, wurde eine basische Kaliumhexacyanoferrat(II) ($K_4Fe(CN)_6$) -Lösung verwendet. Nach fünf bis zehn Minuten hatte sich die Chromschicht aufgelöst und die Quarzscheiben konnten nach dem Waschen mit Reinstwasser wieder mit Chrom/Gold bedampft werden.

Aufbau der Doppelschichten auf den Goldelektroden

Die zu beschichtende Elektrode – im Folgenden als Oberseite bezeichnet - wurde mit Silberleitkleber am Rand des Quarzes mit ihrem an der Unterseite liegenden Kontakttelektrodenstück leitend verbunden (Abbildung 11 b). Der Quarz wurde mit der Oberseite nach oben fünf bis zehn Minuten im Argonplasma gereinigt. Sofort wurde der Quarz in die Messzelle eingesetzt und mit 200 μ l einer 2 mM ethanolischen Oktanthiollösung überschichtet. Nach einer Stunde wurde die Oktanthiollösung vollständig abgezogen und die Schicht fünfmal mit je 1 ml Ethanol und fünfmal mit je 1 ml Puffer E₁ (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM NaN₃) gespült. Anschließend wurde ein Impedanzspektrum in Puffer aufgenommen (Kapitel 3.4.2.3). Lag die Kapazität der Schicht zwischen 1,8 und 2,3 μ F/cm², so wurde mit dem Aufbau der Doppelschicht fortgefahrene. Nach dem vollständigen Entfernen des Puffers wurde der Quarz mit 100 μ l der Suspension unilamellarer Vesikel und 100 μ l des Puffers E₁ überschichtet. Nach einer Stunde Inkubation der Monoschicht mit der Vesikelsuspension wurde wieder ein Impedanzspektrum aufgenommen, um die Qualität der Präparation zu überprüfen. Die Membran wurde zur mikrogravimetrischen Untersuchung verwendet, wenn die Kapazität der Doppelschicht zwischen 0,9 und 1,3 μ F/cm² lag. Die Vesikelsuspension wurde entfernt, indem zehnmal mit je 1 ml Puffer E₁ gespült wurde. Anschließend wurde der Puffer durch den in der jeweiligen Quarzmikrowaagemessung verwendeten durch zehnmaliges Spülen ausgetauscht. Dabei wurde jedoch nie die gesamte Flüssigkeit über der Schicht abgezogen, da dies die Lipidmembran zerstören würde.

3.2.2.2 Aufbau einer Phospholipid-Doppelschicht auf Glimmer

Ein frisch gespaltenes Glimmerplättchen (Maße ca. 0,8 x 2 cm) wurde in eine Teflonzelle eingebaut und mit ca. 200 μ l einer 1 mg/ml Vesikelsuspension (unilamellare POPC/POPS (4:1)-Vesikel in Puffer Ca₁ (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM CaCl₂ und 1 mM NaN₃)) überschichtet. Nach etwa einer Stunde Inkubation wurde die Oberfläche unter fließendem Puffer gespült, ohne dass diese trocken wurde. Die Qualität der Präparation wurde mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht (3.4.1.3).

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.3.1.1 UV-Spektroskopie

Die Konzentration von Annexin A1, Annexin A2t, Annexin A2m und S100A10 wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Allgemein wird hierbei die Absorption der aromatischen Aminosäuren im Protein bei $\lambda = 280$ nm genutzt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz gilt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d , \quad \text{GL-1}$$

wobei E die Extinktion, ε der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration der Probe und d die Schichtdicke ist.

Tabelle 2: Zur Konzentrationsbestimmung verwendete Extinktionskoeffizienten ε und Molekularmassen M der Proteine.

Protein	$\varepsilon_{280 \text{ nm}} / \text{cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$	$M / \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Annexin A1	0,6 ^{35,73}	38700
Annexin A2t	0,65 ⁷⁴	98900
Annexin A2m	0,75 ⁷⁵	38400
S100A10₂	0,23 ⁷⁵	22000

3.3.1.2 Bradford-Test

Da bei 280 nm fast ausschließlich die aromatische Aminosäure Tryptophan zur Extinktion von Proteinen beiträgt, und S100A11 kein Tryptophan besitzt, wurde die Konzentration von S100A11₂ mit dem Test von Bradford ermittelt.⁷⁶ Für jede Messung wurde eine Eichkurve mit BSA ermittelt, wofür jeweils 10 BSA-Eichlösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg/ml verwendet wurden. Zu jeweils 1 ml Bradford-Reagenz wurden je 20 μl Proteinprobe gegeben und nach fünf bis zehn Minuten die Extinktion bei 595 nm ermittelt. Zu den gemessenen Extinktionswerten der S100A11-Proben wurden die entsprechenden Proteinkonzentrationen aus der Eichkurve ermittelt.

Bradford-Stammlösung: 0,5 mg/ml Coomassie Blue G

25 % (v/v) Methanol

42,5 % H_3PO_4

Bradford-Reagenz: 20 % (v/v) Bradford-Stammlösung

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE-Analysen von Annexinen wurden hauptsächlich 12,5 %ige, für S100-Proteine 15 bzw. 17 %ige SDS-PA-Gele nach Lämmli verwendet.⁷⁷ Zur Größenidentifikation wurde auf jedes Gel ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Um die Proteine im Sammelgel zu fokussieren, wurde ein Strom von 15 mA, zur Trennung im Trenngel von 20-30 mA eingestellt. Sobald der Farbstoff Bromphenolblau durch das Gel durchgelaufen war, wurde der Lauf beendet. Die Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt und der Hintergrund mit Entfärbner anschließend wieder entfärbt. Zur Konservierung wurden die Gele zuerst eine Stunde in Wasser und eine Stunde in Trocknungslösung eingelegt und dann zwischen zwei Cellophanpapieren in einem Trocknungsrahmen zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8.3

Probenpuffer (6x): 0,175 mM Tris, pH 6.8, 5% (w/w) SDS,
15% (v/v) Glycerin, 0,06 g/l Bromphenolblau,
zusätzlich für reduzierende Bedingungen: 0,3 M DTT

Färbelösung: 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250,
45 % (v/v) Methanol, 18,5 % (v/v) Eisessig

Entfärbelösung: 5 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Eisessig

Trocknungslösung: 20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Glycerin

Sammelgel (5 %): 1,4 ml H₂O
0,25 ml 1 M Tris/HCl, pH 6.8
0,33 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)
20 µl 10% SDS
20 µl 10% APS
2 µl TEMED

Trenngel (12,5%): 1,6 ml H₂O
2,1 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)
1,3 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8.8
50 µl 10% SDS
50 µl 10% APS
2 µl TEMED

3.3.3 Proteinexpression in *E.coli*-Bakterien

Die Bakterien wurden aus einem Glycerolstock auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde gepickt und über Nacht eine 5 ml Vorkultur angezogen. Die Hauptkultur wurde mit der Vorkultur 1:50 bis 1:500 angeimpft und bis zu einer OD bei 600 nm von 0,6 okkultiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert und die Bakterien weitere drei bis vier Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden zehn Minuten auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation (15 Minuten, 2 500 × g, 4 °C) geerntet.

LB-Medium: 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5-10 g/l NaCl, pH 7.5

LB-Selektionsmedium: 34 µg/ml Ampicillin in LB-Medium

Zur Herstellung der Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde das Antibiotikum zugegeben und die Flüssigkeit in Petrischalen gegossen.

3.3.4 Aufreinigung von rekombinantem Schweine-Annexin A1 aus *E.coli*

Rekombinantes Annexin A1 wurde aus einer 1 l *E.coli* Kultur (BL21 mit pKK-Anx A1-Vektor) nach einer Vorschrift von Rosengarth et al.⁷⁸ gereinigt. Das geerntete Bakterienpellet wurde in 30 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C aufgeschlossen. Die Aufreinigung wurde im Folgenden bei 4 °C durchgeführt. Die Probe wurde zusätzlich zum Aufschluss der Bakterien sechsmal eine Minute - mit einer Minute Pause dazwischen - sonifiziert (Branson Sonifier, 50 % output, Stufe 5) und anschließend 90 min zentrifugiert (100 000 × g, 4 °C). Der Überstand wurde zuerst vier Stunden und anschließend noch einmal über Nacht gegen je 2 l Puffer Q dialysiert.

Das Dialysat wurde auf eine Q-Sepharose Säule (Durchmesser: 2,5 cm, Höhe: 10 cm, V = 40-45 ml) aufgetragen und zuerst mit 120 ml Puffer Q und anschließend mit 80 ml Puffer Q + 50 mM NaCl gewaschen. Der Proteindurchlauf sowie die Waschfraktionen, die nach SDS-PAGE-Analyse eindeutig Annexin A1 enthielten, wurden zweimal gegen je 4 l Puffer M1 zuerst vier Stunden und dann noch einmal über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde 30 Minuten zentrifugiert (100 000 × g, 4 °C), um eventuell ausgefallene Substanzen abzutrennen und so die Proteinlösung zu klären.

Die Proteinlösung wurde bei 4 °C mittels FPLC über einen Kationenaustauscher (MonoS, Pharmacia) chromatographiert. Die Säule wurde mit zwei filtrierten und entgasten Puffern unterschiedlicher NaCl-Konzentration (Puffer M1 und Puffer M2) äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mittels eines Injektionssystems auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten zwischen 0,01 M (Puffer M1) und 0,5 M (Puffer M2) in einem Gesamtvolumen von 60 ml. Die Elutionslösung wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 0,6 ml Fraktionen gesammelt. Mittels Online-Leitfähigkeits- und Absorptionsmessung bei 280 nm konnten sowohl der NaCl-Gradient als auch die Proteinelution detektiert werden. Die gesammelten Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert, Annexin A1-haltige Fraktionen vereinigt und als Aliquots von ca. 0,6 ml bei –20 °C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurde je ein Aliquot Annexin A1 (ca. 0,6 mg) aufgetaut und mindestens 18 Stunden bei 4 °C gegen 500 ml Puffer E_1^{DTT} oder $E_{0,1}^{\text{DTT}}$ dialysiert. Die Proteinlösung wurde zehn Minuten mit einer Tischzentrifuge bei 15 000 × g zentrifugiert, um eventuell ausgefallene Proteine abzutrennen. Die Proteinlösung wurde bei 4 °C bis zu drei Wochen gelagert.

Lysispuffer:	50 mM Imidazol/HCl, pH 7.4, 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 25 µM E-64 und 1 µg/ml Trypsin-Inhibitor
Puffer Q:	10 mM Imidazol/HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM NaN ₃ , 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin
Puffer M1:	50 mM Mes/NaOH, pH 5.9, 10 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT und 1 mM NaN ₃
Puffer M2:	50 mM Mes/NaOH, pH 5.9, 500 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT und 1 mM NaN ₃
Puffer E_1^{DTT} :	20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM NaN ₃ , 1 mM DTT
Puffer $E_{0,1}^{\text{DTT}}$:	20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 0,1 mM EGTA, 1 mM NaN ₃ , 1 mM DTT

3.3.5 Aufreinigung von rekombinantem Schweine-S100A11 aus *E.coli*

Rekombinantes S100A11 wurde aus einer 100 ml *E.coli* Kultur (BL21 mit pET23a-Vektor mit Schweine-S100A11-Insert) nach einer Vorschrift von Seemann et al.⁵⁹ gereinigt. Das geerntete Bakterienpellet wurde in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei

37 °C aufgeschlossen. Die Aufreinigung wurde bei 4 °C durchgeführt. Die Probe wurde zusätzlich zum Aufschluss der Bakterien viermal 30 Sekunden - mit einer Minute Pause dazwischen - sonifiziert (Branson Sonifier, 50 % output, Stufe 5) und anschließend eine Stunde zentrifugiert ($100\ 000 \times g$, 4 °C). Der Überstand wurde langsam durch Zugabe einer 1 M CaCl₂-Stammlösung auf 5 mM CaCl₂ eingestellt. Die Proteine wurden anschließend an einer mit Puffer P + 5 mM CaCl₂ äquilibrierten Phenylsepharose-Säule (Durchmesser: 1 cm, Höhe: 7 cm, V = 5,5 ml) aufgetrennt. Durch die Besetzung der Ca²⁺-Bindungsstellen ändert S100A11 seine Konformation und hydrophobe Domänen treten an die Oberfläche, welche mit der hydrophoben Phenylsepharose wechselwirken können. Die Säule wird mit je fünf Säulenvolumina Puffer P + 5 mM CaCl₂ und anschließend mit Puffer P^{DTT} + 1 mM CaCl₂ gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Ca²⁺-abhängig gebundene Proteine wurden mit ca. 20 ml Puffer P + 1 mM EGTA (Puffer E₁^{DTT}) eluiert. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und proteinhaltige Fraktionen mittels SDS-PAGE-Analyse ermittelt und vereinigt. Das Protein wurde bei 4 °C gelagert.

Lysispuffer: 20 mM Imidazol/HCl, pH 7.5, 0,3 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 µg/ml Leupeptin

Puffer P^{DTT}: 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 1 mM DTT

3.3.6 Aufreinigung von Annexin A1 aus Schweinelunge

Die Lunge wurde direkt nach dem Schlachten des Schweins auf Eis gekühlt und sofort weiterverarbeitet. Die gesamte Aufreinigung wurde bei 4 °C nach einer Anleitung von Seemann⁵⁸ durchgeführt. 700 g kleingeschnittenes Lungengewebe wurden mit 0,5 l Lysispuffer versetzt und im Messerhomogenisator zerkleinert. Durch Zentrifugation (30 Minuten, $15\ 000 \times g$, 4 °C) wurden zuerst größere unlösliche Bestandteile abgetrennt und diese verworfen. Anschließend wurde der Überstand ultrazentrifugiert (60 Minuten, $100\ 000 \times g$, 4 °C) und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde durch schrittweise Zugabe einer 1 M CaCl₂-Stammlösung auf 15 mM Ca²⁺ eingestellt, wobei der pH-Wert durch Zugabe von 1 M Tris-Lösung auf pH 7.5-8.0 gehalten wurde. Nach 30 Minuten Rühren wurde die Probe im Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert und anschließend zentrifugiert (60 Minuten, 40000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 180 ml Puffer Ca_A aufgenommen und im Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert. In sechs Zentrifugenbecher wurden je 30 ml Puffer Ca_A + 5 % Sucrose (w/v) vorgelegt, mit jeweils 30 ml der Suspension überschichtet und zentrifugiert (60 Minuten, $100\ 000 \times g$, 4 °C). Das Pellet wurde in 150 ml Puffer E_A

resuspendiert, im Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert, 30 Minuten gerührt, wieder homogenisiert und zentrifugiert (60 Minuten, $100\,000 \times g$, 4 °C). Der Überstand wurde erst vier Stunden, dann noch einmal über Nacht gegen je 10 l Puffer E_B dialysiert. Um ausgefallene Proteine zu entfernen wurde das Dialysat zentrifugiert (60 Minuten, $100\,000 \times g$, 4 °C). Anschließend wurde die Ca²⁺-Konzentration des Überstands schrittweise mit einer 1 M CaCl₂-Stammlösung auf 4 bis 5 mM eingestellt, wobei durch Zugabe einer 1 M Tris-Lösung der pH-Wert auf 7.5-8.0 gehalten wurde. Der Ansatz wurde 30 Minuten gerührt, homogenisiert und zentrifugiert (60 Minuten, $100\,000 \times g$, 4 °C). Das Pellet wurde in 15 ml Puffer E_C resuspendiert, homogenisiert, 30 Minuten gerührt und zentrifugiert (60 Minuten, $150\,000 \times g$, 4 °C). Der Überstand wurde zuerst vier Stunden und dann noch einmal über Nacht gegen je 4 l Puffer I dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine Q-Sepharose-Säule (Durchmesser: 1,2 cm, Höhe: 9 cm, V = 10 ml) aufgetragen, mit 30 ml Puffer I und mit 40 ml Puffer I + 10 mM NaCl gespült. Mittels Online-Absorptionsmessung bei 280 nm konnte die Proteinelution beim Spülen mit Puffer I + 10 mM NaCl detektiert werden. Die gesammelten Fraktionen wurden einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen. Die Waschfraktionen mit Puffer I + 10 mM NaCl, die Annexin A1 enthielten, wurde auf eine Hydroxyapatit-Säule (Durchmesser: 0,6 cm, Höhe: 5 cm, V = 1,5 ml, Pasteurpipette) aufgetragen. Nach Spülen mit 5 ml Puffer I wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,2 M NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ in Puffer I, pH 7.2, der durch einen manuellen Gradientenmixer erzeugt wurde, in einem Gesamtvolumen von 60 ml eluiert und der Durchlauf in Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen. Mittels Online-Absorptionsmessung bei 280 nm konnte die Proteinelution detektiert werden. Annexin A1-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE-Analyse identifiziert, vereinigt, über Nacht gegen 1 l Puffer I + 0,5 mM EGTA + 50 % Glycerin (v/v) dialysiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurde je ca. 0,5 ml Annexin A1 (ca. 0,1 mg) mindestens 18 Stunden bei 4 °C gegen 500 ml Puffer E₁^{DTT} dialysiert. Die Proteinlösung wurde zehn Minuten mit einer Tischzentrifuge bei 15 000 $\times g$ zentrifugiert um eventuell ausgefallene Proteine abzutrennen. Die Proteinlösung wurde bei 4 °C gelagert und bis zu drei Wochen verwendet.

Lysispuffer: 40 mM Tris/HCl, pH 8.8, 1 % Triton X.100 (v/v), 15 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 20 µg/ml Trypsin-Inhibitor, 4 µg/ml E-64

Puffer Ca_A: 10 mM Imidazol/HCl, pH 7.2, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 20 µg/ml Trypsin-Inhibitor, 4 µg/ml E-64

Puffer E _A :	20 mM Imidazol/HCl, pH 7.2, 10 mM EGTA, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 20 µg/ml Trypsin-Inhibitor, 4 µg/ml E-64
Puffer E _B :	10 mM Imidazol/HCl, pH 7.2, 25 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 20 µg/ml Trypsin- Inhibitor
Puffer E _C :	20 mM Imidazol/HCl, pH 7.2, 1 M NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 0,5 mM EGTA, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 20 µg/ml Trypsin-Inhibitor
Puffer I:	10 mM Imidazol/HCl, pH 7.2, 1 mM DTT, 1 mM NaN ₃
Puffer E ₁ ^{DTT} :	20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM NaN ₃ , 1 mM DTT

3.3.7 Aufreinigung des (Annexin A2)₂-(S100A10)₂-Heterotetramerkomplexes (AnxA2t) aus Schweinemucosa

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Prinzip von Gerke et al.⁷⁴ nach einer Anleitung von Ross.⁷⁹ Annexin A2t wurde aus einem Ca²⁺/EGTA-Extrakt aus Schweinemucosa zuerst über Anionenaustauschchromatographie an einer DE52-Säule und anschließend über Kationenaustauschchromatographie an einer MonoS-Säule (Pharmacia) mit Hilfe eines FPLC-Systems isoliert. Das in 50 mM Mes/NaOH, pH 6.0, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM NaN₃ und 1 mM DTT mit einer Konzentration von ca. 10 mg/ml bzw. 25 mg/ml als Aliquots (je 0,5 mg) bei -20 °C gelagerte Protein wurde aufgetaut und durch Zugabe von Puffer E₁^{DTT} auf ca. 0,8 mg/ml verdünnt. Das Protein wurde bei 4 °C gelagert und etwa drei Wochen verwendet.

3.3.8 Trennung des Annexin A2t-Komplexes in seine Untereinheiten Annexin A2 und S100A10

Die Trennung der Untereinheiten des (Annexin A2)₂-(S100A10)₂-Komplexes erfolgte nach Gerke et. al.⁵⁶ durch Denaturierung von ca. 5 mg des Proteins mit einer Konzentration von ca. 25 mg/ml in Harnstoff-Puffer (9 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0,1 M NaCl, 2 mM NaN₃, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA und 3 mM DTT) und anschließender Auftrennung durch Gelfiltration über eine Sephadex-200-HR (Sigma)-Säule (Durchmesser: 0,9 cm, Höhe: 100 cm, V = 64 ml). Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,3-0,6 ml aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die beiden getrennten Proteinuntereinheiten wurden in harnstoffhaltigem Puffer bei -20 °C gelagert. Nach

Auftauen konnten die Proteine durch Dialyse (mindestens 24 Stunden) gegen harnstofffreien Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0,1 M NaCl, 1,5 mM NaN₃, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA und 0,5 mM DTT) renaturiert werden.

3.3.9 Limitierte Proteolyse von Annexin A1

Annexin A1 wurde im molekularen Verhältnis von 140 : 1 mit Trypsin 2 h bei RT in 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃ (Puffer Ca₁) inkubiert. Die Annexin A1-Konzentration lag dabei zwischen 0,1 und 1 mg/ml. Nach Seemann et al. führt dies zu einer Abspaltung der ersten 29 Aminosäuren von Annexin A1.⁵⁹ Der Verlauf und die Vollständigkeit der Proteolyse wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Δ^{1-29} -Anx A1 wurde ohne weitere Aufreinigung sofort verwendet.

3.3.10 Western Blot Analyse

Die Proteinproben wurden nach Abschnitt 3.3.2 mittels Gelelektrophorese auf einem SDS-PA-Gel aufgetrennt. Statt der Färbung mit Coomassie Blau wurde das Gel 30 Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Anschließend wurden die Proteine im elektrischen Feld ($U = 15$ V) 12 bis 15 Minuten auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für diesen Übertrag wurde das *Semi-dry*-Verfahren angewendet, in dem das Gel und die Nitrozellulosemembran zwischen zwei in Blotpuffer getränkten Filterpapiere und diese zwischen zwei Elektrodenplatten platziert wurden. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Proteinbanden auf der Nitrozellulose fünf Minuten mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Die Membran wurde eine Stunde in 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Lösung abgesättigt und anschließend eine Stunde mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:400 bis 1:1000 in TBS-T-Lösung) inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde dreimal je fünf Minuten mit TBS-T-Lösung gewaschen und dann mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnung 1:5000 in TBS-T-Lösung) eine Stunde inkubiert. Die Membran wurde daraufhin nochmals dreimal je fünf Minuten mit TBS-T-Lösung gewaschen.

Entwickelt wurde der Blot durch einminütige Inkubation mit einer Chemolumineszenz-Mischung (LumigenTM TMA 6, Lösung A : Lösung B, 1:1). Chemolumineszenz tritt nur an den Stellen auf, an denen der zweite Antikörper über den ersten Antikörper an das zu untersuchende Protein gebunden hatte. Detektiert und dokumentiert wurden die entsprechenden Banden über Photopapier (Kodak), das mit dem Blot eine geeignete Zeit (zwischen 5 und 50 Sekunden) belichtet und anschließend entwickelt (Entwicklerlösung, Kodak) und fixiert (Fixierlösung, Kodak) wurde.

Blotpuffer:	20 % Methanol, 25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8.3
Ponceau-Lösung:	0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Essigsäure
TBS-T-Lösung:	20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,15 M NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20
Primäre Antikörper:	Annexin A1: mAB Anx A1, R281.13 (anti-Maus) S100A11: anti S100C r 656 (anti-Kaninchen)
Sekundäre Antikörper:	Peroxidase-gelabelt, anti-Kaninchen (Amersham) Peroxidase-gelabelt, anti-Maus (Amersham)

3.3.11 S100A11-Bindung an immobilisiertes Annexin

Die verschiedenen Annexin-Proben wurden analog 3.3.2 einer SDS-PAGE mit 15 bzw. 17 %igen Gel unterzogen und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Der Proteintransfer wurde mit Ponceau-Färbung kontrolliert und der Blot eine Stunde in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS_{Ca} (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,15 M NaCl, 0,5 mM CaCl₂) bzw. in TBS_{EGTA} (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,15 M NaCl, 25 mM EGTA*) abgesättigt. Die Membran wurde eine Stunde mit 5 µg/ml S100A11 in TBS_{Ca} bzw. TBS_{EGTA} inkubiert und dreimal je fünf Minuten mit dem entsprechenden Puffer gewaschen. An Annexin gebundenes S100A11 wurde wie in Kapitel 3.3.10 mit einem anti-S100C-Antikörper detektiert. In allen Schritten wurde jedoch statt TBS-T-Lösung TBS_{Ca} bzw. TBS_{EGTA} verwendet.

3.3.12 Vesikelbindungsstests

Jeweils 4 oder 8 µg Annexin und - in den entsprechenden Versuchen – 4 oder 8 µg des S100-Proteins wurden mit 125 oder 250 µg reinen POPC- oder POPC/POPS (4:1)-Vesikeln (MLVs) in 160 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 1 mM CaCl₂ (Puffer Ca₁) bzw. 1 mM EGTA (Puffer E₁) 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, nachdem die Proteine vorher 20 Minuten ohne Vesikel in entsprechender Pufferlösung inkubiert worden waren. Die Probe wurde 30 Minuten bei 15 000 × g und 20 °C in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 15 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 10 mM CaCl₂ (Puffer Ca₁₀) bzw. 1 mM EGTA (Puffer E₁) gewaschen und erneut zentrifugiert. Gegebenenfalls wurde das Pellet ein weiteres Mal mit 15 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 1 mM CaCl₂ (Puffer Ca₁) bzw. 1 mM EGTA (Puffer E₁)

* Die EGTA-Konzentration wurde so hoch gewählt, um die Ca²⁺-Ionen aus dem Magermilchpulver zu komplexieren.

gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 10 mM EGTA (Puffer E₁₀) resuspendiert und 20 Minuten inkubiert um Ca²⁺-abhängig gebundene Proteine abzulösen. Die Vesikel wurden wieder zentrifugiert und das Pellet in 15 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 1 mM EGTA (Puffer E₁) aufgenommen. Jeweils 15 µl des Überstandes nach der ersten Zentrifugation, sowie die kompletten Überstände nach den Waschschritten und der EGTA-Ablösung und die Vesikelsuspension wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Zur Untersuchung der Annexin – S100-Protein-Wechselwirkungen wurden die Proteine entweder wie oben beschrieben gleichzeitig mit den Vesikeln inkubiert oder nacheinander zugegeben. Hierzu wurden zuerst 4 oder 8 µg des entsprechenden Annexins mit den Vesikeln inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Vesikelpellet wurde in 160 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 1 mM CaCl₂ (Puffer Ca₁) resuspendiert und mit 4 oder 8 µg S100-Protein weitere 20 Minuten inkubiert. Es wurde erneut zentrifugiert und der Ansatz wie oben beschrieben weiterbehandelt.

3.3.13 Tryptischer Verdau von membran-gebundenem Annexin A1

Um den Einfluss von S100A11 auf den zeitlichen Verlauf der N-terminalen Proteolyse von Vesikel-gebundenem Annexin A1 zu untersuchen wurden abgeänderte Vesikelbindungstests wie in Kapitel 3.3.12 durchgeführt. Für die Ansätze wurden je 8 µg Annexin A1 mit und ohne 8 µg S100A11 und 62,5, 125 oder 250 µg Lipid in je 160 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 1 mM CaCl₂ (Puffer Ca₁) eingesetzt. Nach dem ersten Waschschritt wurde das Pellet in 160 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 1 mM CaCl₂ (Puffer Ca₁) resuspendiert und dann mit Trypsin im molaren Verhältnis Trypsin:Annexin 1:140 bzw. 1:28 inkubiert. Nach jeweils ein, zwei und drei Stunden wurden 50 µl des Ansatzes entnommen und zentrifugiert. Nach einem Waschschritt mit 15 µl 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 M NaCl, 1 mM NaN₃ und 10 mM CaCl₂ (Puffer Ca₁₀) wurden die Ca²⁺-abhängig gebundenen Proteine, wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben, von den Vesikeln abgelöst und mit SDS-PAGE analysiert.

3.4 Messmethoden

3.4.1 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (*scanning force microscopy*, SFM oder auch *atomic force microscopy*, AFM) ermöglicht es, zerstörungsfrei Strukturen von Oberflächen im Submillimeterbereich-Bereich bis hinab zu atomarer Auflösung abzubilden. Zusätzlich lassen sich Materialeigenschaften der Probe bestimmen. Diese Methode wurde 1986 als Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops von Binnig et al. entwickelt.⁸⁰ Als Messungen in wässrigem Medium möglich wurden, gewann diese Methode für die Untersuchung biologischer Proben an Bedeutung. Für die Untersuchung von Membranen und Membran-Protein-Systemen stellten sich auf Glimmer immobilisierte festkörperunterstützte Membranen als geeignet heraus, da diese hinreichend planar und einfach zu präparieren sind.⁸¹

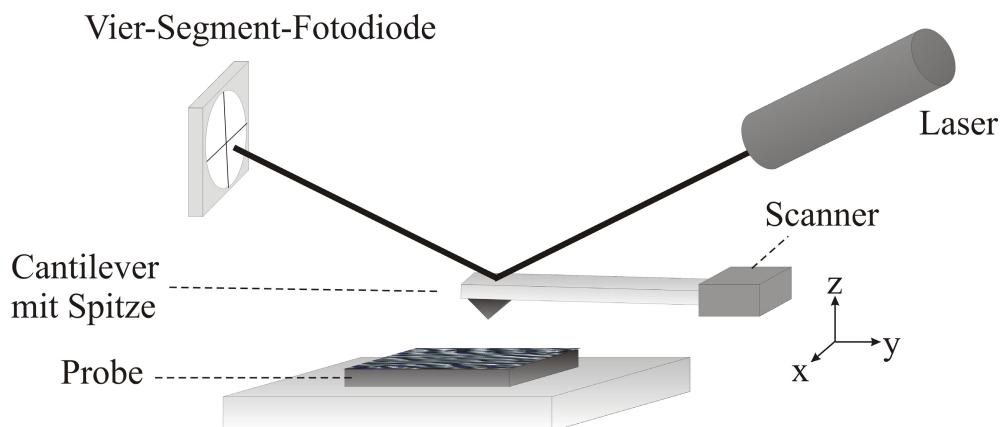


Abbildung 9: Schema des Funktionsprinzips eines Rasterkraftmikroskops.

Der Abbildungsmechanismus basiert auf den attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen zwischen der Probenoberfläche und einer Messspitze, die an einem dünnen Federbalken (*cantilever*) befestigt ist (Abbildung 9). Die Messspitze wird mit der Oberfläche in Kontakt gebracht, wobei die Verbiegung des Federbalkens ein Maß für die Kraft zwischen Spitz und Probe ist. Die Verbiegung des *cantilevers* wird analysiert, indem ein Laserstrahl auf den Federbalken trifft, von dort reflektiert und seine Position auf einer Vier-Segment-Fotodiode registriert wird. Durch Piezo-Stellelemente im Scanner, die durch einen Regler gesteuert werden, kann die Spitz relativ zur Probe bewegt und somit die Oberfläche abgerastert werden. Während erst durch das Signal auf der Photodiode jeweils die z-Richtung der Spitz reguliert wird,

erfolgt die Bewegung in x- und y-Richtung mit konstanter Geschwindigkeit. Aus der Bewegung der Spitze wird dann rechnergestützt eine dreidimensionale Abbildung der Oberfläche erstellt.

3.4.1.1 Der *contact*-Modus

Im *contact*-Modus wird die Kraft zwischen Spitze und Probe durch einen Regelkreis konstant gehalten. Hierzu muss bei einer Bewegung parallel zur Oberfläche die relative Höhe z der Spitze über der Probe jeweils verändert werden. Zusammen mit den lateralen Position (x-, y-Koordinaten) der Spitze ergibt sich aus der Messung der Höhenänderungen ein topografisches Bild der Probenoberfläche.

Durch die mechanischen Einflüsse kann jedoch die Oberfläche verformt oder sogar beschädigt werden. Dadurch wird die Abbildung weicher Proben erschwert und kann durch die Deformation der Probe zu falschen Ergebnissen führen. Jedoch liegt der Vorteil des *contact*-Modus in einer stabilen Abbildung und der hohen Auflösung.

Eine Zusatzinformation des *contact*-Modus ist die Reibungskraftmikroskopie (*lateral force microscopy*, LFM). Hierbei wird die laterale Auslenkung (Torsion) des Hebelarmes detektiert, indem die Probe senkrecht zur Längsachse des Hebelarmes gescannt wird. Mit dieser Methode lassen sich Materialunterschiede analysieren, da eine Veränderung der Reibungskraft zwischen Probe und Spitze das Ausmaß der Torsion des Hebelarmes beeinflusst.

3.4.1.2 Der *tapping*-Modus

Im *tapping*-Modus lässt sich das Problem der Beschädigung der Oberfläche aufgrund starker lateraler Kräfte vermeiden. In diesem Modus ist die Spitze nicht im permanenten Kontakt mit der Oberfläche während des Rasters. Stattdessen wird der *cantilever* durch ein Piezoelement zur Schwingung nahe der Resonanzfrequenz mit einer Amplitude zwischen 30 und 100 nm angeregt und berührt die Oberfläche jeweils nur kurz, wobei nur sehr geringe Lateralkräfte an der Oberfläche entstehen. Im Annäherungsprozess tritt aufgrund von Wechselwirkungen eine Schwingungsdämpfung auf. Um ein topographisches Bild zu erstellen wird der Abstand zwischen Probe und *cantilever* jeweils konstant gehalten. Unterschiede in den Materialeigenschaften, wie Elastizität oder der Adhäsion, führen zu einer Phasenverschiebung, sodass man aus dem Phasenbild Materialunterschiede wie Härteunterschiede in der Probe ermitteln kann. Diese Methode ermöglicht zwar eine weitgehend zerstörungsfreie Abbildung auch sehr weicher Proben, jedoch ist die Abbildungsgeschwindigkeit langsamer und die Messungen sind empfindlicher gegenüber Störungen. Außerdem beeinflussen

verschiedene Variablen wie Elastizität, Viskoelastizität, Adhäsion und Oberflächenladung die gemessenen Variationen in Amplitude und Phase.

3.4.1.3 Messaufbau und Bedingungen

Die Messungen wurden an einem NanoWizard Rasterkraftmikroskop der Firma JPK (Berlin) durchgeführt, das mit einem 100 x 100 μm Scanner ausgestattet ist. Die Messungen in dieser Arbeit wurden ausschließlich im *contact*-Modus durchgeführt, wofür Stäbchen-*cantilever* (CSC37/Al BS) aus Siliziumnitrid (Mikromasch) mit einer Federkonstante von 0,3 bis 0,6 N/m verwendet wurden. Die Präparation der festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten wurde in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben.

3.4.2 Impedanzspektroskopie

3.4.2.1 Theoretische Grundlagen

Die Impedanzspektroskopie liefert Informationen über die Eigenschaften eines elektrochemischen Systems, indem die Frequenzabhängigkeit der Impedanz (Wechselstromwiderstand) gemessen wird.

Beim in dieser Arbeit verwendeten *continuous-wave*-Verfahren wird an das System eine sinusförmige Wechselspannung kleiner Amplitude angelegt und die resultierende Stromantwort gemessen. Bei schrittweiser Variation der Frequenz im gewünschten Messbereich erhält man diskrete frequenzabhängige Werte für die Impedanz des Systems. Das Impedanzspektrum erhält man durch Auftragen der Impedanz gegen die Frequenz.

Zur mathematischen Veranschaulichung werden Spannung, Strom und Impedanz in komplexen Größen dargestellt.

Aus der Wechselspannung

$$U(t, \omega) = U_0 e^{i\omega t} \quad \text{GL-2}$$

$U(t, \omega)$: Momentanwert der Spannung

U_0 : Spannungsamplitude

ω : Kreisfrequenz

t : Zeit

$$i = \sqrt{-1}$$

und dem resultierenden Strom

$$I(t, \omega) = I_0(\omega) e^{i(\omega t - \varphi(\omega))} \quad \text{GL-3}$$

$I(t, \omega)$: Momentanwert des Stromes

$I_0(\omega)$: Stromamplitude

$\varphi(\omega)$: Phasenverschiebung zwischen Spannung $U(t)$ und Strom $I(t)$

ergibt sich nach dem Ohmschen Gesetz die Impedanz, die als Quotient aus Spannung und Stromstärke definiert ist:

$$Z(\omega) = \frac{U(t, \omega)}{I(t, \omega)} = \frac{U_0}{I_0(\omega)} e^{i\varphi(\omega)} = |Z|(\omega) e^{i\varphi(\omega)} \quad \text{GL-4}$$

Die komplexe Impedanz $Z(\omega)$ kann in einen Realteil, den Wirkwiderstand, und einen Imaginärteil, den Blindwiderstand, aufgeteilt werden:

$$Z(\omega) = Z^{re} + iZ^{im} \quad \text{GL-5}$$

Dabei ist der Betrag der Impedanz:

$$|Z| = \sqrt{(Z^{re})^2 + (Z^{im})^2} \quad \text{GL-6}$$

und die Phasenverschiebung:

$$\varphi = \arctan \left(\frac{Z^{im}}{Z^{re}} \right) \quad \text{GL-7}$$

Zur quantitativen Auswertung eines Impedanzspektrums kann das zu untersuchende System mit Hilfe eines Ersatzschaltbildes beschrieben werden. Dieses besteht im Allgemeinen aus Parallel- und Reihenschaltungen von elektrischen Bauteilen und sollte dasselbe frequenzabhängige Impedanzverhalten wie das gemessene elektrochemische System aufzeigen. Den einzelnen Bauelementen können physikalische Eigenschaften des Systems zugeordnet werden.⁸²

3.4.2.2 Impedanzspektroskopische Charakterisierung von Lipiddoppelschichten

Eine Lipiddoppelschicht lässt sich durch eine Membrankapazität C_m und einen dazu parallel geschalteten Membranwiderstand R_m elektrisch beschreiben. Die Kapazität der Membran kann in Analogie zu einem Plattenkondensator

$$C_m = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d} \quad \text{GL-8}$$

- A : Fläche der Membran
- d : Dicke der Membran
- ϵ_0 : elektrische Feldkonstante
- ϵ_r : Dielektrizitätskonstante

beschrieben werden.

Zur Darstellung der elektrischen Eigenschaften des Gesamtsystems müssen jedoch noch weitere Komponenten berücksichtigt werden. Dies führt zur Einführung weiterer Bauelemente in das Ersatzschaltbild des Systems (Abbildung 10).

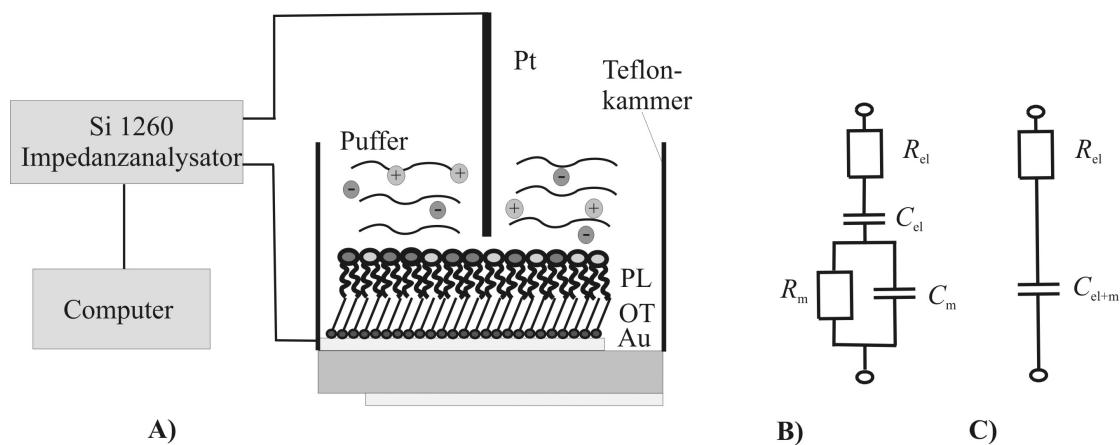


Abbildung 10: **A)** Schematische Darstellung des Messaufbaus für impedanzspektroskopische Untersuchung einer festkörperunterstützten Membran immobilisiert auf einer der beiden Goldoberflächen (Au) eines Schwingquarzes, Oktanthiol- (OT) und Phospholipidschicht (PL), die mit einer Elektrolytlösung (Puffer) überschichtet ist. Mittels eines Impedanzanalysators, gesteuert über einen Computer, wird die frequenzabhängige Impedanz bestimmt. Als Arbeitselektrode diente die beschichtete Goldelektrode, und ein in die Flüssigkeit eingetauchter, platinierter Platindraht (Pt) wurde als Gegenelektrode verwendet. **B)** Ersatzschaltbild für das System. C_m und R_m beschreiben die Kapazität und den Widerstand der Membran, der Elektrolytwiderstand wird durch R_{el} , und die Kapazität der elektrochemischen Doppelschicht an der Grenzfläche durch C_{el} ausgedrückt. **C)** Vereinfachtes Ersatzschaltbild, geltend für hohe Membranwiderstände, mit zusammengefasster Kapazität C_{el+m} .

Zusätzlich zu Widerstand und Kapazität der Membran müssen noch der Elektrolytwiderstand R_{el} und die Kapazitäten C_{el} , die sich aus der elektrochemischen Doppelschicht an der Grenzfläche ergibt, berücksichtigt werden (Abbildung 10 B). Im Falle hoher spezifischer Membranwiderstände von mehr als $1 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-2}$ lassen sich die beiden Kapazitäten C_{el} und C_m im verwendeten Messbereich von 10^{-1} bis 10^6 Hz nicht mehr unterscheiden. Dadurch lässt sich das Ersatzschaltbild zu einer Reihenschaltung aus einer Kapazität C_{el+m} und dem Widerstand R_{el} vereinfachen (Abbildung 10 C).

3.4.2.3 Messaufbau und Bedingungen

Für die impedanzspektroskopischen Untersuchungen der auf Goldelektroden immobilisierten Oktanthiolmonoschichten und der Oktanthiol–Lipid–Doppelschichten wurde der Impedanzanalysator der Firma Solartron Instruments (Farborough, Großbritannien) verwendet. Bei den Messungen wurde die Goldelektrode des Quarzes als Arbeitselektrode und ein in die überstehende Flüssigkeit eingetauchter, platinierter Platindraht als Gegenelektrode eingesetzt (Abbildung 10 A).

Es wurden sinusförmige Wechselspannungen in einem Frequenzbereich von 10^{-1} bis 10^6 Hz mit einer Amplitude von 30 mV angelegt und der frequenzabhängige Betrag der Impedanz des Systems mit der zugehörigen Phasenverschiebung gemessen. Für das Impedanzspektrum wurden 71 Messpunkte in äquidistanten Abständen auf einer logarithmischen Skala aufgenommen. Mit Hilfe einer nicht-linearen Kurvenanpassung (*non-linear least square fit*) wurden die Kapazität C_{el+m} und R_{el} des Ersatzschaltbildes nach Gleichung 9 an die Messdaten angepasst.

$$|Z| = \sqrt{R_{el}^2 + \left(\frac{1}{\omega C_{el+m}} \right)^2} \quad \text{GL-9}$$

3.4.3 Die Quarzmikrowaage-Technik

Aus dem Zusammenhang zwischen abgeschiedener Masse und Resonanzfrequenzänderung eines Dickenscherschwingquarzes kann mit der Quarzmikrowaage (QCM, *quartz crystal microbalance*)-Technik die Masse eines auf der Quarzoberfläche abgeschiedenen Materials quantifiziert werden. Diese Methode ist sehr sensitiv, sodass es möglich ist, kleinste Mengen an Material nachzuweisen. Das Prinzip der QCM ist schon seit den 50er Jahren bekannt und wurde zur Massen- und Dickenbestimmung von dünnen Schichten an Luft oder im Vakuum eingesetzt. Erst seit den 80er Jahren kann diese Technik auch in Flüssigkeiten betrieben werden, sodass sich

die Vielfalt der Einsatzgebiete der QCM-Technik enorm vergrößerte. So wird diese Methode nicht nur zur Bestimmung der Dicke und der Masse von dünnen Filmen oder in der Elektrochemie^{83,84} verwendet, sondern spielt auch vermehrt in der Chemo- und Biosensorik eine Rolle, wie etwa zur Bestimmung von Toxinen, Proteinen, Enzymen, Immunkomponenten, Mikroorganismen oder DNA.⁸⁵⁻⁹²

3.4.3.1 Das Schwingungsverhalten von TSM-Resonatoren

TSM (*thickness shear mode*)-Resonatoren, auch als BAW (*bulk acoustic wave*)-Sensoren bekannt, sind meist dünne Plättchen aus piezoelektrischem Material und können durch Anlegen einer entsprechenden Wechselspannung über auf beiden Seiten aufgebrachte Metallelektroden zur resonanten Dickenscherschwingung angeregt werden. Diese tritt als stehende Welle, die aus der Überlagerung einer halben Welle mit ihrer Reflexion entsteht, zwischen den beiden Oberflächen im Bereich der sich überlappenden Elektroden des Quarzes auf.⁹³

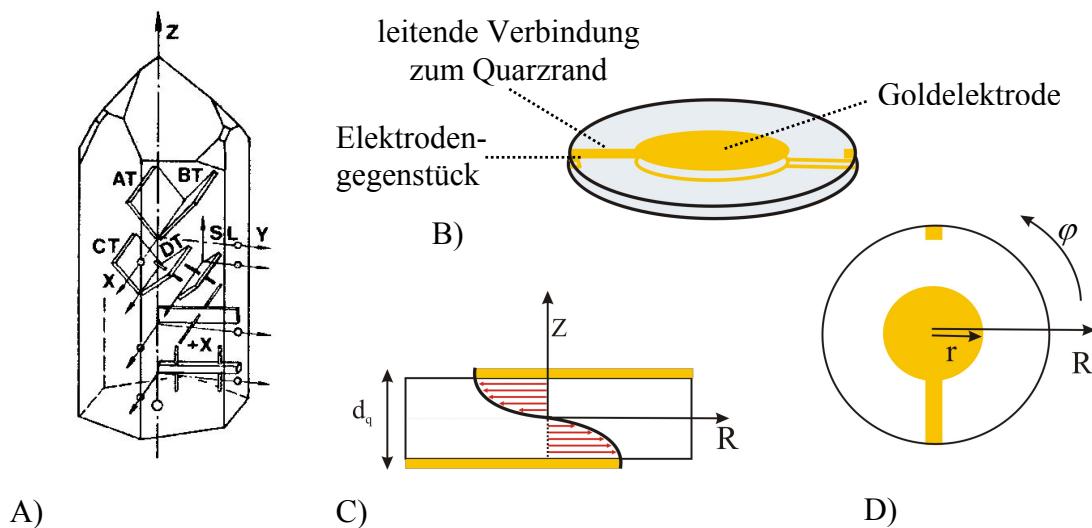


Abbildung 11: A) α -Quarz mit eingezeichneten Schnittwinkeln für verschiedene Resonatoren.⁹⁴ B) Mit Goldelektroden bedampfter AT-cut Quarz. Die Elektrode kann über den Quarzrand mit einem kleinen Elektrodengegenstück leitend verbunden werden, sodass beide Elektroden von der gleichen Seite kontaktiert werden können. C) Grundschwingung eines Dickenscherschwingers mit der Quarzdicke d_q . D) Draufsicht auf ein mit Goldelektroden mit Radius r beschichtetes Quarzplättchen. In C) und D) beschreiben R , Z und φ den Quarz in Zylinderkoordinaten.

Die Teilchenauslenkung erfolgt parallel zur Oberfläche, die Wellenfortpflanzung senkrecht dazu. Bei $z = 0$ (Abbildung 11) liegt bei der Transversalwelle der Scherschwingung ein Knotenpunkt, an den beiden Oberflächen ($z = \pm d_q/2$) ein Schwingungsbauch vor. Somit entspricht die Dicke d_q des Quarzplättchens genau einer halben Wellenlänge der Schwingung. Um die Temperaturabhängigkeit der

Resonanzfrequenz zu minimieren, die Überlagerung anderer Wellen zu unterdrücken und eine hohe Frequenzstabilität zu erzielen, werden als TSM-Resonatoren sogenannte AT-cut-Quarze verwendet, deren Schnittwinkel genau $35^\circ 10'$ zur optischen Achse beträgt.^{91,95}

Die Resonanzfrequenz f_0 eines AT-cut-Quarzes mit der transversalen Ausbreitungsgeschwindigkeit $v_{tr} = 3,34 \cdot 10^4 \text{ m s}^{-1}$ mit dem Elastizitätsmodul $\mu_q = 2.957 \cdot 10^{10} \text{ N/m}^2$ und der Dichte $\rho_q = 2651 \text{ kg/m}^3$, sowie der Dicke $d_q = 0.33 \text{ mm}$ für 5 MHz Quarz lässt sich wie folgt definieren:

$$f_0 = \frac{v_{tr}}{2d_q} = \frac{1}{2d_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} . \quad \text{GL-10}$$

Elektrische und mechanische Beschreibung der Dickenscherschwingung

Die Oszillation des Quarzes kann in Analogie zu einem eindimensionalen gedämpften harmonischen Oszillatoren, und durch ein elektrisches Modell, einen elektrischen Serienschwingkreis verstanden werden.⁹³

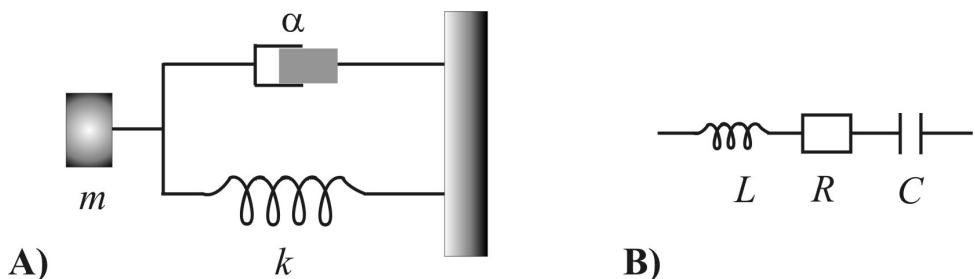


Abbildung 12: A) Eindimensionaler gedämpfter harmonischer Oszillatormodell. Ein Block m ist über eine Feder mit der Federkonstanten k an eine Wand gekoppelt ist. Parallel zur Feder ist ein Dämpfungselement mit einer Dämpfungskonstante α angebracht. B) Serienschaltung aus Spule mit Induktivität L , Widerstand R und Kondensator mit Kapazität C .

Die beiden Modelle bestehen aus klassischen mechanischen bzw. elektrischen Bauelementen, denen jeweils eine bestimmte Eigenschaft zugeordnet ist. Abbildung 12 A zeigt das mechanische Modell aus einer reibungsfrei gelagerten Masse m , die über eine Feder mit der Federkonstanten k an eine Wand gekoppelt ist. Parallel zur Feder ist ein Dämpfungsglied angebracht, dessen Dämpfung proportional zur Auslenkungsgeschwindigkeit der Masse mit der Dämpfungskonstante α ist. Die Bewegungsgleichung für dieses System mit der Auslenkung x und der Zeit t ist gegeben durch

$$m \frac{d^2x}{dt^2} + \alpha \frac{dx}{dt} + kx = 0 \quad \text{GL-11}$$

mit der Lösung für die Resonanzfrequenz f_0

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}. \quad \text{GL-12}$$

Das elektrische Modell besteht aus einer Serienschaltung einer Spule, eines Widerstandes und eines Kondensators (Abbildung 12 B). Die Induktivität L entspricht der Masse, der Widerstand R der Dämpfung und die inverse Kapazität $1/C$ der Federkonstanten k . Die Gleichung für das elektrische System ist analog zum mechanischen System, wobei die Auslenkung x durch die Ladung Q ersetzt wird

$$L \frac{d^2Q}{dt^2} + R \frac{dQ}{dt} + \frac{1}{C} Q = 0. \quad \text{GL-13}$$

Die daraus resultierende Resonanzfrequenz f_0 ist demnach

$$f_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}. \quad \text{GL-14}$$

Zur vollständigen elektrischen Beschreibung eines TSM-Resonators muss die parallel zum Serienschwingkreis auftretende Kapazität C_0 , welche durch die auf die Quarzflächen aufgedampften Elektroden zustande kommt, berücksichtigt werden, was zu dem sogenannten Butterworth-Van Dyke (BVD)-Ersatzschaltkreis führt (Abbildung 13 A).

Im Bereich der Resonanzfrequenzen des Quarzes entspricht der Kapazität C_1 die mechanische Elastizität des Quarzes, der Induktivität L die schwingende Masse, dem Ohmschen Widerstand R die Dämpfung. Die parallel dazu geschaltete Kapazität C_0 beschreibt die Admittanz entfernt von den Resonanzfrequenzen.^{91,93,96}

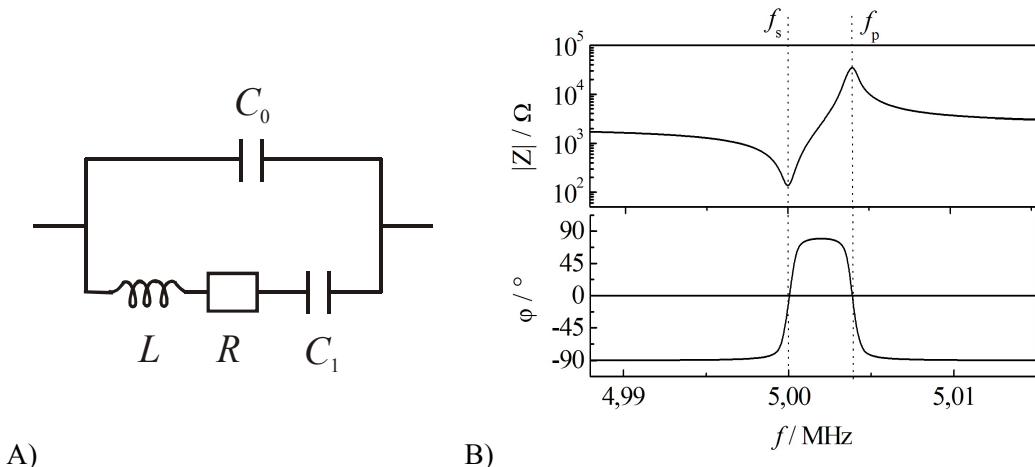


Abbildung 13: A) BVD-Ersatzschaltbild. Die Kapazität C_1 beschreibt die mechanische Elastizität des Quarzes, die Induktivität L die schwingende Masse, der Widerstand R die Dämpfung und die Kapazität C_0 die Admittanz entfernt von der Resonanz. B) Simuliertes Bode-Diagramm eines BVD-Ersatzschaltbildes im Bereich der Resonanzfrequenz mit den Parametern $C_0 = 14 \text{ pF}$, $C_1 = 21,65 \text{ fF}$, $R = 100 \Omega$, $L = 46,8 \text{ mH}$ und den daraus sich ergebenden Resonanzfrequenzen f_s (Serienresonanz) und f_p (Parallelresonanz).

Das Impedanzverhalten eines TSM-Resonators im Bereich seiner Resonanzfrequenz ist in Abbildung 13 B als Simulation nach dem BVD-Modell gezeigt. Der Quarz weist zwei Resonanzfrequenzen f_s (Serienresonanz) und f_p (Parallelresonanz) bei einer Phasenverschiebung $\varphi = 0$ auf. Bei vernachlässigbarer Dämpfung fallen diese mit dem Minimum ($f_{Z\min}$) bzw. dem Maximum ($f_{Z\max}$) der Impedanz zusammen.

Bei nicht vernachlässigbarer Dämpfung – dies entspricht einer Erhöhung des Widerstands R im Ersatzschaltbild – sinkt der Maximalwert der Phasenverschiebung. Gleichzeitig treten die Phasennulldurchgänge und die Impedanzextrema nicht mehr bei gleichen Frequenzen auf. Bei weiterer Erhöhung des Widerstands R fällt das Phasenmaximum unter Null, sodass im aktiven Modus aufgrund der Oszillatorschaltkreisbedingungen ($\varphi > 0$) keine resonante Schwingung mehr stattfinden kann, sondern nur noch eine erzwungene Schwingung im passiven Modus möglich ist.^{91,96} Abbildung 14 zeigt ein simulierte Impedanzspektrum auf Basis des BVD-Modells bei nicht-vernachlässigbarer Dämpfung.⁹¹

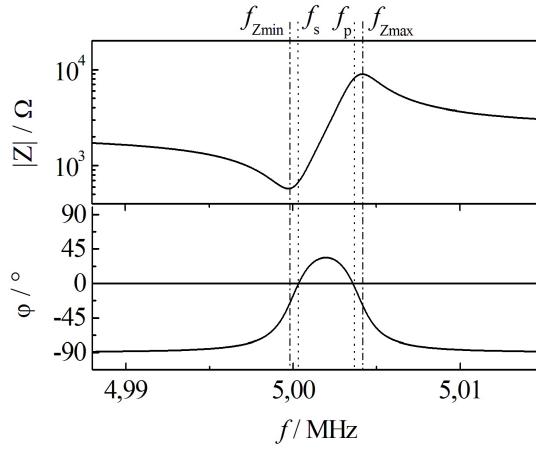


Abbildung 14: Simuliertes Impedanzspektrum auf Basis des BVD-Modells bei nichtvernachlässigbarer Dämpfung mit den Parametern $C_0 = 14 \text{ pF}$, $C_1 = 21,65 \text{ fF}$, $R = 600 \Omega$, $L = 46,8 \text{ mH}$. Die Phasennulldurchgänge f_s bzw. f_p fallen nicht mehr mit den Impedanzextrema $f_{Z\min}$ bzw. $f_{Z\max}$ zusammen. Das Phasenmaximum liegt deutlich unter 90° .

Die Resonanzfrequenzen lassen sich durch die in Tabelle 3 aufgeführten Ausdrücke aus den Parametern C_0 , C_1 , R und L ermitteln.

Tabelle 3: Mathematischer Zusammenhang zwischen den Resonanzfrequenzen und den Parametern aus dem BVD-Modell.⁹¹

Parameter	Ausdruck
f_s	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{LC_1}} \left(1 + \frac{C_0 R^2}{2L} \right)$
f_p	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{LC_1}} \left(1 + \frac{C_1}{2C_0} - \frac{C_0 R^2}{2L} \right)$
$f_{Z\min}$	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{LC_1}} \left(1 - \frac{C_0 R^2}{2L} \right)$
$f_{Z\max}$	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{LC_1}} \left(1 + \frac{C_1}{2C_0} + \frac{C_0 R^2}{2L} \right)$

Die in Gleichung 14 beschriebene Resonanzfrequenz f_0 entspricht der Serienresonanzfrequenz f_s des BVD-Modells bei vernachlässigbarer Dämpfung.

3.4.3.2 Beladung eines TSM-Resonators

Der auf einer Seite beladene Quarz kann elektrisch und mechanisch durch eine Reihe verschiedener Ansätze (unter Annahme entsprechender Näherungen) beschrieben werden:

- Das *Transmission-Line* (TL)-Modell basiert auf einem eindimensionalen Modell der Erzeugung und Fortpflanzung akustischer Wellen in Multischichten aus piezoelektrischen und nicht-piezoelektrischen Schichten.⁹⁷
- Ausgehend vom TL-Modell wird in der Darstellung durch ein modifiziertes BVD-Modell die elektrische Impedanz des beladenen Quarzes in einen Parallelschaltkreis einer statischen Kapazität C_0 und eine dynamische Impedanz Z_m aufgeteilt, welche wiederum aus der dynamischen Impedanz des unbeladenen Quarzes und der Beschichtung zusammengesetzt ist. Die dynamische Impedanz der Beschichtung wird durch einen zusätzlichen Widerstand und eine zusätzliche Induktivität im BVD-Ersatzschaltkreis dargestellt.^{97,98}
- Das *Acoustic-Load* (AL)-Konzept beschreibt den direkten Zusammenhang der gesamten akustischen Lastimpedanz Z_L von einer oder mehreren Schichten der Beladung und zwei messtechnisch wichtigen Größen, der Änderung der Resonanzfrequenz des Sensors und der Änderung des dynamischen Widerstandes, welcher äquivalent zur Dämpfung der Quarzschwingung ist.⁹⁷

Im Folgenden werden verschiedene Beladungszustände eines TSM-Resonators anhand des AL-Konzeptes dargestellt.

Um den Einfluss von verschiedenen Beladungen der Quarzoberfläche zu charakterisieren, wird die gesamte akustische Lastimpedanz Z_L verwendet, welche die komplette Beladung des Quarzes wiederspiegelt, unabhängig davon, welcher Art die Beladung ist (starre Masse, Newton'sche Flüssigkeit, Masse und Flüssigkeit, viskoelastische Schichten usw.). Eine Veränderung der akustischen Lastimpedanz bewirkt eine Änderung der elektrischen Impedanz des Quarzes und ist somit für die Resonanzfrequenzänderung und die Änderung der Dämpfung des Quarzes verantwortlich.⁹⁷

Über verschiedene Parameter des Quarzes kann ein direkter Bezug zwischen der komplexen akustischen Lastimpedanz Z_L und zwei direkt messbaren Parametern des Quarzes, nämlich die Änderung der Resonanzfrequenz Δf_r und des dynamischen Widerstandes ΔR_r im BVD-Modell, welcher die Güte $Q = \omega L/R$ und somit die Energiedissipation der Schwingung wiederspiegelt, hergestellt werden.⁹⁷ Als Wert für die Resonanzfrequenz f_r wird in diesem Fall die Frequenz bei maximalem Realteil der

Admittanz $\text{Max}(\text{Re}(1/Z_{\text{el}}))$ verwendet, und der Widerstand R_r ist der reziproke Wert des Realteils der Admittanz bei f_r .

Nach dem AL-Konzept hängt der Imaginärteil der Lastimpedanz $\text{Im}(Z_L)$ mit der Änderung der Frequenz $\Delta f_r = f_r - f_0$ aufgrund einer Beladung über folgende Gleichung.⁹⁷

$$\frac{\Delta f_r}{f_0} = -\frac{\text{Im}(Z_L)}{\pi \sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad \text{GL-15}$$

zusammen.

Der Realteil der Lastimpedanz $\text{Re}(Z_L)$ steht mit der Änderung des Widerstandes ΔR_r , und somit mit der Dämpfung der Schwingung über

$$\frac{\Delta R_r}{2\omega_0 L} = \frac{\text{Re}(Z_L)}{\pi \sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad \text{GL-16}$$

in Zusammenhang. Die Induktivität L des unbeladenen Quarzes und seine mechanische Resonanzfrequenz $f_0 = \omega_0/2\pi$ sind gerätespezifisch und müssen durch eine Kalibriermessung des unbeladenen Quarzes ermittelt werden.

Dieses Modell kann auf unterschiedliche Oberflächenbelegungen des Quarzes angewendet werden. So ergibt sich für einen einzelnen Film (Index f) auf der Quarzoberfläche die Lastimpedanz Z_L

$$Z_L = i\omega \rho_f h_f \frac{\tan \varphi}{\varphi} = iM V \quad , \quad \text{GL-17}$$

mit

$$\varphi = \omega h_f \sqrt{\rho_f / G_f} \quad , \quad \text{GL-18}$$

wobei h_f die Schichtdicke, ρ_f die Dichte der Beladung und $G_f = G_f' + iG_f''$ der Schermodul ist, der sich aus dem Speichermodul G' und dem Verlustmodul G'' zusammensetzt. $M = \omega \rho_f h_f$ repräsentiert den Masseeffekt, und der akustische Faktor $V = \tan \varphi / \varphi$ ist ein Maß für die viskoelastischen Effekte.

a) Beladung mit einer starren Masse

Im Falle einer Beladung mit einer dünnen starren Masse kann die akustische Lastimpedanz Z_M für kleine $\varphi \equiv \tan\varphi$ vereinfacht ausgedrückt werden durch⁹⁷

$$Z_M = i\omega\rho_M h_M \quad \text{GL-19}$$

mit der Dichte ρ_M und der Schichtdicke h_M der starren Masse.

Nach Einsetzen von Z_M in das AL-Konzept erhält man aus Gleichung 15 den Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung Δf_r^M und physikalischen Parametern der Masse und des Quarzes

$$\frac{\Delta f_r^M}{f_0} = -\omega \frac{\rho_M h_M}{\pi \sqrt{\mu_q \rho_q}}. \quad \text{GL-20}$$

Da die Lastimpedanz keinen Realteil besitzt, ist nach Gleichung 16 die Änderung des Dämpfungswiderstandes $R_r^M = 0$.

Diese Beziehung entspricht mit $\omega = \omega_0$ der von Sauerbrey 1959 hergeleiteten linearen Beziehung zwischen der mechanischen Resonanzfrequenzänderung Δf und der Massenabscheidung $\Delta m = \rho_M h_M A$ an der Oberfläche

$$\Delta f_M = -f_0 \frac{h_M}{d_q} = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} = -S_f \Delta m, \quad \text{GL-21}$$

mit der integralen Schichtwägeempfindlichkeit S_f und der Fläche A .

Schichtwägeempfindlichkeit

Die von Sauerbrey hergeleitete lineare Beziehung zwischen Resonanzfrequenz- und Massenänderung gilt nur unter der Annahme, dass die aufgetragene Masse dieselbe Dichte besitzt wie der Quarz, sich gleichmäßig und fest auf dessen Fläche A verteilt und die Massenbeladung nicht mehr als etwa 0,5 % der ursprünglichen Quarzmasse beträgt.⁸⁴ Da, wie aus Gleichung 21 ersichtlich, die integrale Schichtwägeempfindlichkeit ($S_f = 0.057 \text{ Hz cm}^2/\text{ng}$ für 5 MHz Quarze) quadratisch mit der Resonanzfrequenz steigt, kann die Empfindlichkeit der Messung durch den Einsatz von Schwingquarzen mit

höherer Resonanzfrequenz gesteigert werden. Da diese jedoch auch entsprechend dünner sind, ist aus praktischen Gründen eine natürliche Limitierung gegeben. Die Schichtwägeempfindlichkeit lässt sich auch durch die Anregung des Quarzes zu Oberschwingungen erzielen, da die Schichtwägeempfindlichkeit proportional zur Schwingzahl steigt. Durch die Resonanzbedingungen können TSM-Resonatoren nur zu ungeraden Oberschwingungen ($n = 3, 5$ usw.) angeregt werden. Das bedeutet, ein 5 MHz-Quarz, der beispielsweise zur dritten Oberschwingung angeregt wird, schwingt mit dreifach erhöhter Resonanzfrequenz, also mit 15 MHz, und hat somit eine um den Faktor 3 erhöhte Schichtwägeempfindlichkeit.

Aufgrund der radialen Verteilung der Schwingungsamplitude des Quarzes ist die Schichtwägeempfindlichkeit nicht auf der ganzen Quarzoberfläche konstant, sondern wird korrekt mit einer Besselfunktion beschieben. Die Schichtwägeempfindlichkeit ist in der Mitte des Quarzes ($R = 0$) (Abbildung 11 d) am größten und nimmt zum Rand hin monoton ab. Die Beschränkung der Schichtwägeempfindlichkeit auf die Elektrodenflächen ($R \leq r$) kann durch Energieeinfang (*energy trapping*) erklärt werden, der durch veränderte Resonanzbedingungen des mit Elektroden beschichteten Bereichs des Quarzes im Vergleich zum nicht-beschichteten Quarz zustande kommt.^{91,93} Aufgrund der radialen Verteilung der Schichtwägeempfindlichkeit ist eine gleichmäßige Verteilung der zu detektierenden Masse über die Sensoroberfläche nötig, um die Proportionalität zwischen Massenänderung und gemessener Frequenzänderung zu gewährleisten.

b) Beladung mit einer Newton'schen Flüssigkeit

Ist der Quarz auf einer Seite mit einer idealen Newton'schen Flüssigkeit überschichtet, so pflanzt sich die Scherwelle senkrecht zur Oberfläche in die Flüssigkeit hinein fort und wird dort gedämpft (Abbildung 15).

Die gedämpfte Welle mit der Resonanzfrequenz f kann als Geschwindigkeit $v(z,t)$ der Flüssigkeitsschicht in Höhe z vom Quarzmittelpunkt zur Zeit t folgendermaßen ausgedrückt werden:⁹⁹

$$v(z,t) = A \cdot \exp\left(-\frac{z - d_q/2}{\delta}\right) \cos\left(\frac{z - d_q/2}{\delta} - \omega t\right). \quad \text{GL-22}$$

Dabei beschreiben d_q die Dicke des Quarzes und A die Amplitude der Welle an der Grenzfläche $z = d_q/2$ zwischen Quarz und Flüssigkeit. Als einhüllende Funktion der

gedämpften Welle entsteht eine exponentielle Abklingkurve (Abbildung 15, gepunktete Linie). Die Abklinglänge δ beschreibt die Eindringtiefe der Welle in die Flüssigkeit, bei der ihre Amplitude um den Faktor e gefallen ist und kann aus der Dichte ρ_{Fl} und Viskosität η_{Fl} der Flüssigkeit bestimmt werden:⁹⁹

$$\delta = \sqrt{\frac{\eta_{\text{Fl}}}{\pi f_0 \rho_{\text{Fl}}}}. \quad \text{GL-23}$$

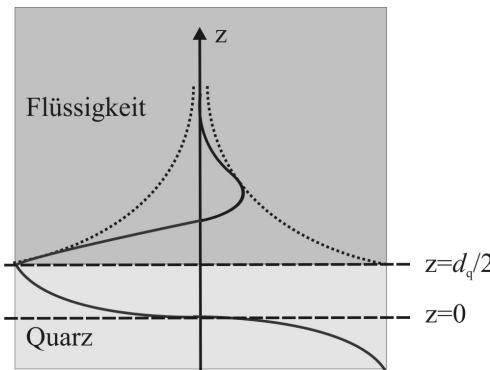


Abbildung 15: Fortpflanzung der Scherwelle des Quarzes in die überstehende Flüssigkeit. Die Dämpfung der Welle kann durch die einhüllende Funktion (gepunktete Linie) charakterisiert werden.

Für Wasser beträgt die Abklinglänge eines 5-MHz-Quarzes 250 nm.⁹⁶

Die Überschichtung des Quarzes mit einer semi-infinitiven Newton'schen Flüssigkeit liefert eine akustische Lastimpedanz Z_{Fl} von⁹⁷

$$Z_{\text{Fl}} = \sqrt{i \rho_{\text{Fl}} \omega \eta_{\text{Fl}}} = (1+i) \sqrt{\frac{\omega \rho_{\text{Fl}} \eta_{\text{Fl}}}{2}}, \quad \text{GL-24}$$

unter der Annahme, dass $G' = 0$ und $G'' = i \omega \eta_{\text{Fl}}$. Die Dicke $h_{\text{Fl}} \gg \delta$ (Abklinglänge), wodurch $i \tan \phi = 1$ ist.

Nach dem AL-Konzept kann aus den Gleichungen 15, 16 und 17 ein Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung Δf_r^{Fl} und der Änderung des Dämpfungswiderstandes ΔR_r^{Fl} aufgrund der Überschichtung des Quarzes mit einer Flüssigkeit folgendermaßen hergestellt werden:

$$\frac{\Delta f_r^{\text{Fl}}}{f_0} = -\frac{1}{\pi\sqrt{\mu_q\rho_q}}\sqrt{\frac{\omega\rho_{\text{Fl}}\eta_{\text{Fl}}}{2}} \quad \text{GL-25}$$

und

$$\frac{\Delta R_r^{\text{Fl}}}{2\omega_0 L} = -\frac{1}{\pi\sqrt{\mu_q\rho_q}}\sqrt{\frac{\omega\rho_{\text{Fl}}\eta_{\text{Fl}}}{2}}. \quad \text{GL-26}$$

Für die Änderung der Resonanzfrequenz eines Schwingquarzes nach Überschichtung mit einer Flüssigkeit bestimmten Kanazawa und Gordon⁹⁹ in Übereinstimmung mit Gleichung 25 für $\omega = \omega_0$:

$$\Delta f_{\text{Fl}} = -f_0^{\frac{3}{2}}\sqrt{\frac{\rho_{\text{Fl}}\eta_{\text{Fl}}}{\pi\mu_q\rho_q}}. \quad \text{GL-27}$$

Für die Änderung des Dämpfungswiderstandes ergibt sich aus Gleichung 26:

$$\Delta R_r^{\text{Fl}} = \frac{4f_0^{\frac{3}{2}}L_q}{\sqrt{\mu_q\rho_q}}\sqrt{\pi\rho_{\text{Fl}}\eta_{\text{Fl}}}. \quad \text{GL-28}$$

Während der Widerstand R_r aus der Impedanzanalyse des Quarzes als Maß für die Dämpfung bestimmt werden kann, wird in der dissipativen Quarzmikrowaagentechnik (QCM-D), welche in den Kapiteln 3.4.3.3 und 3.4.3.4 beschrieben wird, der Dissipationsfaktor D der Schwingung ermittelt, welcher die Dämpfung der Schwingung wiederspiegelt. Der Dissipationsfaktor entspricht dem Verhältnis aus dissipierter und gespeicherter Energie der Schwingung.

Rodahl et al. stellten als Maß für die Dämpfung der freien Quarzschwingung in Flüssigkeiten einen Zusammenhang zwischen der Änderung des Dissipationsfaktors $\Delta D = \Delta Q^{-1} = \Delta R_r/\omega L$ nach Beladung mit einer Flüssigkeit, der Dichte ρ_{Fl} und Viskosität η_{Fl} , sowie der Dicke d_q und der Dichte ρ_q des Quarzes her, die sich auch aus Gleichung 28 nach Einsetzen von Gleichung 10 herleiten lässt:¹⁰⁰⁻¹⁰²

$$\Delta D = \frac{\Delta E_{\text{dissipiert}}}{2\pi E_{\text{gespeichert}}} = \frac{\sqrt{\rho_{\text{Fl}}\eta_{\text{Fl}}}}{\sqrt{\pi f} d_q \rho_q}. \quad \text{GL-29}$$

c) *Beladung mit einer starren Masse und einer Newton'schen Flüssigkeit*

Belegt man den Quarz in Kontakt mit Flüssigkeit zusätzlich noch mit einer Fremdmasse, so lässt sich die Lastimpedanz Z_{M+Fl} näherungsweise durch eine lineare Kombination aus der Lastimpedanz nach Massenbeladung Z_M und Beladung mit einer Flüssigkeit Z_{Fl} schreiben:^{97,98}

$$Z_{M+Fl} = i\omega\rho_M h_M + (1+i)\sqrt{\frac{\omega\rho_{Fl}\eta_{Fl}}{2}}. \quad \text{GL-30}$$

So entspricht die Änderung des Dämpfungswiderstandes ΔR_r^{M+Fl} , der aus dem Realteil der akustischen Lastimpedanz ermittelt werden kann, dem bei reiner Beladung mit einer Newton'schen Flüssigkeit (GL-28). Die Änderung der Frequenz setzt sich additiv aus der Änderung der Frequenz aufgrund der Beladung des Quarzes mit einer starren Masse (GL-20) und der Änderung durch die Überschichtung mit einer Newton'schen Flüssigkeit (GL-25) zusammen:

$$\frac{\Delta f_r^{M+F}}{f_0} = -\omega \frac{\rho_M h_M}{\pi\sqrt{\mu_q\rho_q}} - \frac{1}{\pi\sqrt{\mu_q\rho_q}} \sqrt{\frac{\omega\rho_{Fl}\eta_{Fl}}{2}} \quad \text{GL-31}$$

$$\Delta f_r^{M+F} = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_q\rho_q}} - f_0^{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{\rho_{Fl}\eta_{Fl}}{\pi\mu_q\rho_q}} = -S_f \Delta m - f_0^{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{\rho_{Fl}\eta_{Fl}}{\pi\mu_q\rho_q}}. \quad \text{GL-32}$$

Für gleichbleibende Viskosität und Dichte der Flüssigkeit während einer Messung geht die Gleichung wieder in die Sauerbrey-Gleichung über, und die Frequenzänderung verhält sich proportional zur Massenbeladung.

c) *Beladung des Quarzes mit einer dünnen viskoelastischen Schicht*

Die von Sauerbrey hergeleitete lineare Beziehung zwischen Frequenzänderung und Fremdmassenbelegung gilt nur für dünne, starre Massen. Wird auf die Quarzoberfläche eine viskoelastische Schicht mit genügend geringem Schermodul G aufgebracht, so wirkt sich dies nicht nur auf die Frequenz, sondern auch auf die Dämpfung der Quarzschwingung aus.

Die Lastimpedanz Z_{V+Fl} einer viskoelastischen Schicht (Index V) in Flüssigkeit (Index Fl) kann ausgedrückt werden durch⁹⁷

$$Z_{V+Fl} = i\omega\rho_V h_V \left(1 - \frac{\omega\rho_{Fl}\eta_{Fl}(G' - iG'')}{\rho_V(G'^2 + G''^2)} \right) + (1+i)\sqrt{\frac{\omega\rho_{Fl}\eta_{Fl}}{2}}, \quad GL-33$$

wobei ρ_V die Dichte, h_V die Dicke und $G = G' + iG''$ der Schermodul der viskoelastischen Schicht ist. Unter Vernachlässigung des Beitrags der Flüssigkeit lassen sich für die Frequenzänderung Δf_r^{V+Fl} und die Änderung des Dämpfungswiderstandes ΔR_r^{V+Fl} folgende Beziehungen herstellen:^{97,103}

$$\Delta f_r^{V+Fl} \propto \omega\rho_V h_V \left(1 - \frac{\omega\rho_{Fl}\eta_{Fl}G''}{\rho_V(G'^2 + G''^2)} \right) \quad GL-34$$

$$\Delta R_r^{V+Fl} \propto \omega\rho_V h_V \left(\frac{\omega\rho_{Fl}\eta_{Fl}G'}{\rho_V(G'^2 + G''^2)} \right). \quad GL-35$$

Aus Gleichung 34 ist ersichtlich, dass die Proportionalität zwischen Frequenzänderung und adsorbiertener Masse $\Delta m = \rho_V h_V A$ nach Sauerbrey nicht mehr gegeben ist, sondern sich eine geringere Frequenzänderung für die Adsorption einer viskoelastischen Masse Δm ergibt, als für eine starre Masse erwartet werden würde. Dieser sogenannte „missing mass“-Effekt spiegelt sich in der Subtraktion des Terms in Gleichung 34 wieder. Der Zusammenhang zwischen der „gewogenen“ Masse $\Delta m'$ und der tatsächlich abgeschiedenen Masse Δm ergibt sich aus:¹⁰³

$$\Delta m' = \Delta m \left(1 - \frac{\omega\rho_{Fl}\eta_{Fl}G'}{\rho_V(G'^2 + G''^2)} \right). \quad GL-36$$

Die Belegung des Quarzes mit einer viskoelastischen Schicht an Luft führt zu einer größeren Frequenzänderung als nach der Sauerbrey-Gleichung (GL-21) für eine starre Masse erwartet. Die Frequenzänderung Δf_r^V und die Änderung des Dämpfungswiderstandes ΔR_r^V nach Belegung mit einer dünnen viskoelastischen Schicht lassen sich beschreiben durch:

$$\Delta f_r^V \propto \omega\rho_V h_V \left(1 + \frac{1}{3} \frac{(\omega\rho_V\eta_V)^2 G'}{\rho_V(G'^2 + G''^2)} \right) \quad GL-37$$

und

$$\Delta R_r^V \propto \omega \rho_v h_v \left(1 + \frac{1}{3} \frac{(\omega \rho_v \eta_v)^2 G''}{\rho_v (G'^2 + G''^2)} \right). \quad \text{GL-38}$$

Der sogenannte „*extra mass*“-Effekt wird durch die Addition des Terms in Gleichung 37 deutlich.

3.4.3.3 Betriebsmodi

Passiver Modus

Im passiven Modus schwingt der Quarz nicht frei, sondern führt eine erzwungene Schwingung aus. Es wird eine Wechselspannung an die beiden Elektroden des Quarzes angelegt und die Frequenz im Bereich seiner Resonanzfrequenzen variiert. Aus der daraus resultierenden Stromantwort erhält man das Impedanzverhalten des Quarzes, aus dem die entsprechenden Parameter des BVD-Ersatzschaltbildes ermittelt werden können.

Aktiver Modus

Im aktiven Modus ist der Quarz in eine Rückkopplungsschleife eines Oszillatorschaltkreises eingebaut und wirkt aufgrund der hohen Güte der Schwingung somit als frequenzbestimmendes Bauteil. Die Frequenz des Quarzes kann durch einen Frequenzzähler ausgelesen werden. In diesem Modus wird je nach Oszillatorschaltkreis meist die Frequenz bei minimaler Impedanz $f_{Z_{\min}}$ bestimmt. Der Vorteil dieser Messmethode ist die hohe zeitliche Auflösung.

Die QCM-D-Technik

Die 1996 von Rodahl et al. entwickelte QCM-D-Technik zeichnet sich durch die simultane Bestimmung der Resonanzfrequenz f und des Dissipationsfaktors D aus, welcher invers zur Güte der Schwingung ist. So können neben der Quantifizierung der Fremdmassenbelegung auch Aussagen über die Viskosität der Schicht bzw. der überlagerten Flüssigkeit gemacht werden.^{100-102,104,105} Der Quarz wird in Intervallen durch Wechselspannung, die möglichst nahe an seiner Resonanzfrequenz liegt, zur Schwingung angeregt. Danach wird der Signalgenerator abgekoppelt und die freie Quarzschwingung detektiert. Aus ihrer Abklingkurve wird die Frequenz f und die Dämpfung als Dissipationsfaktor D ermittelt.

3.4.3.4 Messaufbau

Zur Untersuchung der Adsorption von Proteinen in wässriger Lösung an eine auf einer Goldelektrode immobilisierten festkörperunterstützten Membran wurde die QCM-Technik mit einem Aufbau wie in Abbildung 16 A eingesetzt. Zur Untersuchung der Adhäsion von Vesikeln auf Oberflächen wurde die QCM-D-Technik herangezogen, der ein Aufbau analog Abbildung 16 B zu Grunde lag.

Der Quarz wird zwischen zwei Kalrez®-Dichtringen mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Stärke von 1 mm in eine Teflonmesszelle eingespannt, wobei die Dichtringe am äußersten Rand des Quarzes liegen, da so der Dämpfungseinfluss des Dichtringes am geringsten ist.⁸³ Da die obere Goldelektrode mittels Silberleitlack eine leitende Verbindung zur Unterseite des Quarzes besitzt, erfolgt der Kontakt beider Elektroden von der Unterseite mit Federkontakte (Abbildung 16 C). Im **QCM-Aufbau** (Abbildung 16 A) sind die Elektroden des Quarzes mit einem Oszillatorschaltkreis (TTL SN74LS124N, Texas Instruments) verbunden, in dem der Quarz als frequenzbestimmendes Element fungiert. Der Oszillatorschaltkreis wird von einer Spannungsquelle konstant mit 4 V (Gleichspannung) gespeist. Die auftretenden Energieverluste werden durch Rückkopplung phasenrichtig ausgeglichen. Die Frequenz wird über einen Frequenzzähler ausgelesen und an einen Computer weitergeleitet, an dem ein Frequenz-Zeit-Diagramm aufgezeichnet wird. Die zeitliche Auflösung der Resonanzfrequenz liegt bei 0,2-0,3 s.

Es stand ein **QCM-D-Messaufbau** nach dem Prinzip von Rodahl et al.¹⁰¹ zur Verfügung (Abbildung 16 B). Die Elektroden des Quarzes wurden über Federkontakte mit einem externen Frequenzgenerator leitend verbunden und nahe seiner Resonanzfrequenz zur resonanten Schwingung angeregt. Ein computergesteuertes Relais trennte nach Anregung des Quarzes über einen Zeitraum von etwa $1 \cdot 10^{-3}$ s den Signalgenerator vom Quarz. Ein Oszilloskop detektierte den Spannungsabfall $U(t)$ der freien Schwingung über einen Zeitraum von $0,5 \cdot 10^{-3}$ s. Ein Computer ermittelte aus den Daten die Resonanzfrequenz und die charakteristische Abklingzeit durch nicht-lineare Kurvenanpassung.

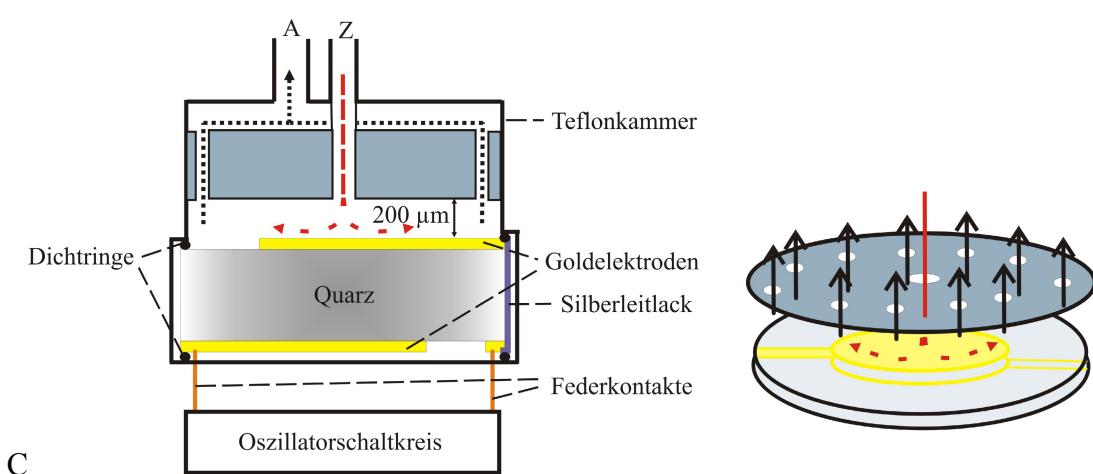
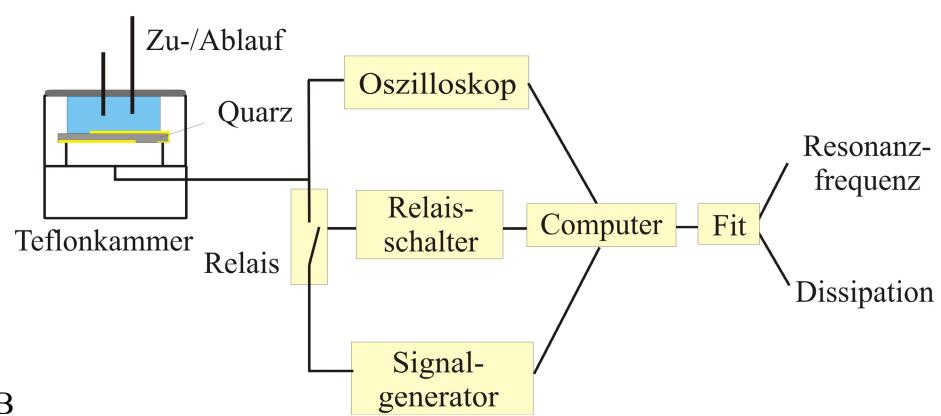
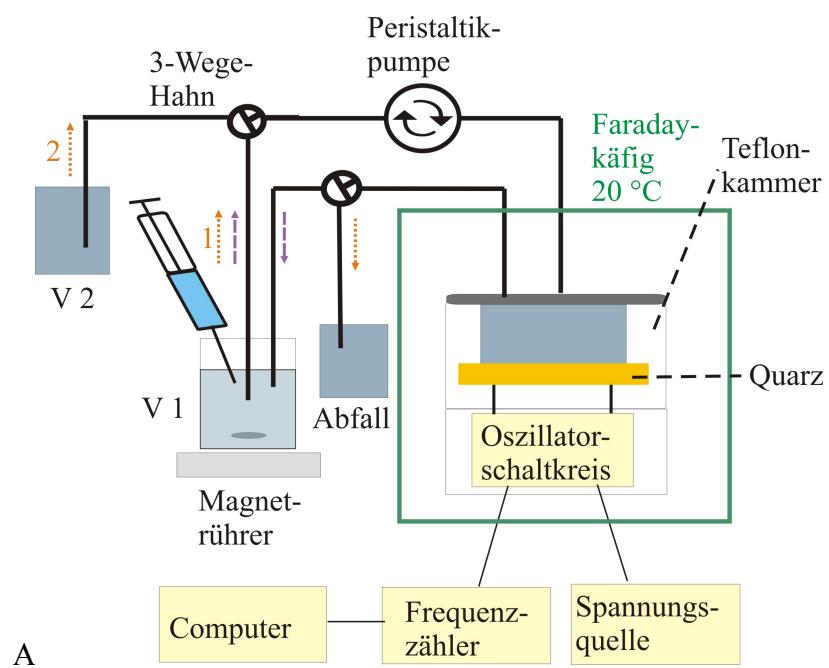


Abbildung 16 (Seite 53): **A)** Aufbau der Quarzmikrowaageapparatur. Der Quarz ist in eine Teflonkammer zwischen zwei Dichtringen eingespannt und mit dem Oszillatorschaltkreis verbunden, der von einer Spannungsquelle gespeist wird. Die Resonanzfrequenz wird über einen Frequenzzähler an einen Computer weitergeleitet. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wird permanent Flüssigkeit aus einem externen Gefäß V1 durch die Messkammer gepumpt. Die Flüssigkeit wird entweder wieder in das Vorratsgefäß V1 zurückgeleitet (violette Pfeile), sodass ein geschlossener Kreislauf entsteht, oder in ein Abfallgefäß geleitet. Im Kreislaufmodus wird die gewünschte Analyt-Lösung in das externe Gefäß V1 injiziert. Beim Durchflussmodus kann mit einem 3-Wege-Hahn zwischen zwei Vorratsgefäß V1 und V2 gewechselt werden (orange Pfeile). **B)** Aufbau der QCM-D- Apparatur. Der Quarz ist analog des QCM-Aufbaus in eine Teflonkammer eingebaut und mit einem Pumpsystem verbunden. Der Quarz wird über einen externen Frequenzgenerator bei geschlossenem Relais zur resonanten Schwingung angeregt. Ein computergesteuertes Relais trennt die Spannungsquelle in zeitlich konstanten Abständen vom Quarz. Ein digitales Oszilloskop detektiert den Abfall der freien Schwingung. Von einem Computer wird die Resonanzfrequenz f und die Dissipation D ermittelt. **C)** Fließverhalten in der Messzelle. Der Flüssigkeitszufluss erfolgt aus einer Öffnung in der Mitte des Kammerdeckels, der 200 μm über dem Quarz platziert ist. Durch mehrere kleinere Öffnungen, die sich am äußeren Rand des Deckels befinden, wird die Flüssigkeit wieder aus der Kammer gedrückt. Damit wird eine Staupunktströmung erreicht.

Bei freier Schwingung fällt die Spannung $U(t)$ über den Quarz nach Abkopplung der Anregungsspannung zur Zeit $t = 0$ mit einer Anfangsspannung U_0 analog einer exponentiell gedämpften Sinusfunktion ab:¹⁰⁴

$$U(t) = U_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \sin(2\pi f t + \varphi). \quad \text{GL-39}$$

Dabei gibt φ die Phase und τ die Abklingzeit wieder.

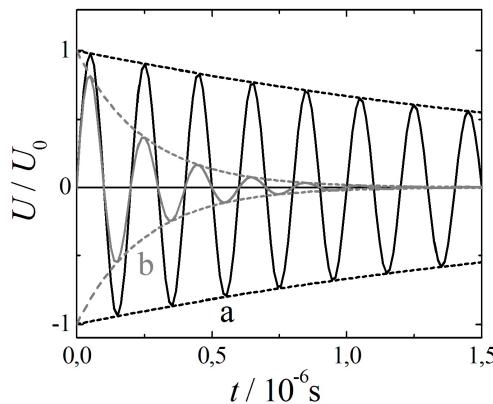


Abbildung 17: Nach Gleichung 42 simulierter Spannungsverlauf der freien Schwingung eines Quarzes mit starrer Beladung (a, schwarz) und viskoelastischer Beladung (b, grau). Die gestrichelten Linien stellen jeweils die einhüllenden Funktionen dar. Die Simulationsparameter sind: $f = 5 \text{ MHz}$, $\varphi = 0$, $\tau = 2,5 \mu\text{s}$ (a) $0,25 \mu\text{s}$ (b).

Abbildung 17 zeigt schematisch den zeitlichen Spannungsverlauf der freien Schwingung eines Quarzes mit unterschiedlicher Dämpfung (durchgezogene Linien) und die entsprechenden einhüllenden Kurven (gestrichelte Linien). Für die Beladung

mit viskoelastischen Schichten (b, graue Kurve) ist die freie Schwingung im Gegensatz zu starren Massen (a, schwarze Kurve) stärker gedämpft, d.h. die Abklingzeit τ ist reduziert.

Die Energieverluste lassen sich durch den Dissipationsfaktor D

$$D = \frac{E_{\text{dissipiert}}}{2\pi E_{\text{gespeichert}}} = \frac{1}{\pi f \tau} \quad \text{GL-40}$$

beschreiben, welcher das Verhältnis aus gespeicherter und dissipierter Energie darstellt und invers proportional zur Frequenz f und zur Abklingzeit τ ist.¹⁰⁴ Die Dissipationsfaktoren der simulierten Schwingungen aus Abbildung 17 ergeben sich somit aus der Frequenz $f = 5 \text{ MHz}$ und $\tau = 2,5 \mu\text{s}$ zu $D \cong 0,25$ (Kurve A) und mit $\tau = 0,25 \mu\text{s}$ zu $D \cong 2,5$ (Kurve B). Zur übersichtlicheren Darstellung wurden in Abbildung 17 Parameter für die Abklingzeit τ verwendet, die nicht der reellen Größenordnung von Quarzen in Flüssigkeiten entsprechen. Dissipationskonstanten der Schwingung eines 5 MHz-Quarzes in Flüssigkeiten liegen im Bereich von 10^{-4} .

Eine zeitlich aufgelöste Bestimmung der Frequenz und der Dissipation wird durch wiederholte Anregung des Quarzes zur Oszillation ($\sim 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}$), Abkopplung des Signalgenerators und anschließende Detektion der freien Schwingung ($0,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}$) erreicht (Abbildung 18). Die zeitliche Auflösung lag bei dem in dieser Arbeit verwendeten System bei zwei bis drei Sekunden.

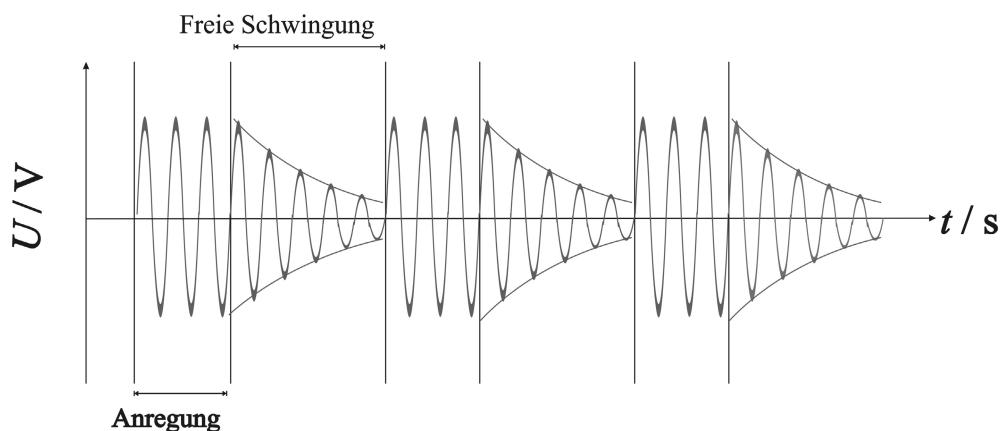


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Anregungsphasen und der freien Schwingung des Quarzes bei der QCM-D-Technik. Wiederholte Anregung zur Schwingung, anschließende Abkopplung und Detektion der freien Schwingung führt zur zeitaufgelösten Bestimmung der Resonanzfrequenz f und des Dissipationsfaktors D .

Die Messkammer und das **Flüssigkeitspumpsystem** ist für QCM- und QCM-D-Messungen identisch. Die Messkammer ist dicht und luftblasenfrei verschlossen und besitzt einen Zu- und Ablauf im Deckel. Da eine direkte Zugabe der Analyt-Lösung in die Messzelle eine Störung der Schwingung des Quarzes und somit eine Verfälschung der Resonanzfrequenz hervorrufen würde, ist die Messzelle an ein externes Pumpensystem angeschlossen. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wird permanent Flüssigkeit aus einem externen Vorratsgefäß V1 durch die Messkammer gepumpt. Das Pumpensystem kann in zwei verschiedene Modi geschaltet werden. Im sogenannten Kreislaufmodus wird die Lösung aus einem Vorratsgefäß V1 in die Messzelle und wieder zurückgeleitet, sodass ein geschlossener Kreislauf entsteht (Abbildung 16 A, violette Pfeile). Die Analyt-Lösung wird mit einer Spritze in das Vorratsgefäß, unter dem sich ein Magnetrührer befindet, zugegeben. Im Durchflussmodus wird die Lösung aus einem Vorratsgefäß V1 durch die Kammer in ein Abfallgefäß gepumpt. Durch einen 3-Wege-Hahn kann auf ein zweites Vorratsgefäß V2 gewechselt werden (Abbildung 16 A, orange Pfeile).

Die Flüssigkeit wird durch einen Zulauf ($r = 0,5$ mm) in der Mitte des Kammerdeckels, der $200\text{ }\mu\text{m}$ über der Quarzoberfläche platziert ist, auf die Mitte des Quarzes gepumpt und aus Öffnungen, die sich am äußeren Rand des Kammerdeckels und somit am Rand der Quarzscheibe befinden, aus der Kammer gepresst (Abbildung 16 c). Somit entspricht der Messaufbau dem Modell der „*radial impinging jet cell*“ und es tritt eine Staupunktströmung über dem Quarz auf.¹⁰⁶

Beim QCM-Aufbau befinden sich die Messzelle und der Oszillatorschaltkreis, beim QCM-D-Aufbau die Messzelle und das Relais, in einem auf $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierten Faraday-Käfig aus Messing, der auf einem gedämpften Tisch aufgestellt ist.

3.4.3.5 Messbedingungen

Die Messkammer, die den Quarz mit einer festkörperunterstützten Membran und den jeweiligen Messpuffer enthielt, wurde luftdicht verschlossen und der Pumpkreislauf hergestellt. Die Pumpgeschwindigkeit betrug $0,35\text{--}0,39\text{ ml/min}$. Anschließend wurde das entsprechende elektrische System (QCM bzw. QCM-D) angeschlossen und die Messzelle im geschlossenen Faraday-Käfig thermostatisiert. Während dieser „Einschwingphase“ konnten Frequenzänderungen von mehreren Hertz auftreten. Erst wenn sich eine konstante Resonanzfrequenz eingestellt hatte, wurde der entsprechende Analyt zugegeben. Bei Messungen im Kreislaufmodus wurde dem Messpuffer eine entsprechende Menge an konzentrierter Proteinlösung bzw. Vesikelsuspension in das Vorratsgefäß V1 (Abbildung 16) zugegeben. Das Gesamtvolumen der Flüssigkeit im Pumpkreislauf betrug zwischen $1,2$ und $1,6\text{ ml}$. Die Volumina der zugegebenen Analyt-

Lösungen lagen zwischen 5 und 200 μ l. Im Durchflussmodus wurde die Analyt-Lösung in gewünschter Konzentration aus dem zweiten Vorratsgefäß V2 durch Umschalten des 3-Wege-Hahns durch die Kammer gepumpt.

3.4.3.6 Charakterisierung des Messaufbaus

Bestimmung der Durchmischungsgeschwindigkeit in der Messzelle

Das Flüssigkeitspumpsystem konnte, wie in Kapitel 3.4.3.5 beschrieben, in zwei Modi betrieben werden: im Kreislauf- oder im Durchflussmodus. Der Unterschied dieser beiden Methoden liegt in der Durchmischungsgeschwindigkeit, d.h. der Zeit bis zur Einstellung der Endkonzentration des Analyten in der Kammer.

Zur Untersuchung des Durchmischungsverhaltens wurde die NaCl-Konzentration der Pufferlösung verändert und die zeitliche Frequenzantwort aufgenommen. Auf diese Weise kann eine maximal schnelle Frequenzantwort beobachtet werden, die nur von der momentan den Quarz überschichtenden Flüssigkeit abhängig ist. Die Pumpgeschwindigkeit betrug (0,35-0,39) ml/min. Abbildung 19 zeigt im Vergleich den zeitabhängigen Frequenzverlauf bei Verwendung der beiden Flussmodi, woraus Informationen über das Durchmischungsverhalten in der Messzelle gewonnen werden können. Eine Frequenzänderung wurde hier durch die Änderung der NaCl-Konzentration des Puffers erreicht. Im Kreislaufmodus (b, grau) wurde 1 M NaCl-Lösung in das Vorratsgefäß V1 zum Zeitpunkt Z zugegeben und somit die NaCl-Konzentration von 100 auf 150 mM erhöht. Im Durchflussmodus (a, schwarz) wurde zum Zeitpunkt Z von Vorratsgefäß V1 auf V2 gewechselt, in dem sich Pufferlösung mit einer NaCl-Konzentration von 150 mM befand, während in V1 dieselbe Pufferlösung mit einer NaCl-Konzentration von 100 mM vorlag. Abbildung 19 zeigt, dass im Durchflussmodus bereits nach etwa 2 Minuten nach Umschalten des 3-Wege-Hahns wieder eine konstante Frequenz erreicht und somit die Konzentration in der Messzelle konstant war. Im Kreislaufmodus wurde in einem Zeitraum von etwa 5 Minuten eine stetige Veränderung der Frequenz beobachtet. Während dieser Zeit pendelte sich die Konzentration in der Messzelle ein.

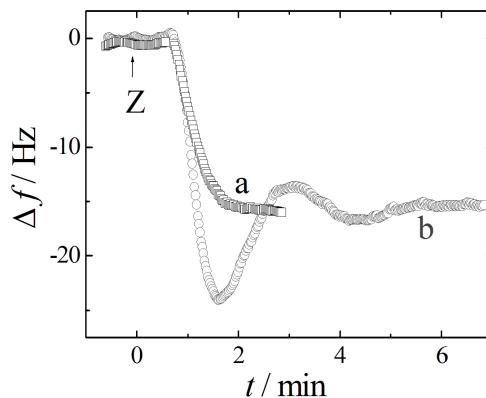


Abbildung 19: Resonanzfrequenzänderung nach Erhöhung der NaCl-Konzentration im Puffer von 100 mM auf 150 mM. Zum Zeitpunkt Z wurde im Kreislaufmodus (b, grau) in das Gefäß V1 (b) konzentrierte NaCl-Lösung zugegeben. Im Durchflussmodus (a, schwarz) wurde zum Zeitpunkt Z von Gefäß V1 auf V2 gewechselt, in dem sich Puffer mit der höheren NaCl-Konzentration befand.

So ist es zur Untersuchung schneller Adsorptionsprozesse nötig, im Durchflussmodus zu messen, da in diesem Fall durch eine schnelle Konzentrationseinstellung in der Messzelle der Einfluss der Durchmischung auf die Adsorptionsprozesse minimiert wird. Langsame Adsorptionsprozesse ($\tau > \sim 5$ min) können im verbrauchsgünstigeren Kreislaufmodus untersucht werden, da die Durchmischung nur den unmittelbaren Anfang des Adsorptionsprozesses beeinflusst. So wurden, soweit nicht anders angegeben, die Messungen zur Untersuchung der Adsorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen im Durchflussmodus und der Adsorption von Vesikeln an membran-gebundenes Annexin A1 im Kreislaufmodus durchgeführt.

Einfluss der Pumpgeschwindigkeit und der Strömungsrichtung auf die Adsorptionskinetik

Die spezifische Bindung von Streptavidin an biotinylierte Oberflächen wurde herangezogen, um den Einfluss der Pumpgeschwindigkeit und der Pumprichtung auf die Kinetik der Adsorption zu untersuchen. Auf der Goldelektrode eines Quarzes wurde eine festkörperunterstützte Membran, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, immobilisiert. Als Lipidschicht wurde eine Mischung aus Asolectin und Biotix-X-DHPE (98:2) verwendet. Es wurde jeweils Streptavidin mit einer Endkonzentration von 12 nM im Pumpkreislaufmodus zum Zeitpunkt Z in das Gefäß V1 zugegeben.

Zur Untersuchung des Einflusses der Strömungsrichtung in der Messzelle auf die Adsorptionskinetik wurde die Flüssigkeit im Kreislaufmodus mit einer Geschwindigkeit von (0,35-0,39) ml/min entweder analog Abbildung 16 C über die Öffnung über der Quarzmitte (Abbildung 20 a, Quadrate) oder über die Randöffnungen (Abbildung 20 a,

Kreise) in die Messzelle gepumpt. Es zeigte sich, dass sich die Ratenkonstanten k_s der Adsorption (mit einer finalen Frequenzänderung Δf_e), die durch die Anpassung der Parameter von Gleichung 41 (Kinetik 1. Ordnung)

$$\Delta f(t) = \Delta f_e (1 - \exp\{-k_s t\}) \quad \text{GL- 41}$$

an die jeweiligen Messdaten $\Delta f(t)$ erhalten wurden, unterschieden. So wurde nach Einströmen der Flüssigkeit über die Mitte des Quarzes ein höherer Wert für $k_s = 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Abbildung 20 a, Quadrate) ermittelt als nach Einströmen der Flüssigkeit über die Randöffnungen ($k_s = 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (Abbildung 20 a, Kreise).

Abbildung 20 b zeigt, dass eine Variation der Pumpgeschwindigkeit ebenso die beobachteten Adsorptionskinetiken im Kreislaufmodus beeinflusst. Die Flüssigkeit wurde über die Öffnung über der Quarzmitte in die Kammer mit Geschwindigkeiten von (0,18-0,20) ml/min (Abbildung 20 b, Kreise), (0,35-0,39) ml/min (Abbildung 20 b, Quadrate) und (0,53-0,58) ml/min (Abbildung 20 b, Dreiecke) gepumpt. Die durch Anpassen der Parameter von Gleichung 41 an die Daten ermittelten Ratenkonstanten steigen mit zunehmender Pumpgeschwindigkeit an: $k_s = 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Kreise), $k_s = 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Quadrate) und $k_s = 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Dreiecke).

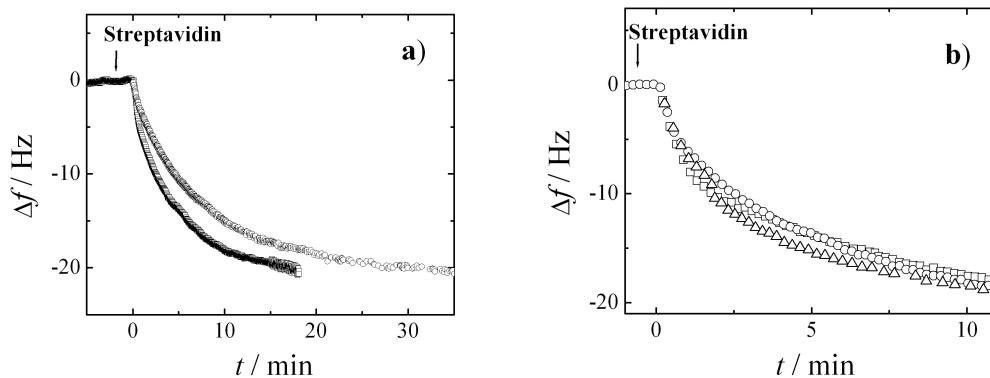


Abbildung 20: Einfluss der a) Einströmrichtung und der b) Pumpgeschwindigkeit auf die Kinetik der Bindung von Streptavidin an biotinylierte Oberflächen. Dargestellt sind die zeitlichen Resonanzfrequenzänderungen nach Zugabe von Streptavidin in V1 mit einer Endkonzentration von 12 nM im Pumpkreislaufmodus zu Asolectin/Biotin-X-DHPE (98:2)-Membranen in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0. a) Zeitliche Resonanzfrequenzänderungen bei Einströmen der Flüssigkeit durch die Öffnung über der Quarzmitte (Kreise) und durch die Randöffnungen zur Mitte (Quadrate) mit einer Pumpgeschwindigkeit von (0,35-0,39) ml/min (Abbildung 16). Die Geschwindigkeitskonstanten wurden nach Anpassen der Parameter der Gleichung 41 an die Messdaten bestimmt: $k_s = 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Quadrate) und $k_s = 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Kreise). b) Zeitliche Resonanzfrequenzänderungen bei Einströmen der Flüssigkeit auf die Quarzmitte mit Pumpgeschwindigkeiten von (0,18-0,20) ml/min (Quadrate), (0,35-0,39) ml/min (Kreise) und (0,53-0,58) ml/min (Dreiecke). Die Geschwindigkeitskonstanten betragen $k_s = 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Kreise), $k_s = 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Quadrate) und $k_s = 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Dreiecke).

Die Abhängigkeit der ermittelten Ratenkonstanten von Einströmrichtung und Pumpgeschwindigkeit kann zum einen mit der veränderten Durchmischungsgeschwindigkeit in der Messzelle erklärt werden. Zum anderen wächst mit zunehmender Pumpgeschwindigkeit die Strömungsgeschwindigkeit über dem Quarz. Dies verringert die Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht und erlaubt eine schnellere Diffusion von Proteinmolekülen an die Oberfläche. Um den Einfluss der Diffusion auf die Adsorptionskinetik zu minimieren, müsste mit maximal schneller Geschwindigkeit die Flüssigkeit durch die Messzelle gepumpt werden. Um jedoch noch ein akzeptables Signal/Rauschverhältnis zu gewährleisten, wurde die Flüssigkeit konstant mit einer Geschwindigkeit von (0,35-0,39) ml/min durch die Öffnung über der Mitte des Quarzes gepumpt.

Zur Auswertung der Messdaten wurde die Kinetik der Adsorption (Desorption), soweit nicht anders angegeben, mittels Computersimulationen nach dem RSA-Modell durchgeführt*, wobei die Durchmischung in der Messzelle und die Diffusion des Analyten zur Oberfläche berücksichtigt wurden und somit die Geschwindigkeitskonstanten unabhängig von diesen Parametern bestimmt werden konnten.

* Die Computersimulationen wurden von A. Janshoff, E. Lüthgens und S. Faiß, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen

Annexin A1 wurde nach bakterieller Expression aus *E.coli* aufgereinigt und wird im Folgenden als Annexin A1_{n-ac} bezeichnet. Annexin A1 mit N-terminaler Acetylierung konnte aus Schweinelunge isoliert werden und wird von bakteriell exprimiertem Protein durch die Bezeichnung Annexin A1_{ac} unterschieden. Außerdem wurde Schweine-S100A11 in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt. Durch Gelfiltration konnte der aus Schweinemucosa isolierte (Annexin A2)₂(S100A10)₂-Heterotetramerkomplex (Annexin A2t) nach Denaturierung in seine beiden Untereinheiten Annexin A2m und S100A10 aufgetrennt werden.

4.1.1 Expression und Aufreinigung von Annexin A1_{n-ac} aus *E.coli*

Annexin A1_{n-ac} wurde, wie in 3.3.4 beschrieben, nach einer Vorschrift von Rosengarth et al.⁷⁸ in Ca²⁺-kompetenten *E.coli* Bakterien (BL21(DE3)pLysS) mit Plasmid-DNA (pKK 233-3-Vektor mit Schweine-Annexin A1-Insert) exprimiert und in Ca²⁺-freiem Milieu aufgereinigt. Die Proteinexpression und die Aufreinigung wurden durch SDS-PAGE Analyse dokumentiert (Abbildung 21). Die Bakterien wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von 1 mM IPTG zur Expression des Proteins induziert. Die Expression wurde durch SDS-PAGE Analyse des Bakterienproteinextraktes kontrolliert. Im Vergleich zu nicht-induzierten Bakterien (Spur 2) war die starke Expression von Annexin A1_{n-ac} drei Stunden nach der Induktion als zusätzliche Bande bei ca. 36 kDa zu erkennen (Spur 3). Nach vier Stunden Expression wurden die Bakterien einer 1 Liter-Kultur geerntet, in 30 ml EGTA-haltigem Lysispuffer durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen sowie durch Sonifizierung aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. In Gegenwart von EGTA löste sich Annexin A1_{n-ac} von den Membranen ab und befand sich im Überstand (Spur 5).

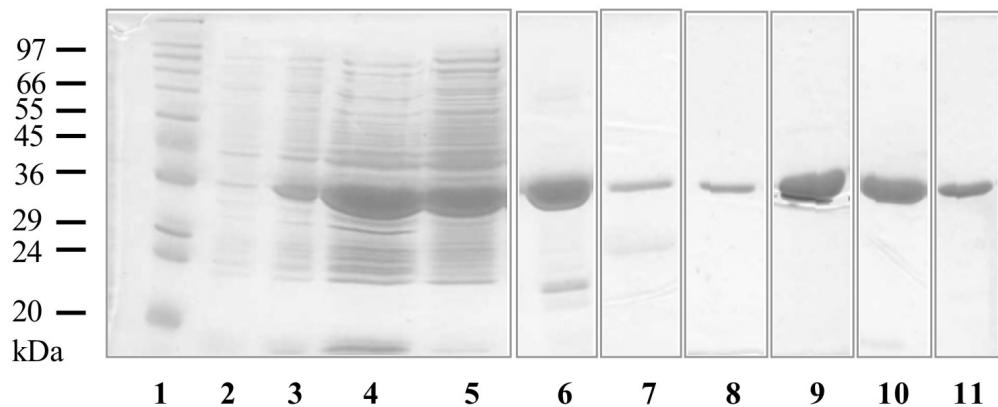


Abbildung 21: SDS-Gel der Expression und der Aufreinigung von Annexin A1_{n-ac} in *E.coli*. Spur 1: Molekulargewichtsmarker mit Proteinen der angegebenen Massen. Spur 2: Bakterienproteinextrakt vor der Induktion. Spur 3: Bakterienproteinextrakt 3 Stunden nach der Induktion mit IPTG. Spur 4: Probe nach dem Zellaufschluss. Spur 5: Überstand nach der Zentrifugation. Spur 6: Durchlauf der Q-Sepharose-Säule nach Spülen mit Puffer Q. Spur 7: Durchlauf der Q-Sepharose-Säule beim Spülen mit Puffer Q + 50 mM NaCl. Spur 8-11: Elutionsfraktionen der MonoS-Säule: Spur 8: Fraktion 42, Spur 9: Fraktion 54, Spur 10: Fraktion 60, Spur 11: Fraktion 82. Es wurden jeweils 15 μ l der Proben zusammen mit 5 μ l Probenpuffer (6x) auf das Gel aufgetragen.

Die Proteinlösung wurde durch Dialyse entsalzt und über eine Q-Sepharose-Säule mit einem Matrixvolumen von 40 ml chromatographisch vorgereinigt. Annexin A1_{n-ac} befand sich in relevanten Mengen in den ersten (80-90) ml des Durchlaufs nach Spülen mit Puffer Q (Spur 6) und in den ersten 40 ml der Waschfraktionen nach Spülen mit Puffer Q + 50 mM NaCl (Spur 7). Aus dem SDS-Gel konnte abgeschätzt werden, dass Annexin A1 zu diesem Zeitpunkt in einer Reinheit von über 90 % vorlag. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Annexin A1_{n-ac}-haltigen Fraktionen, deren Gesamtvolumen (120-130) ml betrug, vereinigt und der pH-Wert der Proteinlösung durch Dialyse auf pH 5.9 (Puffer M1) eingestellt.

Die weitere Aufreinigung von Annexin A1_{n-ac} erfolgte bei 4 °C an einem FPLC-System. Das bei pH 5.9 positiv geladene Annexin A1_{n-ac} (pI = 6.4) wurde mittels eines Injektionssystems auf eine MonoS-Säule aufgetragen und mit einem linearen NaCl-Gradienten zwischen 10 und 500 mM eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden durch Absorptionsmessung bei 280 nm detektiert. Abbildung 22 zeigt den Verlauf des linearen NaCl-Gradienten (schwarze Linie), der durch Leitfähigkeitsmessung bestimmt wurde, und der Absorption (graue Kurve) während der Proteinelution der MonoS-Säule. Das Profil zeigt neben kleineren Peaks einen Hauptpeak bei etwa (150-250) mM NaCl, der jedoch eine Schulter aufweist, was auf die Überlagerung zweier unterschiedlicher Peaks hinweist. Die SDS-PAGE Analyse einzelner Elutionsfraktionen der MonoS-Säule zeigte allerdings, dass sich nicht nur in den Fraktionen 50 bis 68 des Hauptpeaks, sondern auch in den Fraktionen der Nebenpeaks von Fraktion 40 bis 85 Annexin A1_{n-ac}

befand und keine weiteren Banden zu erkennen waren (SDS-Gel, Spuren 8 bis 11). Die Fraktionen des Hauptpeaks und die der Nebenpeaks wurden getrennt voneinander vereinigt. Um die Einheitlichkeit des Proteins zu gewährleisten wurden für die Untersuchungen mit Annexin A1_{n-ac} nur Fraktionen aus dem Hauptpeak verwendet. Aus einem Liter Bakterienkultur wurden insgesamt 35 mg Annexin A1_{n-ac} isoliert.

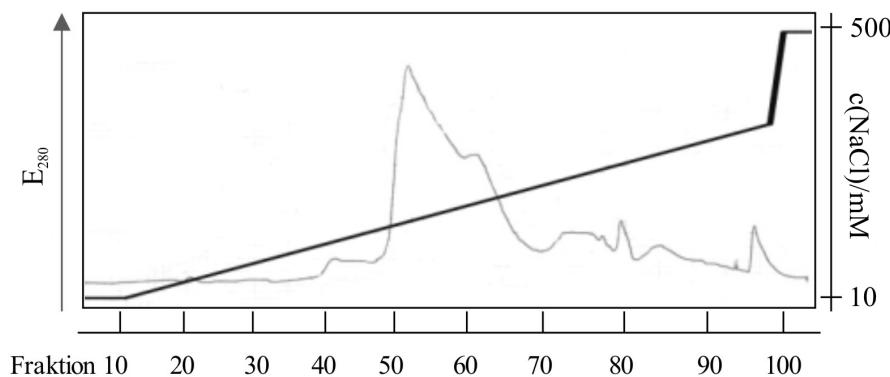


Abbildung 22: Verlauf der Absorption bei 280 nm (E_{280}) (graue Kurve) bei der Aufreinigung von Annexin A1 über eine MonoS-Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten zwischen $c(\text{NaCl}) = 10 \text{ mM}$ (Puffer M1) und 500 mM (Puffer M2). Die NaCl-Konzentration wurde durch Leitfähigkeitsmessung verfolgt (schwarze Linie). Bei einer Konzentration von 400 mM NaCl wurde die Konzentration direkt auf 500 mM erhöht, da die Proteinelution abgeschlossen war. Die Fraktionen 40 bis 85 enthielten Annexin A1_{n-ac}.

Nachweis von Annexin A1_{n-ac}

Das aus *E.coli* Bakterien aufgereinigte Annexin A1_{n-ac} wurde mittels Western-Blot Analyse, wie in 3.3.10 beschrieben, nachgewiesen.

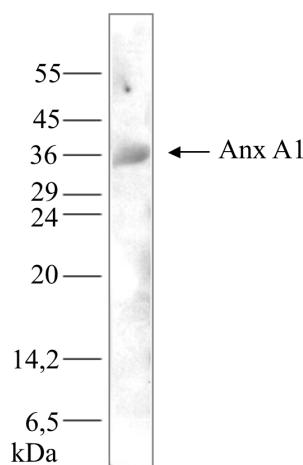


Abbildung 23: Western-Blot Analyse von Annexin A1_{n-ac} aus *E.coli*. Der Größenstandard wurde durch reversible Anfärbung eines Molekulargewichtsmarkers mit Proteinen der angegebenen Massen mit PonceauS auf der Nitrozellulose erhalten.

Hierzu wurde Annexin A1_{n-ac} in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem polyklonalen anti-Annexin A1 Antikörper (mAB Anx A1, R281.13) inkubiert. Dieser Antikörper erkennt spezifisch die Kerndomäne von Annexin A1.

Die deutliche Bande bei ca. 36 kDa nach der Western-Blot Analyse zeigt, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um Annexin A1 handelt (Abbildung 23).

Zusätzlich zu den SDS-PAGE und Western-Blot Analysen wurde eine massenspektrometrische Analyse zur Charakterisierung des Proteins durchgeführt. Hierzu wurde die Elektrosprayionisations (ESI)-Massenspektrometrie verwendet.*

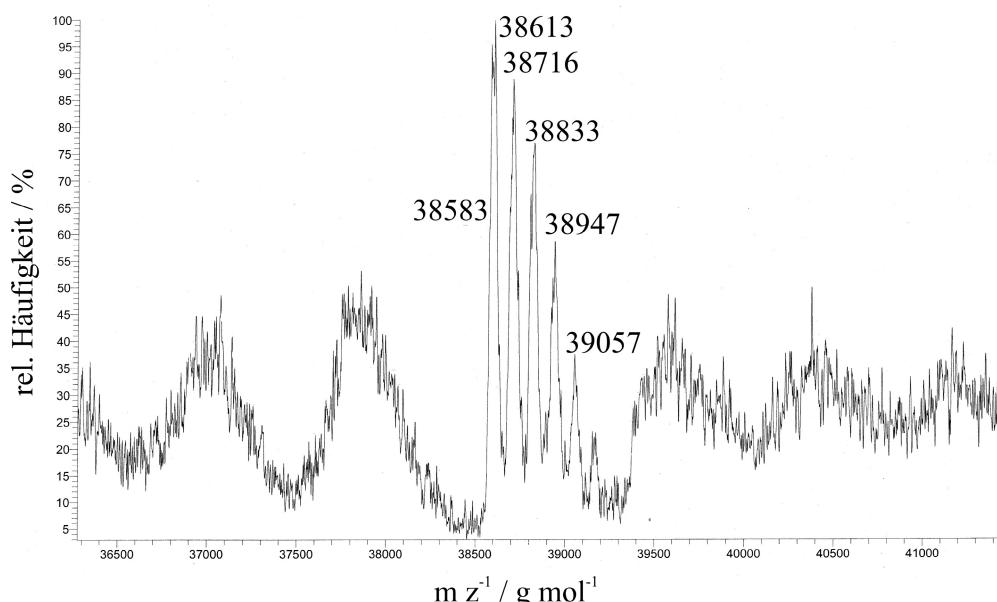


Abbildung 24: ESI-Massenspektrum von Annexin A1_{n-ac} aus *E.coli*.

Das Spektrum zeigt einen Hauptpeak bei einem m/z -Verhältnis von 38613 g/mol mit zusätzlichen Peaks analog der entsprechenden Isotopenverteilung (Abbildung 24). Dieser Wert stimmt mit der aus der Aminosäurezusammensetzung berechneten mittleren molaren Masse $M = 38613 \text{ g/mol}^{107}$ für Annexin A1_{n-ac} überein.

Zur weiteren Kontrolle wurde eine Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuren mittels Edman-Abbau durchgeführt.* Die Sequenz der untersuchten Aminosäuren stimmte mit der aus der Literatur bekannten Sequenz⁷¹ der Aminosäuren 2 bis 10 (AMVSEFLKQ) von porcinem Annexin A1 überein.

* Die ESI-MS-Analysen und die Sequenzierungen wurden von E. Hochmuth und Prof. Dr. R. Deutzmann, Institut für Biochemie, Genetik und Molekularbiologie, Universität Regensburg, durchgeführt.

Untersuchung der Aktivität von Annexin A1_{n-ac} durch Ca²⁺-abhängige Bindung an Membranen

Um seine Funktionalität nachzuweisen, wurde das aus *E.coli* isolierte Annexin A1_{n-ac} auf seine Fähigkeit untersucht, calciumabhängig an Membranen zu binden. Diese Wechselwirkung kann mittels eines einfachen Vesikelassays analysiert werden, bei dem das zu untersuchende Protein mit Vesikeln in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen pelletiert und anschließend durch die Zugabe von EGTA wieder von den Membranen abgelöst wird.

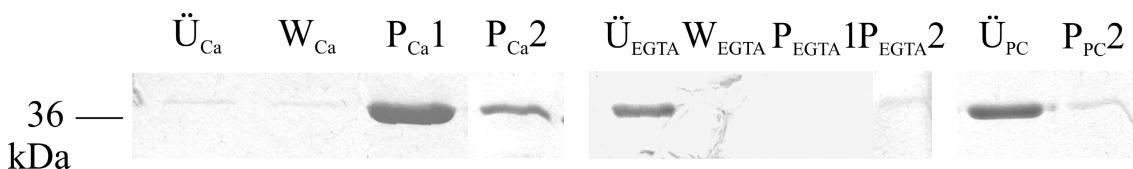


Abbildung 25: SDS-Gel eines Vesikelpelletierungsassays von Annexin A1_{n-ac} aus *E.coli* mit POPC- oder POPC/POPS (4:1)-Vesikeln in An- und Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen. Ca/EGTA: Inkubation erfolgte in Puffer Ca₁ oder in Puffer E₁. Ü: Überstand der zentrifugierten Ansätze. W: Überstand nach Waschschritt. P1: Überstand nach Inkubation des Pellets mit EGTA. P2: Pellet nach Inkubation mit EGTA. PC: Inkubation mit POPC-Vesikeln in Puffer Ca₁.

Es wurden 4 µg Annexin A1_{n-ac} zusammen mit 125 µg multilamellaren POPC- oder POPC/POPS (4:1)-Vesikeln in 160 µl Puffer Ca₁ 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Vesikel anschließend pelletiert. Das Waschen des Pellets mit 15 µl Ca²⁺-haltigem Puffer Ca₁₀ sollte unspezifisch pelletiertes Protein entfernen. Das Pellet wurde anschließend mit 15 µl EGTA-haltigem Puffer E₁₀ 20 Minuten inkubiert, um das Protein von den Membranen abzulösen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Anwesenheit des Proteins im Überstand nach der ersten Zentrifugation (Ü_{Ca}), im Waschüberstand (W_{Ca}), im Überstand nach Inkubation mit EGTA-haltigem Puffer (P_{Ca1}) und im Vesikelpellet (P_{Ca2}) mittels SDS-PAGE Analyse untersucht.

Abbildung 25 zeigt, dass Annexin A1_{n-ac} nahezu vollständig mit POPC/POPS (4:1)-Vesikeln pelletiert wurde, da nahezu kein Protein mehr im Überstand (Ü_{Ca}) nachgewiesen werden konnte. Auch im Waschüberstand (W_{Ca}) konnte nur eine geringe Menge Protein detektiert werden. Erst nach Inkubation der Vesikel mit EGTA-haltigem Puffer löste sich Annexin A1_{n-ac} von den Membranen ab und konnte nach erneuter Zentrifugation der Vesikel im Überstand (P_{Ca1}) nachgewiesen werden. Die Analyse des Vesikelpellets nach Proteinablösung mit EGTA (P_{Ca2}) zeigt jedoch, dass ein Teil des Proteins auch in Abwesenheit von Ca²⁺ an den Membranen gebunden blieb.

Bei der Verwendung von reinen POPC-Vesikeln blieb Annexin A1_{n-ac} in Gegenwart von 1 mM Ca²⁺-Ionen im Überstand (Ü_{PC}). Nach einem Waschschritt mit Puffer Ca₁₀ und nach Inkubation des Pellets mit EGTA (Puffer E₁₀) wurde kein Annexin A1_{n-ac} in

den Überständen detektiert (Daten nicht gezeigt). Die SDS-PAGE Analyse des Vesikelpellets zeigt jedoch, dass eine geringe Menge an Annexin A1_{n-ac} an POPC-Vesikel gebunden hatte (P_{PC2}). Somit konnte bestätigt werden, dass Annexin A1_{n-ac} nur an negativ geladene Phospholipide bindet.

Zur Kontrolle wurde ein entsprechender Ansatz in 1 mM EGTA-haltigem Puffer E₁ mit POPC/POPS (4:1)-Vesikeln durchgeführt. Die SDS-PAGE Analyse zeigt, dass Annexin A1_{n-ac} im Überstand (Ü_{EGTA}) blieb, und im Waschüberstand (W_{EGTA}) und im Überstand nach weiterer EGTA-Inkubation (P_{EGTA1}) kein Annexin A1_{n-ac} detektiert werden konnte. Auch die SDS-PAGE Analyse des Vesikelpellets (P_{EGTA2}) wies nur eine sehr schwache Bande bei 36 kDa auf, wodurch die Ca²⁺-abhängigkeit der Bindung bestätigt werden konnte. Außerdem konnte Annexin A1_{n-ac}, in Abwesenheit von Vesikeln, nicht pelletiert werden (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise wurde die Funktionalität des aus *E.coli* isolierten Annexin A1_{n-ac} durch seine Ca²⁺-abhängige Bindung an negativ geladene Phospholipide nachgewiesen.

4.1.2 Aufreinigung von Annexin A1_{ac} aus Schweinelunge

Die Aufreinigung wurde, wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben, nach einer leicht variierten Vorschrift nach Glenney et al.⁶¹ bzw. nach Seemann et al.^{58,71} durchgeführt und mittels SDS-PAGE dokumentiert (Abbildung 26). Der Hauptreinigungseffekt dieser Aufreinigung beruht auf der Bindung des Proteins an Membranen in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen und der Ablösung von den Membranen in Ca²⁺-freier Lösung.

700 g frisches Lungengewebe wurde in 500 ml detergenzhaltigem Lysispuffer homogenisiert und die Zellen somit aufgeschlossen. Da im Lysispuffer EGTA enthalten war, wurden die calciumabhängig gebundenen Proteine von den Membranen abgelöst und konnten zusammen mit anderen löslichen Substanzen von den festen Bestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt werden. Zu diesem Zeitpunkt war nach Analyse der Proteinlösung mittels SDS-PAGE keine Bande bei ca. 36 kDa erkennbar (Abbildung 26, Spur 2).

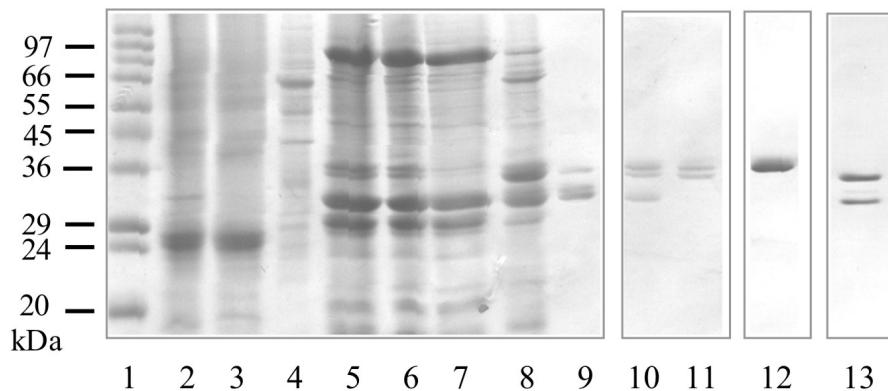


Abbildung 26: SDS-Gel der Aufreinigung von Annexin A1_{ac} aus Schweinelunge. Spur 1: Molekulargewichtsmarker mit Proteinen der angegebenen Massen. Spur 2: Überstand nach der ersten Ultrazentrifugation. Spur 3: Überstand nach der ersten Proteinfällung nach Zugabe von CaCl₂. Spur 4: Überstand nach der Zentrifugation über Sucrose. Spur 5: Überstand nach der Inkubation der gefällten Proteine mit EGTA-haltigem Puffer E_A. Spur 6: Probe nach der ersten Dialyse gegen Puffer E_B. Spur 7: Überstand nach der zweiten Proteinfällung nach Zugabe von CaCl₂. Spur 8: Überstand nach der Inkubation der gefällten Proteine mit EGTA-haltigem Puffer E_C. Spur 9: Durchlauf der Q-Sepharose-Säule. Spur 10: Fraktion 1 der Q-Sepharose-Säule nach Spülen mit Puffer I + 10 mM NaCl. Spur 11: Fraktion 2 der Q-Sepharose-Säule. Spur 12: Fraktion 14 der Hydroxyapatit-Säule bei ca. 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄. Spur 14: Fraktion 33 der Hydroxyapatit-Säule bei ca. (0,18-0,2) M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄.

Um das gewünschte Protein aufzukonzentrieren und es von den restlichen Verunreinigungen zu trennen wurde zunächst die Ca²⁺-Konzentration erhöht, damit Annexine an die in der Lösung befindlichen Membranfragmente binden und aggregieren. Die Protein-Membranaggregate konnten durch Zentrifugation pelletiert und über eine weitere Zentrifugation über eine Sucroselösung von einem Teil der Verunreinigungen getrennt werden (Spur 3 und 4). Durch Komplexierung von Ca²⁺-Ionen durch EGTA wurden die Ca²⁺-abhängig gebundenen Proteine wieder von den Membranfragmenten abgelöst und reicherteten sich im Überstand an. Die Proteinanalyse des Überstandes zeigte im SDS-Gel deutlich ausgeprägte Banden im Bereich von 36 kDa (Spur 5). Nach Dialyse des Ansatzes gegen Puffer E_B (Spur 6) führte eine wiederholte Fällung der Annexine mit Membranen durch Zugabe von CaCl₂ und anschließender Ablösung der Proteine durch Zugabe von EGTA unter veränderten Pufferbedingungen (höhere NaCl- und geringere Ca²⁺-Konzentration) zu einer weiteren Aufreinigung und Aufkonzentrierung des gewünschten Proteins. So waren nach der zweiten Fällung mit CaCl₂ die Banden bei ca. 36 kDa im SDS-Gel des Überstandes nach der Zentrifugation nicht mehr erkennbar (Spur 7), wodurch bestätigt werden konnte, dass Annexin A1_{ac} pelletiert wurde. Nach Inkubation des Pellets mit EGTA-haltigem Puffer E_C reicherte sich das Protein wieder im Überstand an (Spur 8). Nach Entsalzen der Lösung durch Dialyse gegen Puffer I konnte das Protein über eine Q-Sepharose-Säule mit einem Säulenvolumen von 10 ml vorgereinigt werden.

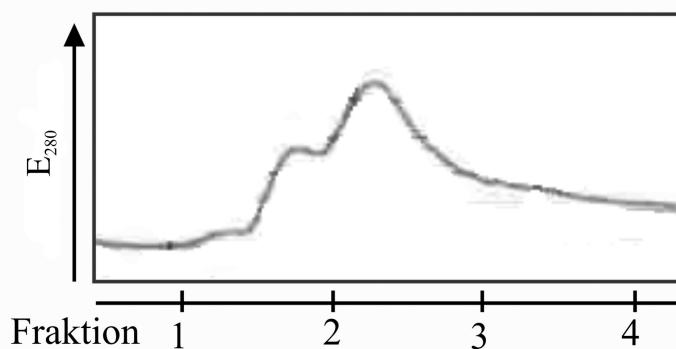


Abbildung 27: Elutionsprofil der Absorption bei 280 nm (E₂₈₀) der Aufreinigung von Annexin A1_{ac} über eine Q-Sepharose-Säule nach Spülen mit Puffer I + 10 mM NaCl.

Das SDS-Gel zeigt, dass nach Spülen mit Puffer I im Durchlauf (Spur 9) Proteine mit Massen von ca. 36 kDa und ca. 33 kDa vorhanden waren. Das Elutionsprofil der Q-Sepharose-Säule (Abbildung 27) weist mindestens zwei nicht voneinander getrennte Peaks beim Spülen mit Puffer I + 10 mM NaCl auf. Das SDS-Gel zeigt, dass Proteine mit ca. 33 kDa, ca. 36 kDa und ca. 38 kDa eluierten (Spur 10: Fraktion 1, Spur 11: Fraktion 2). Mittels Western-Blot Analysen wurde nachgewiesen, dass sich Annexin A1_{ac} nicht im Durchlauf nach Spülen mit Puffer I, sondern in den Waschfraktionen nach Spülen mit Puffer I + 10 mM NaCl befand (Daten nicht gezeigt). So konnte die Bande bei ca. 38 kDa der Waschfraktionen dem Annexin A1_{ac} zugeordnet werden. Die Annexin A1_{ac}-haltigen Waschfraktionen 1 bis 3 mit einem Gesamtvolumen von (30-35) ml wurden zur weiteren Aufreinigung auf eine Hydroxyapatit-Säule mit einem Säulenvolumen von 1,5 ml aufgetragen.

Annexin A1 konnte erfolgreich von den Verunreinigungen durch Elution mit einem linearen Phosphatgradienten zwischen 0 und 0,2 M getrennt werden. Abbildung 28 zeigt das Elutionsprofil der Hydroxyapatit-Säule, das zwei deutlich voneinander getrennte Peaks bei einer Phosphatkonzentration von ca. (0,9-1,3) M und von (0,18-0,2) M aufweist. Die SDS-PAGE Analyse der Elutionsfraktionen 12 bis 20 des ersten Peaks (Abbildung 26, Bande 12) zeigen nur eine Bande bei ca. 38 kDa, die dem Annexin A1_{ac} zugeordnet werden konnte. Die Fraktionen 28 bis 38 des zweiten Peaks wiesen im SDS-Gel jeweils eine Bande bei ca. 33 kDa und 36 kDa auf. Bei diesen beiden Proteinen handelte es sich um N-terminal verkürztes Annexin A1 (ca. 33 kDa) und Annexin A2 (ca. 36 kDa).⁶¹ Aus 700 g Schweinelunge wurden auf diesem Weg ca. 0,7 mg Annexin A1_{ac} gewonnen. Die Reinheit lag nach Abschätzung aus dem SDS-Gel bei über 95 %.

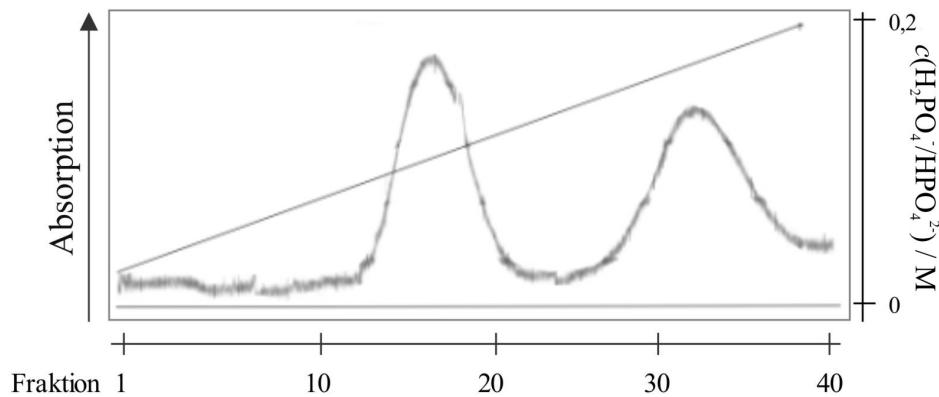


Abbildung 28: Elutionsprofil der Absorption bei 280 nm (E₂₈₀) der Aufreinigung von Annexin A1_{ac} über eine Hydroxyapatit-Säule mit einem linearen Phosphat-Gradienten zwischen 0 und 0,2 M in Puffer I.

Nachweis von Annexin A1_{ac}

Das aufgereinigte Annexin A1_{ac} wurde mittels Western-Blot Analyse analog Annexin A1_{n-ac} mit einem polyklonalen Annexin A1 Antikörper (mAB Anx A1, R281.13) nachgewiesen. Das Protein wurde in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Antikörper inkubiert.

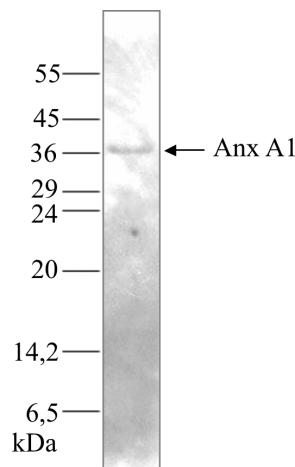


Abbildung 29: Nachweis von Annexin A1 mittels Western-Blot Analyse. Der Größenstandard wurde durch reversible Anfärbung eines Molekulargewichtsmarkers mit Proteinen der angegebenen Massen mit PonceauS auf der Nitrozellulose erhalten.

Durch Western-Blot Analyse konnte das isolierte Protein mit ca. 38 kDa eindeutig als Annexin A1_{ac} identifiziert werden (Abbildung 29).

Das aus Schweinelunge isolierte Annexin A1_{ac} wurde einer massenspektrometrischen Analyse mittels ESI-MS unterzogen.*

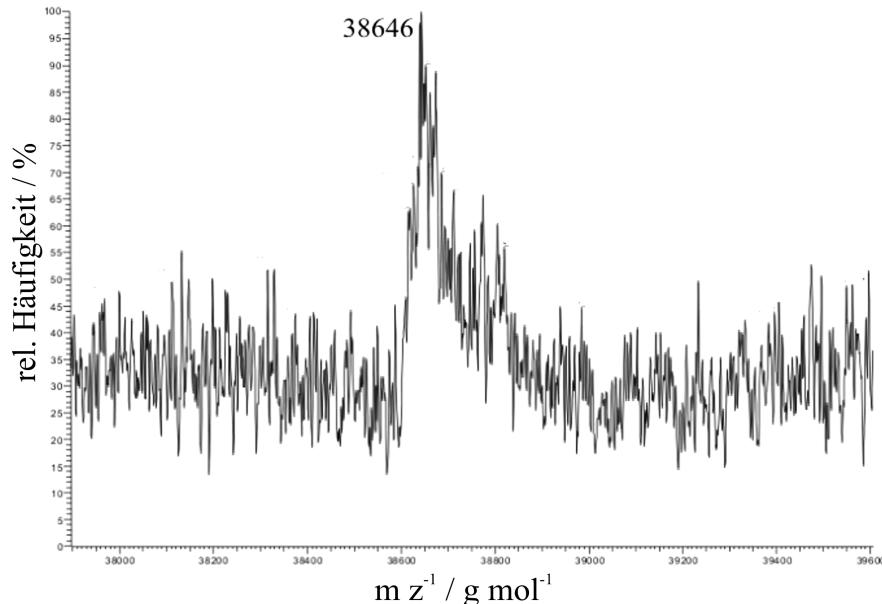


Abbildung 30: ESI-Massenspektrum von Annexin A1_{ac} isoliert aus Schweinelunge.

Das Massenspektrum zeigt einen breiten Peak mit einem Maximum bei einem m/z-Verhältnis von 38646 g/mol (Abbildung 30). Die aus der Aminosäurezusammensetzung des porcinen Annexin A1 mit N-terminaler Acetylierung berechneten mittlere molare Masse ist 38655 g/mol.¹⁰⁷ Die Abweichung von 9 g/mol der bestimmten Masse liegt aufgrund der geringen Auflösung des Massenspektrums im Fehlerbereich.

Um sicher zu gehen, dass vollständiges Annexin A1_{ac} vorlag wurde eine N-terminale Sequenzanalyse mittels Edman-Abbau durchgeführt.* Diese zeigte, dass die N-terminale Aminosäure blockiert war, was auf eine Acetylierung der ersten Aminosäure hinweist. Trotz der Blockierung konnte jedoch die Aminosäuresequenz bestimmt werden, da einem Teil des vorliegenden Proteins die Acetylierung fehlte. Durch die Bestimmung der Sequenz der Aminosäuren 2-10 (AMVSEFLKQ) konnte das isolierte Protein eindeutig als Annexin A1_{ac} identifiziert werden.

* Die ESI-MS-Analysen und die Sequenzierungen wurden von E. Hochmuth und Prof. Dr. R. Deutzmann, Institut für Biochemie, Genetik und Molekularbiologie, Universität Regensburg, durchgeführt.

Untersuchung der Aktivität von Annexin A1_{ac} durch calciumabhängige Bindung an Membranen

Das aus Schweinelunge isolierte Annexin A1_{ac} wurde analog zu dem aus *E.coli* isolierten Annexin A1_{n-ac} auf seine Fähigkeit untersucht, calciumabhängig an negativ geladene Lipide zu binden, um seine Funktionalität nachzuweisen. Hierzu wurde ein Vesikelpelletierungsassay mit 4 µg Annexin A1_{ac} zusammen mit 125 µg multilamellaren Vesikeln POPC/POPS (4:1) in 160 µl Puffer Ca₁ analog Kapitel 3.3.12 durchgeführt. Es wurde die Anwesenheit des Proteins im ersten Überstand (Ü_{Ca}), im Waschüberstand (W_{Ca}), im Überstand nach Proteinablösung mit EGTA-haltigem Puffer (P_{Ca1}) und im Vesikelpellet (P_{Ca2}) untersucht.

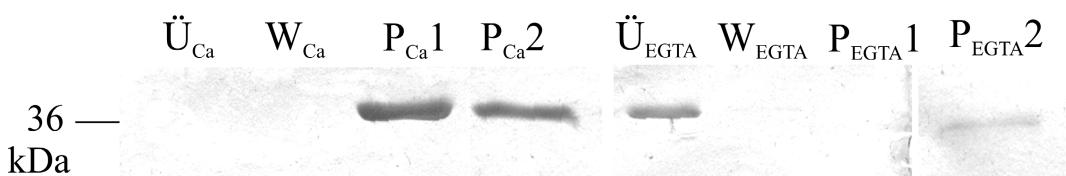


Abbildung 31: SDS-Gel eines Vesikelpelletierungsassays von 4 µg Annexin A1_{ac} mit 125 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikeln. Ca/EGTA: Inkubation erfolgte in 160 µl Puffer Ca₁ oder in Puffer E₁. Ü: Überstand der zentrifugierten Ansätze. W: Überstand nach dem Waschschritt. P1: Überstand nach der Inkubation mit EGTA. P2: Vesikelpellet nach Inkubation mit EGTA.

Abbildung 31 zeigt, dass Annexin A1_{ac} vollständig mit den Vesikeln pelletiert, da sich kein Protein im Überstand des zentrifugierten Ansatzes befand (Ü_{Ca}). Nach einem Waschschritt mit Ca²⁺-haltigem Puffer (Ca₁₀) konnte im SDS-Gel des Überstandes kein Annexin A1_{ac} detektiert werden (W_{Ca}). Erst bei Entzug von Ca²⁺-Ionen durch EGTA löste sich das Protein von den Membranen ab und konnte nach erneuter Zentrifugation im Überstand nachgewiesen werden (P_{Ca1}). Die Analyse des Vesikelpellets nach der Inkubation mit EGTA zeigt jedoch, dass ein Teil des Proteins auch in Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen an den Membranen gebunden blieb (P_{Ca2}).

Zur Kontrolle wurde ein entsprechender Ansatz in 1 mM EGTA-haltigem Puffer E₁ ohne Ca²⁺-Ionen durchgeführt. Die SDS-PAGE Analyse zeigt, dass Annexin A1_{ac} komplett im Überstand (Ü_{EGTA}) blieb und weder nach einem Waschschritt mit Puffer E₁, (W_{EGTA}) noch nach weiterer Inkubation mit EGTA-haltigem Puffer (P_{EGTA1}) im Überstand nachgewiesen werden konnte. Das SDS-Gel zeigt jedoch, dass eine sehr geringe Menge an Annexin A1_{ac} in Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen an die Vesikel gebunden hatte (P_{EGTA2}). Somit konnte die Funktionalität des aus Schweinelunge isolierten Annexin A1_{ac} durch seine Fähigkeit, Ca²⁺-abhängig an negativ geladene Membranen zu binden, nachgewiesen werden.

4.1.3 Expression und Isolierung von Schweine-S100A11 aus *E.coli*

S100A11 wurde, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, nach einer Anleitung von Seemann et al. in *E.coli* (BL21 mit pET23a-Vektor mit Schweine-S100A11-Insert) exprimiert und aufgereinigt.⁵⁹ Die Proteinexpression und die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE Analyse dokumentiert (Abbildung 32). Der Reinigungseffekt beruht auf der unterschiedlichen Hydrophobizität von S100-Proteinen im Ca^{2+} -gebundenen und Ca^{2+} -freien Zustand. S100A11 kann im Ca^{2+} -gebundenen Zustand an eine hydrophobe Matrix, wie etwa Phenylsepharose, gebunden und durch Zugabe von EGTA wieder abgelöst werden.

Die Bakterien wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von IPTG zur Expression des Proteins induziert. Die Expression konnte durch SDS-PAGE Analyse des Bakterienproteinextraktes verfolgt und anhand einer ausgeprägten Bande bei ca. 10 kDa kontrolliert werden (Spur 2). Nach drei Stunden Inkubation wurden die Bakterien einer 100 ml-Kultur in 10 ml Lysispuffer durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen sowie durch Sonifizieren aufgeschlossen (Spur 3) und anschließend unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. S100A11 befand sich mit anderen löslichen Proteinen im Überstand (Spur 4), was an einer ausgeprägten Bande bei ca. 10 kDa zu erkennen ist.

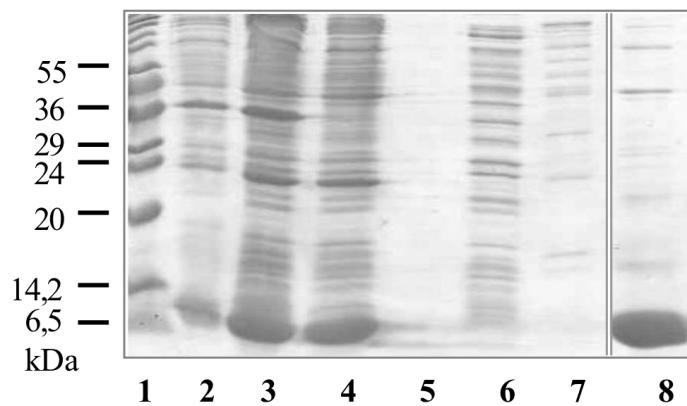


Abbildung 32: SDS-Gel der Expression und der Aufreinigung von S100A11 in *E.coli*. Spur 1: Molekulargewichtsmarker mit Proteinen der angegebenen Massen. Spur 2: Bakterienproteinextrakt zwei Stunden nach Induktion. Spur 3: Bakterienproteinextrakt nach Aufschluss der Bakterien. Spur 4: Überstand nach der Zentrifugation. Spur 5: Durchfluss der Phenylsepharose-Säule beim Auftragen der Proteinlösung. Spur 6: Durchfluss der Phenylsepharose-Säule nach Spülen mit 5 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer. Spur 7: Durchfluss der Phenylsepharose-Säule nach Spülen mit 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer. Spur 8: Elutionsfraktion der Phenylsepharose-Säule nach Spülen mit 1 mM EGTA-haltigem Puffer.

Die Aufreinigung von S100A11 erfolgte über eine Phenylsepharose-Säule mit einem Säulenvolumen von 5,5 ml. Hierzu wurde die Ca^{2+} -Konzentration in der Proteinlösung auf 5 mM erhöht. Dadurch werden die Ca^{2+} -bindungsstellen des S100A11 besetzt, was

zu einer Konformationsänderung des Proteins führt. Über hydrophobe Bereiche an der Oberfläche kann das Protein mit der Phenylsepharose-Matrix wechselwirken.^{47,48,51,54,59} Wie im SDS-Gel zu erkennen ist, hat S100A11 komplett an die Phenylsepharose gebunden, da kein S100A11 im Säulendurchlauf nach Auftragen der Proteinlösung nachgewiesen werden konnte (Spur 5). Nach Spülen mit 5 mM (Spur 6) und 1 mM (Spur 7) Ca^{2+} -haltigem Puffer wurden nur Verunreinigungen von der Säule gespült, jedoch kein S100A11. Nach dem Entzug von Ca^{2+} -Ionen durch EGTA ging S100A11 in seine Ca^{2+} -freie hydrophilere Konformation über und löste sich von der Phenylsepharose-Matrix ab. Die SDS-PAGE Analyse der Elutionsfraktionen nach Spülen der Säule mit 1 mM EGTA-haltigem Puffer E_1^{DTT} zeigte eine Bande bei ca. 10 kDa, die dem S100A11 zugeordnet werden kann (Spur 8). Aus 100 ml Bakterienkultur konnten ca. 17 mg S100A11 isoliert werden. Die Reinheit lag nach Abschätzung aus dem SDS-Gel bei über 95 %.

Nachweis von S100A11

Das aufgereinigte S100A11 wurde mittels Western-Blot Analyse mit einem polyklonalen S100A11-Antikörper (r656) nachgewiesen. Das Protein wurde auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Antikörper inkubiert.

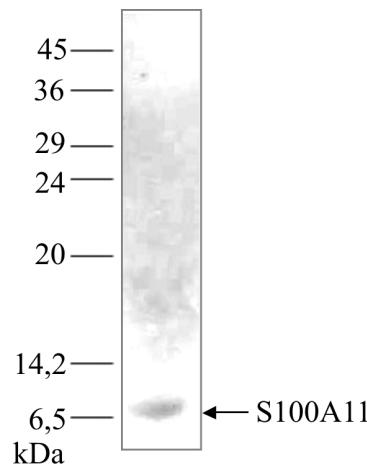


Abbildung 33: Western-Blot Analyse von Schweine-S100A11 aus *E.coli*. Der Größenstandard wurde durch reversible Anfärbung eines Molekulargewichtsmarkers mit Proteinen der angegebenen Massen mit PonceauS auf der Nitrozellulose erhalten.

Das isolierte Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa konnte durch den Antikörper als S100A11 identifiziert werden (Abbildung 33).

Zur weiteren Charakterisierung wurde eine massenspektrometrische Analyse des isolierten S100A11 mittels ESI-MS durchgeführt.*

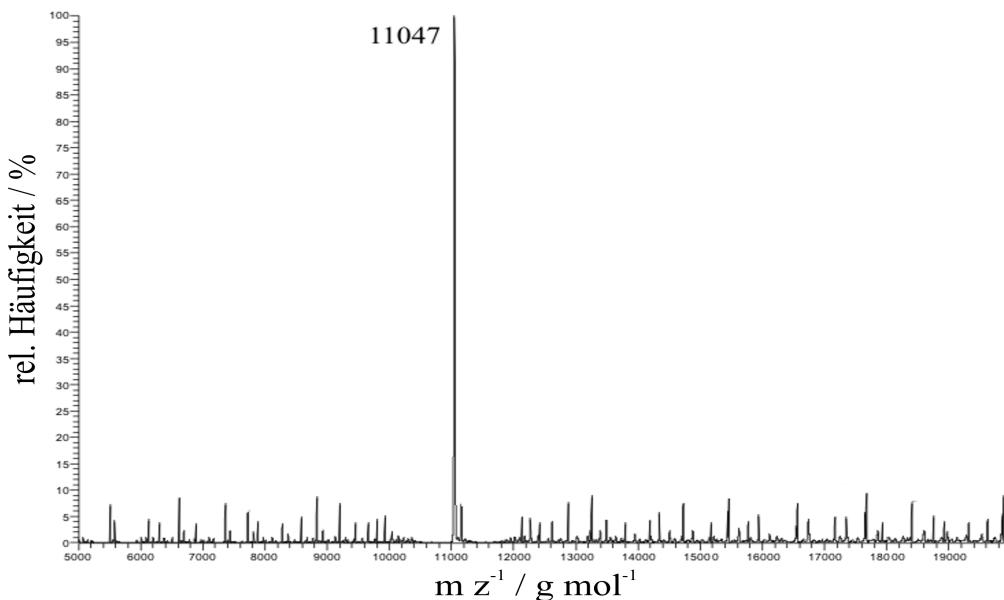


Abbildung 34: ESI-Massenspektrum von Schweine-S100A11 isoliert aus *E.coli*.

Das Massenspektrum (Abbildung 34) weist einen Peak bei einem m/z -Verhältnis von 11047 g/mol auf, der mit der aus der Aminosäurezusammensetzung von monomeren Schweine-S100A11 berechneten molekularen Masse von $11048 \text{ g/mol}^{107}$ im Fehlerbereich übereinstimmt.

Durch N-terminale Sequenzierung* des isolierten Proteins wurden die Aminosäuren 2-10 (AKRPTETER) bestimmt und so das Protein als Schweine-S100A11 identifiziert.

4.1.4 Aufreinigung des $(\text{Annexin A2})_2(\text{S100A10})_2$ -Heterotetramerkomplexes aus Schweinemucosa

$(\text{Annexin A2})_2(\text{S100A10})_2$, im Folgenden auch Annexin A2t genannt, wurde nach einer Vorschrift nach Ross⁷⁹, welche auf der Vorschrift von Gerke und Weber⁷⁴ basierte, aus der Mucosa von Schweinedärmen isoliert. Der Hauptreinigungseffekt beruht auf der calciumabhängigen Bindung von Annexin A2t an Membranen und dessen Ablösung mit EGTA.

Nach mehreren Zentrifugationsschritten in Ca^{2+} -haltigem Puffer konnte ein Teil der löslichen Verunreinigungen abgetrennt werden, während das Protein an Membranen

* Die ESI-MS-Analysen und die Sequenzierungen wurden von E. Hochmuth und Prof. Dr. R. Deutzmann, Institut für Biochemie, Genetik und Molekularbiologie, Universität Regensburg, durchgeführt.

gebunden pelletiert wurde. Nach Ablösen des Proteins von den Membranen in EGTA-haltigem Puffer wurden die festen Bestandteile abzentrifugiert und die überstehende Proteinlösung, in der sich Annexin A2t befand bei pH 7.4 über eine DE52-Säule vorgereinigt. Annexin A2t befand sich ausschließlich im Durchlauf. Bei einem pH-Wert von 6.0 wurde Annexin A2t an einer MonoS-Säule mittels eines FPLC-Systems durch Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten zwischen 50 und 500 mM NaCl von noch vorhandenen Verunreinigungen getrennt. Annexin A2t lag mit einer aus dem SDS-Gel abgeschätzten Reinheit von über 95 % vor (Abbildung 35). Annexin A2t wurde im SDS-Gel durch die beiden Banden bei 36 kDa (Annexin A2) und 10 kDa (S100A10) nachgewiesen. Aus 700 g Mucosa wurden etwa 50 mg Annexin A2t isoliert.

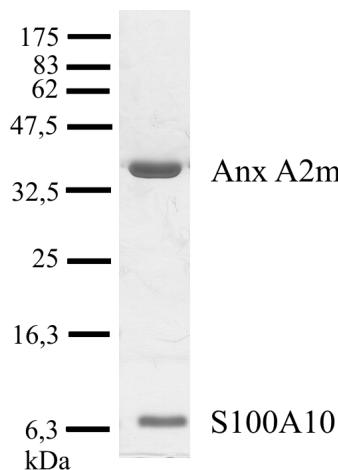


Abbildung 35: SDS-Gel von Annexin A2t nach der Aufreinigung aus Schweinemucosa.

Mittels Western-Blot Analysen und MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry)-Analyse des intakten Heterotetramerkomplexes, sowie einer Peptidkartierung der tryptischen Fragmente mittels Massenspektrometrie konnte das isolierte Protein eindeutig als Annexin A2t identifiziert werden (Daten siehe Dissertation Ross⁷⁹).

Untersuchung der Aktivität von Annexin A2t durch calciumabhängige Bindung an Membranen

Das aus Schweinemucosa isolierte Annexin A2t wurde auf seine Fähigkeit, Ca^{2+} -abhängig an Membranen zu binden, mittels eines Vesikelpelletierungsassays analog 3.3.12 untersucht. Es wurden 8 μg Annexin A2t zusammen mit 125 μg multilamellaren POPC/POPS (4:1) Vesikeln in 160 μl Puffer Ca_1 eingesetzt. Die Anwesenheit des Proteins wurde im Überstand nach der ersten Zentrifugation (\ddot{U}_{Ca}) und im Überstand nach der Inkubation mit EGTA (P_{Ca}) überprüft.

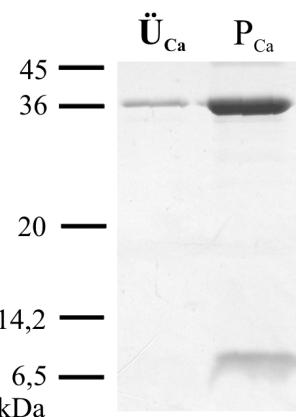


Abbildung 36: SDS-Gel des Vesikelpelletierungssassys mit 8 µg Annexin A2t aus Schweinemucosa in Gegenwart von 160 µl 1 mM Ca^{2+} -haltigen Puffer Ca_1 mit 125 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikeln. Ü: Überstand des Ansatzes. P: Überstand nach Inkubation des Pellets mit EGTA.

Annexin A2t lag nur noch in geringer Konzentration im Überstand nach der Zentrifugation des Ansatzes vor ($\ddot{\text{U}}_{\text{Ca}}$). Aufgrund der geringen Konzentration des Proteins im Überstand, konnte nur noch die Bande des Annexin A2m bei ca. 36 kDa und nicht mehr die des S100A10 bei 10 kDa detektiert werden (Abbildung 36). Durch Inkubation des Vesikelpellets mit EGTA-haltigem Puffer löste sich das gebundene Annexin A2t von den Membranen ab und wurde nach der Pelletierung der Vesikel im Überstand (P_{Ca}) durch die beiden Banden bei 36 kDa und 10 kDa nachgewiesen. Bei einem Kontrollansatz ohne Ca^{2+} konnte nahezu keine Annexin A2t-Membran-Wechselwirkung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).⁷⁹ Die Aktivität des isolierten Annexin A2t, d.h. die Ca^{2+} -abhängige Bindung an Membranen, konnte somit bestätigt werden.

4.1.5 Trennung des $(\text{Annexin A2})_2(\text{S100A10})_2$ -Heterotetramerkomplexes in seine beiden Untereinheiten

Der aus Schweinemucosa isolierte $(\text{Annexin A2})_2(\text{S100A10})_2$ -Heterotetramerkomplex (Anx A2t) wurde nach einer Vorschrift von Gerke et al.⁵⁶ in seine beiden Untereinheiten Annexin A2m und S100A10 aufgetrennt. Hierzu wurden 5 mg Annexin A2t mit einer Konzentration von ca. 25 mg/ml durch Dialyse gegen 9 M Harnstoff-Puffer (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 2 mM NaN_3 , 3 mM DTT, pH 7.5) bei Raumtemperatur denaturiert. Das Proteingemisch wurde auf eine Sephadex S-200-HR-Säule (Höhe: 100 cm, Durchmesser: 0,9 cm, V = 64 ml) aufgetragen und die gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 37). Aufgrund ihrer

unterschiedlichen Massen von ca. 36 kDa (Anx A2m) und ca. 11 kDa (S100A10) eluierten die beiden Proteine deutlich getrennt voneinander (Abbildung 37).

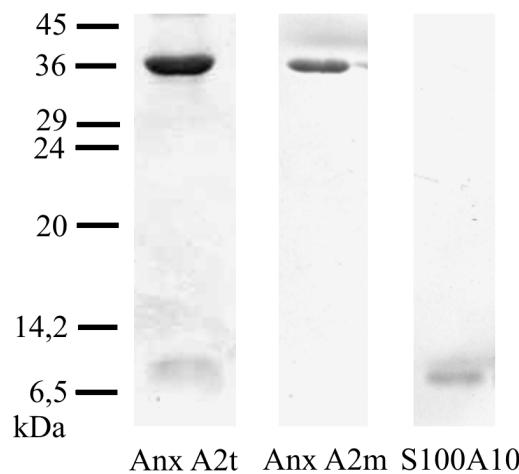


Abbildung 37: SDS-Gel des $(\text{Annexin A2})_2(\text{S100A10})_2$ -Heterotetramerkomplexes (Anx A2t) und seinen Untereinheiten Annexin A2m (Anx A2m) und S100A10 nach Trennung mittels Gelfiltration in 9 M-Harnstoff-haltigem Puffer.

Um die beiden Proteine zu renaturieren, wurden sie getrennt voneinander mindestens 24 Stunden gegen Renaturierungspuffer (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1,5 mM NaN₃, 0,5 mM DTT, pH 7,5) dialysiert.

Untersuchung der Aktivität von Annexin A2m und S100A10 durch Bildung des aktiven Heterotetramerkomplexes

Um die Funktionalität der nach der Denaturierung voneinander getrennten und wieder renaturierten Proteine Annexin A2m und S100A10 zu kontrollieren, wurde die Fähigkeit der Proteine, einen aktiven Heterotetramerkomplex zu bilden, untersucht. Die Bildung des Komplexes wurde durch dessen Eigenschaft, Ca²⁺-abhängig an Membranen zu binden, wie in Kapitel 3.3.12 nachgewiesen. Nach 20 minütiger Inkubation von 8 µg Annexin A2m mit 8 µg S100A10 wurde ein Vesikelpelletierungsassay mit 125 µg multilamellaren POPC/POPS (4:1)-Vesikel in 160 µl Puffer Ca₁ durchgeführt. Es wurde die Anwesenheit des Proteins im Überstand nach der ersten Zentrifugation (\ddot{U}_{Ca}) und im Überstand nach der Inkubation mit EGTA (P_{Ca}) untersucht.

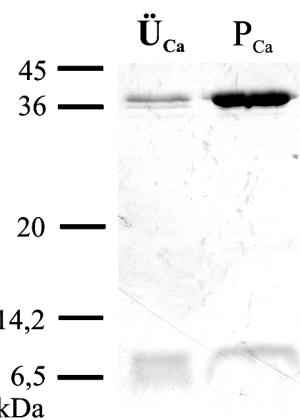


Abbildung 38: SDS-Gel des Vesikelpellettierungsassays mit 8 µg Annexin A2m und 8 µg S100A10 in Gegenwart von 1 mM Ca²⁺-haltigem Puffer Ca₁ nach 20 Minuten Inkubation und anschließender Zugabe von 125 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikel. Ü: Überstand des Ansatzes. P: Überstand nach Inkubation des Pellets mit EGTA.

Die schwache Bande bei ca. 36 kDa in der Spur des Überstandes Ü_{Ca} in Abbildung 38 zeigt, dass Annexin A2m nur noch in geringer Konzentration im Überstand nach Inkubation mit den Vesikeln vorlag. Außerdem befand sich S100A10 noch deutlich im Überstand, da es nicht im äquimolaren Verhältnis mit Annexin A2m inkubiert, sondern im Überschuss zugesetzt wurde. Auf dem SDS-Gel ist zu sehen, dass beide Proteine mit den Vesikeln pelletiert wurden und sich nach Inkubation mit EGTA-haltigem Puffer im Überstand befanden. Eine Wechselwirkung von S100A10 mit Membranen konnte durch einen äquivalenten Vesikelassay nur mit S100A10 in Abwesenheit von Annexin A2m nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise konnte die Aktivität der beiden Proteine bestätigt werden.

4.1.6 Diskussion

4.1.6.1 Isolierung und Charakterisierung von Annexin A1 aus verschiedenen Organismen

Annexin A1 wurde aus zwei verschiedenen Organismen isoliert. Durch rekombinante Expression in *E.coli*-Bakterien konnten aus einem Liter Kultur 35 mg Annexin A1 mit einer Reinheit von über 95 % nach einer Vorschrift von Rosengarth et al.⁷⁸ isoliert werden. Alle Aufreinigungsschritte wurden in Ca²⁺-freien Lösungen durchgeführt, da die Proteolyse des proteolyseempfindlichen N-Terminus von Annexin A1 in Ca²⁺-freier Umgebung langsamer abläuft als in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen.^{8,42} Der Grund hierfür ist, dass Annexin A1 im Ca²⁺-beladenen und -freien Zustand unterschiedliche Konformationen aufweist. Die N-terminale Domäne ist in Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen

in die relativ proteolysestabile Kerndomäne eingelagert und ist somit wahrscheinlich für Proteasen erschwert zugänglich.¹⁶ Durch die zusätzliche Verwendung von Proteaseinhibitoren wurde die Proteolyse erfolgreich unterdrückt, sodass bei allen Aufreinigungsschritten in den SDS-Gelen keine proteolytischen Fragmente wie Δ^{1-16} Annexin A1 mit 35 kDa oder Δ^{1-29} Annexin A1 mit 33 kDa zu erkennen waren. Auf diese Weise konnte vollständiges Annexin A1_{n-ac} mit guter Ausbeute isoliert werden.

Das Elutionsprofil der MonoS-Säule zeigte neben einem Hauptpeak auch noch mehrere kleine Nebenpeaks. Aus den SDS-Gelen ist erkennbar, dass bei den Elutionsfraktionen des Hauptpeaks nur eine einzelne Bande bei ca. 36 kDa auftritt, jedoch bei den Fraktionen der Nebenpeaks ebenfalls nur eine schwache Bande bei 36 kDa und keine weiteren Banden nachgewiesen werden konnten. So wird angenommen, dass die Nebenpeaks entweder durch Verunreinigungen zustande kommen, die nicht auf den hier verwendeten 12,5 und 15 %igen SDS-Gelen nachzuweisen sind, oder dass Annexin A1-Populationen, welche durch partielle Denaturierung oder Oxidation veränderte Ladungseigenschaften besitzen, bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluieren. Es wurde darauf geachtet, dass die Fraktionen des Hauptpeaks nicht mit den Fraktionen der Nebenpeaks vereinigt wurden, um die Verwendung von einheitlichem Annexin A1_{n-ac} für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu prokaryontischen Systemen, wie Bakterien, können in eukaryontischen Expressionssystemen, wie Hefen oder Insektenzellen, Proteine mit ihren posttranslationalen Modifizierungen isoliert werden. Nur die Isolierung von Proteinen aus Primärgewebe gewährleistet jedoch, dass diese in ihrer original wirksamen Form mit dem entsprechenden Anteil an Modifizierungen gewonnen werden. Allerdings sind derartige Aufreinigungen meist aufwendiger und liefern geringere Ausbeuten. Da die N-terminale Acetylierung von Annexin A1 essentiell für seine Wechselwirkung mit S100A11 sein soll, wurde es aus Schweinlunge nach einer leicht veränderten Vorschrift von Seemann et al. aufgereinigt.^{58,71} Aus 700 g Lunge wurden 0,7 mg Annexin A1_{ac} mit einer Reinheit von über 95 % gewonnen. Bei dieser Methode war es essentiell, die Proteolyse von Annexin A1_{ac} während der Aufreinigung so gut wie möglich durch eine schnelle Aufarbeitung des Gewebes, den Einsatz hoher Konzentrationen an Proteaseinhibitoren und ständige Kühlung des Ansatzes einzuschränken. Die deutlichen Banden bei ca. 33 kDa, der typischen Masse von Annexin-Kerndomänen, im SDS-Gel deuten darauf hin, dass trotz der Maßnahmen, Proteolyseprozesse einzuschränken, ein großer Anteil an N-terminal verkürzten Annexinen vorliegt. Dies liegt zum einen an der sukzessiven Proteolyse der Proteine vor allem in den Anfangsschritten der Aufreinigung, zum anderen daran, dass auch im Gewebe selbst bereits proteolytisch

abgedaute Annexine vorliegen. Es ist bekannt, dass durch die kontrollierte Proteolyse N-terminaler Segmente die Funktion der einzelnen Annexine reguliert wird.⁷ So ist es naheliegend, dass bereits in lebenden Zellen ein bestimmter Anteil an Annexin-Fragmenten mit unterschiedlichen Proteolysegraden vorliegen.

Die mittleren molekularen Massen des aus *E.coli* isolierten Annexin A1_{n-ac} und des aus Schweinelunge gewonnenen N-terminal acetylierten Annexin A1_{ac} wurden mittels ESI-MS bestimmt. Die Differenz der beiden ermittelten mittleren molaren Massen entsprach im Rahmen des Fehlerbereiches der Masse einer Acetylgruppe (42 g/mol).

Die Blockierung der N-terminalen Aminosäure des isolierten Annexin A1_{ac} bei der N-terminalen Sequenzierung bestätigte ebenfalls, dass das Protein aus Schweinelunge, im Gegensatz zu rekombinantem Annexin A1_{n-ac}, am Aminoende acetyliert ist. Trotzdem konnte die Sequenz der ersten Aminosäuren bestimmt werden, die mit der des nicht-acetylierten Annexin A1_{n-ac} übereinstimmt und das Protein eindeutig als Annexin A1_{ac} identifiziert. Dies war möglich, da ein geringer Anteil des Proteins in nicht-acetylierter Form vorlag (E. Hochmuth, persönliche Mitteilung). Der genaue Grad der Acetylierung konnte jedoch nicht bestimmt werden. Da aber das Massenspektrum des aus Schweinelunge isolierten Annexins nur einen, wenn auch weniger aufgelösten, Peak um 38655 g/mol und keinen signifikanten Peak bei einer um 42 g/mol kleineren Masse aufwies, wurde davon ausgegangen dass nur ein vernachlässigbarer Anteil an nicht-acetyliertem Annexin A1 nach der Aufreinigung aus Schweinelunge vorlag.

Um sicherzugehen, dass die isolierten Proteine in ihrer aktiven Form gewonnen wurden, wurde jeweils ein Aktivitätstest durchgeführt. Hierbei wurde die Eigenschaft der Annexine, Ca²⁺-abhängig an negativ-geladene Phospholipide zu binden mittels eines Vesikelpellettierungsassays kontrolliert. Multilamellare Vesikel, die zu 80 % aus POPC und zu 20 % aus dem negativ geladenen POPS bestanden, wurden mit dem entsprechenden Annexin in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen inkubiert. Die Vesikel wurden mit den daran gebundenen Proteinen pelletiert und anschließend die Ca²⁺-abhängig gebundenen Proteine wieder durch Zugabe von EGTA abgelöst. Die SDS-PAGE Analysen ergaben eindeutig, dass die isolierten Proteine Annexin A1_{n-ac} und Annexin A1_{ac} Ca²⁺-abhängig an Membranen binden. Allerdings blieb ein geringer Teil (etwa 20 %) von Annexin A1 nach Inkubation mit EGTA irreversibel an die Vesikel gebunden. Schläpfer et al. zeigten ebenfalls, dass Annexin A1 nur in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen an unilamellare PS-Vesikel und nicht an PC-Vesikel bindet.²⁴

4.1.6.2 Isolierung von S100A11 aus *E.coli*

Die nach einer leicht veränderten Vorschrift von Seemann et al.⁵⁹ durchgeführte Aufreinigung von S100A11 aus einer 100 ml *E.coli*-Kultur lieferte eine Ausbeute von 17 mg mit einer Reinheit von über 95 %. Das gegenüber Proteolyse relativ unempfindliche S100A11 konnte in nur einem Aufreinigungsschritt mit hoher Reinheit gewonnen werden. Zur Aufreinigung wurde die unterschiedliche Konformation des Proteins im Ca²⁺-beladenen und Ca²⁺-freien Zustand ausgenutzt. Durch die Besetzung der Ca²⁺-Bindungsstellen treten hydrophobe Aminosäurereste an die Proteinoberfläche.^{47,51,54} So kann das Protein an eine hydrophobe Matrix wie Phenylsepharose über hydrophobe Wechselwirkungen binden. Die Wechselwirkung konnte aufgrund einer Konformationsänderung des Proteins in seinen hydrophileren Ca²⁺-freien Zustand nach Entzug der gebundenen Ca²⁺-Ionen durch EGTA aufgelöst werden.^{47,48,51,54,59,108} Die Aufreinigung von S100A11 über die Ca²⁺-abhängige Bindung an eine hydrophobe Matrix beschrieben auch Allen et al.⁴⁸ aus Primärgewebe wie Hühnermuskelmagen und Ohta et al.¹⁰⁹ aus dem Schweineherzmuskel.

Das isolierte Protein wurde eindeutig durch Western-Blot-Analyse, Massenspektroskopie und N-terminaler Sequenzierung als S100A11 identifiziert.

Seemann et al. konnten mittels analytischer Gelfiltration zeigen, dass die Retentionszeit, bei der das isolierte S100A11 eluierte, einer Masse von etwa 20 kDa entsprach und somit in der für S100-Proteine charakteristischen dimeren Form vorlag.^{58,59}

4.1.6.3 Isolierung des Annexin A2t aus Schweinemucosa und Aufspaltung in seine aktiven Untereinheiten

Annexin A2t wurde nach einer leicht veränderten Vorschrift von Gerke und Weber⁷⁴ aus Schweinemucosa isoliert. Aus 700 g Mucosa wurden etwa 50 mg Annexin A2t mit einer Reinheit von über 95 % gewonnen. Durch MALDI-MS wurde das Protein eindeutig als nicht-kovalent verbundener Komplex aus den beiden Untereinheiten Annexin A2m und S100A10 nachgewiesen.⁷⁹ So wurde angenommen, dass nach der Denaturierung von Annexin A2t in Gegenwart von 9 M Harnstoff und anschließender gelchromatographischer Auftrennung es sich bei den beiden erhaltenen Proteinen um Annexin A2m und S100A10 handelte. Dies wurde durch Größenabschätzung mittels SDS-PAGE Analyse bestätigt. Die Bande im SDS-Gel des Annexin A2m entsprach der oberen Bande von Annexin A2t bei ca. 36 kDa und die des S100A10 der unteren Bande bei ca. 10 kDa. Die Renaturierung der Proteine erfolgte durch Dialyse, um Harnstoff aus der Proteinlösung zu entfernen. Dadurch sollten sich die durch Harnstoff teilweise

zerstörten nicht-kovalenten Wechselwirkungen der Proteine wieder ausbilden und so die native Konformation des Proteins wiederhergestellt werden.

Gerke und Weber⁵⁶ bestätigten, dass nach Trennung der beiden Untereinheiten von Annexin A2t unter denaturierenden Bedingungen die Proteine unter den oben genannten Bedingungen wieder renaturiert werden können und in ihrer aktiven Form vorliegen. Sie konnten mittels Gelfiltration zeigen, dass S100A10 in denaturiertem Zustand als monomeres 10 kDa-Protein vorlag, sich nach Renaturierung jedoch wieder das nativ vorliegende S100A10-Dimer mit 20 kDa bildete. Nach einstündiger Inkubation der beiden Untereinheiten in äquimolarem Verhältnis, zeigten sie mittels analytischer Gelfiltration, dass sich wieder ein aktiver ca. 90 kDa-Heterotetramerkomplex gebildet hatte.⁵⁶ Bei einigen Studien, welche sich mit Annexin A2t beschäftigten, wurde der Heterotetramerkomplex nicht direkt isoliert, sondern Annexin A2m und S100A10 getrennt voneinander rekombinant aus Hefezellen oder Bakterien gewonnen. Nach Inkubation der beiden Proteine lagerten sie sich zu dem Heterotetramerkomplex zusammen.^{110,111}

Die Fähigkeit der beiden isolierten Untereinheiten, einen aktiven Heterotetramerkomplex zu bilden, wurde in dieser Arbeit mittels eines Vesikelpellettierungssassays überprüft. Da S100A10 nicht ohne Annexin A2m signifikant an Membranen bindet, kann angenommen werden, dass S100A10 mit Annexin A2m wechselwirkt und somit über Annexin A2m an die Membranen gebunden hatte. Da die Membranbindungseigenschaft der beiden Proteine nach Inkubation dem Bindungsverhalten von Annexin A2t entsprach, wurde davon ausgegangen, dass Annexin A2m und S100A10 vollständig renaturiert wurden und sich wieder zu einem aktiven heterotetrameren Komplex zusammenlagerten.

4.2 Modelle zur Auswertung der Bindungskinetik von Teilchen an Oberflächen

Wie bereits aus mehreren Studien bekannt ist und in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, bindet Annexin A1 in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an PS-haltige Membranen und lässt sich durch Zugabe eines Ca^{2+} -Chelators wieder von den Membranen ablösen.^{8,24,31} So sollte im Folgenden mit Hilfe der Quarzmikrowaage die Bindung von Annexin A1 an planare festkörperunterstützte Membranen quantifiziert werden. Dabei sollte das Ausmaß der Reversibilität der Wechselwirkung durch die Messung der Desorption in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration analysiert werden und Erkenntnisse über die Dynamik dieser Interaktion gewonnen werden (Kapitel 4.3). Weiterhin sollte die Annexin A1-vermittelte Membranaggregation aus dem Adsorptionsverhalten von Vesikeln an membran-gebundenes Annexin A1 mittels der dissipativen Quarzmikrowaage (QCM-D) untersucht werden (Kapitel 4.5).

Um die Kinetik der Wechselwirkung von Annexin A1 mit festkörperunterstützten Membranen, sowie der Interaktion von Vesikeln mit membran-gebundenem Annexin A1 beschreiben zu können, ist es nötig, ein geeignetes theoretisches Modell aufzustellen. Zur allgemeinen Beschreibung der Bindung von Makromolekülen an Oberflächen wird im Folgenden das Random Sequential Adsorption (RSA)-Modell vorgestellt.

Während das Langmuir-Modell die Bindung an definierte nicht-überlappende Gitterplätze voraussetzt, wird beim RSA-Modell entweder die Adsorption an eine kontinuierliche Fläche oder an Gitterplätze, die sich überlappen können, angenommen. Das Prinzip der Adsorption nach dem RSA-Modell basiert auf der zufälligen Positionierung eines Partikels auf einer definierten Fläche mit gleicher Wahrscheinlichkeit. Bei Überlappung des Partikels mit einem anderen adsorbierten Partikel erfolgt keine Adsorption. Bei erfolgreicher Adsorption wird der Partikel fixiert und die Prozedur wiederholt sich. Auf diese Weise kann für scheibenförmige Partikel eine maximale Belegung von 0,547 erreicht werden.¹¹²

Es lassen sich drei unterschiedliche Fälle der Adsorption unterscheiden:

- Reversible Adsorption
- Irreversible Adsorption
- Partiell reversible Adsorption / heterogene Oberflächen

a) Reversible Adsorption

Die Ratengleichung im reversiblen Fall (vergleiche Abbildung 39) kann ausgedrückt werden durch:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{\text{on}} \tilde{\rho}(\delta) \rho(\theta) - k_{\text{off}} \theta, \quad \text{GL-42}$$

wobei θ die Oberflächenbelegung, $\tilde{\rho}(\delta)$ die Geschwindigkeitskonstante der Adsorption, k_{off} die Geschwindigkeitskonstante der Desorption, πa^2 die Fläche, welche durch einen scheibenförmigen Partikel belegt wird, $\Phi(\theta)$ die Oberflächenblockierungsfunktion und $\rho(\delta)$ die Partikeldichte in der Nähe der Oberfläche beschreiben.

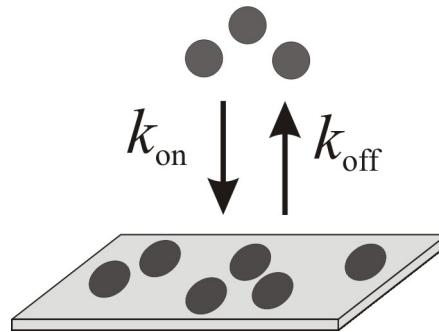


Abbildung 39: Modell der vollständig reversiblen Bindung von Teilchen auf eine Oberfläche mit den Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption k_{on} und der Desorption k_{off} .

$\rho(\delta)$ hängt vom Massentransport der Moleküle zur Oberfläche ab. Der Fluss j zur Oberfläche kann im Falle eines Stauflusspunktes durch Gleichung 43 näherungsweise ausgedrückt werden:^{113,114}

$$j = k_{\text{tr}} [\rho(\infty) - \rho(\delta)], \quad \text{GL-43}$$

mit der Transportgeschwindigkeitskonstante k_{tr} und der Moleküldichte $\rho(\infty)$ in der Lösung.

Das Modell der reversiblen Adsorption stellt einen idealen Fall dar, der in der Praxis bei der Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen nur selten auftritt. Meistens wird eine irreversible oder zumindest partiell irreversible Adsorption beobachtet.¹¹⁵⁻¹¹⁷

b) Irreversible Adsorption

Da festgestellt wurde, dass es sich bei der Adsorption von Vesikeln an membran-gebundenes Annexin A1 um einen irreversiblen Prozess handelt (Kapitel 4.5), wird im Folgenden ein Modell zur Auswertung der Kinetik der irreversiblen Adsorption von Vesikeln vorgestellt.

Für eine irreversible Adsorption (vergleiche Abbildung 40) ist $k_{\text{off}} = 0$. Somit ergibt sich als Ratengleichung:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{\text{on}}^{\text{irr}} \pi a^2 \rho(\delta) \Phi(\theta), \quad \text{GL-44}$$

wobei $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ die Geschwindigkeitskonstante der irreversiblen Adsorption, πa^2 die Fläche, welche durch ein Molekül belegt wird, $\Phi(\theta)$ die Oberflächenblockierungsfunktion und $\rho(\delta)$ die Moleküldichte in der Nähe der Oberfläche ist.

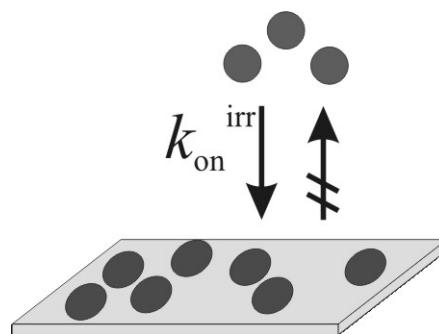


Abbildung 40: Modell der irreversiblen Adsorption mit der Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ von Teilchen an eine Oberfläche, die in gleich große Bereiche aufgeteilt ist.

Zur Auswertung der Kinetik der Adsorption von Vesikeln an membran-gebundenes Annexin A1 wurden geeignete Computersimulationen durchgeführt, welche auch die Diffusion der Vesikel zu Oberfläche berücksichtigen (Algorithmus vergleiche ^{118,119}).^{*} Die Adsorption von Vesikeln wurde durch die zweidimensionale aufeinanderfolgende zufällige Adsorption (RSA) von runden Scheiben simuliert in Kombination mit einem *mean-field*-Ansatz, um den Fluss der Vesikel zur Oberfläche zu berücksichtigen. Hierfür wurde eine quadratische Fläche mit einer Kantenlänge von 12 μm angenommen, an die Vesikel mit einem Radius von (60 ± 10) nm adsorbieren (vergleiche Abbildung 40). Dabei wurden die elektrostatischen Wechselwirkungen

* Die Simulationen wurden von E. Lüthgens und A. Janshoff, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt.

zwischen den adsorbierten Vesikeln, die hauptsächlich negativ geladen waren, durch eine Erhöhung des effektiven Radius berücksichtigt (Berücksichtigung der Elektrostatik bei der Größe der Vesikel, siehe Anhang 7.2).

c) Partiell reversible Adsorption / heterogene Oberflächen

Für die Bindung von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen wurde festgestellt, dass es sich um eine partiell reversible Bindung handelt, d.h. ein Teil des Proteins adsorbiert irreversibel und ein Teil reversibel. Im Folgenden wird ein Modell aufgestellt, nach dem die Kinetik dieser Bindung ausgewertet werden kann.

Es wird angenommen, dass eine heterogene Oberfläche vorliegt, an deren unterschiedliche Bereiche das Protein unterschiedlich bindet. Für die Adsorption von Annexin A1 an Membranen wird angenommen, dass das Protein irreversibel an runde Domänen und reversibel an die Bereiche zwischen den Domänen bindet (Abbildung 41).

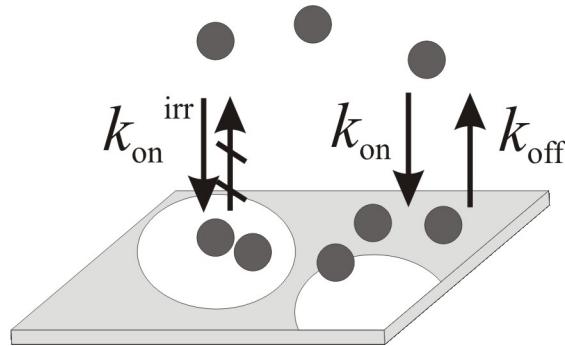


Abbildung 41: Modell der partiell reversiblen Adsorption von Teilchen an eine Oberfläche. Auf der Oberfläche befinden sich Bereiche, hier runde weiße Domänen, an die Teilchen irreversibel adsorbieren ($k_{\text{on}}^{\text{irr}}$). Die reversible Adsorption (k_{on} und k_{off}) kann an die restliche Oberfläche (Zwischenbereich) erfolgen.

Für den Bereich der irreversiblen (Index 1) und der reversiblen (Index 2) Adsorption können separate Ratengleichungen aufgestellt werden:

$$\frac{d\theta_1}{dt} = k_{\text{on}}^{\text{irr}} \pi a^2 \rho(\delta) \Phi_1(\theta_1) - k_{\text{off}} \theta_1 \quad \text{GL-45}$$

und

$$\frac{d\theta_2}{dt} = k_{\text{on}} \pi a^2 \rho(\delta) \Phi_2(\theta_2) - k_{\text{off}} \theta_2, \quad \text{GL-46}$$

wobei $\tilde{k}_{\text{on}}^{\text{irr}}$ die Geschwindigkeitskonstante der irreversiblen Adsorption, \tilde{k}_{on} und k_{off} die Werte für die reversible Adsorption sind. Die reversible und irreversible Adsorption kann jedoch nicht strikt getrennt voneinander betrachtet werden, da bei der Adsorption eines Teilchens an einer Domänengrenze (vergleiche Abbildung 41) zwar das Teilchen als irreversibel gebunden betrachtet wird, jedoch sowohl θ_1 als auch θ_2 verändert werden.

Zur Auswertung der Kinetik der Adsorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen wurden Computersimulationen durchgeführt, welche die reversible und die irreversible Adsorption, sowie die Diffusion des Proteins zur Oberfläche umfassen.* Die Proteinadsorption durch die zweidimensionale aufeinanderfolgende zufällige Adsorption (RSA) von harten runden Scheiben simuliert in Kombination mit einem *mean-field*-Ansatz.

Es wurde eine Simulationsfläche mit der Kantenlänge 1 μm angenommen, auf der 200 kreisrunde Domänen zufällig angeordnet sind. Die von den Domänen eingenommene maximale Oberflächenbelegung wurde auf 35 % gesetzt. Um eine geringere Oberflächenbelegung zu berücksichtigen wurde die von den Domänen eingenommene Oberfläche zwischen 5 % und 35 % variiert, und mittlere Domänengrößen von 17 bis 44,8 nm für die Simulationen verwendet.

* Die Simulationen wurden von S. Faiß, E. Lüthgens und A. Janshoff, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt.

4.3 Einfluss von Ca^{2+} -Ionen auf die Adsorption und Desorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen – Charakterisierung der primären Membranbindung

Annexin A1 kann Ca^{2+} -abhängig an Membranen binden und diese auch aggregieren. Dabei handelt es sich um zwei unterschiedliche Membran-Wechselwirkungen. Während die primäre Membranbindung über die Ca^{2+} -Bindungsstellen an der konvexen Seite des Proteinkerns vermittelt wird, bindet eine zweite Membran an die konkave Seite. Die primäre Ca^{2+} -abhängige Membranbindung von Annexin A1 kann unter Ausschluss der Membranaggregation mittels festkörperunterstützter Membranen untersucht werden. Zur Quantifizierung dieser Wechselwirkung stellte sich die Quarzmikrowaagetechnik als geeignet heraus. Hierzu wurde eine festkörperunterstützte Membran auf einer Goldelektrode des Resonators immobilisiert und die Adsorption des Proteins an die Membran durch zeitaufgelöste Messung der Frequenzänderung $\Delta f(t)$ verfolgt, welche proportional zur adsorbierten Masse ist (vergleiche Kapitel 3.4.3). Es konnte bereits in früheren Studien auf diese Weise bei konstanten Ca^{2+} -Konzentrationen die Affinität von Annexin A1 an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen durch Proteintitrationsexperimente ermittelt werden. Die Untersuchung der Reversibilität der Bindung von Annexin A1 an Membranen beschränkte sich in der Literatur darauf, die Adsorption und Desorption bei konstanter Ca^{2+} -Konzentration für die halbmaximale Bindung, meist als $c_{1/2}$ bezeichnet, zu bestimmen. Durch EGTA-Titrationsexperimente bei konstanter Proteinkonzentration wurde auch in früheren Studien mittels der QCM-Technik bereits die Ca^{2+} -Konzentration für halbmaximale Bindung ($c_{1/2} = (53 \pm 10)$ μM) für die Adsorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen bestimmt.³⁶ Über die Reversibilität der Bindung bei konstanter Ca^{2+} -Konzentration gibt es jedoch bislang wenig Informationen. Bitto et al. beobachteten, dass Annexin A1 in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} -Ionen nur partiell reversibel an Membranen bindet.³³ Diese Beobachtung gab Anlass dazu, die Reversibilität der Bindung zu charakterisieren und zu untersuchen, inwiefern die Ca^{2+} -Konzentration die Reversibilität der Bindung beeinflusst. Daraus sollten Informationen über die Dynamik und Organisation dieses Bindungsprozesses erhalten werden.

4.3.1 Charakterisierung der verwendeten festkörperunterstützten Membranen auf Goldoberflächen mittels Impedanzspektroskopie

Zur Untersuchung der Bindung von Annexin A1 an Membranen wurden festkörperunterstützte Membranen auf einer Goldelektrode des Quarzresonators, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, präpariert. Hierfür wurde zunächst eine Oktanthiol (OT)-Schicht chemisorbiert und anschließend mit einer Suspension von unilamellaren Vesikeln in EGTA-haltigem Puffer (E_1) überschichtet, um eine Fusion der Vesikel auf der hydrophoben OT-Oberfläche zu erzielen. Jeweils nach der Chemisorption der OT-Schicht und der Inkubation mit den Vesikeln wurde ein Impedanzspektrum im Bereich von 0,1 Hz bis 1 MHz in Puffer E_1 aufgenommen, wofür ein Messaufbau, wie in Kapitel 3.4.2.3 beschrieben, verwendet wurde. Abbildung 42 zeigt das Bode-Diagramm nach Messung einer OT-Schicht und einer OT-Phospholipid-Doppelschicht nach Fusion der Vesikel. Im Bode-Diagramm sind der Betrag der Impedanz $|Z|$, sowie die Phasenverschiebung φ in Abhängigkeit der angelegten Wechselspannungsfrequenz f dargestellt.

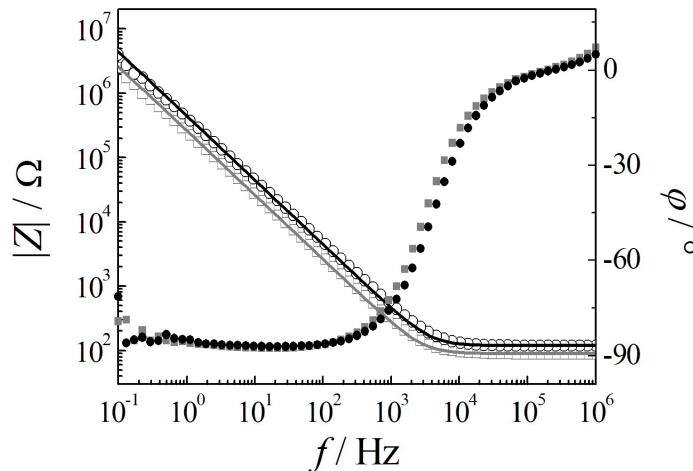


Abbildung 42: Impedanzspektrum einer OT-Schicht (■, □) und einer OT-POPC/POPS (4:1)-Doppelschicht (●, ○) in Puffer E_1 . Der Betrag der Impedanz $|Z|$ (□, ○) und die Phasenverschiebung φ (■, ●) sind in Abhängigkeit der Frequenz aufgetragen. Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 10 C: (□) $C_{el+m} = 2,03 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_{el} = 99 \Omega$, (○) $C_{el+m} = 1,19 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_{el} = 120 \Omega$.

Im Bereich hoher Frequenzen ist die Impedanz nahezu frequenzunabhängig, da hier der Widerstand R das Impedanzverhalten bestimmt. Bei kleinen Frequenzen beeinflusst die Kapazität die Gesamtimpedanz, sodass ab etwa 10⁴ Hz ein linearer Anstieg des Betrages der Impedanz zu beobachten ist und die Phasenverschiebung auf -90 ° sinkt. Nach Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes CR, das aus einer Reihenschaltung von Widerstand und Kapazität besteht (siehe Kapitel 3.4.2.2), wurden die elektrischen

Parameter C_{el+m} und R_{el} der präparierten Schichten bestimmt. Die ermittelte Elektrodenkapazität C_{el+m} setzt sich aus der Membrankapazität C_m und der Kapazität der elektrochemischen Doppelschicht C_{el} zusammen:

$$C_{el+m} = \frac{1}{\frac{1}{C_m} + \frac{1}{C_{el}}} . \quad \text{GL-47}$$

Da jedoch die Membrankapazität C_m etwa um den Faktor 10 kleiner ist als C_{el} , wird die Gesamtkapazität C_{el+m} hauptsächlich durch C_m bestimmt.⁸⁶

Die Kapazität einer Oktanthiolmonoschicht lag typischerweise bei $(1,8\text{--}2,3) \mu\text{F/cm}^2$. Für eine Oktanthiol-Phospholipid-Doppelschicht betrug der Wert der Kapazität $(0,9\text{--}1,3) \mu\text{F/cm}^2$. Durch statistische Auswertung der Kapazitäten aus 10 unabhängigen Messungen erhielt man einen Mittelwert der Kapazität für eine Oktanthiolmonoschicht von $(2,0 \pm 0,2) \mu\text{F/cm}^2$. Für die Doppelschichten ergab sich ein Mittelwert der Kapazität von $(1,1 \pm 0,2) \mu\text{F/cm}^2$. Somit ist gewährleistet, dass die Qualität der Schichten, d.h. die Belegung der Oberfläche, in jedem Fall bei mehr als 99 % liegt.^{120,121} Für die QCM-Messungen wurden nur festkörperunterstützte Membranen verwendet, deren Werte in diesem Bereich lagen.

4.3.2 Mikrogravimetrische Untersuchung der Ca^{2+} -abhängigen Bindung von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen

Um die Reversibilität der Annexin A1-Membran-Bindung bei konstanten Ca^{2+} -Konzentrationen zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Quarzmikrowaage zeitaufgelöst die Änderung der Resonanzfrequenz $\Delta f(t) = f(t) - f_0$ des Schwingquarzes während der Adsorption und der Desorption von Annexin A1 detektiert, wobei $f(t)$ die Frequenz zum Zeitpunkt t und f_0 die Resonanzfrequenz zu Beginn der Messung ist. Diese Messungen wurden im Durchflussmodus der QCM durchgeführt (Abbildung 43). Nach Zugabe von $0,4 \mu\text{M}$ Annexin A1 in Puffer Ca_1 ist eine Abnahme der Resonanzfrequenz zu beobachten, wobei nach 30 Minuten ein Gleichgewichtswert von $-(24 \pm 2) \text{ Hz}$ erreicht wird, welcher der maximalen Proteinbelegung unter diesen Messbedingungen entspricht.³⁶ Nach 30 Minuten Inkubation der Membran mit der Proteinlösung wurde das System mit Puffer Ca_1 gespült, um die Desorption zu induzieren. Daraufhin stieg die Resonanzfrequenz um $(4 \pm 2) \text{ Hz}$, was zeigt, dass nur etwa 20 % des adsorbierten Proteins wieder von der Membran desorbieren und die restlichen 80 % irreversibel gebunden sind. Um zu untersuchen, inwiefern die Ca^{2+} -Konzentration diese partielle

Reversibilität der Bindung beeinflusst, wurden analoge Messungen in Gegenwart von 100 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$) und 50 μM CaCl_2 (Puffer $\text{Ca}_{0,05}$) durchgeführt. Bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 100 μM sinkt die Resonanzfrequenz nach Zugabe von 0,4 μM Annexin A1 um $-(21 \pm 2)$ Hz und steigt nach dem Spülen um (5 ± 2) Hz. Bei weiterer Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration auf 50 μM wurde eine Frequenzabnahme von $-(11 \pm 2)$ Hz und eine Frequenzerhöhung von (3 ± 2) Hz ermittelt.

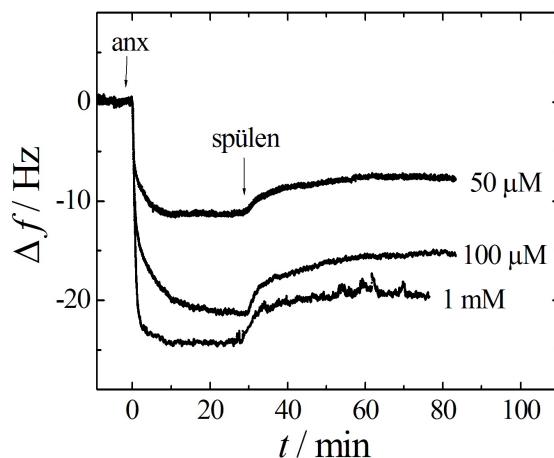


Abbildung 43: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes funktionalisiert mit einer OT-POPC/POPS (4:1)-Doppelschicht. Es wurden jeweils 0,4 μM Annexin A1 (anx) im Durchflussmodus der QCM in Gegenwart von entweder 50 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,05}$), 100 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$) oder 1 mM (Puffer Ca_1) CaCl_2 zugegeben und nach 30 Minuten die Messkammer mit dem entsprechenden Puffer gespült (spülen).

Die Ergebnisse zeigen, dass bei geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen weniger Annexin A1 an die Membran adsorbiert als bei höheren. Nach Entfernen des Proteins aus der Lösung durch Spülen mit Puffer desorbiert unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentrationen nur ein Anteil des Proteins von 20-40 %.

Kontrollmessungen belegen, dass die beobachteten Frequenzänderungen durch die Ca^{2+} -abhängige Bindung von Annexin A1 an negativ geladene Lipide hervorgerufen wird. Nach Zugabe von Annexin A1 zu POPS-freien POPC-Membranen in Puffer Ca_1 , sowie zu POPC/POPS (4:1)-Membranen in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen in Puffer E_1 konnte keine signifikante Frequenzänderung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Um Viskositätseffekte auszuschließen, welche Änderungen in der Resonanzfrequenz hervorrufen können, wurde die Adsorption mittels QCM-D-Messungen analysiert. Neben der Frequenzänderung konnte keine Dissipationsänderung nachgewiesen werden, was beweist, dass die Frequenzänderung durch die Adsorption einer relativ starren Masse, in diesem Fall des Proteins, zustande kommt und somit die Proportionalität zwischen Frequenzshift und Massenbelegung gegeben ist.

4.3.3 Topographische Untersuchung von membran-gebundenem Annexin A1 mittels Rasterkraftmikroskopie (SFM)

Die QCM-Messungen zeigten, dass Annexin partiell reversibel an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen adsorbiert. Um zu verstehen, welche laterale Organisation irreversibel gebundenes Annexin A1 besitzt, wurden rasterkraftmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Es wurden festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen auf frisch gespaltenem Glimmer durch Spreiten von unilamellaren Vesikeln analog den Ausführungen in Kapitel 3.2.2.2 in Puffer Ca_1 oder $\text{Ca}_{0,1}$ hergestellt. Um die Qualität der Membran zu analysieren, d.h. Defekte in den Membranen auszuschließen, wurden rasterkraftmikroskopische Bilder der Membranen an mindestens zwei verschiedenen Stellen aufgenommen. Alle Messungen wurden im *contact*-Modus durchgeführt. Die topographischen Aufnahmen zeigen fast defektfreie Membranen auf Glimmeroberflächen (Abbildung 44, -Anx A1).

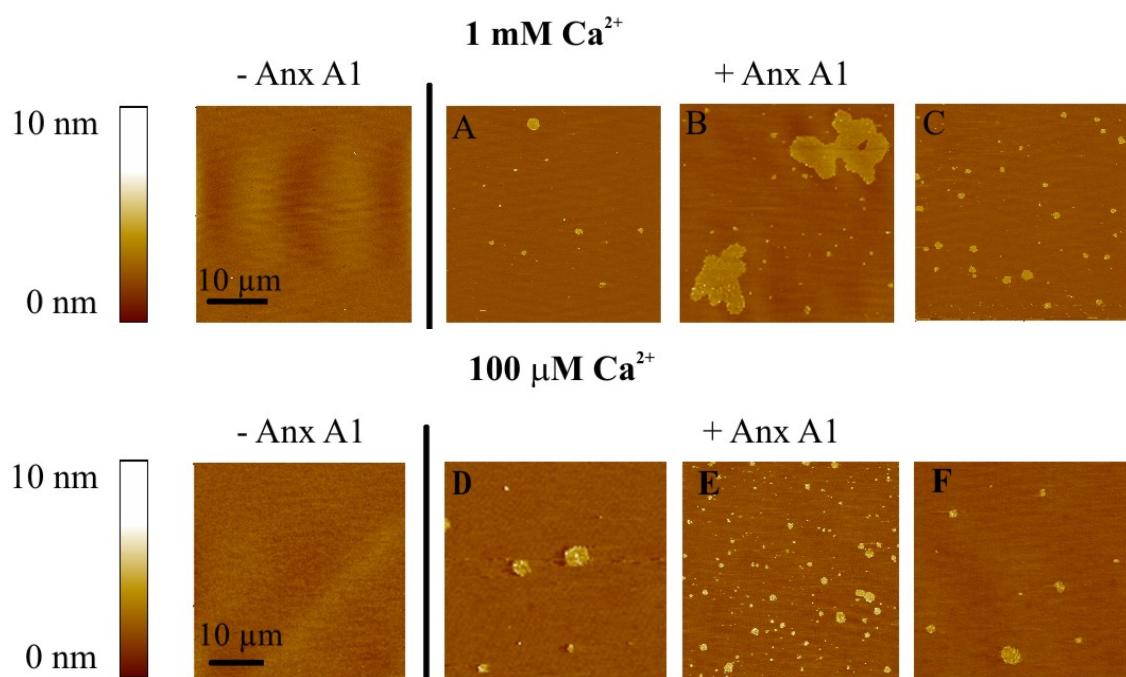


Abbildung 44: Topographische SFM-Aufnahmen einer POPC/POPS (4:1)-Doppelschicht auf Glimmer vor (-Anx A1) und nach (+Anx A1) 30-minütiger Inkubation mit 0,4 μM Annexin A1 in Gegenwart von 1 mM (Puffer Ca_1) und 100 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$) Ca^{2+} -Ionen. Um ausschließlich irreversibel gebundenes Annexin A1 an der Oberfläche zu gewährleisten, wurde nach der Proteininkubation mit Puffer gespült und dadurch reversibel gebundenes Protein entfernt. Die Abbildungen sind jeweils $30 \times 30 \mu\text{m}$ groß. Die Bilder A, B und C, bzw. D, E und F stellen jeweils unterschiedliche exemplarische Aufnahmen an verschiedenen Stellen der Proben dar.

Nach den Kontrollaufnahmen wurde die Membran mit 0,4 μM Annexin A1 entweder in 1 mM (Puffer Ca_1) oder 100 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$) Ca^{2+} -haltigem Puffer für 30 Minuten inkubiert. Da die Organisation von irreversibel gebundenem Annexin A1 untersucht werden sollte, wurde nach der Proteininkubation die Membran intensiv unter fließendem Puffer gespült, um reversibel gebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurde die Membran sofort an 5 bis 10 verschiedenen Stellen der Probe gescannt. Exemplarische Ergebnisse zeigen die Höhenbilder in Abbildung 44, wobei jeweils drei charakteristische Abbildungen von unterschiedlichen Stellen einer oder verschiedener Proben dargestellt sind. In den topographischen Aufnahmen sind heterogen verteilte Domänen erkennbar, die auf die Adsorption von Annexin A1 an die Membran zurückzuführen sind. Eine statistische Analyse der topographischen Aufnahmen von Membranen nach Annexin A1-Zugabe ergab, dass sowohl in Gegenwart von 1 mM als auch 100 μM Ca^{2+} -haltigem Puffer die Oberflächenbelegung durch die Domänen im Mittel etwa 5 % beträgt, wobei jedoch die Oberflächenbelegung von Bild zu Bild bei der gleichen Probe an unterschiedlichen Stellen sehr stark (zwischen 0,5 % und 10 %) variieren kann.

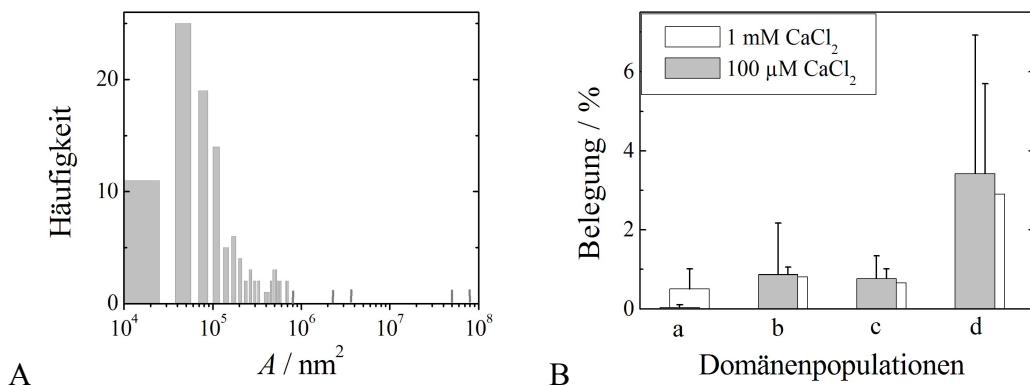


Abbildung 45: **A** Exemplarische Größenverteilung der Domänen einer charakteristischen Aufnahme (ca. $50 \times 50 \mu\text{m}$) von irreversibel gebundenem Annexin A1 auf POPC/POPS (4:1)-Membranen in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} -Ionen. **B** Verteilung der Proteinbelegung auf Domänenpopulationen unterschiedlicher Fläche A in Puffer Ca_1 und $\text{Ca}_{0,1}$. a: $A \leq 3 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$, b: $3 \cdot 10^4 \text{ nm}^2 < A \leq 8 \cdot 10^5 \text{ nm}^2$, c: $8 \cdot 10^5 \text{ nm}^2 < A \leq 3 \cdot 10^6 \text{ nm}^2$, d: $A > 3 \cdot 10^6 \text{ nm}^2$.

Die Verteilung der Fläche der visualisierten Domänen erstreckt sich über einen breiten Bereich von weniger als 10^4 nm^2 bis zu 10^8 nm^2 . Die Häufigkeit der Domänen einer Größenordnung nimmt tendenziell mit zunehmender Domänenfläche ab, wobei sehr große Proteinaggregate mit einer Fläche im Bereich von 10^6 bis 10^8 nm^2 nur vereinzelt auftreten (Abbildung 45 A). Diese großen Aggregate bestimmen jedoch die Oberflächenbelegung, da die Verteilung der Proteinbelegung auf Domänenpopulationen unterschiedlicher Domänengröße zeigt, dass über die Hälfte der Oberflächenbelegung

durch Domänen zustande kommt, deren Fläche größer als $3 \cdot 10^6 \text{ nm}^2$ ist (Abbildung 45 B). Vergleicht man die SFM-Ergebnisse bei den beiden Ca^{2+} -Konzentrationen, so sind neben der ähnlichen Oberflächenbelegung auch nahezu keine Unterschiede in der Verteilung der Größe der Domänen zu erkennen. Es ist zwar eine höhere mittlere Belegung durch kleine Domänen ($A < 3 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$) in Puffer Ca_1 ermittelt worden, jedoch stimmt der Wert im Rahmen seines Fehlers mit dem Wert bei $100 \text{ } \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Ionen überein.

Um die Höhe der Proteindomänen zu bestimmen, wurden einzelne Bereiche eines Bildes gewählt und eine Höhenanalyse vorgenommen.

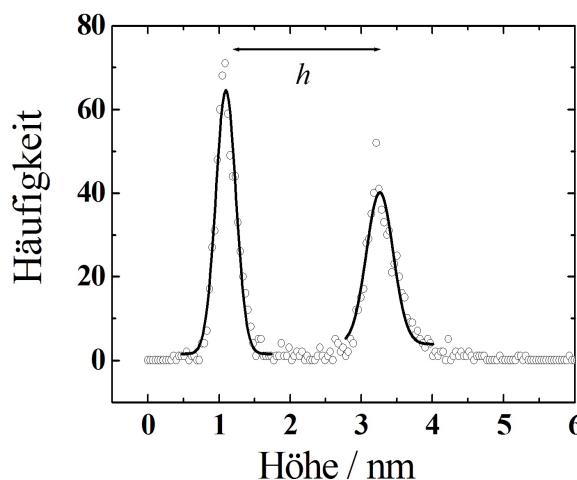


Abbildung 46: Exemplarische Höhenanalyse einer Proteindomäne. Aus der Höhendifferenz der beiden Peaks ergibt sich in diesem Beispiel eine Höhe von $h = 2,1 \text{ nm}$.

Die erhaltenen Histogramme zeigen zwei Peaks, deren Abstand die Dicke der Proteinschicht h wiedergibt. Abbildung 46 zeigt eine exemplarische Höhenanalyse einer Proteindomäne. Nach Anpassung der Parameter einer Gauß-Funktion an die Daten wurde jeweils die Höhe einer Domäne ermittelt. Die statistische Auswertung ergab eine Höhe der Domänen von $h = (2,2 \pm 0,3) \text{ nm}$.

Damit nachgewiesen werden kann, ob es sich bei den beobachteten Domänen um membran-gebundenes Protein handelt, wurden zusätzlich Reibungskraftmikroskopie (LFM, *lateral force deflection*)-Aufnahmen von den Proben gemacht. In Abbildung 47 sind im Vergleich das Höhenbild (A) und das dazugehörige LFM-Bild (B) dargestellt.

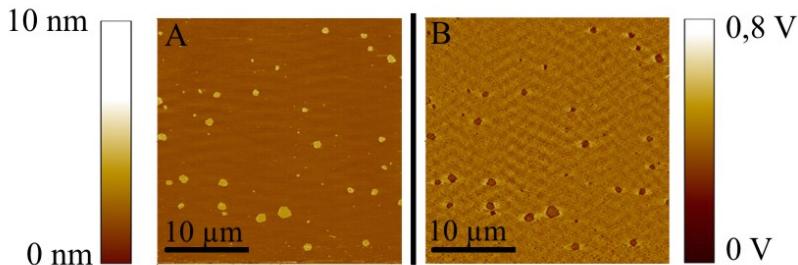


Abbildung 47: Vergleich des Höhenbildes (A) und des LFM-Bildes (B) einer POPC/POPS (4:1)-Membran auf Glimmer mit irreversibel gebundenem Annexin A1 nach 30-minütiger Inkubation mit $0,4 \mu\text{M}$ Annexin A1 in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (Ca_1). Nach der Proteininkubation wurde mit Puffer gespült, um reversibel gebundene Proteine zu entfernen. Bild A entspricht Bild C in Abbildung 44.

In den LFM-Aufnahmen weisen die Domänenbereiche deutlich von der Membran zu unterscheidende Signale auf, was auf einen Materialunterschied an der Oberfläche zurückzuführen ist.

4.3.4 QCM-Studie zur Untersuchung der Kinetik der Ca^{2+} -abhängigen Adsorption und Desorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen

Die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3 zeigen, dass Annexin A1 partiell reversibel an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen bindet und irreversibel gebundenes Protein in Clustern an der Oberfläche vorliegt. Jedoch ist noch nicht klar, nach welchem Mechanismus dieser partiell reversible Bindungsprozess erfolgt. Um dies aufzuklären, wurde der Einfluss der Proteininkubationszeit auf die Reversibilität der Annexin A1-Membran-Wechselwirkungen bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen untersucht.

Zunächst wurde ermittelt, ob sich die Reversibilität der Bindung bei einer Verkürzung der Inkubationszeit von 30 Minuten (vergleiche Kapitel 4.3.2) auf 10 Minuten verändert. Mittels der QCM-Technik wurde die Adsorption und Desorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ (Puffer $\text{Ca}_{0,01}$), $50 \mu\text{M}$ (Puffer $\text{Ca}_{0,05}$), $100 \mu\text{M}$ (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$), $500 \mu\text{M}$ (Puffer $\text{Ca}_{0,5}$) und 1 mM (Puffer Ca_1) CaCl_2 untersucht.

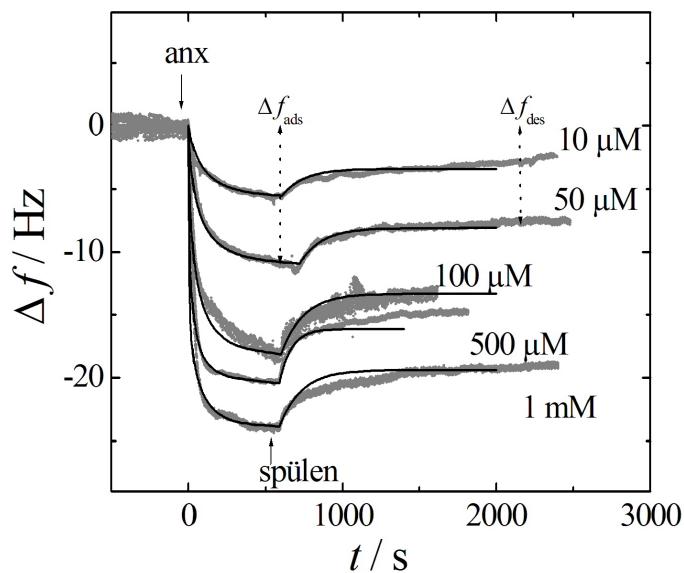


Abbildung 48: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach Zugabe von 0,4 μM Annexin A1 (anx) zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen in Gegenwart von 10 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,01}$), 50 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,05}$), 100 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$), 500 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,5}$) und 1 mM (Puffer Ca_1) CaCl_2 . Nach 600 Sekunden (10 Minuten) wurde mit dem jeweiligen Puffer gespült (spülen). Die Messdaten sind in Grau dargestellt, die schwarzen durchgezogenen Linien sind jeweils das Ergebnis der Computersimulationen (Ergebnisse siehe Tabelle 4 und Tabelle 5).

Die Zugabe von jeweils 0,4 μM Annexin A1 im Durchflussmodus der QCM führte je nach Ca^{2+} -Konzentration zu Frequenzänderungen nach 10 Minuten von -(5-25) Hz (Abbildung 48). Nach 10-minütiger Proteininkubation wurde das System mit dem jeweiligen Puffer gespült, worauf die Resonanzfrequenz um $(1 - \Theta_{\text{des}}^{\text{rel}}) = (20-40)$ % des Wertes des Frequenzshifts Δf_{ads} nach der Adsorption ansteigt. (Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgelistet und in Abbildung 49 graphisch dargestellt.) Dies bedeutet, dass $\Theta_{\text{des}}^{\text{rel}} = (60-80)$ % des adsorbierten Proteins nach dem Spülen an der Membran gebunden bleibt, wie dies auch bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten beobachtet wurde (vergleiche Kapitel 4.3.2). Aus der relativen Belegung nach Adsorption $\Theta_{\text{ads}}^{\text{rel,1mM}}$ und Desorption $\Theta_{\text{des}}^{\text{rel,1mM}}$, bezogen auf die maximale Adsorption in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 , die einer Frequenzänderung von $\Delta f_{\text{ads}} = -(23 \pm 2)$ Hz entspricht, nimmt $\Theta_{\text{ads}}^{\text{rel,1mM}}$ mit abnehmender Ca^{2+} -Konzentration ab, wobei bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 50 μM etwa eine halbmaximale Belegung erreicht wird.

Tabelle 4: Frequenzänderungen der QCM nach Adsorption Δf_{ads} und Desorption Δf_{des} von Annexin A1 an POPC/POPS (4:1)-Membranen bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen $c(\text{Ca}^{2+})$ und die daraus ermittelten relativen Oberflächenbelegungen Θ .

$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{M}$	$\Delta f_{\text{ads}}/\text{Hz}$	$\Theta_{\text{ads}}^{\text{rel_1mM} +}$	$\Delta f_{\text{des}}/\text{Hz}$	$\Theta_{\text{des}}^{\text{rel } \S}$	$\Theta_{\text{des}}^{\text{rel_1mM } \#}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$5,5 \pm 1$	$0,2 \pm 0,1$	$3,5 \pm 1$	$0,6 \pm 0,3$	$0,15 \pm 0,06$
$5 \cdot 10^{-5}$	11 ± 2	$0,5 \pm 0,1$	8 ± 2	$0,8 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,1$
$1 \cdot 10^{-4}$	18 ± 2	$0,8 \pm 0,2$	13 ± 3	$0,7 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$
$5 \cdot 10^{-4}$	20 ± 2	$0,9 \pm 0,2$	15 ± 3	$0,8 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,2$
$1 \cdot 10^{-3}$	23 ± 2	1	$17,5 \pm 3$	$0,8 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$

⁺) $\Theta_{\text{ads}}^{\text{rel_1mM}} = \Delta f_{\text{ads}}(c(\text{Ca}^{2+})) / \Delta f_{\text{ads}}(1 \cdot 10^{-3} \text{ M})$

[§]) $\Theta_{\text{des}}^{\text{rel}} = \Delta f_{\text{des}}(c(\text{Ca}^{2+})) / \Delta f_{\text{ads}}(c(\text{Ca}^{2+}))$

[#]) $\Theta_{\text{des}}^{\text{rel_1mM}} = \Delta f_{\text{des}}(c(\text{Ca}^{2+})) / \Delta f_{\text{ads}}(1 \cdot 10^{-3} \text{ M})$

Die Frequenzänderungen nach der Adsorption Δf_{ads} und Desorption Δf_{des} sind in Abbildung 49 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration dargestellt.

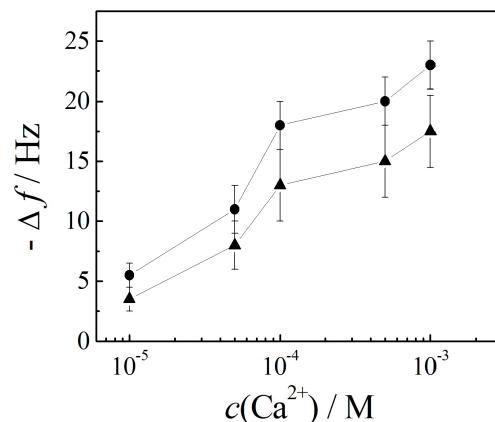


Abbildung 49: Frequenzshifts nach Adsorption Δf_{ads} (●) und Desorption Δf_{des} (▲) von Annexin A1 an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen bei einer Proteininkubationszeit von 10 Minuten in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration.

Aus den zeitaufgelösten QCM-Messungen ist es möglich, die Kinetik der Bindung zu analysieren. Es wurden Monte-Carlo Computersimulationen nach dem RSA-Modell, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, durchgeführt, woraus die Geschwindigkeitskonstanten der irreversiblen und der reversiblen Bindung ermittelt werden konnten:^{*}

* Die Simulationen wurden von S. Faiß, E. Lüthgens und A. Janshoff, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt.

Diese basierten auf einem Modell, wie in Abbildung 50 B schematisch dargestellt, in dem Annexin A1 an kreisrunde Domänen irreversibel mit einer Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ adsorbiert und an die Fläche zwischen den Domänen reversibel mit den Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption k_{on} und der Desorption k_{off} bindet. Bei den Simulationen wurden 200 Domänen auf der Simulationsfläche angenommen, deren mittlerer Durchmesser variierten, um die unterschiedlichen Oberflächenbelegungen zu berücksichtigen.

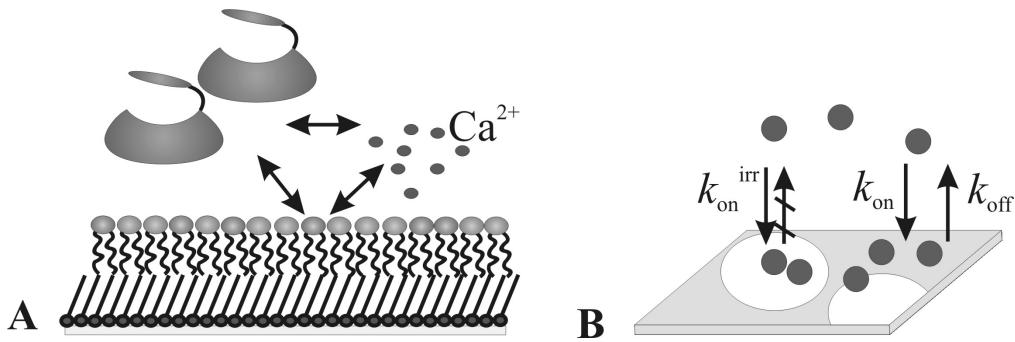


Abbildung 50: **A** Wechselwirkungen zwischen Membran, Annexin A1 und Ca^{2+} -Ionen. **B** Modell zur Auswertung der Kinetik der Ca^{2+} -abhängigen Wechselwirkung von Annexin A1 mit festkörperunterstützten Membranen. Annexin A1 kann an runde Domänen (weiß) irreversibel mit einer Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ adsorbieren, in dem Bereich zwischen den Domänen ist eine reversible Bindung mit den Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption k_{on} und der Desorption k_{off} möglich.

Die Ergebnisse der Simulationen sind in Abbildung 48 als schwarze durchgezogene Linien dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die simulierten Kurven relativ gut mit den Messdaten übereinstimmen. Eine Übersicht über die ermittelten Parameter liefert Tabelle 5.

Tabelle 5: Ergebnisse der Computersimulationen aus Abbildung 48. k_{on} und k_{off} stellen die Geschwindigkeitskonstanten der reversiblen Adsorption und Desorption dar, $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ ist die Geschwindigkeitskonstante der irreversiblen Adsorption, K_d ist die Dissoziationskonstante, berechnet aus $k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$, d ist der mittlere Durchmesser der Domänen und $\theta_{\text{bel}}^{\text{sim}}$ ist die jeweilige Oberflächenbelegung des irreversibel adsorbierten Proteins auf der Simulationsfläche.

$c(\text{Ca}^{2+}) /$ M	$k_{\text{on}} /$ $10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} /$ 10^{-3} s^{-1}	$K_d /$ 10^{-6} M	$k_{\text{on}}^{\text{irr}} /$ $10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$d /$ nm	$\theta_{\text{bel}}^{\text{sim}}$
$1 \cdot 10^{-5}$	0,56	7	12,5	35	17	0,043
$5 \cdot 10^{-5}$	0,95	7	7,4	60	28,4	0,102
$1 \cdot 10^{-4}$	2,4	7	2,9	120	37,2	0,166
$5 \cdot 10^{-4}$	4,3	13	3,0	360	40,2	0,201
$1 \cdot 10^{-3}$	3,0	7	2,3	950	44,8	0,243

Es stellte sich heraus, dass die Werte für $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration deutlich ansteigen. k_{on} zeigt tendenziell dasselbe Verhalten, jedoch fällt der etwas höhere Wert bei 500 μM CaCl_2 aus der Reihe. Die Werte für k_{off} sind hingegen, bis auf den Wert bei 500 μM CaCl_2 , konstant. Das bedeutet, dass mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration sowohl die reversible, als auch die irreversible Adsorption schneller verläuft, die Desorptionsgeschwindigkeit jedoch im Allgemeinen nicht von der Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst wird. Die Dissoziationskonstante K_d für die reversible Bindung wurde aus $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass K_d mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration abnimmt.

Aus den Messungen ist ersichtlich, dass mit abnehmender Ca^{2+} -Konzentration die absolute Menge an irreversibel gebundenem Annexin A1 abnimmt. Um herauszufinden, ob dieser Anteil nur von der präsenten Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist, oder durch die geringere Proteinbelegung nach der Adsorption bei geringerer Ca^{2+} -Konzentration zustande kommt, wurden $> 0,3 \mu\text{M}$ Annexin A1 in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (Ca_1) zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen gegeben.* Abbildung 51 zeigt, dass nach 10 Minuten ein nahezu konstanter Frequenzshift von $-(20 \pm 3) \text{ Hz}$ erreicht ist, welcher etwa der maximalen Adsorption des Proteins entspricht.³⁶ Anschließend wurde die Desorption des Proteins durch Spülen mit Puffer induziert. Es wurde mit Puffern mit entweder 1 mM (Puffer Ca_1), 500 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,5}$), 100 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$), 10 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,01}$) CaCl_2 oder 1 mM EGTA (Puffer E_1) gespült.

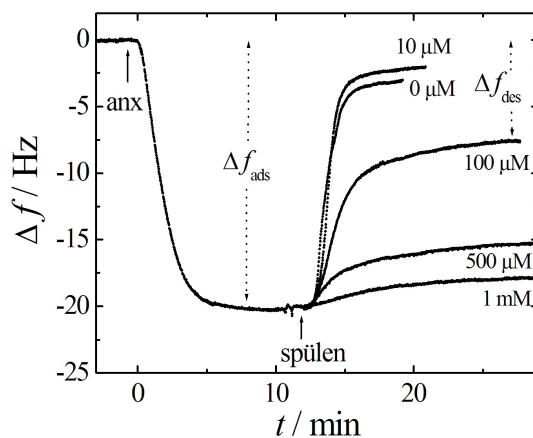


Abbildung 51: Adsorption und Desorption von Annexin A1 an POPC/POPS (4:1)-Membranen. Annexin A1 ($c > 0,3 \mu\text{M}$) wurde in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (Ca_1) zu POPC/POPS (4:1)-Membranen gegeben (anx). Die Desorption des Proteins wurde durch Spülen mit Puffer induziert (spülen). Zum Spülen wurde Puffer mit 1 mM (Puffer Ca_1), 500 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,5}$), 100 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$) und 10 μM (Puffer $\text{Ca}_{0,01}$) CaCl_2 , bzw. 1 mM EGTA (Puffer E_1) verwendet.

* Diese Messungen wurden bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,23 ml/min im Kreislaufmodus und in umgekehrter Flussrichtung in der Messkammer durchgeführt (vergleiche Kapitel 3.4.3.4)

Daraufhin ist jeweils ein Anstieg der Resonanzfrequenz zu beobachten, dessen Endwert von der vorliegenden Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist. Kontrollmessungen zeigen, dass in diesem Fall eine signifikante Frequenzänderung durch den Pufferwechsel auszuschließen ist (Daten nicht gezeigt) und sich somit die Frequenzänderungen proportional zu den Oberflächenflächenbelegungen des Proteins verhalten.

Während bei 1 mM CaCl_2 $\Theta_{\text{des}}^{\text{rel-1mM}} = (82 \pm 8) \%$ des Proteins nach dem Spülen, analog dem Ergebnis, welches in Abbildung 48 gezeigt ist, an der Membran gebunden bleibt, desorbiert beim Spülen mit 10 μM Ca^{2+} -haltigem Puffer das Protein nahezu vollständig und führt zu einer Belegung von $\Theta_{\text{des}}^{\text{rel-1mM}} = (9 \pm 7) \%$. Sogar nach Spülen mit 1 mM EGTA-haltigem Puffer bleibt ein kleiner Teil des adsorbierten Proteins an der Membran gebunden, was durch die unspezifische Adsorption an hydrophobe Defekte in der Membran erklärt werden kann.³⁸ Die relativen Oberflächenbelegungen des irreversibel gebundenen Annexin A1 nach Spülen mit dem jeweiligen Puffer sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Es zeigt sich, dass die aus diesen Messungen ermittelten Werte für die Oberflächenbelegung von irreversibel gebundenem Annexin A1 ungefähr den Werten ($\Theta_{\text{des}}^{\text{rel-1mM}}$) aus Tabelle 4 entsprechen, die aus den Daten aus Abbildung 48 ermittelt wurden.

Tabelle 6: Relative Oberflächenbelegung $\Theta_{\text{des}}^{\text{rel-1mM}} = \Delta f_{\text{des}} / \Delta f_{\text{ads}}$ von Annexin A1 an POPC/POPS (4:1)-Membranen nach Spülen mit Puffern unterschiedlicher Ca^{2+} -Konzentrationen und die Geschwindigkeitskonstanten der Desorption k_{off} . Die maximale Belegung, erhalten für $c(\text{Annexin A1}) > 0,3 \mu\text{M}$, wurde gleich 1 gesetzt.

$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{M}$	$\Theta_{\text{des}}^{\text{rel-1mM}}$
0 [#]	$0,15 \pm 0,1$
$1 \cdot 10^{-5}$	$0,09 \pm 0,07$
$1 \cdot 10^{-4}$	$0,30 \pm 0,09$
$5 \cdot 10^{-4}$	$0,73 \pm 0,04$
$1 \cdot 10^{-3}$	$0,82 \pm 0,08$

[#]) 1 mM EGTA

Wie bereits gezeigt, konnte kein signifikanter Unterschied in der Reversibilität der Annexin A1-Bindung an festkörperunterstützte Membranen zwischen einer Inkubationszeit von 10 und 30 Minuten festgestellt werden. Allerdings war nach 10 Minuten Inkubation meist schon die jeweilige maximale Belegung erreicht. Somit stellt sich die Frage, ob sich die Reversibilität bei noch geringeren Inkubationszeiten und nicht-maximalen Oberflächenbelegungen verändert. Um dieser Fragestellung

nachzugehen wurde die Adsorption und Desorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen mit Proteininkubationszeiten von 30, 60, 120, 600 oder 1800 Sekunden in Gegenwart von 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M und 1 mM CaCl_2 untersucht (Abbildung 52).

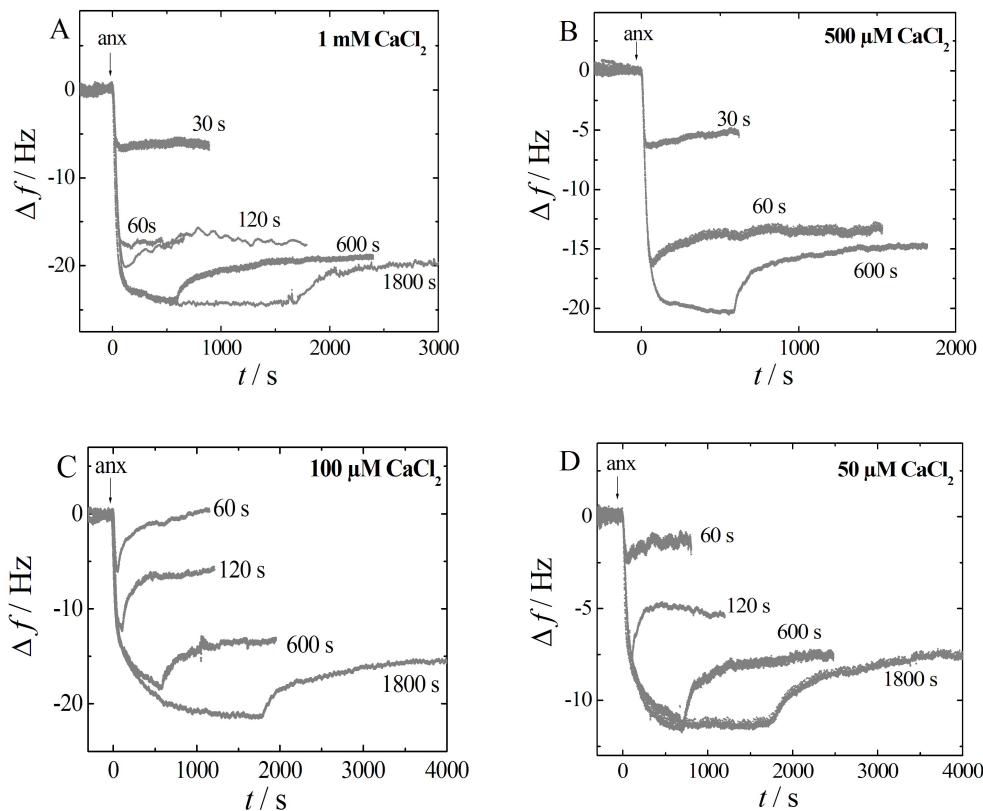


Abbildung 52: Zeitliche Resonanzfrequenzänderungen eines 5 MHz-Quarzes nach Zugabe von 0,4 μ M Annexin A1 (anx) zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen in Gegenwart von **A** 1 mM (Puffer Ca_1), **B** 500 μ M (Puffer $\text{Ca}_{0,5}$), **C** 100 μ M (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$) und **D** 50 μ M (Puffer $\text{Ca}_{0,05}$) CaCl_2 . Es wurde nach den angegebenen Inkubationszeiten mit dem jeweiligen Puffer gespült.

In Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (Ca_1) wurde nach 30 bzw. 60 Sekunden Proteininkubation mit 0,4 μ M Annexin A1 Frequenzshifts von $-(7 \pm 1)$ Hz bzw. $-(17 \pm 2)$ Hz erhalten, wobei nach dem Spülen mit Puffer keine Desorption zu erkennen ist (Abbildung 52 A). Nach 120 Sekunden Inkubation führt die Proteinadsorption zu einer Frequenzänderung von $-(20 \pm 2)$ Hz und steigt nach dem Spülen um (3 ± 2) Hz an. Bei Inkubationszeiten von 600 und 1800 Sekunden wird die maximale Proteinbelegung erreicht, die einem Frequenzshift von $-(23 \pm 2)$ Hz entspricht. Nach dem Spülen steigt die Frequenz um (5 ± 2) Hz. Abbildung 52 B zeigt, dass bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 500 μ M eine 30-sekündige Inkubation mit 0,4 μ M Annexin A1 zu einer Frequenzänderung von $-(6 \pm 1)$ Hz führt und nahezu kein Protein nach dem Spülen desorbiert. Nach 60 Sekunden Proteininkubation sinkt die Frequenz um $-(17 \pm 2)$ Hz,

wobei nur eine geringe Menge an gebundenem Protein desorbiert. Bei einer Inkubationszeit von 600 Sekunden ist bereits die Sättigung der Bindung mit einem Frequenzshift von $-(20 \pm 2)$ Hz erreicht, wobei die Menge an desorbiertem Protein einer Frequenzänderung von (5 ± 2) Hz entspricht. Eine weitere Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration auf $100 \mu\text{M}$ führt dazu, dass bei Inkubationszeiten von 60 bzw. 120 Sekunden die Frequenz um $-(6 \pm 1)$ Hz bzw. $-(11 \pm 2)$ Hz sinkt, nach dem Spülen jedoch eine deutliche Desorption zu beobachten ist, die einem Frequenzanstieg von jeweils (6 ± 2) Hz entspricht (Abbildung 52 C). Bei einer Inkubationszeit von 600 Sekunden sinkt die Frequenz um $-(18 \pm 2)$ Hz und steigt nach dem Spülen um (5 ± 2) Hz an. Nach einer Inkubationszeit von 1800 Sekunden ist die Sättigung der Bindung erreicht mit einer Frequenzänderung von $-(21 \pm 2)$ Hz. Die Desorption führt zu einer Frequenzerhöhung von (5 ± 2) Hz. In Gegenwart von $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Ionen führt die Adsorption von Annexin A1 über 60 Sekunden zu einem Frequenzshift von $-(2,5 \pm 1)$ Hz und steigt nach dem Spülen nur geringfügig an (Abbildung 52 D). Nach 120 Sekunden Inkubation sinkt die Frequenz um $-(7,5 \pm 2)$ Hz. Durch Spülen wird eine Desorption erreicht, was aus dem Frequenzanstieg um (3 ± 2) Hz erkennbar ist. Nach 600 bzw. 1800 Sekunden Inkubation war die Sättigung mit einer Frequenzänderung von $-(11 \pm 2)$ Hz erreicht. Die Desorption führte zu einem Anstieg der Frequenz um (3 ± 2) Hz.

Aus den Messungen ist ersichtlich, dass in Gegenwart von 1 mM und $500 \mu\text{M}$ CaCl_2 nahezu keine Desorption des Proteins bei kurzen Inkubationszeiten nach Spülen mit Puffer zu beobachten ist. Somit zeigt sich, dass bei diesen Ca^{2+} -Konzentration der Bindungsprozess anfangs durch die irreversible Adsorption dominiert wird und erst ab einer Oberflächenbelegung, die etwa einer Frequenzänderung von -17 Hz entspricht, Protein reversibel bindet. Bei den niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen (50 und $100 \mu\text{M}$) ist zu erkennen, dass bereits zu Beginn der Adsorption die reversible Bindung erfolgt, da durch Spülen nach kurzen Inkubationszeiten (60 bzw. 120 Sekunden) ein Teil des gebundenen Proteins desorbiert (Abbildung 52 C und D). Bei einer Inkubationszeit von 60 Sekunden in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ CaCl_2 wird sogar eine vollständige Reversibilität beobachtet. Erst nach Erreichen einer maximalen Belegung bleibt der irreversibel gebundene Anteil konstant.

Da die QCM-Messungen zeigen, dass bei kurzen Inkubationszeiten Unterschiede in der Reversibilität der Annexin A1-Bindung zwischen niedrigen und höheren Ca^{2+} -Konzentrationen beobachtet wurden, wurde untersucht, ob bei kurzen Inkubationszeiten

auch Veränderungen in der Organisation von irreversibel gebundenem Annexin A1 auftreten.

Um die Oberflächenorganisation von membran-gebundenen Annexin A1 bei kurzen Inkubationszeiten zu untersuchen, wurden SFM-Messungen wie in Kapitel 4.3.3 durchgeführt. Es wurden jeweils $0,4 \mu\text{M}$ Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Lipiddoppelschichten auf Glimmer in 1 mM (Puffer Ca_1) oder $100 \mu\text{M}$ (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$) Ca^{2+} -haltigem Puffer zugegeben und entweder 30 Sekunden (1 mM CaCl_2) oder 60 Sekunden ($100 \mu\text{M} \text{CaCl}_2$) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Puffer gespült, um reversibel gebundene Proteine zu entfernen und nur irreversibel gebundenes Annexin A1 an der Membran zu untersuchen. Es wurden topographische Bilder mittels Rasterkraftmikroskopie im *contact*-Modus von verschiedenen Stellen der Probe aufgenommen.

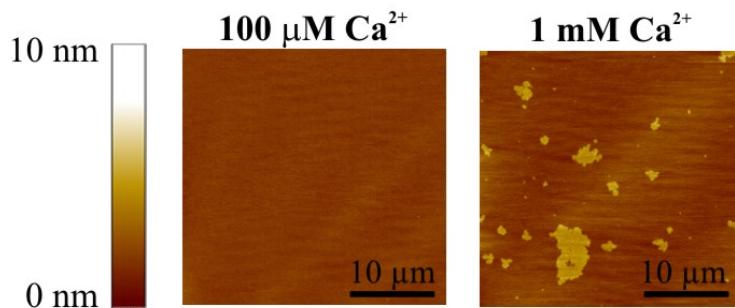


Abbildung 53: Exemplarische topographische SFM-Aufnahmen einer POPC/POPS (4:1)-Doppelschicht auf Glimmer in Gegenwart von 1 mM (Puffer Ca_1) und $100 \mu\text{M}$ (Puffer $\text{Ca}_{0,1}$) Ca^{2+} -Ionen nach 30 Sekunden (1 mM CaCl_2) und 60 Sekunden ($100 \mu\text{M} \text{CaCl}_2$) Inkubation mit $0,4 \mu\text{M}$ Annexin A1 und anschließendem Spülen mit dem jeweiligen Puffer. Die Abbildungen sind jeweils $30 \times 30 \mu\text{m}$.

Die rechte Aufnahme in Abbildung 53 zeigt, dass Annexin A1 nach 30 Sekunden Inkubation in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 an die Membran irreversibel bindet und die gleichen Domänen ausbildet wie sie auch nach 30 Minuten Inkubation (Abbildung 44) beobachtet werden. Außerdem tritt analog zu den Messungen in Abbildung 44 eine heterogene Verteilung der Domänen und eine breite Größenverteilung auf. Die mittlere Oberflächenbelegung ist jedoch reduziert und liegt im Bereich von 2 %. Im Gegensatz dazu konnte mittels SFM nach 60 Sekunden Inkubation mit Annexin A1 in Gegenwart von $100 \mu\text{M} \text{CaCl}_2$ kein irreversibel adsorbiertes Protein nachgewiesen werden. Um die Aktivität der Membranen zu kontrollieren, wurden nach diesen Messungen die Membranen nochmals für mindestens 10 Minuten mit Annexin A1 inkubiert und erneut gescannt. Die Aufnahmen zeigten, dass bei längerer Proteininkubation Annexin A1 irreversibel an die Membran bindet und die gleichen Bilder liefert, wie nach 30 Minuten

Inkubation (Abbildung 44, D, E und F) erhalten wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen der QCM-Messungen, die in Abbildung 52 A (30 s) und C (60 s) gezeigt sind. Während in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ nach 30 Sekunden Inkubation mit dem Protein eine irreversible Adsorption nachgewiesen werden konnte, wurde bei 100 µM CaCl₂ bei 60 Sekunden Inkubation eine nahezu vollständige reversible Adsorption beobachtet.

4.3.5 Diskussion

4.3.5.1 Untersuchung der Ca²⁺-abhängigen Bindung von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen

Nach ihrer Definition binden Annexine Ca²⁺-abhängig an negativ geladene Phospholipide. Zur Aufklärung der Funktionsweise von Annexin A1 *in vivo* sind in der Literatur verschiedene Studien beschrieben. So wurden in zellulären Studien die Lokalisation⁷¹ sowie der Einfluss des Proteins auf verschiedene Prozesse, wie z. B. die Entzündung,⁶² der Einfluss von strategisch verändertem Protein durch Genmutationen auf die Proteineigenschaften²⁸ und vieles mehr untersucht. Außerdem leisten Strukturanalysen von Annexin A1 einen großen Beitrag, um die Funktionsweise von Annexin A1 besser zu verstehen.¹⁶⁻¹⁸ Einen weiteren großen Forschungsbereich bilden Studien an Modellmembransystemen, die hauptsächlich auf biochemischen und physikalischen Methoden basieren und die Ca²⁺-abhängige Wechselwirkung von Annexin A1 mit Phospholipiden aufklären sollen. Der Vorteil von Modellmembransystemen, wie Vesikel, Monoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche und festkörperunterstützte Membranen ist, dass die Funktionsweise von Proteinen unter Ausschluss der komplexen zellulären Umgebung mit einem einfach zu variierenden, artifiziellen System untersucht werden kann.

Das Bindungsverhalten von Annexin A1 an Membranen wurde bisher in der Literatur meist durch Pelletierungstests untersucht, in denen das Protein zusammen mit Vesikeln pelletiert wird. In diesen Experimenten wurde die Ca²⁺-Konzentration in der Lösung variiert, die gebundenen Proteine quantifiziert und daraus die Ca²⁺-Konzentration $c_{1/2}$ für die halbmaximale Bindung von Annexin A1 an Membranen ermittelt. Die dabei erhaltenen Werte der Ca²⁺-Konzentration für die Bindung an PS-Vesikel liegen bei 1,3 µM³¹, 22 µM²⁴ und 30 µM⁸. Um die Reversibilität der Bindung zu analysieren, werden meist die Ca²⁺-Ionen mit einem Chelator (EDTA, EGTA) komplexiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Bindung Ca²⁺-abhängig ist und nach Entzug der Ca²⁺-Ionen wieder vollständig aufgelöst wird.^{1,31,37} Da Annexin A1 jedoch nicht nur in der Lage ist,

Ca^{2+} -abhängig an Membranen zu binden, sondern diese auch aggregieren kann, treten bei Vesikelpelletierungstest meist beide Bindungsprozesse auf, sodass die Dissoziationskonstante für den primären Bindungsprozess nicht exakt bestimmt werden kann. Nur unter bestimmten Bedingungen, nämlich bei geringer Protein- und Ca^{2+} -Konzentration, kann die Aggregation unterdrückt und nur die Membranbindung des Proteins analysiert werden.²³ Festkörperunterstützte Membranen bieten jedoch die Möglichkeit, die primäre Bindung von Annexin A1 über die Ca^{2+} -Bindungsstellen mit Membranen ohne Überlagerung einer Aggregation zu messen. Bei der Bindung von Annexin A1 an planare, festkörperunterstützte Membranen handelt es sich um einen komplexen Prozess, der mehrere Bindungsschritte beinhaltet und bei dem die Eigenschaften der Grenzschicht berücksichtigt werden müssen. So muss die fehlende Krümmung der Membran im Vergleich zu Vesikeln berücksichtigt werden, da etwa für Annexin A5 bereits gezeigt wurde, dass mit zunehmender Krümmung der Ca^{2+} -Bedarf für die Membran-Wechselwirkung ansteigt.¹²²

Nur wenige Studien in der Literatur beschäftigen sich mit der Quantifizierung der Ca^{2+} -abhängigen Bindung von Annexinen an festkörperunterstützte Membranen. So untersuchten Andree et al. die Bindung von Annexin A5 und eines chimären Proteins aus der Kerndomäne von Annexin A5 und dem N-Terminus von Annexin A1 an festkörperunterstützte DOPC/DOPS (4:1)-Membranen mittels Ellipsometrie.^{30,123} Für Annexin A1 und Annexin A2t wurden bereits QCM-Studien aus unserer Arbeitsgruppe zum Adsorptionsverhalten an festkörperunterstützte POPC/POPS-Membranen durchgeführt.^{36,124}

Die Adsorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen wurde in dieser Arbeit in Gegenwart unterschiedlicher Ca^{2+} -Konzentrationen mittels zeitaufgelöster QCM-Technik verfolgt. Nach Zugabe des Proteins wurden maximale Frequenzänderungen -25 Hz beobachtet. Die Kontrollexperimente zeigen, dass die beobachteten Frequenzänderungen nach der Proteinzugabe nur durch die Ca^{2+} -abhängige Adsorption von Annexin A1 an die negativ geladene festkörperunterstützte Membran hervorgerufen wird. So konnte weder eine signifikante Bindung in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen im Puffer, noch in Abwesenheit des negativ geladenen POPS in der Membran nachgewiesen werden. Außerdem konnte ausgeschlossen werden, dass die Frequenzänderung durch viskoelastische Effekte hervorgerufen wird, da bei QCM-D-Messungen neben der Frequenzänderung Δf keine Änderung des Dissipationsfaktors ΔD festgestellt werden konnte (Abbildung 68). Somit kann das adsorbierte Protein als starre Masse betrachtet werden, für die ein linearer Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung und der adsorbierten Masse analog der Sauerbrey-Gleichung (GL-21) gültig ist. Jedoch ist es nicht möglich, die adsorbierte

Masse Δm aus der Frequenzänderung zu berechnen, da die Schichtwägeempfindlichkeit von der Proteinkomponente abhängt. Nach der Berechnung der Masse mit der Schichtwägeempfindlichkeit $S_f = 0,057 \text{ Hz cm}^2 \text{ ng}^{-1}$ für 5 MHz-Quarze erhält man für $\Delta f = -25 \text{ Hz}$ eine Massenabscheidung von etwa 400 ng cm^{-2} . Jedoch wird meist eine zu große Masse ermittelt, da in die Proteinschicht eingeschlossenes Wasser und Wassermoleküle, die an das Protein und somit an die Oberfläche gekoppelt sind, „mitgewogen“ werden.⁸⁸ Somit werden in dieser Arbeit die Proteinbelegungen nur relativ zueinander durch die Resonanzfrequenzänderungen verglichen und keine absoluten Massenbelegungen angegeben.

4.3.5.2 SFM-Studie zur Aufklärung der Organisation von membran-gebundenem Annexin A1

Mittels Rasterkraftmikroskopie wurde gezeigt, dass Annexin A5, gebunden an eine Membranoberfläche, lateral aggregiert und sogar zweidimensionale Proteinkristalle ausbildet.¹²⁵ Bei Annexin A1 und Annexin A2t wurde beobachtet, dass es in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen nur an die PS-reichen Domänen rigider DPPC/DPPS-Membranen als Monoschicht bindet.^{38,126} Um die Fähigkeit von membran-gebundenem Annexin A1, Aggregate auszubilden, zu untersuchen, analysierten Bitto et al. die räumliche Nähe von Proteinen untereinander mittels chemischer Kreuzvernetzung. Auf diese Weise wurden bei Vesikel-gebundenem Annexin A1 größere Proteinaggregate nachgewiesen.³³

Aus den QCM-Messungen in dieser Arbeit ist ersichtlich, dass Annexin A1 partiell reversibel an POPC/POPS (4:1)-Membranen bindet. Mittels Rasterkraftmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass irreversibel gebundenes Annexin A1 auf POPC/POPS (4:1)-Doppelschichten in lateralen Aggregaten vorliegt. Hierfür wurden Rasterkraftmikroskopie-Bilder der Membranen nach 30-minütiger Inkubation mit Annexin A1 und anschließendem Spülen bei zwei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen aufgenommen. Die Bilder zeigen, dass die Domänen heterogen verteilt sind und unterschiedliche Flächen einnehmen. Die Höhe der Domänen wurde zu $(2,2 \pm 0,3) \text{ nm}$ bestimmt. Aus der Kristallstruktur von Annexin A1 wird eine Proteinhöhe von etwa 3 nm erwartet, sodass demnach die Domänen für membran-gebundenes Annexin A1 zu niedrig erscheinen.^{16,17} Bei membran-gebundenem Annexin A1 auf rigiden DPPC/DPPS-Membranen wurde eine Höhe der Domänen von $(3,2 \pm 0,3) \text{ nm}$ bestimmt, welche gut mit den Daten aus der Kristallstruktur übereinstimmt.³⁸ Trotzdem kann angenommen werden, dass es sich bei den Domänen um Protein handelt, da die Höhenbestimmung von Proteinen immobilisiert auf fluiden Membranen nicht exakt ist und das Protein leicht beim Scannen im *contact*-Modus etwas in die Membran gedrückt

werden kann, was zu einer geringeren Höhendifferenz führt. Dass es sich bei den Domänen um membran-gebundenes Protein handelt, kann auch aus den Reibungskraftmikroskopie (*lateral force microscopy*, LFM)-Aufnahmen geschlossen werden, die einen deutlichen Materialunterschied zwischen den Proteindomänen und der Membran zeigen (Abbildung 47 B). Die Oberflächenbelegung, welche die Domänen einnehmen, variierte an den verschiedenen Stellen der Probe und lag zwischen 0,5 und 10 %. Während bei manchen Aufnahmen nur wenige kleine Domänen beobachtet wurden, die weniger als 1 % der Fläche belegten, traten an anderen Stellen zahlreiche Domänen unterschiedlicher Größe mit einzelnen größeren Aggregaten auf, die einen Durchmesser von mehreren Mikrometern haben und eine Oberflächenbelegung von bis zu 10 % einnehmen (vergleiche Abbildung 44). Da bei den hier durchgeföhrten SFM-Aufnahmen die Membranen nach der Proteininkubation gespült wurden, wurde reversibel gebundenes Protein entfernt und in den Aufnahmen nur irreversibel gebundenes Annexin A1 beobachtet. Die QCM-Messungen zeigen jedoch, dass nach der Proteininkubation durch Spülen etwa (20-40) % des Proteins desorbieren. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass die absolute Proteinbelegung durch reversibel und irreversibel gebundenes Protein bis zu 14 % ist. Für die irreversible Annexin A1-Bindung an DPPC/DPPS (4:1)-Membranen wurde eine Oberflächenbelegung von 35 % erhalten, welche der Fläche der Ca^{2+} -abhängig gebildeten PS-reichen Domänen in diesen Membranen entspricht. Möglicherweise stehen bei POPC/POPS (4:1)-Membranen aufgrund der unterschiedlichen lateralen Verteilung des PS weniger Bindungsplätze für Annexin A1 als bei DPPC/DPPS (4:1)-Membranen zur Verfügung.

4.3.5.3 QCM-Studie zur Untersuchung der Reversibilität der Annexin A1-Membran-Wechselwirkung

Um die Reversibilität der Bindung von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen bei verschiedenen Ca^{2+} -Gehalten zu untersuchen, wurde die Adsorption und die Desorption des Proteins mittels der QCM analysiert. Die Adsorption wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,4 μM verfolgt, da bei dieser Konzentration die maximale Oberflächenbelegung – zumindest für 1 mM und 100 μM CaCl_2 – erreicht wird.³⁶ Erwartungsgemäß nimmt die Menge an adsorbiertem Annexin A1 mit steigender Ca^{2+} -Konzentration zu, wobei unter Annahme einer maximalen Belegung bei 1 mM CaCl_2 die halbmaximale Belegung bei etwa 50 μM CaCl_2 erreicht wird und somit der aus den EGTA-Titrationsexperimenten ermittelten Ca^{2+} -Konzentration $c_{1/2} = (53 \pm 10)$ μM entspricht. Dies stimmt mit Ergebnissen aus der Literatur überein, bei denen für

Annexin A2t¹²⁴, Annexin A2m¹²⁷ und Annexin A5 und A6¹²⁸ auch gezeigt wurde, dass die Belegung der Membran mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Durch Entfernen der Proteins aus der Lösung wird die Desorption induziert. Jedoch desorbieren bei jeder Ca^{2+} -Konzentration nach einer Proteininkubationszeit von 10 bzw. 30 Minuten nur 20 bis 40 % des gebundenen Proteins. Hieraus lässt sich schließen, dass zwei unterschiedliche Populationen von membran-gebundenem Annexin A1 vorliegen, von denen die eine reversibel und die andere irreversibel gebunden ist. Aus den SFM-Aufnahmen wird zudem deutlich, dass irreversibel gebundenes Annexin A1 an der Oberfläche lateral aggregiert ist.

Um den Mechanismus der Annexin A1-Membran-Wechselwirkung aufzuklären, wurde die Adsorption und Desorption von Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration und der Proteininkubationszeit untersucht.

Es konnte ein Modell aufgestellt werden, anhand dessen die Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden. In dem Modell wird die partiell reversible Bindung von Annexin A1 an POPC/POPS-Membranen in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration beschrieben und die laterale Aggregation des irreversibel gebundenen Proteins, sowie die Membrandomänenbildung miteinbezogen (Abbildung 54).

Nach diesem Modell steigt die Oberflächenbelegung mit steigender Ca^{2+} -Konzentration an, da mehr Bindungsplätze auf der Membran zur Verfügung stehen. In Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen bzw. nach Komplexierung mit EGTA bindet kein Protein bzw. löst sich gebundenes Protein wieder ab. Dies ist aus Titrationsexperimenten bekannt, in denen nachgewiesen wurde, dass adsorbiertes Annexin A1 durch Zugabe von EGTA schrittweise von der Membran dissoziiert.³⁶ Das Auftreten zweier oder mehrerer Populationen von membran-gebundenem Annexin A1 wird dadurch erklärt, dass Annexin A1 zum einen an die PS-reichen Membranstrukturen (Domänen) bindet und irreversibel gebundene laterale Aggregate bildet, zum anderen einzeln und reversibel an die Zwischenbereiche der Domänen binden kann.

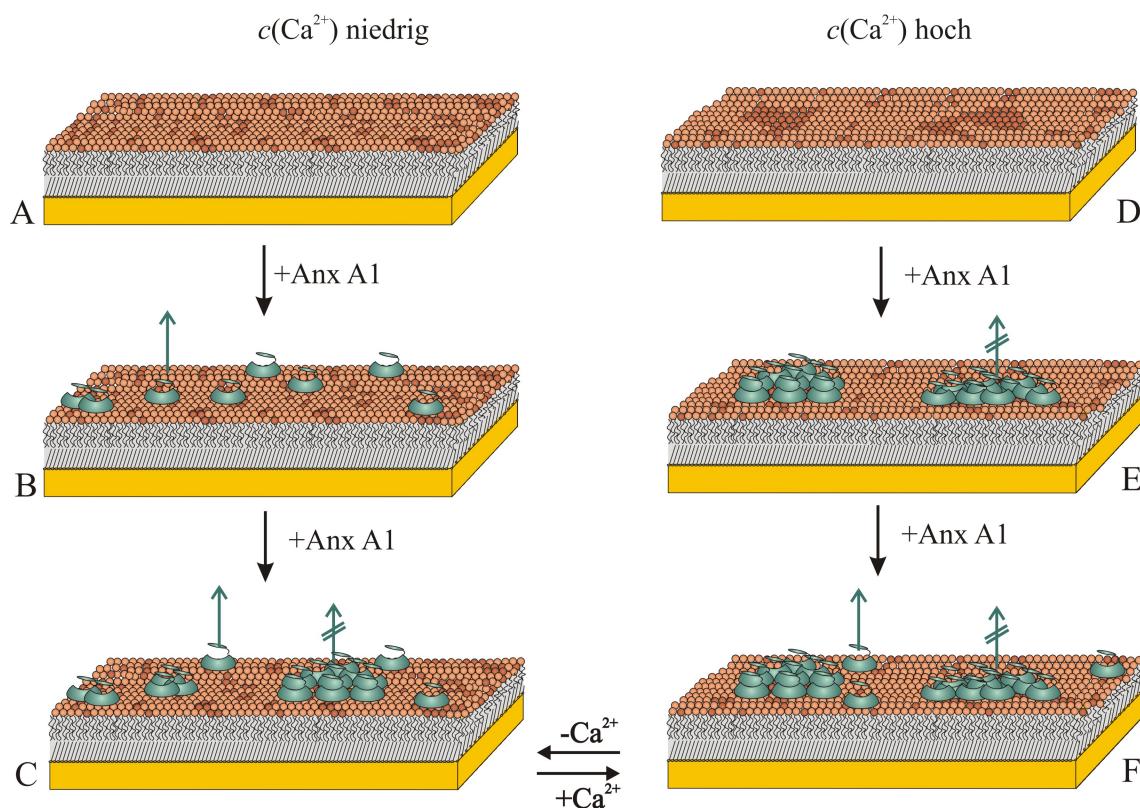


Abbildung 54: Modell der Interaktion von Annexin A1 mit Membranen. Es sind auf Goldoberflächen immobilisierte OT-POPC/POPS (4:1)-Membranen bei A) niedrigen und D) hohen Ca^{2+} -Konzentrationen dargestellt. Die Zugabe von Annexin A1 führt im Falle niedriger Ca^{2+} -Konzentrationen zunächst zur Adsorption des Proteins an reversible Bindungsplätze (B), bei längerer Proteininkubation befindet sich zum einen einzelne Annexin A1-Moleküle, die reversibel gebunden sind, und zum anderen lateral aggregiertes Annexin A1, das irreversibel gebunden ist, an der Membran (C). Bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen bilden sich bereits in der Membran Strukturen aus, bei denen es sich wahrscheinlich um PS-reiche Bereiche handelt (D), die nach Zugabe von Annexin A1 als erstes irreversibel durch Protein, das lateral aggregiert, besetzt werden (E). Bei längerer Inkubation mit dem Protein binden auch einzelne Annexin A1-Moleküle reversibel an die Membran (F). Bei Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration lösen sich die Proteinaggregate wieder auf, wobei die Menge an irreversibel gebundenen Proteininclusoren von der Ca^{2+} -Konzentration abhängt.

Die Menge an irreversibel gebundenem Annexin A1 ist abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration. Nach Adsorption von Annexin A1 bei 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer und anschließendem Spülen mit Puffern unterschiedlicher Ca^{2+} -Gehalte wurde mit sinkender Ca^{2+} -Konzentration ein abnehmender Anteil an irreversibel gebundenem Annexin A1 nachgewiesen, welcher jeweils einem Anteil entspricht, der auch nach Adsorption und Desorption bei gleichbleibender Ca^{2+} -Konzentration beobachtet wird (vergleiche $\theta_{\text{des}}^{\text{rel}, 1\text{mM}}$ -Werte Tabelle 4 und Tabelle 6).

Die Beobachtung, dass auch nach Spülen mit EGTA-haltigem Puffer ein kleiner Teil (etwa 10 %) von Annexin A1 an der Membran gebunden bleibt, kann auf unspezifische Bindung an hydrophobe Membranefekte zurückgeführt werden. Es ist jedoch auch denkbar, dass sich die Proteinincluster auf den planaren Membranen trotz des Ca^{2+} -Entzugs nicht wieder vollständig auflösen. Eine teilweise irreversible Bindung konnte

auch in Vesikelpelletierungsassays nachgewiesen werden, in denen nach Inkubation der Annexin A1-Vesikel-Aggregate mit EGTA sich noch ein Teil von Annexin A1 an den Membranen befand (vergleiche Aktivitätstest Annexin A1 in Kapitel 4.1.1). Auch für die Adsorption von Annexin A5 an festkörperunterstützten Membranen wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) keine vollständige Reversibilität bei Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration beobachtet, was auf eine unvollständige Auflösung des Annexin A5-Kristallnetzwerkes an der Oberfläche zurückgeführt wurde.²⁷ Bitto et al. beobachteten für an immobilisierte Vesikel gebundenes Annexin A1 jedoch eine vollständige Ablösung des Proteins nach Spülen mit EGTA-haltigem Puffer mittels SPR.³³ Eine unvollständige Ablösung nach EGTA-Zugabe wurde auch für an festkörperunterstützte Membranen gebundenes Annexin A2t mittels QCM-Messungen festgestellt.¹²⁴

Die SFM-Aufnahmen zeigen, dass Annexin A1 irreversibel in Domänen gebunden ist. Diese Beobachtung stimmt mit dem vorgestellten Modell in Abbildung 54 überein. Jedoch wurde hier nicht untersucht, auf welche Weise Annexin A1 reversibel bindet, da diese Aufnahmen nicht in Gegenwart des Proteins in Lösung, sondern immer in reiner Pufferlösung gemacht wurden. Da vermutet wird, dass die Clusterbildung, also die laterale Aggregation für die Irreversibilität der Annexin A1-Membranbindung mitverantwortlich ist, liegt reversibel gebundenes Annexin A1 möglicherweise nicht lateral aggregiert vor. Im Modell wird eine Ca^{2+} -abhängige PS-Domänenbildung in der Membran angenommen, ähnlich wie sie bei rigiden DPPC/DPPS-Membranen nachgewiesen wurde, an die Annexin A1 irreversibel bindet. Mittels SFM-Messungen wurden bei den hier verwendeten POPC/POPS (4:1)-Membranen in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen PS-reiche Domänen im Größenbereich von einigen 10 nm nachgewiesen, die jedoch nicht bei jeder Präparation reproduzierbar zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahmen zeigen jedoch, dass Annexin A1 unabhängig von der Visualisierung der Membrandomänen in Clustern an die Oberfläche bindet.

Um die Kinetik der Annexin A1-Membran-Wechselwirkung zu bestimmen, mussten sowohl die reversible als auch die irreversible Adsorption berücksichtigt werden. Es wurden Monte-Carlo Computersimulationen nach dem RSA-Modell durchgeführt, bei denen eine partiell reversible Bindung von Annexin A1 angenommen wurde.* Auf der Simulationsfläche wurden runde Domänen unterschiedlicher Größe angenommen, an die Annexin A1 irreversibel binden kann. Auf die Fläche zwischen den Domänen soll das Protein reversibel binden können (vergleiche Abbildung 50 B).

* Die Simulationen wurden von S. Faiß, E. Lüthgens und A. Janshoff, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt.

Die Simulationen ergaben, dass mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ der irreversiblen Adsorption zunimmt (Tabelle 5). Die Geschwindigkeitskonstante der reversiblen Adsorption k_{on} nimmt ebenfalls tendenziell zu. Die Desorptionsgeschwindigkeit ist außer bei 500 μM CaCl_2 bei allen Messungen gleich. Beim Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der reversiblen und irreversiblen Adsorption ist erkennbar, dass die Werte für die irreversible Adsorption um ein bis zwei Größenordnungen höher liegen. Ermittelt man aus den k_{on} und k_{off} -Werten die Dissoziationskonstanten K_d für die reversible Bindung, so nimmt diese mit steigender Ca^{2+} -Konzentration ab, was einer Erhöhung der Affinität der reversiblen Bindung gleichzusetzen ist. Eine Erhöhung der Affinität der Bindung von Annexin A1 an POPC/POPS (4:1)-Membranen bei einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration von 100 μM auf 1 mM wurde bereits in früheren Studien durch Proteintitrationen bei konstanten Ca^{2+} -Konzentrationen ermittelt. Die nach dem Langmuir-Modell ermittelten Dissoziationskonstanten sinken von $K_d = (263 \pm 48) \text{ nM}$ bei 100 μM CaCl_2 auf $K_d = (59 \pm 7) \text{ nM}$ bei 1 mM CaCl_2 , wobei jedoch eine vollständig reversible Adsorption angenommen wurde.³⁶ Die in dieser Arbeit ermittelten Dissoziationskonstanten, die im Bereich von $(10^{-5}\text{--}10^{-6}) \text{ M}$ liegen, gelten nur für die reversible Adsorption getrennt von der irreversiblen. Die können somit nicht mit den Werten aus dem Langmuir-Modell direkt verglichen werden. In QCM-Studien von Ross et al. wurde ebenfalls herausgefunden, dass die Affinität der Adsorption von Annexin A2t an festkörperunterstützte Membranen mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration zwischen 10 und 100 μM CaCl_2 signifikant ansteigt.¹²⁴ Bei der Auswertung der kinetischen Parameter aus den Adsorptionsprozessen nach dem Langmuir-Modell ergab sich eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption k_{on} und der Desorption k_{off} bei einer Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM auf 100 μM von $k_{\text{on}} = (14 \pm 3) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = (3 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ auf $k_{\text{on}} = (53 \pm 6) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = (7,0 \pm 1,5) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.³⁶ Die daraus resultierenden schnelleren Adsorptions- und Desorptionsprozesse in Gegenwart von niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen stimmen nicht mit den in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Parametern überein, bei denen im Allgemeinen die Tendenz zur schnelleren Adsorption des Proteins mit steigender Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden konnte. Die k_{off} -Werte aus dem Langmuir-Modell und aus den Simulationen stimmen relativ gut überein. Die k_{on} -Werte aus dem Langmuir-Modell liegen im Größenbereich genau zwischen den simulierten Werten von k_{on} und $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$. Allerdings ist es schwierig, die in beiden Studien ermittelten Geschwindigkeitskonstanten zu vergleichen, da zum einen die Messbedingungen (Pumpgeschwindigkeit, Pumprichtung, Flussmodus) bei den Experimenten verändert wurden, was einen

erheblichen Einfluss auf die Adsorptionskinetik hat (vergleiche Kapitel 3.4.3.6), und zum anderen im Langmuir-Modell die partielle Reversibilität der Bindung und die Diffusion zur Oberfläche nicht berücksichtigt wurden.

Die aus den Simulationen ermittelten Parameter zeigen, dass die Kinetik der irreversiblen Adsorption deutlich schneller ist als die der reversiblen Adsorption. Um den Einfluss der Adsorptionszeit auf das Desorptionsverhalten zu analysieren, wurde Annexin A1 bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen unterschiedlich lange mit den Membranen inkubiert und anschließend gespült (Abbildung 52). Beim Spülen nach kurzen Inkubationszeiten (30 bzw. 60 Sekunden) wird der Bindungsprozess im Anfangsbereich unterbrochen und somit nur eine geringe Oberflächenbelegung erreicht. Hier ist zu bedenken, dass bedingt durch den Messaufbau, die Membran nicht die angegebene Zeit mit genau der Proteinkonzentration inkubiert wird, sondern durch den Durchflussprozess die Proteinkonzentration in der Messzelle in einem bestimmten Zeitraum (siehe Abbildung 19) ansteigt und beim Spülen wieder absinkt. Bei sehr kurzen Inkubationszeiten (< 60 Sekunden) wird die angegebene Konzentration in der Messzelle nicht mehr erreicht.

Bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (1 mM und 500 μM) wird bei Unterbrechung der Bindung im Anfangsbereich nur eine irreversible Bindung und erst ab einer bestimmten Oberflächenbelegung eine anteilige reversible Bindung beobachtet. Diese Beobachtung stimmt mit den ermittelten Daten überein, welche zeigen, dass die irreversible Adsorption viel schneller abläuft als die reversible. Die SFM-Aufnahmen von POPC/POPS (4:1)-Membranen nach 30 Sekunden Inkubation mit Annexin A1 in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer zeigen, dass sich die Oberflächenorganisation der Proteine nach kurzer Zeit (30 Sekunden, Abbildung 53) nicht von der nach langer Proteininkubation (30 Minuten, Abbildung 44) unterscheidet. Jedoch ist erwartungsgemäß die Oberflächenbelegung bei kürzerer Inkubationszeit reduziert.

Im Gegensatz dazu konnten nach 60 Sekunden Proteininkubation der Membranen in Gegenwart von 100 μM CaCl_2 keine Domänen abgebildet werden (Abbildung 53). Diese Beobachtung steht in Einklang mit dem in Abbildung 54 gezeigten Modell und den QCM-Messungen. Diese zeigen ebenfalls, dass bei niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen im Vergleich zu höheren Ca^{2+} -Konzentrationen das Bindungsverhalten verändert ist. So wird bereits im Anfangsbereich der Adsorption reversibel gebundenes Annexin A1 nachgewiesen und erst mit zunehmender Inkubationszeit und Oberflächenbelegung steigt der Anteil an irreversibel gebundenem Protein. Auffällig ist, dass die Menge an desorbiertem Annexin A1 nahezu konstant ist. Diese Messungen lassen darauf schließen, dass im Falle niedriger Ca^{2+} -Konzentrationen die reversible

Bindung schneller erfolgt als die irreversible. Dies stimmt jedoch nicht mit den ermittelten Werten der Geschwindigkeitskonstanten überein, da die ermittelten Werte für k_{on}^{irr} deutlich größer sind als die für k_{on} . Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass das angenommene Modell für die Computersimulationen nur bedingt gültig ist und zur exakten Bestimmung der kinetischen Parameter das Modell weiterentwickelt und auch die Geschwindigkeit der lateralen Aggregation, welche durch die Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst werden kann, miteinbezogen werden müssen.

Aus den in dieser Arbeit beobachteten Eigenschaften der Annexin A1-Membran-Wechselwirkung können Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins *in vivo* gezogen werden. Das Ca^{2+} -Ion ist ein sekundärer Botenstoff in der Zelle. Während die Ca^{2+} -Konzentration in ruhenden Zellen bei $<10^{-7}$ M gehalten wird, steigt die cytosolische Konzentration nach Stimulation der Zelle in den mikromolaren Bereich. So wird angenommen, dass Annexin A1 in ruhenden Zellen im Cytosol vorliegt und nach Stimulation der Zelle durch einen starken Anstieg der zellulären Ca^{2+} -Konzentration an die Membranen bindet. Durch laterale Aggregation des gebundenen Annexin A1 bilden sich irreversibel gebundene Cluster aus, welche eine Bindungsstelle für eine zweite Membran darstellen und somit die Membranaggregation ermöglichen. Dieser Sachverhalt wird in Kapitel 4.5 noch eingehender diskutiert. Durch die Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration im ruhenden Zustand der Zelle lösen sich die Proteincluster auf und das Protein desorbiert wieder in das Zytosol. Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist bedeutend höher als die cytosolische und liegt bei etwa 1,5 mM. Die Unterschiede im Membranbindungsverhalten von Annexin A1 bei niedrigeren ($<10^{-4}$ M) und höheren ($>10^{-4}$ M) Ca^{2+} -Konzentrationen können möglicherweise den unterschiedlichen extra- und intrazellulären Funktionen von Annexin A1 zugeordnet werden.

4.4 Untersuchung der Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung

Annexin A2m bildet mit seinem zellulären Liganden S100A10 einen stabilen, heterotetrameren Komplex. Hierbei wechselwirken zwei Annexin A2-Monomere über die Aminosäuren 1-14 der N-terminalen Domäne mit jeweils einer der beiden Bindungsstellen des S100A10-Dimers.^{56,60} Die N-terminalen Aminosäuren des Annexins bilden in dem Komplex eine amphipatische α -Helix, deren hydrophobe Seite mit S100A10 wechselwirken soll.^{55,129}

Einige Studien geben Hinweise darauf, dass Annexin A1 in strukturell ähnlicher Weise mit S100A11 interagiert.^{54,57,59,72} Als wichtige Voraussetzung für diese Interaktion wird die N-terminale Acetylierung von Annexin A1 postuliert.⁵⁹ Basierend auf diesem Postulat sollte in dieser Arbeit die Wechselwirkung von S100A11 mit Annexin A1 hinsichtlich ihrer Selektivität und der Rolle der N-terminalen Acetylierung untersucht werden.

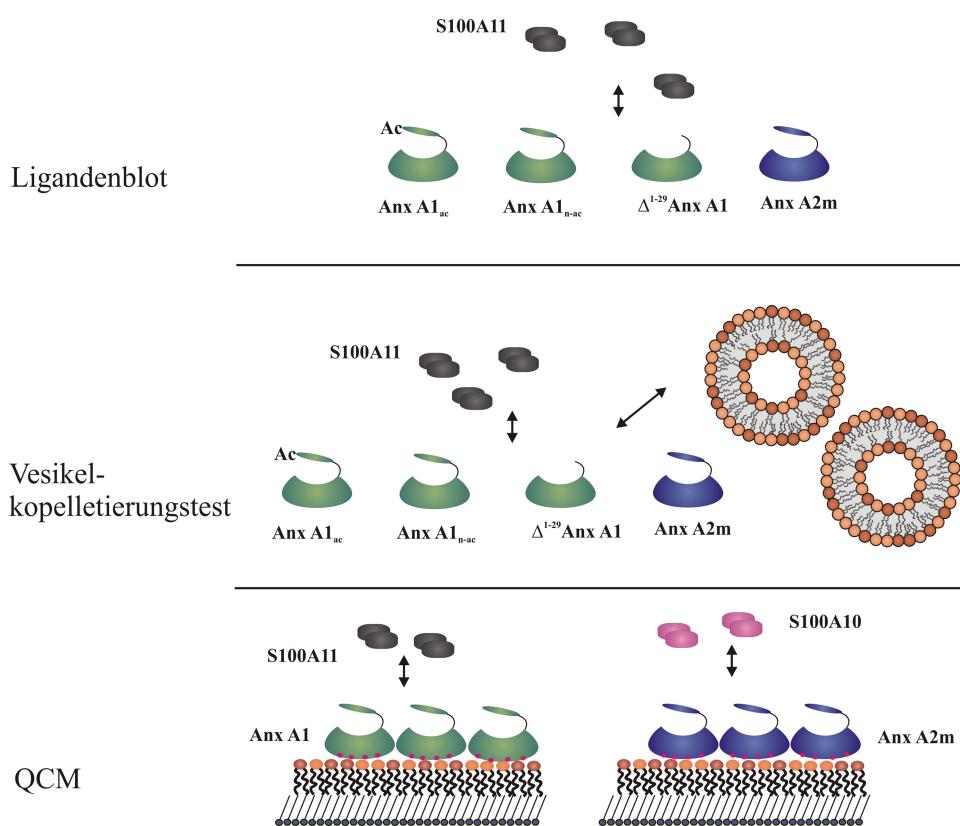


Abbildung 55: Modellansätze zur Untersuchung der Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung.

Die Spezifität dieser Wechselwirkung sollte zum einen mittels Ligandenblots in Lösung, zum anderen in Vesikelkoppelungstests mit Membranen nachgewiesen werden. Dabei wurde die S100A11-Bindung an acetyliertes Annexin A1_{ac} (Anx A1_{ac}), nicht-acetyliertes Annexin A1_{n-ac} (Anx A1_{n-ac}), N-terminal verkürztes Δ^{1-29} Annexin A1 (Δ^{1-29} Anx A1) und monomeres Annexin A2 (Anx A2m) im Vergleich analysiert (Abbildung 55). Weiterhin sollte membran-gebundenes Annexin A1 auf seine Fähigkeit zur S100A11-Assoziation hin mittels der Quarzmikrowaage-Technik (QCM) untersucht werden, wobei hier ein Vergleich mit dem analogen Proteinpaares Annexin A2m und S100A10 zusätzliche Informationen liefern soll.

4.4.1 Bindung von S100A11 an immobilisiertes Annexin

Ligandenblots werden oft verwendet, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. Hierbei wird eines der zu untersuchenden Proteine auf einer PVDF- oder Nitrozellulosemembran immobilisiert, mit dem zweiten Protein inkubiert und dessen Bindung mit einem Antikörper nachgewiesen. Auf diese Weise zeigte Seemann et al., dass S100A11 nur an vollständiges, acetyliertes Annexin A1 bindet.⁵⁹ Mittels eines Ligandenblots sollte die Selektivität des S100A11 für Annexin A1_{ac} im Vergleich zu Annexin A1_{n-ac}, Δ^{1-29} Annexin A1 und Annexin A2 untersucht werden.

Es wurden je 8 µg Annexin A1_{ac} (aus Schweinelunge), Annexin A1_{n-ac} (aus *E.coli*), Δ^{1-29} Annexin A1 und Annexin A2 (aus Schweinemucosa) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Um Δ^{1-29} Annexin A1 zu erhalten, wurden 8 µg Annexin A1_{n-ac} zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Trypsin in einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:140 in Puffer Ca₁ inkubiert und anschließend sofort einer Gelelektrophorese unterzogen. Das obere Bild in Abbildung 56 zeigt die mit Coomassie gefärbten Proteine nach Auf trennung im SDS-Gel. Die einzelne Bande bei ca. 33 kDa in Spur 3 zeigt deutlich, dass der tryptische Verdau von Annexin A1 zu Δ^{1-29} Annexin A1 vollständig war. Nach der Auf trennung wurden die Proteine im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (vergleiche Kapitel 3.3.10). Der Proteintransfer wurde mittels reversibler Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran kontrolliert. Nach Absättigung mit 5 %-Milchpulver wurde die Membran mit einer S100A11-Lösung (5 µg/ml) mindestens eine Stunde in Gegenwart von Ca²⁺- oder EGTA inkubiert und das gebundene S100A11 mit einem polyklonalen, affinitätsgereinigten S100A11 Antikörper (r676) nachgewiesen.

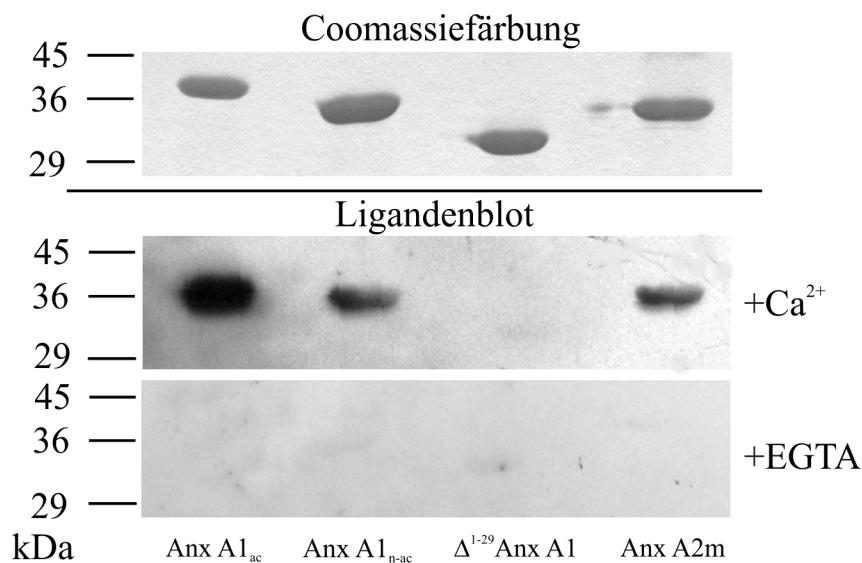


Abbildung 56: Ligandenblots zur Untersuchung der Bindung von S100A11 an immobilisiertes Annexin in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen und EGTA. Spur 1: Annexin A1_{ac}. Spur 2: Annexin A1_{n-ac}. Spur 3: Δ^{1-29} Annexin A1. Spur 4: Annexin A2. Je 8 μg Protein wurden einer SDS-PAGE in einem 15 %igem Gel unterzogen und anschließend mit Coomassie-Färbelösung angefärbt (oberes Bild) oder auf Nitrozellulose transferiert. Nach Absättigung der Membranen wurden sie mit einer S100A11-Lösung (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (TBS/Ca) oder in 1 mM EGTA-haltigem Puffer (TBS/EGTA) für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und gebundenes S100A11 mit einem spezifischen S100A11 Antikörper (r676) nachgewiesen.

S100A11 wurde in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen nicht nur assoziiert mit acetyliertem Annexin A1_{ac}, sondern auch mit nicht-acetyliertem Annexin A1_{n-ac} nachgewiesen. Jedoch war die Intensität der Bande bei Annexin A1_{ac} tendenziell stärker als bei Annexin A1_{n-ac}. Bei einem um die ersten 29 Aminosäuren verkürzten Δ^{1-29} Annexin A1 konnte keine Wechselwirkung mit S100A11 nachgewiesen werden. Um die Selektivität der Wechselwirkung zwischen diesen beiden Proteinen zu charakterisieren, wurden Ligandenblots mit S100A11 und Annexin A2 analog zusammen mit Annexin A1 durchgeführt. Diese zeigen, dass S100A11 in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen mit Annexin A2 assoziiert. Jedoch war die Intensität der Bande schwächer als für Annexin A1_{ac}. In Gegenwart von EGTA wurde weder für Annexin A1_{ac}, noch für Annexin A1_{n-ac} und Annexin A2 eine Bindung mit S100A11 detektiert, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen essentiell für die Wechselwirkung von S100A11 mit Annexin A1 und Annexin A2 ist.

4.4.2 Untersuchung der Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung mittels Vesikelkoppellettierungsassays

Die Eigenschaft von Annexin A1 Ca^{2+} -abhängig an negativ geladene Phospholipide zu binden wurde genutzt, um das Bindungsverhalten von S100A11 an Annexin A1 mittels

eines Vesikelkoppellettierungsassays zu charakterisieren. Proteine, die direkt an Membranen binden, sowie an diese Proteine assoziierte Liganden können nach der Zentrifugation der Vesikel durch SDS-PAGE-Analyse detektiert werden.

Um auf diese Weise die Wechselwirkung von Annexin A1 mit S100A11 zu untersuchen, wurden Vesikelkoppellettierungsassays mit je 4 µg Annexin A1_{ac} oder Annexin A1_{n-ac} zusammen mit (Abbildung 57, +S100) oder ohne (Abbildung 57, -S100) 4 µg S100A11 und 125 µg multilamellaren POPC/POPS (4:1)-Vesikeln in Gegenwart von entweder 1 mM Ca²⁺ oder 1 mM EGTA eingesetzt. Abbildung 57 zeigt die SDS-Gel-Analysen der Überstände nach den einzelnen Zentrifugationsschritten.

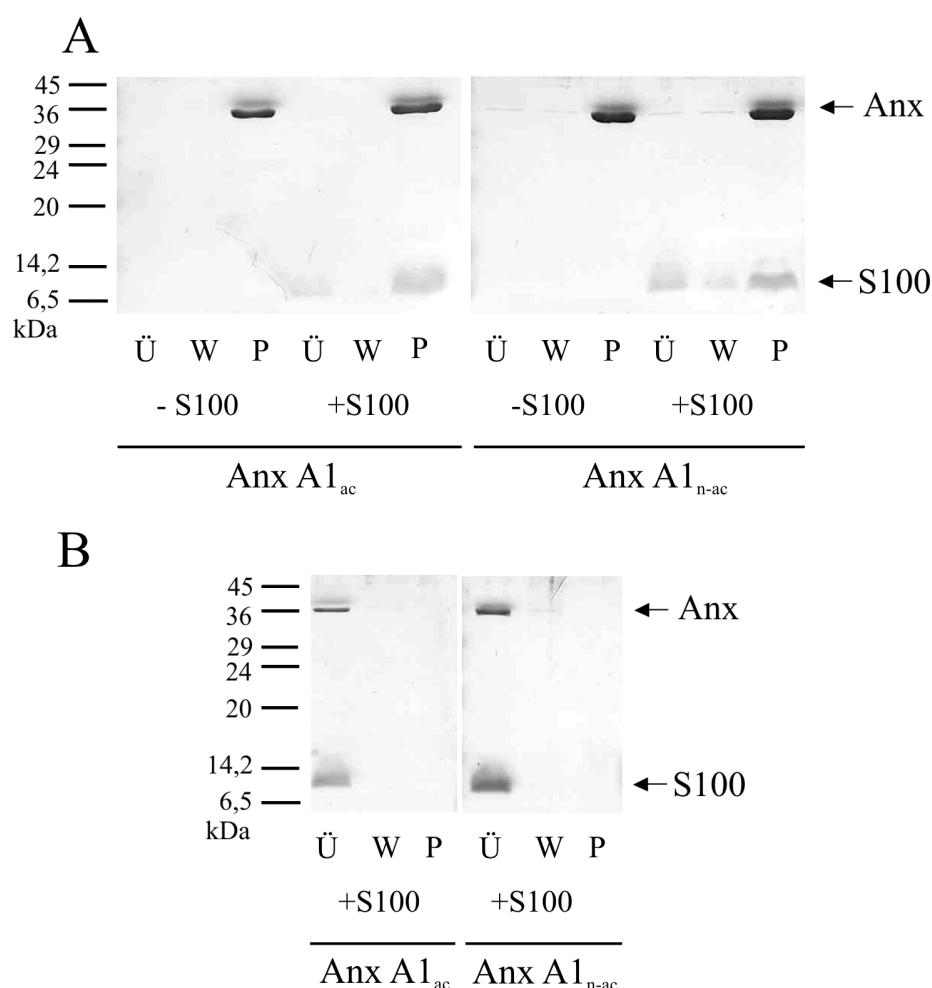


Abbildung 57: SDS-Gel eines Vesikelkoppellettierungsassays mit Annexin A1_{ac} und Annexin A1_{n-ac} mit (+S100) und ohne (-S100) S100A11 in Gegenwart von **A:** 1 mM CaCl₂ oder **B:** 1 mM EGTA. Es wurden je 4 µg der Proteine und 125 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikel in 160 µl Puffer Ca₁ oder Puffer E₁ eingesetzt. Die Proteine wurden in Puffer Ca₁ oder Puffer E₁ zuerst 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zusammen mit den Vesikeln nochmals 20 Minuten inkubiert und dann zentrifugiert. Das Vesikelpellet wurde mit 15 µl 10 mM Ca²⁺-haltigem Puffer (Ca₁₀) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit 15 µl 10 mM EGTA-haltigem Puffer (E₁₀) 20 Minuten inkubiert. Nach erneuter Pelletierung der Vesikel wurden die Überstände nach den Zentrifugationsschritten einer SDS-PAGE Analyse unterzogen. Ü: Überstand nach Zentrifugation des Ansatzes. W: Überstand nach dem Waschschnitt. P: Überstand nach der Inkubation mit Puffer E₁₀.

Anhand des SDS-Gels kann nachgewiesen werden, dass S100A11 sowohl zusammen mit Annexin A1_{ac} als auch mit Annexin A1_{n-ac} in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ mit multilamellaren POPC/POPS (4:1)-Vesikeln in ähnlichem Verhältnis pelletiert und durch Zugabe von EGTA zusammen mit Annexin A1 von den Membranen abgelöst wird. Somit konnte kein Einfluss der N-terminalen Acetylierung von Annexin A1 auf seine Wechselwirkung mit S100A11 beobachtet werden. Das SDS-Gel zeigt, dass Annexin vollständig an die Membranen gebunden hat. Da gleiche Massen an S100A11 und Annexin A1 eingesetzt wurden, lag S100A11 im molaren Überschuss (etwa ein Annexin A1 pro zwei S100A11-Dimere) vor. So wurde S100A11 auch im Überstand nach der ersten Zentrifugation und teilweise im Waschüberstand nachgewiesen. Vergleicht man die Bindung des Annexin A1_{ac} und des Annexin A1_{n-ac} in Gegenwart von S100A11 (Abbildung 57 A, +S100) mit der Annexin A1-Membranbindung ohne S100A11 (Abbildung 57 A, -S100), so ist nach Abschätzung aus dem SDS-Gel kein Unterschied in den Mengen an pelletiertem Annexin A1 zu erkennen. In Gegenwart von EGTA konnte keine Bindung von Annexin A1_{ac} und Annexin A1_{n-ac} an die Membranen, und somit auch keine Kopelletierung von S100A11 nachgewiesen werden. Mittels Vesikelkopelletierungstests mit S100A11 in Puffer Ca₁ ohne Annexin A1 konnte ebenfalls keine Assoziation von S100A11 mit Membranen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die Wechselwirkung des S100A11 über die N-terminale Domäne von Annexin A1 vermittelt wird, wurden Vesikelkopelletierungsassays mit N-terminal verkürztem Δ^{1-29} Annexin A1 und S100A11 durchgeführt. Es wurden 8 µg Δ^{1-29} Annexin A1, zusammen mit 8 µg S100A11 in 1 mM Ca²⁺-haltigem Puffer (Ca₁) und 250 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikel eingesetzt. Die SDS-PAGE Analyse zeigt, dass die N-terminalen Aminosäuren 1-29 von Annexin A1_{n-ac} vollständig abgespalten waren, da nur ein 33 kDa Proteinfragment nachgewiesen wurde (Abbildung 58). S100A11 wurde nicht zusammen mit Δ^{1-29} Annexin A1 mit den Vesikeln pelletiert, sondern blieb vollständig im Überstand.

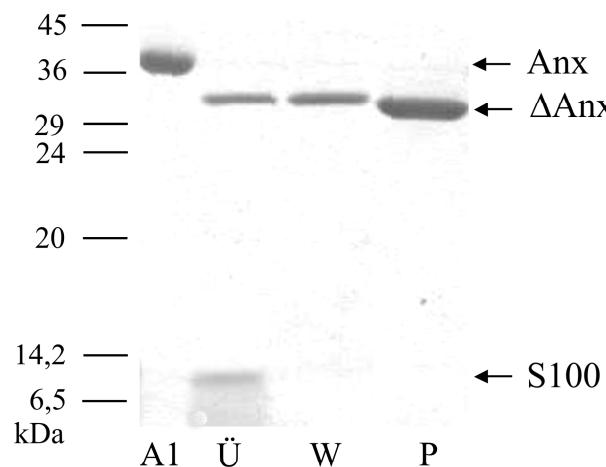


Abbildung 58: SDS-Gel eines Vesikelkoppelungsassays von Δ^{1-29} Annexin A1 mit S100A11 in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} -Ionen. Es wurden je 8 μg der Proteine und 250 μg POPC/POPS (4:1)-Vesikel in 160 μl Puffer Ca_1 eingesetzt. Δ^{1-29} Annexin A1 wurde mit 8 μg S100A11 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zusammen mit den Vesikeln nochmals 20 Minuten inkubiert und dann zentrifugiert. Das Vesikelpellet wurde mit 15 μl 10 mM EGTA-haltigem Puffer E_{10} 20 Minuten inkubiert. Nach erneuter Pelletierung der Vesikel wurden die Überstände nach den Zentrifugationsschritten einer SDS-PAGE Analyse unterzogen. Ü: Überstand nach Zentrifugation des Ansatzes. W: Überstand nach dem Waschschritt. P: Überstand nach der Inkubation mit Puffer E_{10} . In der ersten Spur (A1) wurde zum Vergleich intaktes Annexin A1_{n-ac} aufgetragen.

Da im Ligandenblot eine Wechselwirkung von S100A11 mit immobilisiertem Annexin A2 beobachtet wurde (vergleiche Abbildung 56) sollte die Spezifität der Bindung von S100A11 in einem Vesikelkoppelungsassay kontrolliert werden. Analog zu den oben beschriebenen Versuchen wurden hierfür 8 μg Annexin A2m, 8 μg S100A11 und 250 μg POPC/POPS (4:1)-Vesikel in 160 μl 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (Ca_1) eingesetzt. Der Überstand des zentrifugierten Ansatzes (Ü), sowie die Überstände nach dem Waschschritt (W) und nach der Inkubation mit EGTA (P) wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 59).

Das SDS-Gel zeigt deutlich, dass Annexin A2m vollständig an die Membranen gebunden hat, da sowohl im Überstand des zentrifugierten Ansatzes als auch im Waschüberstand nahezu kein Annexin A2m nachgewiesen werden konnte. Nach Inkubation des resuspendierten Vesikelpellets mit EGTA-haltigem Puffer löste sich Annexin A2m von den Membranen ab und reichertete sich im Überstand (Abbildung 59, P) an. S100A11 konnte noch deutlich im Überstand (Abbildung 59, Ü) und etwas schwächer im Waschüberstand (Abbildung 59, W) detektiert werden. Nach Inkubation des Vesikelpellets mit EGTA-haltigem Puffer befand sich jedoch neben Annexin A2m auch S100A11 eindeutig im Überstand (Abbildung 59, P). Dies zeigt, dass S100A11 zusammen mit Annexin A2m calciumabhängig mit den Vesikeln pelletiert wurde. Die

Menge an kopelletiertem S100A11 war jedoch, abgeschätzt aus dem SDS-Gel, etwas geringer als bei den Experimenten mit Annexin A1 (Abbildung 57).

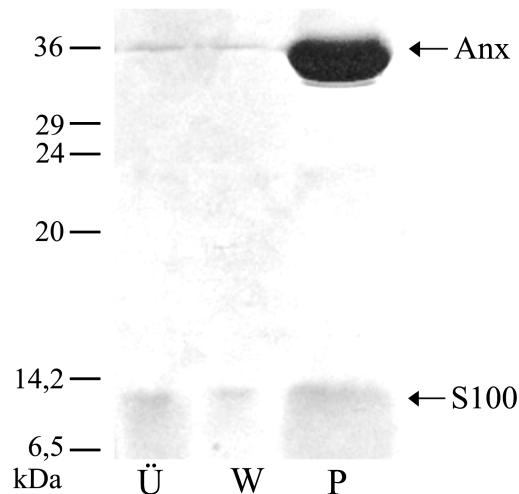


Abbildung 59: SDS-Gel eines Vesikelkopelletierungsassays von Annexin A2m mit S100A11 in Gegenwart von 1 mM CaCl₂. Es wurden je 8 µg der Proteine und 250 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikel in 160 µl Puffer Ca₁ eingesetzt. Die Proteine wurden in Puffer Ca₁ oder Puffer E₁ zuerst 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zusammen mit den Vesikeln nochmals 20 Minuten inkubiert und dann zentrifugiert. Das Vesikelpellet wurde mit 15 µl 10 mM Ca²⁺-haltigem Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit 15 µl 10 mM EGTA-haltigem Puffer E₁₀ 20 Minuten inkubiert. Nach erneuter Pelletierung der Vesikel wurden die Überstände nach den Zentrifugationsschritten einer SDS-PAGE Analyse unterzogen. Ü: Überstand nach Zentrifugation des Ansatzes. W: Überstand nach dem Waschschritt. P: Überstand nach der Inkubation mit Puffer E₁₀.

4.4.3 Untersuchung des Einflusses von S100A11 auf den tryptischen Verdau von membran-gebundenem Annexin A1

S100A11 konnte, wie in Kapitel 4.4.2 gezeigt, zusammen mit Annexin A1_{ac} und Annexin A1_{n-ac}, jedoch nicht mit N-terminal verkürztem Δ^{1-29} Annexin A1 in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ mit POPC/POPS (4:1)-Vesikeln pelletiert werden. Da die N-terminale Domäne von Annexin A1 eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung von S100A11 mit Annexin A1 zu spielen scheint, wurde zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zuerst S100A11 zusammen mit Annexin A1_{n-ac} mit Vesikeln pelletiert und anschließend die N-terminale Domäne des membran-gebundenen Annexin A1_{n-ac} durch Inkubation mit Trypsin abgespalten. Der Verlauf der Abspaltung wurde mittels SDS-PAGE Analyse verfolgt.

Es wurden je 8 µg Annexin A1_{n-ac} zusammen mit (Abbildung 60, +S100) oder ohne (Abbildung 60, -S100) 8 µg S100A11 in 160 µl Puffer Ca₁ mit 125 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikeln analog 3.3.13 inkubiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 160 µl

Puffer Ca_1 resuspendiert und mit Trypsin im Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:140 (bezogen auf 8 μg Annexin A1_{n-ac}) versetzt. Nach 1, 2 und 3 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 50 μl des Ansatzes entnommen, zentrifugiert und das Pellet mit 15 μl Puffer Ca_{10} gewaschen. Das Pellet wurde in 15 μl Puffer E_{10} resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 60).

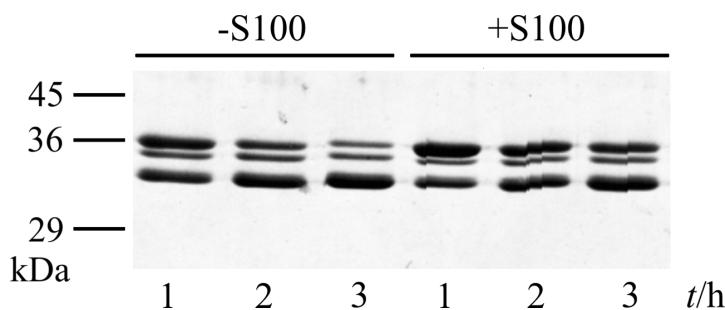


Abbildung 60: SDS-Gel des tryptischen Verdaus von membran-gebundenem Annexin A1_{n-ac} in Gegenwart von S100A11. Ein Ansatz aus je 8 μg Annexin A1_{n-ac} zusammen mit (+S100) oder ohne (-S100) 8 μg S100A11 und mit 125 μg POPC/POPS (4:1)-Vesikeln in 160 μl Puffer Ca_1 wurde zentrifugiert und das Pellet in 160 μl Puffer Ca_1 resuspendiert. Der Ansatz wurde mit Trypsin im Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:140 (bezogen auf 8 μg Annexin A1_{n-ac}) inkubiert und nach 1, 2 und 3 Stunden je 50 μl des Ansatzes entnommen, zentrifugiert und das Pellet mit 15 μl Puffer Ca_{10} gewaschen. Ca^{2+} -abhängig gebundene Proteine wurden mit 15 μl Puffer E_{10} abgelöst und mittels SDS-PAGE analysiert.

Das SDS-Gel weist in jeder Spur jeweils Banden bei 36, 35 und 33 kDa mit unterschiedlichen Intensitäten auf. Die Bande bei 36 kDa wird dem Annexin A1 und die bei 33 kDa dem Δ^{1-29} Annexin A1 zugeordnet.⁷¹ Das Proteinfragment mit 35 kDa entspricht nach Literaturangaben Δ^{1-9} Annexin A1.³⁷ Der zeitliche Verlauf der Proteolyse von Annexin A1_{n-ac} konnte anhand des SDS-Gels verfolgt werden. Die Abspaltung von N-terminalen Peptiden von Annexin A1 zeichnet sich durch sukzessive Abnahme der Intensität der Bande bei 36 kDa und gleichzeitiger Zunahme der Intensität der Bande bei 33 kDa nach jeweils 1, 2 und 3 Stunden Inkubation mit Trypsin aus. Beim Vergleich der Proteolyse in An- und Abwesenheit von S100A11 ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität der Bande bei 36 kDa in Anwesenheit von S100A11 innerhalb von drei Stunden tendenziell langsamer abnimmt als in Abwesenheit von S100A11. Analog dazu nimmt die Intensität der Bande bei 33 kDa in Gegenwart von S100A11 langsamer zu als ohne S100A11. Die Intensität der Bande bei 35 kDa bleibt in beiden Fällen nahezu unverändert. So wurde etwa nach 3 Stunden Inkubation mit Trypsin ohne S100A11 nur noch eine schwache Bande bei 36 kDa beobachtet, während in Anwesenheit von S100A11 diese deutlich ausgeprägter war. Hieraus lässt sich schließen, dass die

Geschwindigkeit des tryptischen Verdaus des N-Terminus von Annexin A1_{n-ac} durch Zusatz von S100A11 in Gegenwart von Vesikeln und 1 mM CaCl₂ vermindert ist.

Nach dreistündiger Inkubation von S100A11 mit Trypsin unter analogen Bedingungen in Puffer Ca₁ konnte im SDS-Gel weder eine Veränderung der Bande von S100A11 bei ca. 10 kDa, noch kleinere Proteinfragmente nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluss von S100A11 auf die Proteolysegeschwindigkeit des N-Terminus von Annexin A1_{n-ac} weiter zu untersuchen, wurden zum einen äquivalente Experimente mit unterschiedlichen Mengen an Lipid und gleichen Proteinmengen mit (Abbildung 61, +S100) oder ohne (Abbildung 61, -S100) 8 µg S100A11 in 160 µl Puffer Ca₁ durchgeführt. Zum anderen wurde das Enzym-Substrat-Verhältnis um den Faktor 5 auf 1:28 erhöht. Nach 1, 2 und 3 Stunden Inkubation des resuspendierten Protein-Vesikelpellets mit Trypsin wurden je 50 µl des Ansatzes entnommen, wie oben beschrieben weiterverarbeitet und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 61).

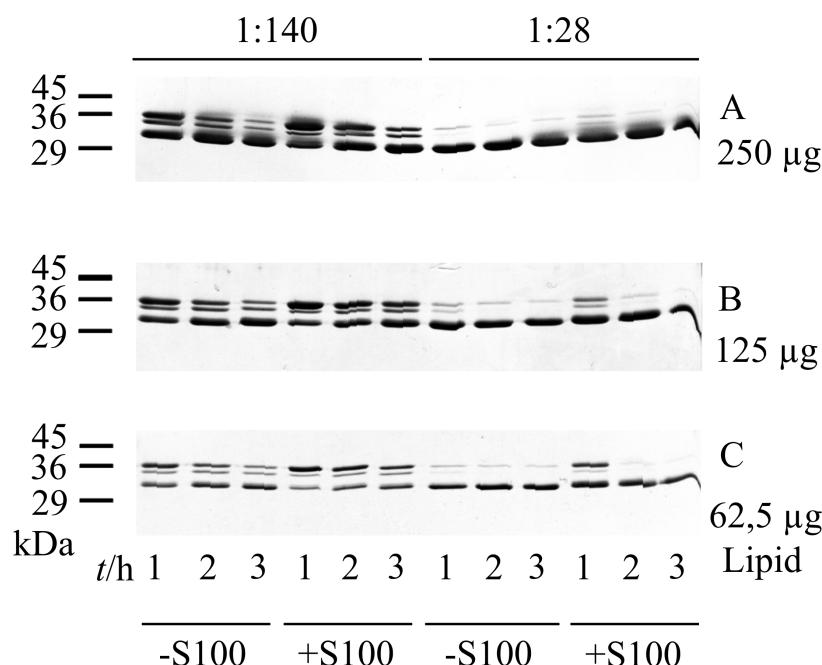


Abbildung 61: SDS-Gel des tryptischen Verdaus von membran-gebundenem Annexin A1_{n-ac} in Gegenwart von S100A11. Ein Ansatz aus je 8 µg Annexin A1_{n-ac} zusammen mit (+S100) oder ohne (-S100) 8 µg S100A11 und mit A) 250, B) 125 oder C) 62,5 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikeln in 160 µl Puffer Ca₁ wurde zentrifugiert und das Pellet in 160 µl Puffer Ca₁ resuspendiert. Der Ansatz wurde mit Trypsin im Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:140 oder 1:28 (bezogen auf 8 µg Annexin A1_{n-ac}) inkubiert und nach 1, 2 oder 3 Stunden je 50 µl des Ansatzes entnommen, zentrifugiert und das Pellet mit 15 µl Puffer Ca₁₀ gewaschen. Ca²⁺-abhängig gebundene Proteine wurden mit 15 µl Puffer E₁₀ abgelöst und mittels SDS-PAGE analysiert.

Aus dem SDS-Gel wird ersichtlich, dass die Menge an gebundenem Annexin A1 mit sinkender eingesetzter Lipidmenge entsprechend abnimmt. Bei einem um den Faktor 5 erhöhten Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:28 sind nach 1 bis 2 Stunden Inkubationszeit

hauptsächlich nur noch Banden bei 33 kDa zu erkennen, was bedeutet, dass der N-Terminus von Annexin A1_{n-ac} bereits weitgehend vollständig abgespalten war. Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Proteolyse mit und ohne S100A11 kann festgestellt werden, dass die Proteolysegeschwindigkeit in allen Ansätzen tendenziell durch Zusatz von S100A11 vermindert ist. Besonders deutlich ist dies beim Einsatz von 62,5 µg POPC/POPS (4:1)-Vesikeln (Abbildung 61 C) und einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:28 erkennbar. In Abwesenheit von S100A11 lag bereits nach einer Stunde Inkubation mit Trypsin fast nur noch Δ^{1-29} Annexin A1 vor. In Gegenwart von S100A11 war dies erst nach zwei Stunden Inkubation mit Trypsin zu beobachten, während nach einer Stunde Inkubationszeit noch deutlich das 36 kDa schwere Annexin A1_{n-ac} nachgewiesen werden konnte.

4.4.4 Untersuchung der Wechselwirkung von S100A11 mit membran-gebundenem Annexin A1 mittels der Quarzmikrowaage-Technik

Durch die Ligandenblots und Vesikelkoppelungstests wurde eine Assoziation von S100A11 mit Annexin A1 nachgewiesen, jedoch sind diese Methoden weniger gut geeignet, diese Interaktion zu quantifizieren. So sollte die Wechselwirkung von S100A11 mit membran-gebundenem Annexin A1 mittels festkörperunterstützter Membranen unter Ausschluss von Membranaggregationsprozessen untersucht werden, wie sie bei den Vesikelkoppelungstests unter den hier verwendeten Bedingungen auftreten und welche ebenfalls über den N-Terminus von Annexin A1 vermittelt werden. Da davon ausgegangen werden kann, dass Annexin A1 mit seiner konvexen Seite des Proteinkerns über die Ca²⁺-Bindungsstellen an Membranen bindet,¹⁶ liegt somit der an der konkaven Seite lokalisierte N-Terminus an der Oberfläche.

Zur Untersuchung der Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung wurde N-terminal acetyliertes Annexin A1_{ac} sowie nicht-acetyliertes Annexin A1_{n-ac} in 1 mM Ca²⁺-haltigem Puffer (Ca₁) an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen adsorbiert und die Wechselwirkung von S100A11 mit membran-gebundenem Annexin A1 mittels der QCM-Technik verfolgt (Abbildung 62). Es wurden nach Zugabe von 0,2 µM Annexin A1 (Abbildung 62, anx (I)) und anschließender Erhöhung der Konzentration auf 0,4 µM (Abbildung 62, anx (II)) für Annexin A1_{ac} (Abbildung 62 A) und Annexin A1_{n-ac} (Abbildung 62 B) Frequenzänderungen im Bereich von –19 bis –22 Hz beobachtet, die einer maximalen Proteinbelegung unter diesen Bedingungen entsprechen.³⁶ Nicht-gebundenes Protein wurde durch Spülen (Abbildung 62, spülen) des Systems mit Puffer Ca₁ entfernt. Dies führte nur zu geringen Frequenzerhöhungen von 1 bis 3 Hz, sodass gewährleistet war, dass der größte Teil des Proteins an der

Membran gebunden blieb. Anschließend wurde S100A11 mit einer Konzentration von 1 μM zugegeben.

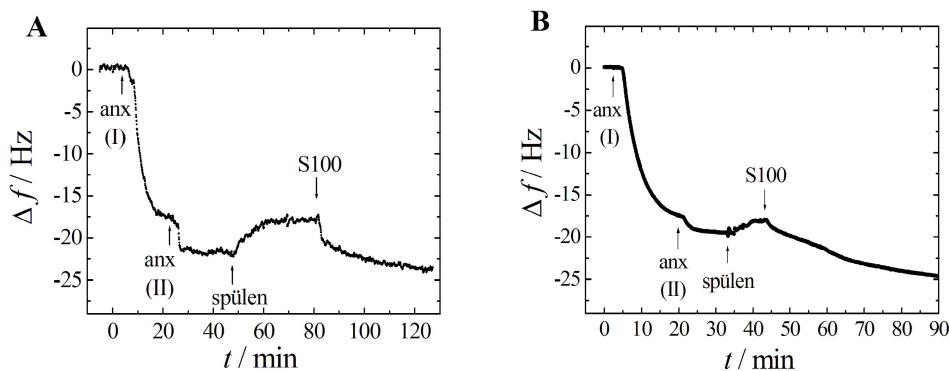


Abbildung 62: QCM-Messungen der Adsorption von Annexin A1_{ac} (A) und Annexin A1_{n-ac} (B) an festkörperunterstützte Membranen und anschließender Zugabe von S100A11 in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (Ca₁). Nach Zugabe von Annexin A1 (anx) mit einer Konzentration von I) 0,2 μM und II) 0,4 μM zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen wurde nicht-gebundenes Protein durch Spülen entfernt und 1 μM S100A11 zugegeben (S100).

Im Falle von membran-gebundenem Annexin A1_{ac} fiel die Resonanzfrequenz anfangs um etwa 3 Hz und ging dann in einen eher linearen Abfall über (Abbildung 62 A). Bei Annexin A1_{n-ac} wurde nach Zugabe von S100A11 direkt ein monotoner Abfall der Resonanzfrequenz beobachtet (Abbildung 62 B). In beiden Fällen sank die Resonanzfrequenz nach Zugabe von 1 μM S100A11 innerhalb von 40 Minuten um 5-6 Hz ohne dass ein konstanter Wert erreicht wurde.

Der beobachtete Frequenzverlauf nach Zugabe von S100A11 zu membran-gebundenem Annexin A1 variierte stark, sodass bei einigen Messungen nahezu keine Frequenzänderung beobachtet wurde, bei anderen wiederum die Frequenz eher linear mit unterschiedlicher Steigung über mehrere Stunden abfiel ohne dass ein Endwert erreicht wurde. Dieses Verhalten zeigte sich sowohl bei Verwendung von Annexin A1_{ac} als auch bei Annexin A1_{n-ac} in gleicher Weise. Äquivalente Messungen mit variablen S100A11-Konzentrationen im Bereich von 0,3 μM bis ca. 10 μM führten zu ähnlichen Ergebnissen, sodass kein eindeutiger Einfluss der Proteinkonzentration auf das Resonanzfrequenzverhalten erkennbar ist (Daten nicht gezeigt). Eine geringere Oberflächenbelegung von Annexin A1, die einer Resonanzfrequenzänderung von -5 Hz entspricht, beeinflusste den Verlauf der Resonanzfrequenz nach Zugabe von S100A11 ebenfalls nicht, sondern führte zu ähnlichen Messdaten wie in Abbildung 62 gezeigt (Daten nicht gezeigt). Nach Entfernen von S100A11 aus dem System stieg die Resonanzfrequenz wieder an, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Während in manchen Fällen die Frequenz nur geringfügig anstieg, erreichte in anderen Fällen die

Resonanzfrequenz wieder denselben Wert wie vor der S100A11-Zugabe (Daten nicht gezeigt). Aus den QCM-Messungen konnte kein eindeutiges, konzentrationsabhängiges Bindungsverhalten von S100A11 mit definierter Kinetik an membran-gebundenes Annexin A1 nachgewiesen werden. Nimmt man an, dass ein gebundenes Annexin A1-Molekül mit seinem N-Terminus eine Bindungsstelle für ein S100A11-Dimer bildet, so müsste die Oberflächenbelegung von S100A11 genauso groß sein wie die des Annexin A1. Da ein S100A11-Dimer mit etwa 20 kDa ungefähr halb so groß ist wie ein Annexin A1-Molekül mit 38 kDa, müsste die Resonanzfrequenz bei einer 1:1 Wechselwirkung etwa um 10 Hz sinken.

Bei der Zugabe einer Mischung von 0,6 μM Annexin A1 und 0,6 μM S100A11, die zuvor in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 inkubiert wurde, zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen, führte zu den gleichen Frequenzänderungen wie die bei der Adsorption von Annexin A1 ohne S100A11 (ca. -20 Hz) beobachteten und nicht zu einer deutlich größeren Frequenzänderung von ca. -40 Hz, wie sie bei der Adsorption von Annexin A2t unter analogen Bedingungen erhalten wurde.¹²⁴

Um den Einfluss der N-terminalen Domäne auf das Bindungsverhalten von S100A11 zu membran-gebundenem Annexin A1 zu untersuchen, wurde durch tryptischen Verdau N-terminal verkürztes Δ^{1-29} Annexin A1 auf POPC/POPS (4:1)-Membranen in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer Ca_1 immobilisiert und nach Entfernen von nicht-gebundenem Protein S100A11 zugegeben.

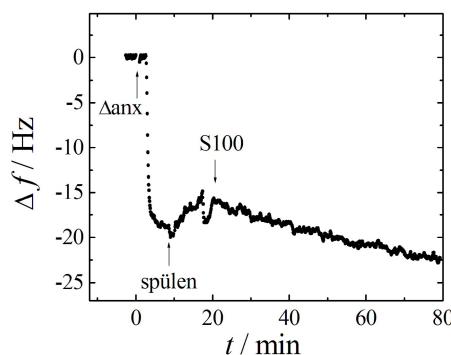


Abbildung 63: QCM-Messung der Adsorption von N-terminal verkürztem Δ^{1-29} Annexin A1 und anschließender Zugabe von S100A11. Zu POPC/POPS (4:1)-Membranen wurde 0,3 μM Δ^{1-29} Annexin A1 ($\Delta\text{anx.}$) in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (Ca_1) gegeben. Nicht gebundenes Protein wurde durch Spülen entfernt und anschließend S100A11 mit einer Konzentration von 2 μM zugegeben.

Die Adsorption von N-terminal verkürztem Δ^{1-29} Annexin A1 mit einer Konzentration von 0,3 μM (Abbildung 63, $\Delta\text{anx.}$) an die Membran führte zu einer Resonanzfrequenzänderung von $-(19 \pm 2)$ Hz und entspricht somit ungefähr der

Resonanzfrequenzänderung, die bei der Adsorption von Annexin A1 erhalten wird (Abbildung 63). Nach Spülen (Abbildung 63, spülen) mit Puffer Ca_1 stieg die Resonanzfrequenz um (3 ± 2) Hz, wodurch gewährleistet war, dass $\Delta^{1-29}\text{Annexin A1}$, genauso wie Annexin A1, zum größten Teil an der Membran gebunden blieb. Nach Zugabe von $2 \mu\text{M}$ S100A11 (Abbildung 63, S100) wurde ein nahezu linearer Abfall der Resonanzfrequenz mit einer Änderung von etwa -6 Hz in 60 Minuten beobachtet. Die Reproduzierbarkeit der Experimente mit $\Delta^{1-29}\text{Annexin A1}$ und S100A11 war, wie im Fall von intaktem Annexin A1, gering. So wurde in manchen Fällen keine Resonanzfrequenzänderung nach Zugabe von S100A11, in anderen Fällen ein stetiger leichter Abfall der Frequenz beobachtet. Wiederum zeigte der Frequenzverlauf in einem Konzentrationsbereich von $0,3$ bis $4 \mu\text{M}$ S100A11 kein konzentrationsabhängiges Verhalten. Auf diese Weise konnte kein eindeutiger Unterschied im Bindungsverhalten von S100A11 an membran-gebundenes Annexin A1 und $\Delta^{1-29}\text{Annexin A1}$ beobachtet, und somit die Wechselwirkung von S100A11 mit der N-terminalen Domäne von Annexin A1 nicht bestätigt werden.

Kontrollexperimente zeigen, dass die Zugabe von S100A11 zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer Ca_1 in Abwesenheit von Annexin A1 entweder eine geringe Erniedrigung der Resonanzfrequenz um etwa 1 bis 4 Hz verursachte, oder einen linearen Abfall der Frequenz zufolge hatte, welcher ähnlich dem Frequenzverlauf nach Zugabe von S100A11 zu membran-gebundenem Annexin A1 war.

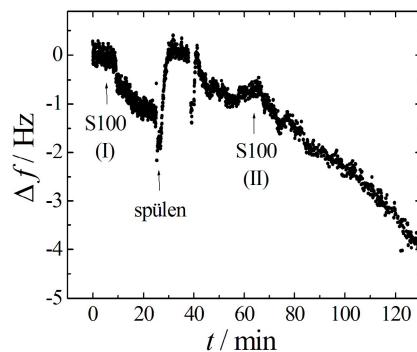


Abbildung 64: Verlauf der Resonanzfrequenz nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ S100A11 (S100 (I)) zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer Ca_1 . Nach Spülen des Systems wurde nochmals S100A11 mit einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ (S100(II)) zugegeben.

In der in Abbildung 64 gezeigten exemplarischen Messung wurde nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ S100A11 (S100(I)) eine Resonanzfrequenzerniedrigung von 1 bis 2 Hz beobachtet, die nach Entfernen von S100A11 durch Spülen wieder bis auf den Anfangswert anstieg. Nach erneuter Zugabe von $2 \mu\text{M}$ S100A11 (S100(II)) sank die Frequenz nahezu linear

um etwa 4 Hz in 60 Minuten. Weitere Experimente zeigten, dass eine Variation der zugegebenen S100A11-Konzentration in einem Bereich von 0,3-2 μ M keinen Einfluss auf den Resonanzfrequenzverlauf nahm. So konnte zwischen der Zugabe von S100A11 zu membran-gebundenem Annexin A1 und zu reinen POPC/POPS (4:1)-Membranen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, sodass weder eine Wechselwirkung von S100A11 mit an planare Membranen gebundenem Annexin A1_{ac} noch mit Annexin A1_{n-ac}, eindeutig nachgewiesen werden konnte.

4.4.5 Untersuchung der Wechselwirkung von S100A10 mit membran-gebundenem Annexin A2m mittels der Quarzmikrowaage-Technik

Die Wechselwirkung von Annexin A2 mit seinem Liganden S100A10 über die Aminosäuren 1-14 von Annexin A2 und die Ausbildung eines heterotetrameren Komplexes wurde bereits in zahlreichen Studien charakterisiert.^{60,74,110,130} Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Annexin A2 und Annexin A1 sowie zwischen S100A10 und S100A11 lässt vermuten, dass die Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen Proteinen ähnlicher Natur sind. Deshalb wurde die Wechselwirkung von S100A10 mit membran-gebundenem Annexin A2m analog den Experimenten mit Annexin A1 und S100A11 mittels der QCM-Technik untersucht (Abbildung 65).

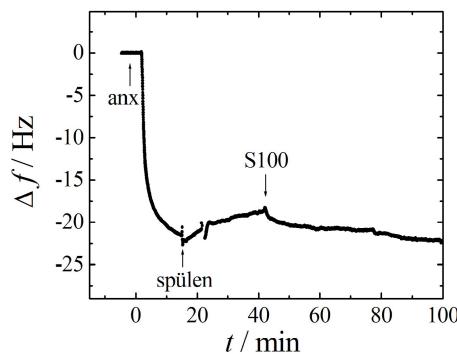


Abbildung 65: QCM-Messung zur Untersuchung der Wechselwirkung von membran-gebundenem Annexin A2m und S100A10. Zu POPC/POPS (4:1)-Membranen wurde 0,3 μ M Annexin A2m in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer Ca_1 gegeben (anx). Nicht-gebundenes Protein wurde durch Spülen entfernt und 1 μ M S100A10 zugegeben (S100).

Es wurden 0,3 μ M Annexin A2m zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer Ca_1 gegeben. Dies führte zu einer Frequenzänderung von $-(21 \pm 2)$ Hz und entsprach somit der maximalen Belegung von Annexin A2m unter diesen Bedingungen (Grosser, M. und Menke, M., unveröffentlichte Ergebnisse). Aus den ähnlichen Resonanzfrequenzänderungen ist

ersichtlich, dass die Oberflächenkonzentration von Annexin A1 und Annexin A2m an POPC/POPS (4:1)-Membranen in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ nach Zugabe des Proteins mit einer Konzentration von 0,3 µM ähnlich sind. Nach Spülen des Systems mit Puffer Ca₁, um nicht-gebundenes Protein zu entfernen, stieg die Resonanzfrequenz um (3 ± 2) Hz, was beweist, dass der größte Anteil des Annexin A2m nach dem Spülen an der Oberfläche gebunden bleibt. Anschließend wurde 1 µM S100A10 zugegeben und eine Frequenzabnahme von -(3 ± 1) Hz innerhalb von 60 Minuten beobachtet. Eine Variation der S100A10-Konzentration von 0,3 bis 2 µM hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Frequenzverlauf und führte zu Frequenzänderungen nach Zugabe von S100A10 ohne erkennbare Abhängigkeit von der Proteinkonzentration von -1 bis -4 Hz. Mittels der QCM-Technik konnte somit keine eindeutige Wechselwirkung von S100A10 mit an festkörperunterstützte Membranen gebundenem Annexin A2m nachgewiesen werden.

4.4.6 Diskussion

In einigen Studien wurde bereits beschrieben, dass S100A11 in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen selektiv mit dem N-Terminus von Annexin A1 wechselwirkt, wobei postuliert wurde, dass die N-terminale Acetylierung essentiell für diese Interaktion ist.^{52,54,59,72} Ausgehend von diesen Erkenntnissen war es ein Ziel dieser Arbeit, selektiv die Interaktion von Annexin A1 und S100A11 zu quantifizieren, um dadurch detailliertere Informationen über mögliche funktionelle Eigenschaften dieser Proteine zu erhalten.

4.4.6.1 Allgemeine strukturelle Charakterisierung der Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung

Um die Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung zu quantifizieren, sollte zunächst die in anderen Studien (Seemann, 96) beschriebene, Ca²⁺-abhängige Wechselwirkung von Annexin A1 und S100A11 mittels Ligandenblots und Vesikelkoppelungassays verifiziert werden, um die Aktivität der Proteine zu überprüfen. Es konnte auf diese Weise eine Wechselwirkung von S100A11 mit Annexin A1 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Ligandenblots zeigen, dass S100A11 nur in Gegenwart von CaCl₂ an Annexin A1, immobilisiert an Nitrozellulose, bindet. In Vesikelexperimenten konnte gezeigt werden, dass S100A11 zusammen mit Annexin A1 und negativ-geladenen Phospholipidvesikeln in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ koppelletiert wird und sich nach Inkubation mit EGTA wieder in der Lösung anreichert.

Da bei Vesikelkoppelungssassays Annexin A1 nur in Gegenwart von CaCl_2 an die Vesikel binden kann, ist es auf diese Weise nicht möglich, selektiv die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Protein-Protein-Wechselwirkung nachzuweisen. Allerdings konnte durch die Ligandenblot-Experimente bestätigt werden, dass S100A11 nur in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen an immobilisiertes Annexin A1 bindet. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Wechselwirkung beruht auf der Konformationsänderung von S100A11 im Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -beladenen Zustand. Strukturanalysen zeigen, dass in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen einige für die Bindung mit Annexin A1 entscheidende Aminosäurereste in den hydrophoben Proteinkern eingelagert sind.^{51,108} Bei Besetzung der Ca^{2+} -Bindungsstellen treten diese hydrophoben Reste an die Oberfläche und aktivieren die Bindungsstelle für Annexin A1.^{47,48,51,52,54,59,72} Außerdem ist die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen für die Konformation von Annexin A1 entscheidend. Die Kristallstruktur von Annexin A1 in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen zeigt, dass die N-terminale α -Helix von Annexin A1, welche als Bindungsstelle diskutiert wird, in die Kerndomäne eingelagert und somit für S100A11 nicht zugänglich ist.¹⁶ Erst wenn die Ca^{2+} -Bindungsstellen des Annexin A1 beladen sind, wird die N-terminale Domäne aus dem Proteinkern freigesetzt und befindet sich auf dessen konkaver Seite.¹⁷

Bei vergleichenden Experimenten mit N-terminal acetyliertem Annexin A1_{ac}, welches aus Schweineleunge isoliert wurde, und bakteriell exprimiertem, nicht-acetyliertem Annexin A1_{n-ac} wurde, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Seemann et al.⁵⁹ in beiden Fällen eine Assoziation mit S100A11 sowohl in den Ligandenblot-Experimenten als auch in den Vesikelkoppelungssassays beobachtet. War auch die Intensität der Bande bei Annexin A1_{n-ac} in den Ligandenblots mit S100A11 etwas weniger intensiv als die mit Annexin A1_{ac}, so ergab sich aus den Vesikelkoppelungssassays - nach Abschätzung aus den SDS-Gelen - kein signifikanter Unterschied in den Mengen an koppeltem S100A11 mit Annexin A1_{n-ac} und Annexin A1_{ac}.

So konnte generell gezeigt werden, dass die N-terminale Acetylierung nicht essentiell für die Annexin A1-S100A11-Wechselwirkung ist, wie frühere Studien vermuten ließen, sondern möglicherweise nur die Affinität von S100A11 zu Annexin A1_{n-ac} niedriger ist als zu Annexin A1_{ac}. Aus der Struktur des Komplexes von S100A11 mit dem Annexin A1-Peptid Ac2-14 ist bekannt, dass die N-terminale Acetylgruppe des Peptids nicht direkt in den Kontakt mit S100A11 involviert ist. Allerdings ist die Carbonylfunktion der Acetylgruppe an einer Wasserstoffbrückenbindung mit der Aminogruppe der vierten Aminosäure des Peptids beteiligt. So wird vermutet, dass die Acetylgruppe die helikale Konformation des Peptids stabilisiert, die für die Erkennung der Bindungsstelle im S100A11 nötig ist.⁵² Dass die N-terminale Acetylierung nicht essentiell für die Bindung ist, zeigten auch Maillard et al.⁵⁴ Das Fusionsprotein aus

Glutathion-S-Transferase (GST) und den Aminosäuren 1 bis 46 von Annexin A1, GST-AINT, das aufgrund bakterieller Expression nicht N-terminal acetyliert war, wurde auf Glutathion-Agarosekugelchen immobilisiert und konnte S100A11 aus dem Lysat von A431 Zellen binden. Die Bindung trotz fehlender Acetylierung könnte hier auf eine Stabilisierung der helikalen Konformation durch das gesamte Protein, insbesondere der GST-Einheit, beruhen.^{52,57} Die Abweichung der Beobachtungen von Seemann et al.⁵⁹ von den im Rahmen dieser Arbeit durchgeföhrten Experimenten könnte möglicherweise dadurch begründet werden, dass bei vollständigem Annexin A1_{n-ac}, je nach Aufreinigung einer Proteincharge, leichte konformative Unterschiede auftreten können. Dadurch könnte je nach Proteincharge die helikale Anordnung der N-terminalen Domäne stabilisiert werden und somit Annexin A1_{n-ac} unterschiedliches Bindungsverhalten mit S100A11 aufweisen. Außerdem könnten die Unterschiede in den leicht veränderten Versuchsbedingungen liegen. Während Seemann et al.⁵⁹ eine Ca²⁺-Konzentration von 0,25 mM in den Vesikelkoppelungstests verwendeten, wurden die Experimente in dieser Arbeit bei einer Ca²⁺-Konzentration von 1 mM durchgeföhr. Da S100A11 eine Affinität für Ca²⁺-Ionen von $c_{1/2} = 0,52$ mM besitzt⁵⁴, ist die Ca²⁺-Besetzung, welche für die Aktivierung der Annexin A1-Bindungsstelle essentiell ist, in Gegenwart von 0,25 mM Ca²⁺-Ionen geringer als bei 1 mM. Außerdem ist es denkbar, dass die helikale Anordnung der N-terminalen Aminosäuren von Annexin A1 durch die höhere Ca²⁺-Konzentration stabilisiert wird.

Im Vergleich zur strukturell offenbar ähnlichen Wechselwirkung zwischen Annexin A2 und S100A10 wird die Rolle der N-terminalen Acetylierung kontrovers diskutiert. So fanden Kang et al., dass die N-terminale Acetylierung von Annexin A2 nicht essentiell für die Interaktion mit S100A10 ist.¹³¹ Sie zeigten, dass die rekombinante aus Bakterien isolierten Proteine S100A10 und Annexin A2, dessen N-Terminus nicht acetyliert war, einen aktiven Heterotetramerkomplex mit denselben Eigenschaften wie der native Komplex bilden, wogegen durch einige Studien von Jost et al.^{132,133} und Thiel et al.¹³⁴ der N-terminalen Acetylierung von Annexin A2 eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung mit S100A10 zugeschrieben wird. Daher ist anzunehmen, dass der Einfluss der N-terminalen Acetylierung auf die S100-Bindung sehr sensitiv von unterschiedlichen Messbedingungen und/oder Proteinchargen abhängt.

Um festzustellen, ob die S100A11-Bindung über den N-Terminus von Annexin A1 vermittelt wird, wurden Experimente mit N-terminal verkürztem Δ^{1-29} Annexin A1 durchgeföhr. Bei der Verwendung von Δ^{1-29} Annexin A1, welches durch limitierte Proteolyse von Annexin A1 durch Inkubation mit Trypsin erhalten wurde, konnte weder im Ligandenblot noch in den Vesikelkoppelungstests eine Assoziation von S100A11 beobachtet werden. Somit wurde bestätigt, dass der N-Terminus von Annexin

A1 für die beobachtete Interaktion verantwortlich ist. Dies stimmt mit den Studien von Seemann et al.⁵⁹ und Maillard et al.⁵⁴ überein. Darin wurde nachgewiesen, dass kein S100A11 mit den Proteinfragmenten Δ^{1-26} Annexin A1, Δ^{1-12} Annexin A1⁵⁴, sowie Δ^{1-29} Annexin A1⁵⁹ zusammen mit Vesikeln pelletiert wurde. Zusätzlich konnten sie feststellen, dass durch Zugabe eines Peptids, das den ersten 18 Aminosäuren von Annexin A1 entsprach, die Assoziation des S100A11 inhibiert wurde.

Um die Selektivität der S100A11-Interaktion mit Annexin A1 zu charakterisieren, wurden Vesikelkoppelungsassays mit Annexin A2m, das dem Annexin A1 sehr ähnlich ist, und S100A11 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass S100A11 nicht nur spezifisch mit Annexin A1 und Vesikeln koppelte, sondern auch in Gegenwart von Annexin A2m und Vesikeln, wenn auch – abgeschätzt aus dem SDS-Gel – in geringerer Menge als mit Annexin A1, im Pellet nachgewiesen werden konnte. Seemann et al. beschrieben die Selektivität von Annexin A1 für S100A11 dadurch, dass andere S100-Proteine (S100 α , S100L, S100P und S100A10) nicht zusammen mit Annexin A1 und Vesikeln koppelten wurden.⁵⁹ Auch konnten sie keine Wechselwirkung zwischen Annexin A2m und S100A11 nachweisen. Maillard et al. fanden, dass S100A11 weder an Annexin A5 noch an Annexin A12 bindet.⁵⁴

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der N-Termini von Annexin A1 und Annexin A2 ist es jedoch nicht abwegig, dass S100A11 eine gewisse Affinität zu Annexin A2 aufweist. Hinweise auf eine geringere Affinität von S100A11 zu Annexin A2 im Gegensatz zu Annexin A1 lieferten die Vesikelkoppelungsassays, in denen weniger S100A11 mit Annexin A2 pelletiert wurde als mit Annexin A1. Es ist denkbar, dass die Abweichung der Ergebnisse von Seemann et al.⁵⁹, die keine Annexin A2-S100A11-Wechselwirkung mittels Vesikelkoppelungsassays bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,25 mM beobachten konnten, möglicherweise durch die in dieser Arbeit verwendeten höheren Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM hervorgerufen wurde. Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in diesem Bereich führt zu einem Anstieg des Belegungsgrades der Ca^{2+} -Bindungsstellen von S100A11, für die eine Ca^{2+} -Affinität von $c_{1/2} = 0,52$ mM ermittelt wurde, und somit zu einer verstärkten Ausbildung der hydrophoben Annexin-Bindungsstelle im S100A11.

4.4.6.2 Modell zu den Wechselwirkungen zwischen Annexin A1, S100A11 und Membranen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen zwischen Annexin A1, S100A11 und Membranen zu quantifizieren, um daraus Informationen über die zelluläre Funktion

dieses Systems zu erhalten. In Abbildung 66 wird ein vereinfachtes Modell der einzelnen Interaktionen (1 bis 4) zwischen Annexin A1, S100A11 und Membranen in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen aufgestellt, anhand dessen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse diskutiert werden sollen.

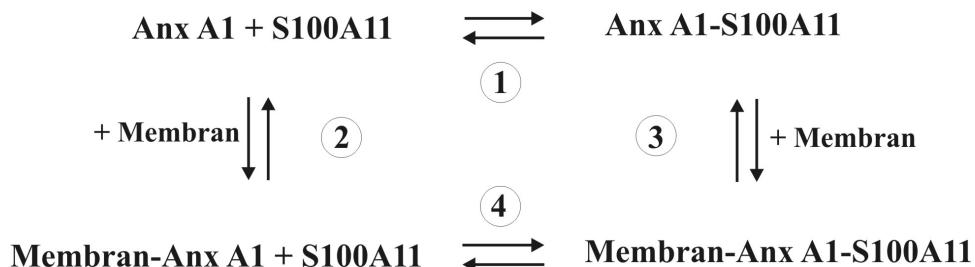


Abbildung 66: Mögliches Schema der Interaktionen zwischen Annexin A1, S100A11 und Membranen in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen.

Die einzelnen Wechselwirkungsschritte sind nach dem Modell in Abbildung 66 zu unterteilen in:

Interaktion 1: S100A11-Bindung an Annexin A1 in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen in Lösung; Ausbildung eines Heterotetramerkomplexes;

Interaktion 2: Ca^{2+} -abhängige Bindung von Annexin A1 an Membranen;

Interaktion 3: Wechselwirkung des Annexin A1-S100A11-Komplexes mit Membranen;

Interaktion 4: Assoziation von S100A11 mit membran-gebundenem Annexin A1;

Im Folgenden sollen die einzelnen Interaktionen nacheinander diskutiert werden:

Mittels Ligandenblots, die in Abwesenheit von Lipidmembranen durchgeführt wurden, konnte die Wechselwirkung von Annexin A1 mit S100A11 in Lösung (Interaktion 1) analysiert werden. S100A11 assoziierte nur in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen mit intaktem Annexin A1, wobei die N-terminale Acetylierung von Annexin A1 hierfür nicht essentiell ist. Die Stöchiometrie und die Struktur des Annexin A1-S100A11-Komplexes ist bislang ungeklärt, jedoch kann aufgrund der großen Ähnlichkeit beider Proteine mit Annexin A2 und S100A10 die Bildung eines, dem Annexin A2t strukturell analogen $(\text{Annexin A1})_2(\text{S100A11})_2$ -Heterotetramerkomplex angenommen werden, welcher jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnte. Über die Stabilität des Komplexes ist bislang nichts bekannt. Es kann jedoch nicht zwingend angenommen werden, dass es sich, aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Annexin A2t, um einen ähnlich stabilen Komplex handelt, sondern vielmehr, dass die freien Proteine und der Komplex nebeneinander im Gleichgewicht vorliegen. Es wird davon ausgegangen, dass die Tetramerkomplexbildung über zwei Stufen verläuft. Im ersten Schritt wechselwirkt ein

Annixin A1 mit einem S100A11-Dimer zu einem Heterotrimer, im zweiten Schritt bindet ein weiteres Annexin A1-Molekül an die zweite Bindungsstelle im S100-Dimer. Inwiefern eine Kooperativität zwischen den beiden Schritten besteht, ist bislang jedoch unklar. Möglich wäre, dass die Assoziation des zweiten Annexins erheblich begünstigt ist, und der Tetramerkomplex im Vergleich zum Trimerkomplex stabiler ist. Quantifiziert wurde diese Wechselwirkung bezüglich ihrer Affinitäten und Kinetik jedoch bislang nicht.

Die Ca^{2+} -abhängige Wechselwirkung von monomerem Annexin A1 mit Membranen (Interaktion 2) wurde bereits in den Kapiteln 4.1 und 4.3 ausführlich beschrieben. Es stellte sich heraus, dass Annexin A1 partiell reversibel an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen bindet und irreversibel gebundenes Protein an der Oberfläche laterale Aggregate ausbildet.

Die Wechselwirkung des Annexin A1-S100A11-Komplexes mit Membranen (Interaktion 3) zu analysieren, stellte sich als schwierig heraus, da unter Annahme eines Gleichgewichtszustandes zwischen monomerem Annexin A1 bzw. dem S100A11-Dimer und dem Komplex (Interaktion 1), neben einer Wechselwirkung des Komplexes mit den Membranen parallel dazu die Membranassoziation des monomeren Annexin A1 auftritt.

In den Vesikelkoppelungstests wurde Annexin A1 und S100A11 nicht im äquimolaren Verhältnis eingesetzt, sondern S100A11 im Überschuss zugegeben, um die Bildung des Komplexes zu begünstigen. Die ausschließliche Bindung eines Heterotetramerkomplexes an die Membranen würde nach Abschätzung aus den molaren Massen zu einem Intensitätsverhältnis der Banden bei 36 und 11 kDa auf dem SDS-Gel von etwa 3 zu 1 führen. Dieses Verhältnisses ist jedoch aus den SDS-Gelen nur ungenügend genau abzuschätzen (Abbildung 57).

Um die Membranbindung des Komplexes unter Ausschluss der, bei Vesikelkoppelungstests auftretenden, Membranaggregation zu untersuchen, sollte die Adsorption des Komplexes an festkörperunterstützte Membranen mittels der QCM-Technik quantifiziert werden.

Während die Adsorption von Annexin A2m an festkörperunterstützte Membranen eine maximale Frequenzänderung von etwa -20 Hz bewirkt (Grosser, M. und Menke, M., unveröffentlichte Ergebnisse), führt im Vergleich dazu die Adsorption von Annexin A2t zu einer etwa doppelt so großen Frequenzänderungen von maximal etwa -40 Hz.¹²⁴ Für die Adsorption eines Annexin A1-S100A11-Komplexes wurden deshalb ebenfalls Frequenzänderungen um etwa -40 Hz erwartet. Dagegen wurden nach Zugabe von äquimolaren Mengen an Annexin A1 und S100A11 in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer nur Frequenzänderungen von maximal etwa -20 Hz detektiert, die den Werten der

Adsorption von monomerem Annexin A1 entsprechen. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass nahezu kein Tetramerkomplex an die Oberfläche adsorbiert, sondern hauptsächlich das monomere Annexin A1, das sich in der Lösung befindet, die Oberfläche belegt, da möglicherweise die Kinetik der Adsorption von monomerem Annexin A1 im Vergleich zum Komplex schneller, oder die Affinität höher ist. Der Unterschied zwischen den Vesikelexperimenten, in denen die Membranassoziation von Annexin A1 mit S100A11 bestätigt werden konnte, zu den Messungen an festkörperunterstützten Membranen, an die vermutlich kein Komplex bindet, könnte daran liegen, dass bei den Vesikelexperimenten durch den S100A11-Überschuss ein größerer Anteil von Annexin A1 in der Komplexform vorlag als bei den QCM-Experimenten, in denen die Proteine im äquimolaren Verhältnis eingesetzt wurden. Ein weiterer Aspekt ist, dass bei den planaren Membranen nur eine begrenzte Membranoberfläche vorhanden ist, an die nur ein kleiner Teil des Proteins in Lösung adsorbieren kann. Im Gegensatz dazu wurden in den Vesikelkoppelungstests Membranen im Überschuss eingesetzt, sodass die Proteinassoziation nahezu quantitativ erfolgte. Außerdem könnte die unterschiedliche Krümmung der Membranen die Affinität des Annexin A1-S100A11-Komplexes beeinflussen.

Um schließlich die Affinität von S100A11 zu Annexin A1 zu quantifizieren und mögliche Unterschiede zwischen acetyliertem und nicht-acetyliertem Annexin A1 aufzudecken, sollte die Wechselwirkung von S100A11 mit Annexin A1, welches an festkörperunterstützten Membranen gebunden war, mittels der QCM-Technik quantifiziert werden (Interaktion 4). Da Annexin A1 über die Ca^{2+} -Bindungsstellen auf der konvexen Seite des Proteinkerns an die Membran binden, sollte nach der Adsorption der auf der konkaven Seite lokalisierte N-Terminus für die Bindung mit S100A11 zugänglich sein.¹⁷

Die QCM-Messungen zeigen jedoch, dass die Zugabe von S100A11 sowohl zu membran-gebundenem Annexin A1_{ac} als auch Annexin A1_{n-ac} nur eine geringe Frequenzerniedrigung oder einen linearen Abfall der Frequenz bewirkten. Die Messungen waren wenig reproduzierbar, und es konnte kein Einfluss der Proteinkonzentration auf den zeitlichen Verlauf der Frequenz beobachtet werden. Nimmt man an, dass ein S100A11-Dimer an ein membran-gebundenes Annexin A1 binden kann, so würde nach Abschätzung aus den molaren Massen der Proteine die Zugabe von S100A11 erwartungsgemäß zu einer maximalen Frequenzänderung von etwa -10 Hz führen, da die Bindung von Annexin A1 Frequenzänderungen im Bereich von -20 Hz bewirkt. Die in dieser Studie beobachteten Frequenzänderungen nach S100A11-Zugabe variierten stark und führten meist nur zu einem nahezu linearen Abfall der Frequenz ohne Erreichen eines konstanten Wertes, sodass diese

Frequenzänderungen auf keinen eindeutigen Bindungsprozess von S100A11 an membran-gebundenes Annexin A1 zurückgeführt werden können. Kontrollexperimente mit N-terminal verkürztem Δ^{1-29} Annexin A1 zeigen, dass die Zugabe von S100A11 ähnliche zeitliche Frequenzverläufe bewirkt wie bei membran-gebundenem, intaktem Annexin A1. Zudem führte die Zugabe von S100A11 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen zu ähnlichen Ergebnissen. Daraus kann geschlossen werden, dass die nach der Zugabe von S100A11 zu membran-gebundenem Annexin A1 erhaltenen Frequenzänderungen nicht zwingend auf die Bindung von S100A11 an den N-Terminus von Annexin A1 zurückgeführt werden muss. Vielmehr ist es denkbar, dass eine unspezifische Adsorption von S100A11 an die Oberfläche erfolgte, was sowohl durch die geringe Reproduzierbarkeit der Messdaten, als auch durch die nicht nachzuweisende Konzentrationsabhängigkeit des Adsorptionsprozesses bekräftigt werden kann. Außerdem zeigten rasterkraftmikroskopische Aufnahmen, dass die Zugabe von S100A11 zu membran-gebundenem Annexin A1 nicht zu einer, nach einer Adsorption erwarteten, Erhöhung der Proteinschicht führte, sondern sich keine Veränderungen auf der mit Annexin A1 belegten Membranoberfläche nachweisen ließen (Daten nicht gezeigt).

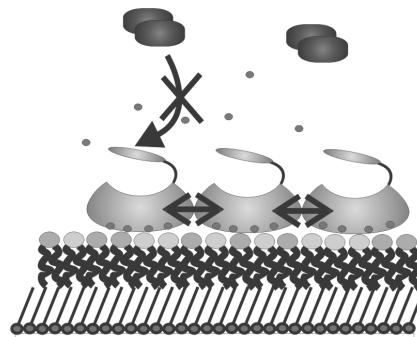


Abbildung 67: membran-gebundenes Annexin A1 kann keine Wechselwirkung mit S100A11 über den N-Terminus eingehen, da eventuell durch die laterale Aggregation von Annexin A1 die Bindung blockiert ist.

Da jedoch eine Assoziation von S100A11 mit Annexin A1 in Ligandenblot-Experimenten und Vesikelkoppelungssassays nachgewiesen wurde, ist die S100A11-Bindung an Annexin A1, das an festkörperunterstützten Membranen gebunden ist, möglicherweise gehemmt. So könnte die laterale Aggregation der Annexin A1-Moleküle, die bereits in Kapitel 4.3 beschrieben wurde, dazu führen, dass die Bindung von S100A11 aufgrund der dichten Packung der Annexin-Moleküle sterisch gehindert ist, oder die Bindungsstelle im N-Terminus in dieser membran-gebundenen Konformation des Annexins blockiert ist. Somit ist es denkbar, dass S100A11 nur mit in Lösung befindlichem Annexin A1 wechselwirkt oder mit membran-gebundenem

Annexin A1 interagiert, dessen Bindungsstelle eventuell durch fehlende laterale Aggregation nicht blockiert ist. Mittels der QCM-Technik war es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich, diese Wechselwirkung nachzuweisen, da die laterale Aggregation von Annexin A1 an der Oberfläche unter den möglichen Messbedingungen nicht verhindert werden konnte, um eine eventuelle Bindung von S100A11 zu untersuchen.

Um eine mögliche Assoziation von S100A11 an membran-gebundenem Annexin A1 nachzuweisen, wurden Vesikelkoppelungstests durchgeführt, in denen Annexin A1 und S100A11 nicht zusammen mit den Vesikeln, sondern S100A11 mit Vesikel-gebundenem Annexin A1 inkubiert wurde.* Auch in diesem Fall konnte keine eindeutige Assoziation von S100A11 mit membran-gebundenem Annexin A1 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), wodurch die Blockierung der S100A11-Bindungsstelle von membran-gebundenem Annexin A1 bekräftigt werden kann. Hier muss aber wiederum berücksichtigt werden, dass der N-Terminus auch durch die Annexin A1-vermittelte Membranaggregation blockiert sein kann (vergleiche 4.5).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Annexin A1 und S100A11 mit Annexin A2m und S100A10 wurde zum Vergleich die Wechselwirkung letzterer, die in Lösung einen stabilen heterotetrameren Komplex ausbilden, unter analogen Bedingungen untersucht. Die QCM-Messungen zeigen, dass S100A10 nicht an Annexin A2m, das an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen gebunden war, adsorbiert, sondern die S100A10-Zugabe nur zu sehr geringen Frequenzänderungen von -1 bis -4 Hz führt. Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von Menke et al. bestätigten, dass die Zugabe von S100A10 zu membran-gebundenem Annexin A2m zu keiner Veränderung der Oberfläche führte und somit keine Bindung von S100A10 an Annexin A2m nachgewiesen werden konnte. Jedoch konnte eine geringe Adsorption von S100A10 an POPC/POPS (4:1)-Membranen in Abwesenheit von Annexin A2m beobachtet werden (Menke, unveröffentlichte Ergebnisse). So ist vermutlich auch bei membran-gebundenem Annexin A2m, dass auf POPC/POPS (4:1)-Membranen - analog zu Annexin A1 - Protein-Cluster ausbildet (Menke, unveröffentlichte Ergebnisse), die Bindung seines Liganden S100A10 gehemmt. Denkbar ist wiederum, dass durch die laterale Aggregation eine sterische Hinderung der S100A10-Bindung besteht, oder dass die Bindungsstelle für S100A10 nicht in seiner aktiven Konformation vorliegt. So scheint die Wechselwirkung von S100A10 nur mit Annexin A2m, das sich in Lösung

* Annexin A1 und Vesikel wurden zusammen pelletiert. Das resuspendierte Pellet wurde mit S100A11 inkubiert und wieder zentrifugiert. Die koppelten Proteine wurden, wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben, analysiert.

befindet, abzulaufen. Die selektive Bindung von Annexin A2m und S100A10 quantifizierten Ayala-Sanmartin et al. mittels SPR-Messungen, in denen die Wechselwirkung von Annexin A2m an S100A10, das kovalent an eine carboxylierte Dextranmatrix auf einer Oberfläche gekoppelt war, verfolgt wurde. Sie ermittelten eine Dissoziationskonstante für die Bindung von 175 nM.¹¹⁰

Die Ergebnisse sind mit den bislang bekannten Eigenschaften von Annexin A2 in Einklang zu bringen, denn während Annexin A2m hauptsächlich im Cytosol vorliegt, befindet sich der Heterotetramerkomplex Annexin A2t vor allem an der Plasmamembran, sodass S100A10 möglicherweise dazu nötig ist, um Annexin A2 an die Membran zu rekrutieren. Des weiteren wird dem S100A10 eine wichtige Rolle bei der Membranaggregation zugesprochen. Während Annexin A2t Membranen bereits bei submikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen aggregieren kann, fehlt dem Annexin A2m diese Fähigkeit.^{22,135}

So wird auch vermutet, dass S100A11 eine regulative Rolle bei der Annexin A1-vermittelten Membranaggregation spielt und Annexin A1 zusammen mit S100A11 in der Regulation von Prozessen im endozytotischen Weg involviert ist.^{2,72} Es wäre denkbar, dass S100A11 die Lokalisation von Annexin A1 durch Veränderung der Kinetik und Affinität der Membranassoziation an bestimmte Membranmotive beeinflusst. Annexin A1 liegt an frühen Endosomen kolokalisiert mit S100A11 vor, was Fluoreszenzmikroskopie-Studien von Seemann et al. zeigen.⁷² Dort soll es Membran-Wechselwirkungen stabilisieren, die für das Einstülpen von Vesikeln nötig sind. Es wird außerdem vermutet, dass S100A11 bei der Regulation des Transports von Annexin A1 im endozytotischen Weg beteiligt ist. Futter et al. zeigten, dass Annexin A1 an multivesikulären Körpern (*multivesicular bodies*, MVBs) durch die EGF-Rezeptor/Kinase an Tyr21 phosphoryliert wird.⁹ Aus Studien von Ando et al. ist bekannt, dass die Phosphorylierung die Proteolysesensitivität von Annexin A1 um etwa einen Faktor 20 erhöht.⁸ Die Proteolyse des N-Terminus spielt anscheinend an dieser Stelle eine entscheidende Rolle, da an den späten Endosomen hauptsächlich N-terminal verkürztes Δ^{1-26} Annexin A1 nachgewiesen wurde. So wird vermutet, dass durch die Proteolyse des N-Terminus die Annexin A1-vermittelte Membranaggregation wieder aufgelöst wird und dadurch nur die Kerndomäne über die späten Endosomen zu den Lysosomen transportiert wird.^{71,72}

4.4.6.3 Einfluss von S100A11 auf die Proteolysesensitivität von Annexin A1

Um den N-terminalen Verdau von Annexin A1, gebunden an Membranen zu untersuchen, sowie herauszufinden, ob S100A11 bei diesem Schritt eine Rolle spielt, wurden Annexin A1, Vesikel und S100A11 in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen pelletiert, wieder resuspendiert und anschließend mit Trypsin inkubiert. Aus den SDS-Gelen ist erkennbar, dass die Abspaltung der N-terminalen Domäne von Annexin A1 über zwei Stufen verläuft. Für die Zuordnung des 35 kDa-Proteinfragments kommt nur das nach Lys-9 gespaltene Δ^{1-9} Annexin A1 in Frage, das 33 kDa-Fragment entspricht dem Δ^{1-29} Annexin A1.^{23,71}

Es zeigte sich, dass die tryptische Abspaltung des N-Terminus von membran-gebundenem Annexin A1 in Gegenwart von S100A11 tendenziell etwas langsamer verläuft als in Abwesenheit von S100A11. Nach Inkubation von S100A11 mit Trypsin unter denselben Bedingungen in Abwesenheit von Annexin A1 und Vesikeln konnte mittels SDS-PAGE Analyse keine Veränderung der Konzentration von S100A11 und außerdem keine kleineren Proteinfragmente nachgewiesen werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Trypsin unter diesen Bedingungen S100A11 nicht spaltet und somit die Verlangsamung der Annexin A1-Proteolyse nicht durch eine Konkurrenzreaktion des Trypsins mit S100A11 hervorgerufen wird. In vergleichenden Experimenten mit varierenden Lipidmengen, sowie mit einem um den Faktor 5 erhöhten Enzym/Substrat-Verhältnis wurde die tendenziell langsamere Proteolyse von Annexin A1 in Gegenwart von S100A11 bestätigt. Es wird vermutet, dass S100A11 inhibierend auf die Proteolyse des N-Terminus von Annexin A1 mit Trypsin wirkt. Da die Bindungsstelle für S100A11 in den ersten 13 Aminosäuren des N-Terminus von Annexin A1 liegt und somit sich in der Nähe der Spaltungsstelle für Trypsin befindet, könnte es zu einer sterischen Hinderung des Angriffs von Trypsin kommen. Außerdem wäre es möglich, dass die Assoziation von S100A11 an Annexin A1 eine Konformationsänderung bewirkt, und dadurch die Proteolyseempfindlichkeit des Annexin A1 erniedrigt wird. So ist denkbar, dass die Phosphorylierung von Tyr-21 zwar nötig ist, um die Proteolyse des N-Terminus von Annexin A1 an den MVBs zu ermöglichen, jedoch durch S100A11 eine zusätzliche Regulation der Abspaltung gewährleistet ist.

4.5 Membranaggregationseigenschaften von Annexin A1 – Charakterisierung der sekundären Membranbindung

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Annexin A1 in der Lage ist, nicht nur an Membranen zu binden, sondern auch Membranen zu aggregieren oder sie sogar zu fusionieren.^{25,29,31-33,42} Die Membranaggregation soll über zwei unterschiedliche Membranbindungsstellen im Annexin A1 vermittelt werden. Während Annexin A1 an die erste Membran über die Ca^{2+} -Bindungsstellen auf der konvexen Seite des Proteinkerns bindet, wechselwirkt wahrscheinlich die N-terminale Domäne mit einer zweiten Membran und verbindet somit die beiden.^{16,23,136} In Vesikelbindungstests ist es jedoch schwierig, die primäre Membranbindung und die sekundäre Bindung, welche die Membranen verbindet, zu separieren. Die beiden Membranbindungsereignisse können jedoch mittels festkörperunterstützter Membranen getrennt voneinander untersucht werden.^{30,33}

4.5.1 Untersuchung der sekundären Membran-Wechselwirkung

Die Annexin A1-vermittelte Membranaggregation wurde mittels der dissipativen Quarzmikrowaage-Technik untersucht. Zuerst wurde Annexin A1_{n-ac} an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen, wie in Kapitel 4.3.2, adsorbiert, nicht gebundenes Protein durch Spülen mit Puffer aus der Lösung entfernt und anschließend Vesikel zugegeben.

Nach Zugabe von Annexin A1 mit einer Konzentration von 0,3 μM (Abbildung 68, anx) zu POPC/POPS (4:1)-Membranen in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer (Ca_1) nahm die Resonanzfrequenz um $-(21 \pm 2)$ Hz ab (Abbildung 68). Durch Spülen mit Puffer Ca_1 nach einer Proteininkubationszeit von 10 Minuten erhöhte sich die Resonanzfrequenz um (2 ± 1) Hz. Das bedeutet, dass wie bereits in Kapitel 4.3.2 genauer beschrieben wurde, Annexin A1 in Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 zum größten Teil irreversibel an die Membran bindet. Während der Proteinadsorption und dem Waschschritt blieb die Dissipation konstant, was darauf schließen lässt, dass sich das gebundene Protein wie eine dünne, starre Masse verhält.

Zu membran-gebundenem Annexin A1 wurden POPC/POPS (4:1)-Vesikel (LUVs) mit einem mittleren Durchmesser von (120 ± 40) nm gegeben (ves). Die Lipidkonzentration im System betrug 0,1 mg/ml. Nach der Zugabe von Vesikeln wurde parallel zu einem starken Abfall der Resonanzfrequenz ein Anstieg der Dissipation beobachtet. Nach 45

Minuten wurde eine maximale Frequenzänderung von $\Delta f = -(270 \pm 10)$ Hz und eine Änderung der Dissipation von $\Delta D = (21 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ beobachtet. Die Abnahme der Resonanzfrequenz und die gleichzeitige Zunahme der Dissipation deuten darauf hin, dass intakte Vesikel mit dem membran-gebundenen Annexin A1 wechselwirken und die Vesikel nicht auf der Oberfläche fusionieren.¹³⁷

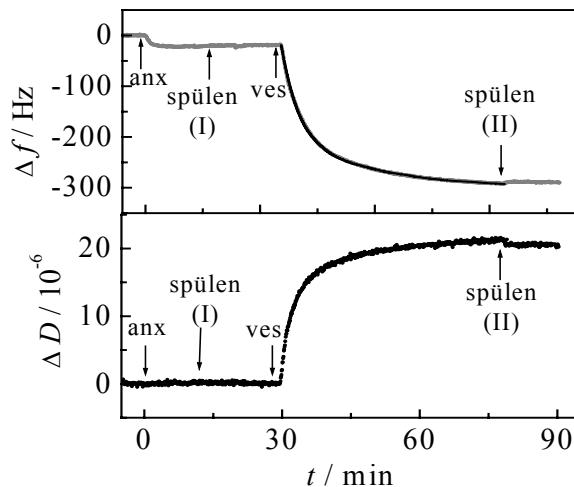


Abbildung 68: Verlauf der Resonanzfrequenz und der Dissipation nach Zugabe von Vesikeln zu membran-gebundenem Annexin A1 in Puffer Ca₁. Nach Zugabe von 0,3 µM Annexin A1 (anx) zu POPC/POPS (4:1)-Membranen wurde nicht-gebundenes Protein durch Spülen (spülen (I)) entfernt. Anschließend wurden POPC/POPS (4:1)-Vesikel mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml und einem Durchmesser von (120 ± 40) nm zugegeben (ves). Nach Erreichen der Endwerte von Δf und ΔD wurde erneut mit Puffer gespült (spülen (II)). Die durchgezogene, schwarze Linie ist das Ergebnis von RSA-Simulationen mit einem k_{on}^{irr} -Wert von (25 ± 2) M⁻¹s⁻¹.

Die Reversibilität der Vesikeladsorption wurde durch Spülen des Systems mit Puffer Ca₁ untersucht (Abbildung 68, spülen (II)). Weder die Resonanzfrequenz noch die Dissipation änderten sich signifikant, woraus man schließen kann, dass die Vesikel irreversibel an die Oberfläche gebunden haben. Die Geschwindigkeitskonstante der Adsorption $k_{on}^{irr} = (25 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ wurde für die irreversible Vesikeladsorption durch Monte-Carlo-Simulation nach dem RSA (Random Sequential Adsorption)-Modell, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, bestimmt.* Das Ergebnis der RSA-Simulation ist in Abbildung 68 als schwarze Linie dargestellt und zeigt, dass die Simulationen sehr gut mit den Messdaten übereinstimmen.

* Die Computersimulationen wurden von E. Lüthgens und A. Janshoff, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt.

4.5.2 Einfluss der Annexin A1-Belegung auf die Membranaggregation

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Verbindung zwischen der festkörperunterstützten Membran und den Vesikeln durch Annexin A1 vermittelt wird. Um den Einfluss der Oberflächenbelegung von Annexin A1 auf die Adsorption der Vesikel zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen an Annexin A1 auf festkörperunterstützten Membranen immobilisiert, die durch die resultierenden Frequenzänderungen bestimmt werden konnten. Anschließend wurde die Vesikeladsorption mittels der QCM-D-Technik verfolgt. Zu POPC/POPS (4:1)-Membranen wurden entweder a) 0, b) 0,045 μ M oder c) 0,3 μ M Annexin A1 in Puffer Ca₁ zugegeben (anx) und nach vollständiger Adsorption nicht-gebundenes Protein durch Spülen des Systems entfernt (Abbildung 69, A).

Die Zugabe von 0,1 mg/ml POPC/POPS (4:1)-Vesikel (ves) zu reinen POPC/POPS (4:1)-Membranen ohne gebundenem Protein ($\Delta f = 0$ Hz) (Abbildung 69, Kurve a) führte zu keiner messbaren Änderung der Resonanzfrequenz und der Dissipation. Dies bestätigte, dass membran-gebundenes Annexin A1 die Voraussetzung für die Adsorption der Vesikel ist. Bei maximaler Proteinbelegung, die einer Resonanzfrequenzänderung von $-(21 \pm 2)$ Hz entspricht (Abbildung 69, Kurve c), führte die Zugabe von Vesikeln zu einer Resonanzfrequenzänderung von $\Delta f = -(270 \pm 10)$ Hz und einer Dissipationsänderung von $\Delta D = (21 \pm 2) \cdot 10^{-6}$. Bei einer um den Faktor drei verringerten Proteinbelegung ($\Delta f = -(6 \pm 2)$ Hz) (Abbildung 69, Kurve b) wurde nach Vesikelzugabe eine Resonanzfrequenzänderung von $\Delta f = -(230 \pm 5)$ Hz und eine Dissipationsänderung von $\Delta D = (21 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ beobachtet, die somit nur wenig geringer war als die bei maximaler Proteinbelegung erreichten Werte. Eine signifikante Verringerung der Resonanzfrequenzänderung von $\Delta f = -(105 \pm 5)$ Hz und eine Dissipationserhöhung von $\Delta D = (14 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ wurde bei einer Proteinbelegung beobachtet, die etwa 3 Hz entsprach und fast im Fehlerbereich der QCM-D-Messung liegt (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigen, dass Annexin A1 die Bindung von Vesikeln an die Oberfläche vermittelt und dass eine bestimmte Anzahl an Proteinmolekülen an der Oberfläche nötig ist, um eine maximale Belegung mit Vesikeln zu erreichen.

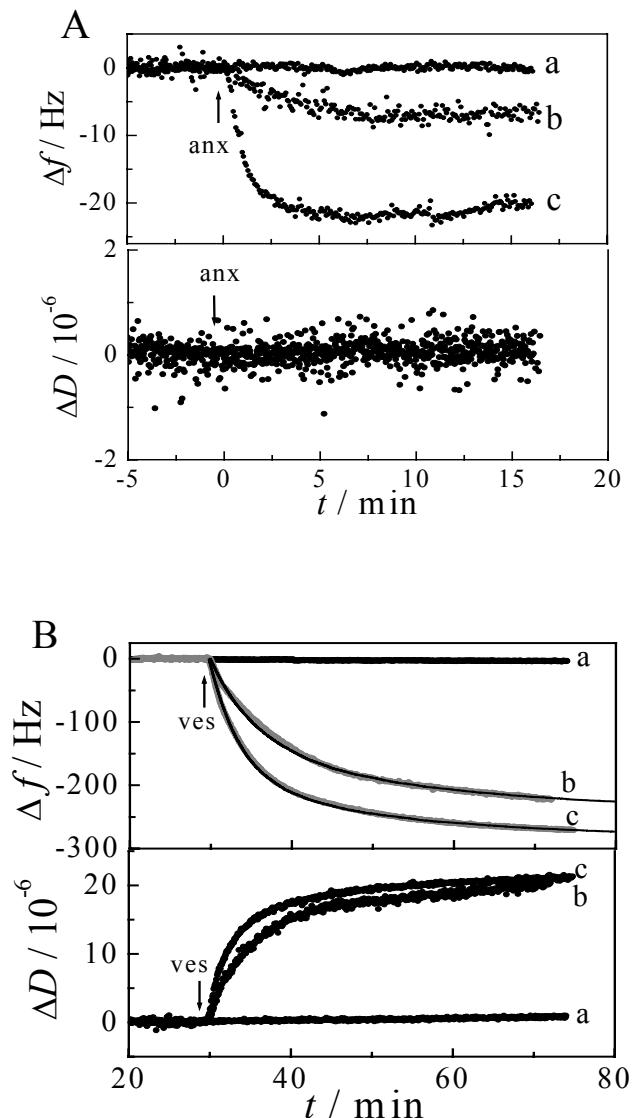


Abbildung 69: Verlauf der Resonanzfrequenz und der Dissipation nach Zugabe von Vesikeln zu festkörperunterstützten Membranen mit unterschiedlicher Annexin A1-Belegung. **A** Zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen wurden entweder a) 0, b) 0,045 μM oder c) 0,3 μM Annexin A1 in Puffer Ca_1 zugegeben (anx). Nach Entfernen von nicht-gebundenem Annexin A1 durch Spülen wurden unterschiedliche Proteinbelegungen erhalten, die aus den jeweiligen Frequenzänderungen bestimmt werden konnten. **B** Es wurden POPC/POPS (4:1)-Vesikel mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml zugegeben (ves). Die durchgezogenen, schwarzen Linien sind die Ergebnisse der RSA-Simulationen mit b) $k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (10 \pm 1) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und c) $k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (24 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Für die Messkurven b und c aus Abbildung 69 wurden RSA-Simulationen durchgeführt und daraus die Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (10 \pm 1) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Kurve b) und $k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (25 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Kurve c) ermittelt. Hierbei wurde die Änderung der maximalen Belegung der Vesikel aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der Bindungsstellen, die durch gebundenes Annexin A1 gebildet wurden, in den Simulationen berücksichtigt.

4.5.3 Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Membranaggregation

Einigen Studien zufolge soll die zweite Membranbindungsstelle im N-terminalen Bereich von Annexin A1 lokalisiert sein.^{30,33,42} Um dies zu bestätigen, wurde Annexin A1 zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Trypsin in einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:140 in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ in Puffer Ca₁ inkubiert. Die Vollständigkeit der Proteolyse wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Nach tryptischen Verdau wurde nur ein 33 kDa-Proteinfragment, das als Δ^{1-29} Annexin A1 identifiziert werden konnte,⁵⁹ und kein vollständiges 38 kDa-Annexin A1 im SDS-Gel beobachtet. (vergleiche 4.4.1: Coomassiefärbung Abbildung 56) Ohne weitere Aufreinigung wurde die Δ^{1-29} Annexin A1-Lösung zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen in 1 mM Ca²⁺-haltigen Puffer Ca₁ gegeben (Abbildung 70 A, anx). Abbildung 70 A zeigt, dass Δ^{1-29} Annexin A1 (●) ($\Delta f = -(19 \pm 2)$ Hz) und Annexin A1 (□) ($\Delta f = -(21 \pm 2)$ Hz) mit jeweils einer Konzentration von 0,3 μ M in ähnlicher Weise an Membranen adsorbieren. Die Entfernung von nicht-gebundenem Protein durch Spülen mit Puffer Ca₁ führte in beiden Fällen nur zu einem geringen Anstieg der Resonanzfrequenz um $\Delta f = (3 \pm 2)$ Hz. Somit konnte die Erhaltung der Membranbindungsaktivität von Annexin A1 nach proteolytischer Abspaltung des N-Terminus bewiesen werden.

Um den Einfluss des N-Terminus auf die Membranaggregationsfähigkeit von Annexin A1 zu charakterisieren, wurden 0,1 mg/ml POPC/POPS (4:1)-Vesikel zu membran-gebundenem Annexin A1 (■) und Δ^{1-29} Annexin A1 (●) gegeben (Abbildung 70 B, ves) und die Adsorption mit Hilfe der QCM-D-Technik verfolgt. Für Annexin A1 wurde eine Frequenzänderung von $\Delta f = -(270 \pm 20)$ Hz und eine Dissipationsänderung von $\Delta D = (21 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ beobachtet (Abbildung 70 B, Kurve d), während für die Bindung von Vesikeln an Δ^{1-29} Annexin A1 auf etwa die Hälfte verringerte Werte der Frequenzänderung $\Delta f = -(100 \pm 20)$ Hz und der Dissipation $\Delta D = (13 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ erhalten wurden (Abbildung 70 B, Kurve b).

Um die Spezifität der Vesikeladsorption bezüglich der Phospholipide zu untersuchen, wurde das negativ geladene Phospholipid POPS in den Vesikeln durch das negativ geladene POPG ersetzt. Für POPC/POPG (4:1)-Vesikel wurden die gleichen Ergebnisse wie für POPC/POPS (4:1)-Vesikel erhalten (Abbildung 70 B). So wurde nach der Zugabe von 0,1 mg/ml POPC/POPG (4:1)-Vesikel für Annexin A1 (□) eine Frequenzänderung von $\Delta f = -(250 \pm 20)$ Hz und eine Dissipationsänderung von $\Delta D = (19 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ erhalten (Abbildung 70 B, Kurve c), während bei N-terminal verkürztem Δ^{1-29} Annexin A1 (○) eine deutlich reduzierte Frequenzänderung von $\Delta f = -(90 \pm 20)$ Hz und eine Dissipationsänderung von $\Delta D = (13 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ beobachtet wurde (Abbildung 70 B, Kurve a).

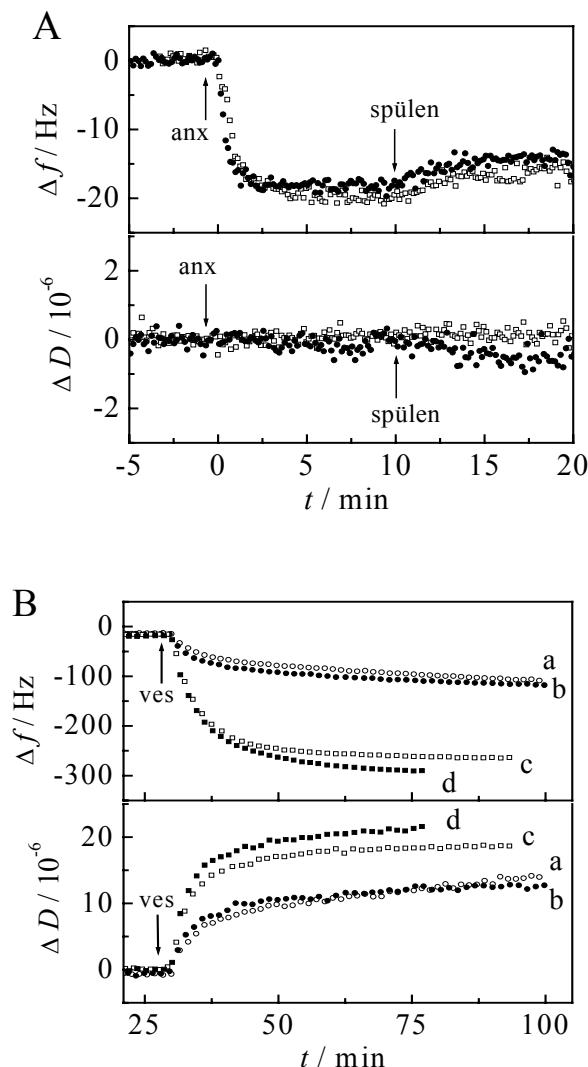


Abbildung 70: A QCM-D-Messung nach Zugabe von 0,3 µM Annexin A1 (□) und Δ¹⁻²⁹Annexin A1 (●) an festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membranen in Puffer Ca₁ (anx). Nicht-gebundenes Annexin wurde nach vollständiger Adsorption durch Spülen entfernt. B Resonanzfrequenz- und Dissipationsverlauf nach Zugabe von 0,1 mg/ml POPC/POPS (4:1)- (●, ■) und POPC/POPG (4:1) (○, □) -Vesikel (ves) zu membran-gebundenem Δ¹⁻²⁹Annexin A1 (●, ○) und Annexin A1 (■, □).

4.5.4 Einfluss der Ladung auf die Vesikeladsorption

Da die Phospholipidkopfgruppe selbst keine große Rolle bei der sekundären Membran-Wechselwirkung von Annexin A1 zu spielen scheint, stellte sich die Frage, inwieweit elektrostatische Wechselwirkungen zur Spezifität der Membranbindung beitragen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Bindung von Vesikeln mit unterschiedlichen POPS-Gehalten an membran-gebundenes Annexin A1 mittels der QCM-D-Technik untersucht (Abbildung 71). Wie in den vorherigen Experimenten wurde 0,3 µM Annexin A1 in 1 mM Ca²⁺-haltigen Puffer (Ca₁) zu

festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen gegeben (Abbildung 71, anx) ($\Delta f = -(21 \pm 2)$ Hz) und anschließend nicht-gebundenes Protein aus dem Pumpkreislauf durch Spülen entfernt (Abbildung 71, spülen) ($\Delta f = (3 \pm 2)$ Hz).

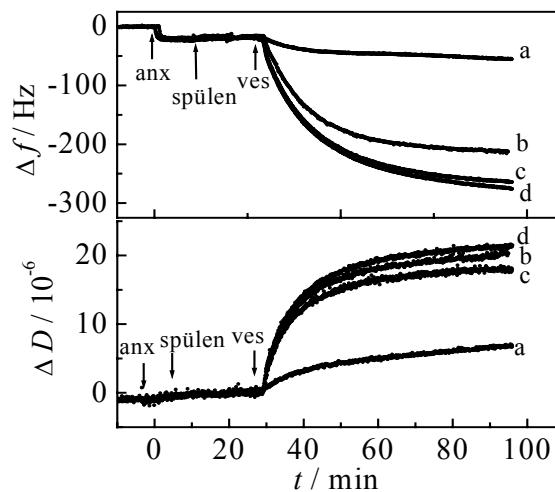


Abbildung 71: QCM-D-Messung der Adsorption von Vesikeln mit unterschiedlichen PS-Gehalten an membran-gebundenes Annexin A1. Nach Zugabe von $0,3 \mu\text{M}$ Annexin A1 (anx) wurde nicht-gebundenes Protein durch Spülen entfernt (spülen). Anschließend wurden $0,04 \text{ mg/ml}$ a) POPC-, b) POPC/POPS (9:1)-, c) POPC/POPS (4:1)- und d) POPC/POPS (2,33:1)-Vesikel zugegeben (ves).

Zu membran-gebundenem Annexin A1 wurden Vesikel mit unterschiedlichen POPS-Gehalten mit jeweils einer Konzentration von $0,04 \text{ mg/ml}$ gegeben. POPC/POPS-Vesikel, die 20 (Abbildung 71, Kurve c) bzw. 30 mol% POPS (Abbildung 71, Kurve d) enthielten, adsorbierten an die mit Protein belegte Oberfläche mit Resonanzfrequenzänderungen nach 90 Minuten von $\Delta f = -(260 \pm 10)$ Hz. Eine etwas geringere Resonanzfrequenzänderung von $\Delta f = -(210 \pm 10)$ Hz wurde für POPC/POPS-Vesikel mit 10 mol% POPS (Abbildung 71, Kurve b) erhalten. Für alle drei Lipidmischungen wurde eine ähnliche Dissipationsänderung von $\Delta D = (20 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ beobachtet. Die Zugabe von reinen POPC-Vesikeln (Kurve a) führte ebenfalls zu einer Resonanzfrequenzniedrigung und einem Anstieg der Dissipation, jedoch war die Adsorptionskinetik bedeutend langsamer. In einem Zeitraum von sechs Stunden fiel die Frequenz um etwa -85 Hz und die Dissipation stieg um etwa $11 \cdot 10^{-6}$, ohne dass ein konstanter Wert erreicht wurde (Daten nicht komplett gezeigt). Im Fall reiner POPC-Vesikel war die Reproduzierbarkeit der Messdaten zudem gering. So wurde beispielsweise in manchen Fällen fast keine Bindung oder nur ein fast linearer Abfall der Frequenz beobachtet. Die Computersimulationen zeigten, dass der PS-Gehalt der

Vesikel, mit Ausnahme von reinen POPC-Vesikeln, keinen Einfluss auf die Adsorptionskinetiken hat (Daten nicht gezeigt).

Kontrollexperimente, in denen reine POPC-Vesikel in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} -Ionen (Puffer Ca_1) zu festkörperunterstützten POPC/POPS (4:1)-Membranen gegeben wurden, zeigten, dass POPC-Vesikel auch ohne Annexin A1 an festkörperunterstützte Membranen binden. So führte die Zugabe von 0,1 mg/ml POPC-Vesikel in Puffer Ca_1 zu POPC/POPC (4:1)-Membranen zu einer Resonanzfrequenzänderung von $\Delta f = -(120 \pm 10)$ Hz und einer Dissipationsänderung von $\Delta D = (13 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ (Daten nicht gezeigt). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Adsorption von POPC-Vesikeln an mit Annexin A1 belegten POPC/POPS (4:1)-Membranen unabhängig von Annexin A1 abläuft. Im Gegensatz dazu binden POPC/POPS (4:1)-Vesikel in Abwesenheit von Annexin A1 nicht an die Membranen (Abbildung 69, Kurve a).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Bindungsstelle für die sekundäre Membran-Wechselwirkung des Annexin A1 durch die Ladungsdichte der Vesikel beeinflusst wird, jedoch dies nicht notwendigerweise die einzige treibende Kraft für die Membranaggregation ist. Um abzuschätzen, wie stark die Bindung durch die Ionenstärke beeinflusst wird, wurden Experimente in Puffersystemen mit verschiedenen Salzkonzentrationen durchgeführt. Annexin A1 wurde mit einer Konzentration von 0,3 μM in 1 mM Ca^{2+} -haltigem Puffer mit den Salzkonzentrationen 0 (Puffer Ca_1^0 , ●), 10 (Puffer Ca_1^{10} , □), 100 (Puffer Ca_1 , ■) oder 500 mM NaCl (Puffer Ca_1^{500} , ○) zu POPC/POPS (4:1)-Membranen gegeben, nicht-gebundenes Annexin A1 durch Spülen mit dem entsprechenden Puffer entfernt und anschließend 0,04 mg/ml POPC/POPS (4:1)-Vesikel zugegeben (Abbildung 72, ves).

Unabhängig von der Salzkonzentration (außer für 500 mM NaCl) lagen die Resonanzfrequenzänderungen, die der Menge an adsorbiertem Annexin A1 entsprechen, im Bereich von -16 bis -19 Hz. Bei 500 mM NaCl wurde eine geringere Frequenzänderung mit nur $\Delta f = -(4 \pm 1)$ Hz beobachtet, was auf die elektrostatische Wechselwirkung von Annexin A1 mit der Membran über die Ca^{2+} -Brücken hinweist. Die Zugabe von Vesikeln führte zu ähnlichen Frequenzabnahmen im Bereich von -240 bis -275 Hz und Dissipationsänderungen von $(18-25) \cdot 10^{-6}$ für alle Salzkonzentrationen außer 500 mM NaCl. In Gegenwart von 500 mM NaCl wurde nach Zugabe der Vesikel eine Resonanzfrequenzänderung von $\Delta f = -(190 \pm 20)$ Hz und eine Dissipationsänderung von $\Delta D = (16 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ erhalten. Die verringerten Werte bei hoher Salzkonzentration wurden wahrscheinlich durch die niedrigere Proteinbelegung hervorgerufen.

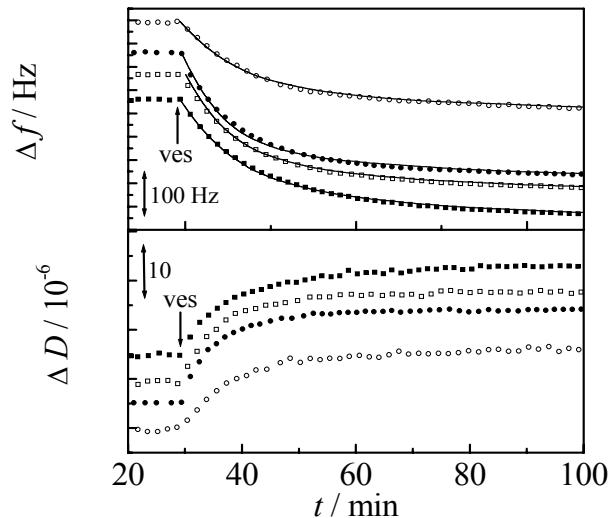


Abbildung 72: Änderung der Resonanzfrequenz und der Dissipation nach Zugabe von 0,04 mg/ml POPC/POPS (4:1)-Vesikel (ves) zu membran-gebundenem Annexin A1 in Gegenwart von Puffern unterschiedlicher Ionenstärken mit 0 (Puffer Ca_1^0 , ●), 10 (Puffer Ca_1^{10} , □), 100 (Puffer Ca_1 , ■) oder 500 mM NaCl (Puffer Ca_1^{500} , ○).* Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse der RSA-Simulationen mit $k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (40 \pm 3) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (0 mM NaCl), $k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (31 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (10 mM NaCl), $k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (24 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (100 mM NaCl) und $k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (26 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (500 mM NaCl).

Durch Computersimulationen nach dem RSA-Modell wurden die Werte für die Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption ($k_{\text{on}}^{\text{irr}} = (40 \pm 3) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für 0 mM NaCl, $(31 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für 10 mM NaCl, $(24 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für 100 mM NaCl und $(26 \pm 2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für 500 mM NaCl) ermittelt. Es zeigt sich, dass die Ionenstärke die $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ -Werte nur geringfügig beeinflusst, aber eine grundsätzliche Tendenz zu höheren $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ -Werte für niedrigere Ionenstärken erkennbar ist. Diese kann durch eine stärkere Anziehung zwischen den Vesikeln und der Annexin A1-Moleküle durch geringere Abschirmung der Ladung durch die Elektrolyten erklärt werden.

4.5.5 Diskussion

4.5.5.1 Untersuchung der sekundären Membranbindung von Annexin A1

Da Annexin A1 zum größten Teil irreversibel an POPC/POPS (4:1)-Membranen in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 bindet, konnte nicht-gebundenes Protein aus der Lösung entfernt werden, sodass die Untersuchungen der Membranaggregation an der Oberfläche nicht durch Vesikelaggregation in der Lösung gestört wurden. Die Bindung von Vesikeln an membran-gebundenes Annexin A1 wurde mit Hilfe der dissipativen

* Zur besseren Übersicht sind nicht alle aufgenommenen Datenpunkte dargestellt.

Quarzmikrowaage (QCM-D)-Technik untersucht. Diese Methode ermöglicht es nicht nur den zeitlichen Verlauf der Resonanzfrequenzänderungen, sondern auch gleichzeitig die Dämpfung der freien Quarzschwingung zu verfolgen. Aus dem zeitlichen Verlauf der Resonanzfrequenz und der Dissipation, sowie deren Gesamtänderungen kann der Deformationsgrad der adsorbierten Vesikel abgeschätzt werden. Außerdem ist es möglich zu bestimmen, ob die Vesikel an der Oberfläche aufplatzen und planare Doppelschichten ausbilden. Die große Abnahme der Resonanzfrequenz und die gleichzeitige Zunahme der Dissipation nach Vesikelzugabe sind charakteristisch für die Adsorption intakter Vesikel an die Oberfläche, wie dies schon in früheren Studien von Keller et al.¹³⁷ und Reimhult et al.^{138,139} beobachtet wurde. Diese untersuchten die Adsorption intakter Vesikel auf verschiedenen Oberflächen wie TiO_2 , oxidiertem Platin oder oxidiertem Gold (Vergleiche Abbildung 73 A). So detektierten sie für die Adsorption intakter Ei-PC-Vesikel mit einem Durchmesser von 30 nm eine Abnahme der Frequenz um etwa 120 Hz und eine Dissipationserhöhung von etwa $7 \cdot 10^{-6}$. Im Gegensatz zu Vesikeladsorptionsprozessen, die mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) und Ellipsometrie verfolgt werden, können mit der QCM-D-Technik Veränderungen in der Form der adsorbierten Vesikel detektiert werden. Keller et al. zeigten, dass die Adsorption, das Aufplatzen und die Fusion von Vesikeln zu planaren Doppelschichten mit charakteristischen zeitlichen Resonanzfrequenz- und Dissipationsänderungen einhergehen.¹³⁷

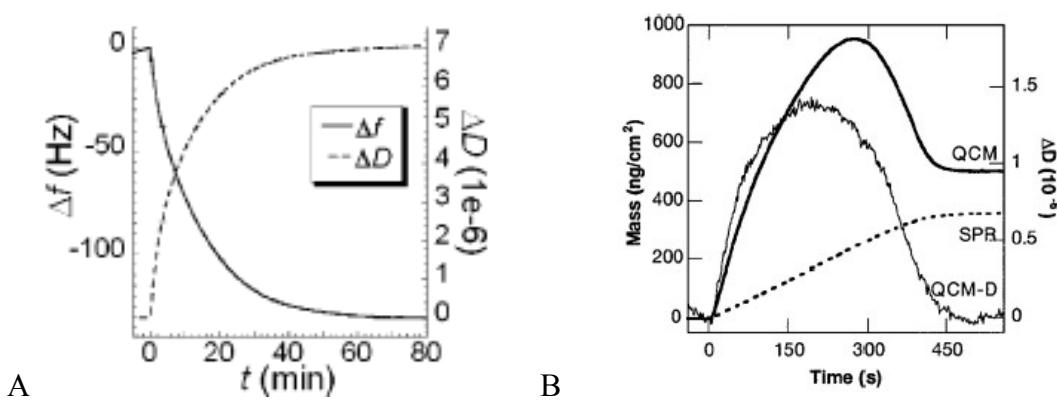


Abbildung 73: A QCM-D-Messung der Adsorption von intakten Ei-PC-Vesikeln mit einem Durchmesser von 30 nm an eine oxidierte Platinoberfläche. (Die Graphik wurde von Reimhult et al.¹³⁹ übernommen.) B QCM-D- (QCM: Frequenz, QCM-D: Dissipation) und SPR-Messung der Fusion von Ei-PC-Vesikeln mit einem Durchmesser von 25 nm an einer SiO_2 -Oberfläche zu einer Lipiddoppelschicht. Die Frequenzänderungen und die SPR-Signaländerungen wurden in Massenbeladung pro Fläche (Mass) umgerechnet. (Die Graphik wurde von Keller et al.¹³⁷ übernommen.)

Abbildung 73 B zeigt die QCM-D-Messung der Fusion von Ei-PC-Vesikeln auf einer SiO_2 -Oberfläche und der Ausbildung einer Lipiddoppelschicht. Dieser Prozess zeichnet

sich anfangs durch einen Abfall der Frequenz (Anstieg der Dissipation) aufgrund der Adsorption der Vesikel, und einem anschließenden Anstieg der Frequenz bis zu einem bestimmten Wert (Abnahme der Dissipation auf Ausgangswert) aufgrund des Aufplatzens und der Fusion der Vesikel zu Doppelschichten, aus. Wird dieser Prozess mittels der SPR-Technik verfolgt (Abbildung 73 B, SPR), so wird ein monotoner Anstieg des Signals bis zu einem bestimmten Wert beobachtet. Somit kann mittels SPR nicht zwischen den einzelnen Prozessen der Adsorption, dem Aufplatzen und der Fusion unterschieden werden.¹³⁷

Den Übergang zwischen der Adsorption von intakten Vesikeln und aufgeplatzten Vesikeln konnte Reiss et al. an Vesikeln mit unterschiedlichem Gehalt an Biotinresten zeigen.⁸⁷ Faiss et al.¹⁴⁰ wiesen mittels QCM-Messungen nach, dass POPC/POPG-Vesikel an 11-Aminoundekanthiol-Oberflächen adsorbieren und mit zunehmenden PG-Anteil immer stärker an der Oberfläche deformieren und beginnen zu fusionieren. Die zunehmende Abflachung und Fusion der adsorbierten Vesikel äußerte sich in abnehmenden Frequenz- und Dissipationsänderungen. Ab einem PG-Anteil von etwa 30 mol% wurden nur noch geringe Frequenz- und Dissipationsänderungen beobachtet, die etwa einer Lipiddoppelschicht entsprachen. Die tatsächliche Ausbildung einer Lipiddoppelschicht konnten sie anschließend mittels Impedanzspektroskopie nachweisen.¹⁴⁰

Wurden POPC/POPS (4:1)-Vesikel mit einem Durchmesser von 120 nm, wie sie auch in dieser Studie verwendet wurden, unter ähnlichen Bedingungen an eine positiv geladene Mercaptoethylamin-Monoschicht adsorbiert, konnte aus dem zeitlichen Verlauf der Resonanzfrequenz und der Dissipation festgestellt werden, dass diese schon teilweise auf der Oberfläche aufplatzen (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass die Wechselwirkung von POPC/POPS-Vesikeln mit der sekundären Bindungsstelle von Annexin A1 hauptsächlich elektrostatisch gesteuert, jedoch schwächer als eine reine elektrostatische Wechselwirkung ist, um das Aufplatzen der Vesikel zu verhindern.

Die Reversibilität der Vesikeladsorption wurde durch Spülen des Systems mit Pufferlösung untersucht. Es wurde nur eine sehr geringe Änderung beobachtet, was darauf hindeutet, dass alle Vesikel irreversibel an die Oberfläche gebunden waren. Diese Beobachtung beweist nicht zwingend, dass jedes Annexin-Molekül irreversibel mit der sekundären Membran verbunden ist, da die Wechselwirkung von mehreren Annexinen mit einem Vesikel zur beobachteten Irreversibilität der Bindung führt (Abbildung 74).

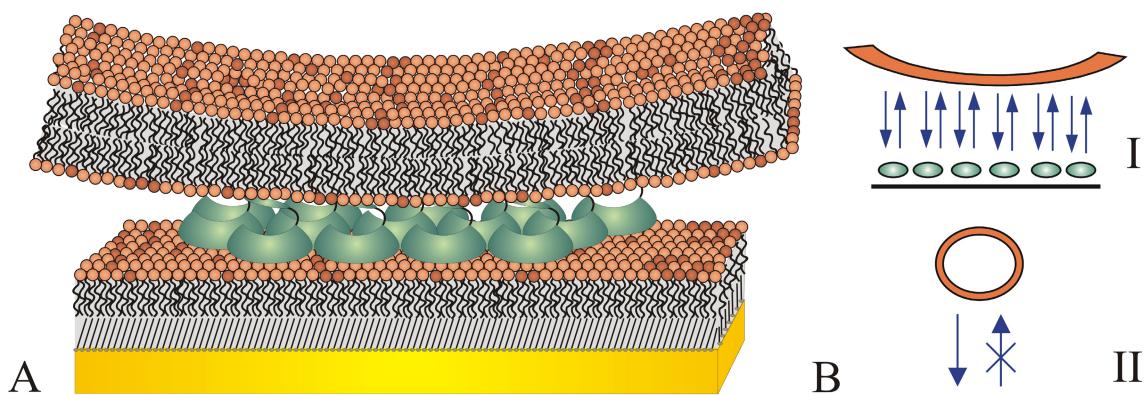


Abbildung 74: Modell der Annexin A1-vermittelten Membranaggregation. **A** Lateral aggregiertes Annexin A1 bindet einen Vesikel. **B** Trotz möglicher Reversibilität der einzelnen Wechselwirkungen von membran-gebundenen Annexin A1-Molekülen mit einer Vesikelmembran (I) führen die Wechselwirkungen mehrerer Annexin A1-Moleküle zu einer irreversiblen Bindung eines Vesikels (II).

Vergleicht man die Fläche eines Annexin-Moleküls, die etwa $7 \times 4 \text{ nm}^2$ beträgt¹⁶, mit der eines Vesikels mit einem Durchmesser von 120 nm und einer angenommenen Kontaktfläche von 10 %*, so ist letztere um etwa einen Faktor 160 größer als die eines einzelnen Proteinmoleküls. Angenommen, die Proteinmoleküle sind an der Oberfläche dicht gepackt, so sind mindestens 100 Annexine an der Bindung eines einzelnen Vesikels beteiligt. Auch im Falle reversibler einzelner Annexin-Membran-Wechselwirkungen, wäre die gesamte Bindung eines Vesikels, die durch mehrere Einzelbindungen erfolgt, irreversibel (Abbildung 74 B).

Zur irreversiblen Bindung von Vesikeln an membran-gebundenes Annexin A1 wurden Monte-Carlo-Computersimulationen durchgeführt (vergleiche Kapitel 4.2), die eine sehr gute Übereinstimmung mit den gemessenen Daten zeigten. Die Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ der in dieser Arbeit untersuchten Vesikeladsorption liegen im Bereich von $(2-9) \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$ und entsprechen somit nach Gleichung 48 mit der Lipidkonzentration c , dem Vesikelradius a und der Vesikelzahldichte $\rho(\infty)$ in der Lösung jeweils den Werten für die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$, die demnach im Bereich von $(10-40) \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ liegen.

$$k_{\text{on}}^{\text{irr}} = \frac{ck_{\text{on}}^{\text{irr}}}{\pi a^2 \rho(\infty)} \quad \text{GL- 48}$$

* Berechnung der Kontaktfläche nach Hertzmodell mit Youngmodus von $2 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ und einer Adhäsionsenergie von $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ J/m}^2$ ¹⁴¹

Um die Adsorption der Vesikel zu charakterisieren, soll sie im Folgenden mit einem theoretischen Adsorptionsmodell verglichen werden, wobei hier die elektrostatische Adsorption von Kolloidpartikeln gewählt wurde. Die elektrostatische Adsorption von Kolloidpartikel mit zur Oberfläche entgegengesetzten Ladung zeichnet sich normalerweise durch hohe $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ -Werte und die Abwesenheit einer Potentialbarriere auf. Die elektrostatische Abstoßung zwischen bereits adsorbierten und in Lösung befindlichen Partikeln nahe der Oberfläche beeinflusst die maximale Oberflächenbelegung und dadurch auch die $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ -Werte. Am einfachsten kann diese Situation durch das Konzept harter Partikel beschrieben werden. Diese Näherung vereinfacht die Wechselwirkung zwischen den Partikeln, indem ein “ganz oder gar nicht”-Prozess angenommen wird, bei dem die Adsorption verweigert wird, falls der neu ankommende Partikel versucht, innerhalb des effektiven Radius von $a^* = a + h_s$ zu adsorbieren. h_s ist der Anstieg des geometrischen Radius a als Funktion der Oberflächenladung des Partikels und der Ionenstärke der Lösung (vergleiche Abbildung 75 und Kapitel 7.2).

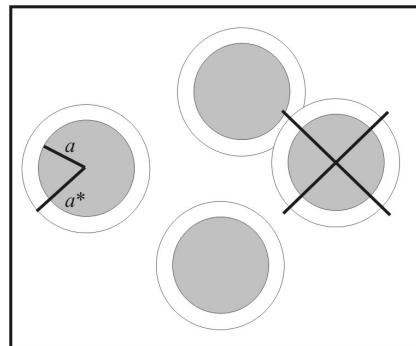


Abbildung 75: Schema der Wechselwirkung zwischen harten Partikeln. Die Radien der Vesikel sind aufgrund elektrostatischer Abstoßung erhöht und bei einer Überlappung ist keine Adsorption eines Partikels möglich.

Aus dem theoretischen Ansatz des Konzeptes harter Partikel kann $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ für $(ak)^{-1} < 0,1$ (κ^{-1} : Debye-Länge) aus Gleichung 49 nach Adamczyk et al. berechnet werden:^{113,142}

$$k_{\text{on}}^{\text{irr}} = \frac{1}{2a} \frac{D_\infty}{1 + \frac{1}{2} \ln \left(1 + \frac{a}{h_s} \right)}, \quad \text{GL- 49}$$

wobei a der Partikelradius und D_∞ die unbegrenzte Diffusionskonstante der Partikel in Lösung ist. Für die Vesikeladsorption unter den hier verwendeten Bedingungen können theoretische $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ -Werte im Bereich von 10^{-5} m/s berechnet werden. Jedoch wurden

durch die Computersimulationen für die hier durchgeführten Experimente Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $(10^6\text{-}10^7)$ m/s bestimmt, die etwa ein bis zwei Größenordnungen niedriger sind, als die theoretischen Werte, welche nach der „*perfect sink*“-Theorie ohne Potentialbarriere berechnet wurden. Diese Abweichung wurde auf eine abstoßende Potentialbarriere zurückgeführt (Abbildung 76).

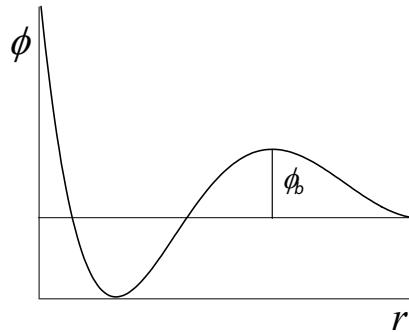


Abbildung 76: Schema des Wechselwirkungspotentials zwischen Vesikel und membran gebundenem Annexin A1.

Unter Annahme einer parabolischen Form dieser abstoßenden Barriere, die größer als die kT -Einheit ist, kann die Barrierenhöhe für $\tilde{k}_{\text{on}}^{\text{irr}}$ -Werte von $(2\text{-}9}\cdot10^7$ m/s aus Gleichung 50 nach Adamczyk et al. berechnet werden:^{113,142}

$$\tilde{k}_{\text{on}}^{\text{irr}} = \frac{D_{\infty}}{a} \sqrt{\frac{\phi_b}{\pi k T}} e^{-\phi_b/kT}. \quad \text{GL- 50}$$

In Abbildung 77 ist $\tilde{k}_{\text{on}}^{\text{irr}}$ in Abhängigkeit der Potentialbarriere dargestellt.

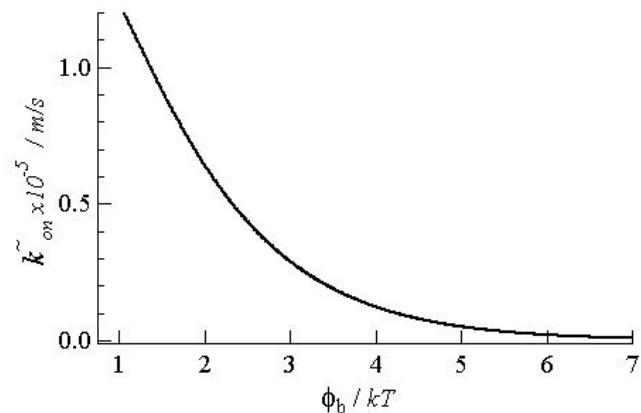


Abbildung 77: Simulation der $\tilde{k}_{\text{on}}^{\text{irr}}$ -Werte in Abhängigkeit von der abstoßenden parabolischen Potentialbarriere.^{113,143}

Für eine abstoßende Barriere mit parabolischer Form beträgt die berechnete Barrierenhöhe $\phi_b = (5.0 \pm 1.5) kT$.

4.5.5.2 Einfluss der Annexin A1-Belegung auf die Vesikeladsorption

Um nähere Informationen über die Abhängigkeit der Vesikeladsorption von der Annexin A1-Oberflächenbelegung zu erhalten, wurden Membranen mit unterschiedlichen Proteinbelegungen hergestellt und die Adsorption der Vesikel mittels der QCM-D-Technik verfolgt. Wenn theoretisch ein Annexin A1-Molekül einen Vesikel binden würde, wäre eine Proteinbelegung von 0,2 % ausreichend, um maximale Vesikelbelegung zu erreichen. Die Messergebnisse zeigen jedoch, dass bei einer Proteinbelegung von 8 % eine Frequenz- und Dissipationsänderung erreicht wurde, die etwa halb so groß war wie die bei maximaler Proteinbelegung beobachteten Werte und somit weniger Vesikel gebunden hatten. Die Proteinbelegung wurde unter der Annahme berechnet, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Belegung und der Resonanzfrequenzänderung besteht, und dass die maximale Frequenzänderung von -21 Hz einer Belegung von 54 %, entsprechend der maximalen Belegung nach dem RSA-Modells, entspricht. Die Tatsache, dass eine höhere Proteinbelegung als 0,2 % nötig ist, um eine maximale Vesikeladsorption zu beobachten, kann durch die Bildung lateraler Aggregate von membran-gebundenem Annexin A1 erklärt werden und steht im Einklang mit der beobachteten Irreversibilität der Bindung. Es ist denkbar, dass eine bestimmte Anzahl an lateral aggregierten Annexinen nötig ist, um eine Vesikelbindungsstelle zu bilden. Die Simulationen in Abbildung 69 zeigen, dass die k_{on}^{irr} -Werte der Vesikeladsorption bei geringerer Proteinbelegung um etwa einen Faktor zwei reduziert ist. Es ist möglich, dass die Kinetik der Adsorption tendenziell dadurch zunimmt, dass mehr Annexin-Moleküle an der Bildung einer Bindungsstelle beteiligt sind. Andrée et al. beobachteten in ähnlichen Experimenten mit einem chimären Protein, bestehend aus der Kerndomäne von Annexin A5 und dem N-Terminus von Annexin A1, einen linearen Zusammenhang zwischen Vesikeladsorption und Proteinoberflächenbelegung.³⁰ Außerdem vermuteten sie auch, dass eine laterale Aggregation des Proteins auf festkörperunterstützten Membranen bei der Wechselwirkung mit Phospholipidvesikeln eine Rolle spielt.

4.5.5.3 Einfluss des N-Terminus auf die Vesikeladsorption

Die primäre Membran-Wechselwirkung von Annexin A1 wird über mehrere Ca^{2+} -Bindungsstellen auf der konvexen Seite der scheibenförmigen Kerndomäne vermittelt.

Der N-Terminus von Annexin A1, in dem vermutlich die Bindungsstelle für die sekundäre Membran-Wechselwirkung liegt, ist in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen in die Kerndomäne eingelagert und wird erst durch die Bindung des Proteins an Membranen in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen auf der konkaven Seite freigesetzt (Abbildung 74).¹⁶ Da bei der Zugabe von Vesikeln zu N-terminal verkürztem Annexin A1 eine deutlich verringerte Änderung der Resonanzfrequenz und der Dissipation trotz gleicher Proteinbelegung beobachtet wurde, verstärkt sich die Vermutung, dass die sekundäre Membranbindungsstelle im N-Terminus lokalisiert ist. Da aus den geringeren Frequenz- und Dissipationsänderungen geschlossen wird, dass weniger Vesikel an die Oberfläche gebunden sind, liegt die Vermutung nahe, dass N-terminal verkürztes Annexin A1 weniger Bindungsplätze bildet als intaktes Annexin A1. Es ist jedoch noch nicht klar, ob die geringere Anzahl der Bindungsstellen durch eine geringere laterale Aggregation von membran-gebundenem Δ^{1-29} Annexin A1 verursacht wird, oder ob, im Vergleich zu intaktem Annexin A1, größere Δ^{1-29} Annexin A1-Cluster nötig sind, um eine Bindungsstelle zu bilden, da vielleicht bei Δ^{1-29} Annexin A1 die Adsorption nur durch einen Teil der Kerndomäne vermittelt wird. Bitto et al. vermuteten, dass bestimmte Aminosäuren des N-Terminus, wie Lysin-26 und Lysin-29, und die Kerndomäne direkt an der sekundären Membran-Wechselwirkung von Annexin A1 beteiligt sind.³³ Wang et al. beobachteten Veränderungen in der Ca^{2+} -Sensitivität der Aggregation von chromaffinen Granulae nach Verkürzung von Annexin A1 um den N-terminalen Rest.²⁵ Weitere Hinweise auf die Beteiligung des N-Terminus bei der sekundären Membran-Wechselwirkung fanden Andrée et al.³⁰ So konnte ein membran-gebundenes chimäres Protein, das aus der Kerndomäne von Annexin A5 und dem N-Terminus von Annexin A1 aufgebaut war, Vesikel aggregieren, während Annexin A5 selbst nicht dazu fähig war. Yoon et al. charakterisierten die Wechselwirkung eines N-terminalen Peptids (2-26) von Annexin A1 mit Phospholipiden als teilweise Ca^{2+} -abhängig.¹³⁶

4.5.5.4 Einfluss der Ladung auf die Vesikeladsorption

Während die primäre Bindung von Annexin A1 mit Membranen über Ca^{2+} -Brücken hauptsächlich elektrostatischer Natur ist, bietet die sekundäre Membranbindung immer noch Grund zur Diskussion. Bitto et al.³³ und Andrée et al.³⁰ folgerten aus ihren Ergebnissen, dass die sekundäre Membranbindung durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommt. Die hier beschriebenen QCM-D-Messungen zeigen jedoch, dass die Vesikelbindung zumindest teilweise elektrostatische Wechselwirkungen beinhaltet. In Abwesenheit negativ geladener Phospholipide in den Vesikeln wurde ein langsamer und undefinierter Bindungsprozess beobachtet, was

zeigt, dass die Elektrostatik zur Spezifität der sekundären Membranbindung beiträgt. Jedoch konnte durch die QCM-D-Experimente auch gezeigt werden, dass die Vesikel an der Oberfläche nicht aufplatzen und somit keine einfache und starke elektrostatische Wechselwirkung vorliegt. Experimente von Faiss et al. zeigten, dass eine starke elektrostatische Wechselwirkung zwischen Vesikel und Oberfläche nicht nur zu einer Bindung, sondern zum Aufplatzen der Vesikel und zur Bildung von planaren Doppelschichten führte.¹⁴⁰ Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen fand Bitto et al. durch SPR-Messungen, dass reine PC-Vesikel mit membran-gebundenem Annexin A1 mit ähnlicher Kinetik und ähnlichen maximalen Signaländerungen wie PS-dotierte Vesikel wechselwirkten.³³ Für ein membran-gebundenes chimäres Protein aus der Annexin A5-Kerndomäne und dem N-Terminus von Annexin A1 wurde beobachtet, dass reine PC-Vesikel in gleichem Maße adsorbieren wie PC/PS-Vesikel.³⁰ Da es sich bei der hier untersuchten Bindung von Vesikeln um einen irreversiblen Prozess handelt, hängt die Menge der gebundenen Vesikel nur von der Anzahl der vorhandenen Bindungsplätze auf der Oberfläche ab. POPG-haltige POPC-Vesikel adsorbierten in gleicher Weise an membran-gebundenes Annexin A1 wie Vesikel, die POPS enthielten. Dies zeigt, dass negativ-geladene Phospholipide den Bindungsprozess begünstigen, dieser aber nicht spezifisch für bestimmte negativ geladene Lipide ist. Allerdings traten Änderungen in der Oberflächenbelegung bei der Adsorption von Vesikeln mit unterschiedlichen PS-Gehalten auf. Diese Beobachtung kann nur durch eine Veränderung der Bindungsplätze auf der Oberfläche erklärt werden. Falls der elektrostatische Beitrag der Vesikelbindung durch eine geringere Ladung der Vesikel verringert wird, sind offensichtlich mehr oder größere Annexin-Cluster nötig, um eine Bindungsstelle zu bilden und so den geringeren PS-Gehalt auszugleichen. Die Computersimulationen zeigen, dass die Kinetik der Adsorption nicht durch den PS-Gehalt der Vesikel beeinflusst wird.

Um den elektrostatischen Beitrag der sekundären Membranbindung weiter zu charakterisieren, wurde die Salzkonzentration in den Pufferlösungen variiert und die Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ bestimmt. Mit Erhöhung der Salzkonzentration sanken die Werte für $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ nur geringfügig. Dies steht jedoch im Einklang mit der Theorie für geladene harte Kugeln. Für die Messung der Adsorption von Partikeln ist der Einfluss der Ionenstärke auf die Geschwindigkeitskonstante in einem angemessenen Bereich relativ klein (Abbildung 78).

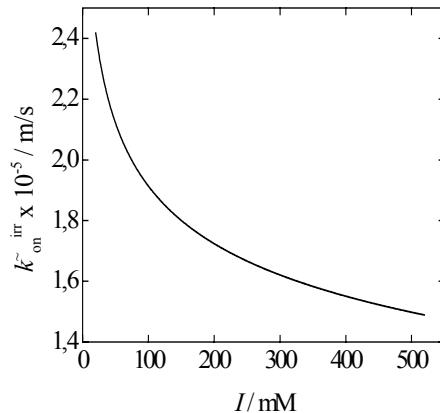


Abbildung 78: Simulation der $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ -Werte in Abhängigkeit der Ionenstärke der Lösung nach dem Modell der Wechselwirkung von harten Partikeln.¹¹³

Experimentell konnte eine ähnliche Abhängigkeit gefunden werden, die bei geringeren Ionenstärken durch eine Absenkung der Barriere aufgrund eines tieferen Potentialtopfes durch elektrostatische Anziehung erklärt werden kann. Eine kleine Änderung in $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ schließt also nicht aus, dass Elektrostatik zum Vesikelbindungsprozess beiträgt. Bitto et al. beobachteten einen Anstieg des SPR-Signals, welches von der Menge an gebundenen Vesikeln abhängt, bei steigender Salzkonzentration und führte dies auf eine hydrophobe Wechselwirkung zurück, da mit zunehmender Ionenstärke mehr Vesikel gebunden hatten.³³ In den hier durchgeführten Experimenten konnten keine signifikanten Änderungen in der Menge an gebundenen Vesikeln festgestellt werden, was im Einklang mit der beobachteten Irreversibilität der Bindung steht. Sogar wenn an der Oberfläche nur elektrostatische Abstoßung der Vesikel auftreten würde, würde eine Erhöhung der Ionenstärke von 10 auf 500 mM zu einer Verringerung der Belegung um nur etwa 10 % führen.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass membran-gebundenes Annexin A1 in der Lage ist, bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen Vesikel irreversibel zu binden. Diese Bindung wird wahrscheinlich durch Protein-Cluster an der Oberfläche vermittelt, wobei der N-Terminus eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Bindungsstellen spielt. Die Vesikeladsorption läuft bevorzugt mit negativ geladenen Phospholipiden ab und beruht zumindest teilweise auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Membran-Protein-Wechselwirkung ist stark genug, um Vesikel zu binden, aber zu schwach, um sie zu fusionieren. Diese Erkenntnis ist wichtig für die Aufklärung der biochemischen Rolle des Annexin A1 in Membrantransportprozessen, wie sie etwa im endozytotischen Weg auftreten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Annexin A1 bindet nicht nur, wie alle Annexine, Ca^{2+} -abhängig an negativ geladene Phospholipide, sondern kann auch Membranen aggregieren.

In dieser Arbeit konnte die Ca^{2+} -abhängige, primäre Bindung von Annexin A1 an negativ geladene, festkörperunterstützte Phospholipidmembranen, getrennt von der sekundären Membraninteraktion, mittels Rasterkraftmikroskopie (SFM) visualisiert und mit Hilfe der Quarzmikrowaage (QCM)-Technik quantifiziert werden. Für die QCM-Messungen wurden festkörperunterstützte Membranen verwendet, die aus einer Oktanthiol (OT)-Monoschicht und einer zweiten POPC/POPS (4:1)-Lipidschicht bestanden und auf Goldelektroden immobilisiert waren, die auf 5 MHz-Quarzscheiben aufgebracht worden waren. Die QCM-Messungen zeigten, dass Annexin A1 Ca^{2+} -abhängig an POPC/POPS (4:1)-Membranen adsorbiert und nach Entzug der Ca^{2+} -Ionen wieder dissoziiert, wobei die Oberflächenbelegung nach der Adsorption mit steigender Ca^{2+} -Konzentration zunimmt. Messungen der Adsorption und Desorption bei definierten Ca^{2+} -Konzentrationen zeigen, dass Annexin A1 nur partiell reversibel an die Membran bindet und jeweils etwa 60 bis 80 % des Proteins irreversibel adsorbieren. Aus topographischen SFM-Aufnahmen von POPC/POPS (4:1)-Doppelschichten, immobilisiert auf Glimmer, nach Proteininkubation ist ersichtlich, dass irreversibel gebundenes Annexin A1 auf der Membranoberfläche zweidimensionale Aggregate bildet, deren Größe und Verteilung sehr heterogen sind. Aufgrund der Beobachtungen ließ sich ein Modell für die Annexin A1-Membran-Wechselwirkung aufstellen, nach dem Annexin A1 irreversibel an Ca^{2+} -abhängig gebildete PS-reiche Domänen in der Membran adsorbiert und reversibel an die Bereiche zwischen den Domänen bindet. Basierend auf diesem Modell konnten mittels Computersimulationen die Geschwindigkeitskonstanten der Wechselwirkung bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeitskonstanten der irreversiblen Adsorption $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ um ein bis zwei Größenordnungen größer sind als die der reversiblen Adsorption k_{on} . Für steigende Ca^{2+} -Konzentrationen ergab sich, dass die irreversible Adsorption schneller verläuft und dass die Affinität der reversiblen Bindung zunimmt.

Um die Membranaggregationseigenschaften von Annexin A1 zu untersuchen, wurde mittels der Dissipativen Quarzmikrowaage (QCM-D)-Technik die sekundäre Membranbindung, getrennt von der primären, durch die Quantifizierung der Vesikeladsorption an membran-gebundenes Annexin A1 charakterisiert. Mit Hilfe der QCM-D-Technik konnte nicht nur die Menge an adsorbierten Vesikeln quantifiziert werden, sondern auch

gezeigt werden, dass die irreversibel gebundenen Vesikel an der Oberfläche intakt bleiben und nicht fusionieren. Es wurde ebenfalls deutlich, dass Annexin-Cluster an der Oberfläche die Vesikeladsorption vermitteln. Außerdem war ersichtlich, dass der N-Terminus von Annexin A1 bei der Membranaggregation erheblich beteiligt ist, da die Vesikeladsorption an membran-gebundenes Δ^{1-29} Annexin A1 vermindert ist. Durch Variation der Ladung der Vesikel und der Ionenstärke der Lösung konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Vesikeladsorption teilweise elektrostatischen Charakter besitzt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Vesikeladsorption, welche durch Computersimulationen ermittelt wurden, lagen jedoch um ein bis zwei Größenordnungen niedriger als die theoretisch für reine elektrostatische Interaktion berechneten, was auf eine Potentialbarriere zurückgeführt wurde, die in der Größenordnung von $(5,0 \pm 1,5) kT$ liegt.

Schließlich wurde die Wechselwirkung von Annexin A1 mit seinem zellulären Liganden S100A11 untersucht und diese Interaktion in Zusammenhang mit den Membranbindungseigenschaften von Annexin A1 gebracht. Mittels Ligandenblots und Vesikelkoppelungssassays konnte gezeigt werden, dass S100A11 Ca^{2+} -abhängig mit Annexin A1 wechselwirkt, jedoch nicht an N-terminal verkürztes Δ^{1-29} Annexin A1 bindet. Da S100A11 sowohl mit N-terminal acetyliertem Annexin A1_{ac}, das aus Schweinelunge isoliert wurde, als auch mit bakteriell exprimiertem, nicht-acetyliertem Annexin A1_{n-ac} wechselwirkt, konnte nachgewiesen werden, dass die N-terminale Acetylierung, wider dem Postulat aus der Literatur, nicht essentiell für die Wechselwirkung ist. Die Wechselwirkung stellte sich nicht als selektiv für Annexin A1 heraus, da auch eine Assoziation mit dem strukturell ähnlichem Annexin A2 detektiert wurde. Aus QCM-Messungen ist ersichtlich, dass weder S100A11 an membran-gebundenes Annexin A1, noch das strukturell ähnliche S100A10 an membran-gebundenes Annexin A2 bindet, da vermutlich die S100-Bindungsstelle durch die laterale Aggregation blockiert ist. Aufgrund der Ergebnisse wird für die Annexin A1-S100A11 Wechselwirkung postuliert, dass die Protein-Protein-Wechselwirkung nur in Lösung stattfindet und der Annexin A1-S100A11-Komplex eine niedrigere Affinität zu POPC/POPS (4:1)-Membranen aufweist als monomeres Annexin A1. Zudem stellte sich heraus, dass S100A11 die Kinetik der tryptischen Proteolyse des N-Terminus von Annexin A1 verlangsamt. So wird angenommen, dass S100A11 nicht nur die Membranbindung, sondern auch die Proteolyse reguliert und somit bei der Lokalisation von Annexin A1 eine Rolle spielt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Meers, P., Daleke, D., Hong, K. and Papahadjopoulos, D. (1991) Interactions of Annexins with Membrane Phospholipids. *Biochemistry* 30, 2903-2908
- 2 Gerke, V. and Moss, S.E. (2002) Annexins: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 82 (2), 331-371
- 3 Gerke, V. and Moss, S.E. (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 129-154
- 4 Donato, R. and Russo-Marie, F. (1999) The Annexins: structure and functions. *Cell Calcium* 26 (3/4), 85-89
- 5 Crumpton, M.J. and Dedman, J.R. (1990) Protein terminology tangle. *Nature* 345 (6272), 212-
- 6 Geisow, M.J., Fritsche, U., Hexham, J.M., Dash, B. and Johnson, T. (1986) A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian Ca^{2+} -dependent membrane-binding proteins. *Nature* 320 (6063), 636-638
- 7 Barnes, J.A. and Gomes, A.V. (2002) Proteolytic signals in the primary structure of annexins. *Mol. Cell. Biol.* 231 (1-2), 1-7
- 8 Ando, Y., Imamura, S., Hong, Y.-M., Owada, M.K., Kakunaga, T. and Kannagi, R. (1989) Enhancement of Calcium Sensitivity of Lipocortin I in Phospholipid Binding Induced by Limited Proteolyses and Phosphorylation at the Amino terminus as Analyzed by Phospholipid Affinity Column Chromatography. *J. Biol. Chem.* 264, 6948-6955
- 9 Futter, C.E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A. and Hopkins, C.R. (1993) Annexin I Is Phosphorylated in the Multivesicular Body During the Processing of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Cell. Biol.* 120 (1), 77 - 83
- 10 Haigler, H.T., Schlaepfer, D.D. and Burgess, W.H. (1987) Characterization of Lipocortin I and an Immunologically Unrelated 33-kDa Protein as Epidermal Growth Factor Receptor/Kinase Substrates and Phospholipase A₂ Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 262, 6921 - 6930
- 11 Polevoda, B. and Sherman, F. (2000) N^α-terminal Acetylation of Eukaryotic Proteins. *J. Biol. Chem.* 275 (47), 36479
- 12 Huber, R., Romisch, J. and Paques, E.P. (1990) The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO Journal* 9, 3867-3874

- 13 Favier-Perron, B., Lewit-Bentley, A. and Russo-Marie, F. (1996) The high-resolution crystal structure of human annexin III shows subtle differences with annexin V. *Biochemistry* 35, 1740-1744
- 14 Benz, J., Bergner, A., Hofmann, A., Demange, P., Göttig, P., Liemann, S. and Huber, R. (1996) The structure of recombinant annexin VI in crystals and membrane-bound. *J. Mol. Biol.* 260, 638-643
- 15 Luecke, H., Chang, B.T., Mailliard, W.S., Schlaepfer, D.D. and Haigler, H.T. (1995) Crystal structure of annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature* 378 (6556), 512-515
- 16 Rosengarth, A., Gerke, V. and Luecke, H. (2001) X-ray Structure of Full-length Annexin 1 and Implications for Membrane Aggregation. *J. Mol. Biol.* 306, 489-498
- 17 Rosengarth, A. and Luecke, H. (2003) A Calcium-driven Conformational Switch of the N-terminal and Core Domains of Annexin A1. *J. Mol. Biol.* 326, 1317 - 1325
- 18 Weng, X., Luecke, H., Song, I.S., Kang, D.S., Kim, S.H. and Huber, R. (1993) Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci.* 2 (3), 448-458
- 19 Liemann, S., Bringemeier, I., Benz, J., Göttig, P., Hofmann, A., Huber, R., Noegel, A.A. and Jacob, U. (1997) Crystal structure of the C-terminal tetrad repeat from synexin (annexin VII) of Dictyostelium discoideum. *J. Mol. Biol.* 270 (1), 79-88
- 20 Burger, A. et al. (1996) The Crystal Structure and Ion Channel Activity of Human Annexin II, a Peripheral Membrane Protein. *J. Mol. Biol.* 257, 839-847
- 21 Liemann, S. and Huber, R. (1997) Three-dimensional structure of annexin. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 516 - 521
- 22 Drust, D.S. and Creutz, C.E. (1988) Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 331, 88 - 91
- 23 Fuente, M.d.l. and Parra, A.V. (1995) Vesicle Aggregation by Annexin I: Role of a Secondary Membrane Binding Site. *Biochemistry* 34, 10393-10399
- 24 Schlaepfer, D.D. and Haigler, H.T. (1987) Characterization of Ca^{2+} -dependent Phospholipid Binding and Phosphorylation of Lipocortin I. *J. Biol. Chem.* 262, 6931-6937
- 25 Wang, W. and Creutz, C.E. (1992) Regulation of the Chromaffin Granule Aggregating Activity of Annexin I by Phosphorylation. *Biochemistry* 31, 9934-9939

- 26 Swairjo, M.A., Concha, N.O., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. and Seaton, B.A. (1995) Ca^{2+} -bridging mechanism and phospholipid head group recognititon in the membrane-binding protein annexin V. *Nature Struct. Biol.* 2, 968-974
- 27 Montaville, P., Neumann, J.M., Russo-Marie, F., Ochsenbein, F. and Sanson, A. (2002) A new consensus sequence for phosphatidylserine recognition by annexins. *J. Biol. Chem.* 277 (27), 24684-24693
- 28 Rescher, U., Zobiack, N. and Gerke, V. (2000) Intact Ca^{2+} -binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells. *J. Cell Sci.* 113, 3931-3938
- 29 Bitto, E. and Cho, W. (1998) Roles of Individual Domains of Annexin I in Its Vesicle Binding and Vesicle Aggregation: A Comprehensive Mutageneses Study. *Biochemistry* 37, 10231-10237
- 30 Andree, H.A.M., Willems, G.M., Hauptmann, R., Maurer-Fogy, I., Stuart, M.C.A., Hermens, W.T., Frederik, P.M. and Reutelingsperger, C.P.M. (1993) Aggregation of Phospholipid Vesicles by a Chimeric Protein with the N-Terminus of Annexin I and the Core of Annexin V. *Biochemistry* 32 (17), 4634-4640
- 31 Blackwood, R.A. and Ernst, J.D. (1990) Characterization of Ca^{2+} -dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem. J.* 266, 195-200
- 32 Meers, P., Mealy, T., Pavlotsky, N. and Tauber, A.I. (1992) Annexin I-Mediated Vesicular Aggregatrion: Mechanism and Role in Human Neutrophils. *Biochemistry* 31, 6372-6382
- 33 Bitto, E., Tikhonov, A.M., Schlossmann, M.L. and Cho, W. (2000) Mechanism of Annexin I-Mediated Membrane Aggregation. *Biochemistry* 39, 13469-13477
- 34 Koppenol, S., Tsao, F.H.C., Yu, H. and Zografi, G. (1998) The interaction of lung annexin I with phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 1369, 221 - 232
- 35 Rosengarth, A., Wintergalen, A., Galla, H.-J., Hinz, H.-J. and Gerke, V. (1998) Ca^{2+} -independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers. *FEBS Lett.* 438 (3), 279-284
- 36 Kastl, K., Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C. (2002) Kinetics and Thermodynamics of Annexin A1 Binding to Solid-Supported Membranes: A QCM-Study. *Biochemistry* 41 (31), 10087 - 10094
- 37 Fuente, M.d.l. and Ossa, C.G. (1997) Binding to Phosphatidyl Serine Membranes Causes a Conformational Change in the Concave Face of Annexin I. *Biophys. J.* 71, 383-387

- 38 Janshoff, A., Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C. (2001) Visualization of Annexin I Binding to Calcium-Induced Phosphatidylserine Domains. *ChemBioChem* 7/8, 587-590
- 39 Lambert, O., Gerke, V., Bader, M.-F., Porte, F. and Brisson, A. (1997) Structural Analysis of Junctions Formed between Lipid Membranes and Several Annexins by Cryo-electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* 272, 42 - 55
- 40 Hoekstra, D., Buist-Arkema, R., Klappe, K. and Reutelingsperger, C.P.M. (1993) Interactions of Annexins with Membranes: The N-Terminus as a Governing Parameter As Revealed with a Chimeric Annexin. *Biochemistry* 32, 14194 - 14202
- 41 Wang, W. and Creutz, C.E. (1994) Role of the Amino-Terminal Domain in Regulating Interactions of Annexin I with Membranes: Effects of Amino-Terminal Truncation and Mutageneses of the Phosphorylation Sites. *Biochemistry* 33, 275-282
- 42 Bitto, E. and Cho, W. (1999) Structural Determinant of the Vesicle Aggregation Activity of Annexin I. *Biochemistry* 38, 14094-14100
- 43 Ando, Y., Imamura, S., Owada, K. and Kannagi, R. (1991) Calcium-induced intracellular cross-linking of lipocortin I by tissue transglutaminase in A431 cells. Argumentation by Membrane Phospholipids. *J. Biol. Chem.* 266 (2), 1101-1108
- 44 Pepinsky, R.B., Sinclair, L.K., Chow, E.P. and O'Brine-Greco, B. (1989) A dimeric form of lipocortin-1 in human placenta. *Biochem. J.* 263, 97 - 103
- 45 Schäfer, B.W. and Heizmann, C.W. (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 21, 134 - 140
- 46 Eckert, R.L., Broome, A.M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D. and Lee, K. (2004) S100 proteins in the epidermis. *J. Invest. Dermat.* 123 (1), 23-33
- 47 Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637-668
- 48 Allen, B.G., Durussel, I., Walsh, M.P. and Cox, J.A. (1996) Characterization of the Ca^{2+} -binding properties of calgizzarin (S100C) isolated from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem. Cell Biol.* 74, 687-694
- 49 Zhao, X.Q., Naka, M., Muneyuki, M. and Tanaka, T. (2000) Ca^{2+} -Dependent Inhibition of Actin-activated Myosin ATPase Activity by S100C (S100A11), a Novel Member of the S100 Protein Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 77 - 79

- 50 Davey, G.E., Murmann, P., Hoechli, M., Tanaka, T. and Heizmann, C.W. (2000) Calcium-dependent translocation of S100A11 requires tubulin filaments. *Biochim. Biophys. Acta* 1498 (2-3), 220-232
- 51 Dempsey, A.C., Walsh, M.P. and Shaw, G.S. (2003) Unmasking the Annexin I Interaction from the Structure of Apo-S100A11. *Structure* 11, 887 - 897
- 52 Réty, S., Osterloh, D., Arié, J.-P., Tabaries, S., Seemann, J., Russo-Marie, F., Gerke, V. and Lewit-Bentley, A. (2000) Structural basis of the Ca^{2+} -dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I. *Structure* 8, 175-184
- 53 Watanabe, M., Ando, Y., Tokumitsu, H. and Hidaka, H. (1993) Binding site of annexin XI on the calcyclin molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 1376-1382
- 54 Mailliard, W.S., Haigler, H.T. and Schlaepfer, D.D. (1996) Calcium-dependent Binding of S100C to the N-terminal Domain of Annexin I. *J. Biol. Chem.* 271 (2), 719-725
- 55 Johnsson, N., Marriott, G. and Weber, K. (1988) p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. *EMBO Journal* 7, 2435-2442
- 56 Gerke, V. and Weber, K. (1985) Calcium-dependent Conformational Changes in the 36-kDa Subunit of Intestinal Protein I Related to the Cellular 36-kDa Target of Rous Sarcoma Virus Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* 260 (3), 1688 - 1695
- 57 Lewit-Bentley, A., Réty, S., Sopkova-de Oliveira Santos, J. and Gerke, V. (2000) S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol. Int.* 24 (11), 799 - 802
- 58 Seemann, J. (1996) Die Rolle des Annexin A1 in der Endozytose. *Dissertation*, Max-Plank-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen
- 59 Seemann, J., Weber, K. and Gerke, V. (1996) Structural requirements for annexin I-S100C complex-formation. *Biochem. J.* 319, 123-129
- 60 Réty, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F. and Lewit-Bentley, A. (1999) The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nature Struct. Biol.* 6 (1), 89-95
- 61 Glenney, J.R.J., Tack, B. and Powell, M.A. (1987) Calpactins: Two Distinct Ca^{++} -regulated Phospholipid- and Actin-binding Proteins Isolated from Lung and Placenta. *J. Cell. Biol.* 104, 503 - 511
- 62 Cuzzocrea, S., Tailor, A., Zingarelli, B., Salzman, A.L., Flower, R.J., Szabó, C. and Perretti, M. (1997) Lipocortin 1 Protects Against Splanchnic Artery Occlusion and Reperfusion by Affecting Neutrophil Migration. *J. Immunol.* 159 (10), 5089 - 5097

- 63 Gassama-Diagne, A., Fauvel, J. and Chap, H. (1990) Calcium-independent Phospholipases from Guinea Pig Digestive Tract as Probes to Study the Mechanism of Lipocortin. *J. Biol. Chem.* 265 (8), 4309 - 4314
- 64 Goulding, N.J., Pan, L., Wardwell, K., Guyre, V.C. and Guyre, P.M. (1996) Evidence for specific annexin I-binding proteins on human monocytes. *Biochem. J.* 316, 593-597
- 65 Alberts, B. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*.
- 66 Robinson, M.S., Watts, C. and Zerial, M. (1996) Membrane Dynamics in Endocytosis. *Cell* 84, 13-21
- 67 Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument, B.H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324
- 68 Bennet, M.K. (1995) SNAREs and the specificity of transprot vesicle targeting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 581-586
- 69 Cole, N.B. and Lippincott-Schwartz, J. (1995) Oraganization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1), 55-64
- 70 Lamaze, C., Fujimoto, L.M., Yin, H.L. and Schmid, S.L. (1997) The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272 (33), 20332-20335
- 71 Seemann, J., Weber, K., Osborn, M., Parton, R.G. and Gerke, V. (1996) The Association of Annexin I with Early Endosomes Is Regulated by Ca^{2+} and Requires an Intact N-Terminal Domain. *Mol. Biol. Cell* 7, 1359-1374
- 72 Seemann, J., Weber, K. and Gerke, V. (1997) Annexin I targets S100C to early endosomes. *FEBS Lett.* 413, 185-190
- 73 Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-2423
- 74 Gerke, V. and Weber, K. (1984) Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO Journal* 3 (1), 227 - 233
- 75 www.expasy.com.
- 76 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- 77 Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

- 78 Rosengarth, A., Rösgen, J., Hinz, H.-J. and Gerke, V. (1999) A Comparison of the Energetics of Annexin I and Annexin V. *J. Mol. Biol.* 288, 1013-1025
- 79 Ross, M. (2003) Quantifizierung der Interaktion von Annexin A2t mit festkörperunterstützten Lipidmembranen. *Dissertation*, Westfälische Wilhelms Universität, Münster
- 80 Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933
- 81 Janshoff, A. and Steinem, C. (2001) Scanning force microscopy of artificial membranes. *ChemBioChem* 2, 798-808
- 82 Ende, D. and Mangold, K.-M. (1993) Impedanzspektroskopie. *Chem. unserer Zeit* 27 (3), 134-140
- 83 Hillier, A.C. and Ward, M.D. (1992) Scanning Electrochemical Mass Sensitivity Mapping of the Quartz Microbalance in Liquid Media. *Anal. Chem.* 64, 2539-2554
- 84 Schumacher, R. (1990) Die Quarzmikrowaage: Eine neue Meßtechnik zur in-situ-Untersuchung des Phasengrenzbereiches fest/flüssig. *Angew. Chem.* 102 (4), 347-460
- 85 Yun, K., Kobatake, E., Haruyama, T., Laukkanen, M.-L., Keinanen, K. and Aizawa, M. (1998) Use of a Quartz Crystal Microbalance To Monitor Immunoliposome-Antigen Interaction. *Anal. Chem.* 70, 260-264
- 86 Steinem, C., Janshoff, A., Wegener, J., Ulrich, W.-P., Willenbrink, W., Sieber, M. and Galla, H.-J. (1997) Impedance and shear wave resonance analyses of ligand-receptor interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers. *Biosensors & Bioelectronics* 12 (8), 787-808
- 87 Reiss, B., Janshoff, A., Steinem, C., Seebach, J. and Wegener, J. (2003) Adhesion Kinetics of Functionalized Vesicles and Mammalian Cells: A Comparative Study. *Langmuir* 19, 1816-1823
- 88 Muratsugu, M., Ohta, F., Miya, Y., Hosokawa, T., Kurosawa, S., Kamo, N. and Ikeda, H. (1993) Quartz Crystal Microbalance for the Detection of Microgram Quantities of Human Serum Albumin: Relationship between the Frequency Change and the Mass of Protein Adsorbed. *Anal. Chem.* 65, 2933-2937
- 89 Kumar, A. (2000) Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application. *The Member Journal of The Minerals, Metals & Materials Society* 52 (10)
- 90 Janshoff, A., Steinem, C., Sieber, M. and Galla, H.-J. (1996) Specific binding of peanut agglutinin to G_{M1}-doped solid supported lipid bilayers investigated by shear wave resonator measurements. *Eur. Biophys. J.* 25, 105-113

- 91 Janshoff, A., Galla, H.-J. and Steinem, C. (2000) Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren? *Angew. Chem.* 112 (22), 4164-4195
- 92 Ebato, H., Gentry, C.A., Herron, J.N., Müller, W., Okahata, Y., Ringsdorf, H. and Suci, P.A. (1994) Investigation of Specific binding of Antifluorescyl Antibody and Fab to Fluorescein Lipids in Langmuir-Blodgett Deposited Films Using Quartz Crystal Microbalance Methodology. *Anal. Chem.* 66, 1683 - 1689
- 93 Buttry, D.A. and Ward, M.D. (1992) Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Chem. Rev.* 92, 1355-1379
- 94 <http://www.thch.uni-bonn.de/pc/bargon/sensorik/Schnittrichtungen.html>.
- 95 <http://www.corningfrequency.com>.
- 96 Martin, S.J., Edwards Granstaff, V. and Frye, G.C. (1991) Characerization of a Quartz Crystal Microbalance with Simultaneous Mass and Liquid Loading. *Anal. Chem.* 63, 2272-2281
- 97 Lucklum, R. and Hauptmann, P. (2003) Transduction mechanism of acoustic-wave based chemical and biochemical sensors. *Meas. Sci. Technol.* 14, 1854-1864
- 98 Bandey, H.L., Martin, S.J. and Cernosek, R.W. (1999) Modeling the Responses of Thickness-Shear Mode Resonators under Various Loading Conditions. *Anal. Chem.* 71, 2205-2214
- 99 Kanazawa, K.K. and Gordon, J.G. (1985) Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with Liquid. *Anal. Chem.* 57, 1770-1771
- 100 Rodahl, M. and Kasemo, B. (1996) Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode. *Sensors and Actuators B* 37, 111-116
- 101 Rodahl, M., Höök, F., Krozer, A., Brzezinski, P. and Kasemo, B. (1995) Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Rev. Sci. Instrum.* 66 (7), 3924-3930
- 102 Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C.A., Krozer, A., Brzezinski, P., Voinova, M. and Kasemo, B. (1997) Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss.* 107, 229-246
- 103 Voinova, M.V., Jonson, M. and Kasemo, B. (2002) Missing mass' effect in biosensor's QCM applications. *Biosensors & Bioelectronics* 17 (10), 835-841
- 104 Rodahl, M., Hoeoek, F. and Kasemo, B. (1996) QCM Operation in Liquids: An Explanation of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity. *Anal. Chem.* 68 (13), 2219-2227

- 105 Rodahl, M. and Kasemo, B. (1996) A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance. *Rev. Sci. Instrum.* 67 (9), 3238-3241
- 106 Adamczyk, Z., Musial, E. and Siwek, B. (2004) Kinetics of particle deposition in the oblique impinging jet cell. *J. Colloid Interface Sci.* 269, 53-61
- 107 <http://rna.rega.kuleuven.ac.be/masspec/pepcal.htm>.
- 108 Bhattacharya, S. and Chazin, W.J. (2003) Calcium-Driven Changes in S100A11 Structure Revealed. *Structure* 11, 738 - 740
- 109 Ohta, H., Sasaki, T., Naka, M., Hiraoka, Osamu, Miyamoto, C., Furuichi, Y. and Tanaka, T. (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA coding for a new member of the S100 protein family from porcine cardiac muscle. *FEBS Lett.* 295, 93 - 96
- 110 Ayala-Sanmartin, J., Gouache, P. and Henry, J.-P. (2000) N-Terminal Domain of Annexin 2 Regulates Ca^{2+} -Dependent Membrane Aggregation by the Core Domain: A Site Directed mutagenesis Study. *Biochemistry* 39, 15190-15198
- 111 Ayala-Sanmartin, J., Henry, J.-P. and Pradel, L.-A. (2001) Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca^{2+} concentration. *Biochim. Biophys. Acta* 1510, 18-28
- 112 Feder, J. (1980) Random sequential adsorption. *J.Theor.Biol.* 87 (2), 237-254
- 113 Adamczyk, Z. (2000) Kinetics of Diffusion-Controlled Adsorption of Colloid Particles and Proteins. *J. Colloid Interface Sci.* 229, 477-489
- 114 Adamczyk, Z., Siwek, B., Warszynski, P. and Musial, E. (2001) Kinetics of Particle Deposition in the Radial Impinging-Jet Cell. *J. Colloid Interface Sci.* 242, 14-24
- 115 Tie, Y., Calonder, C. and Van Tassel, P.R. (2003) Protein adsorption: kinetics and history dependence. *J. Colloid Interface Sci.* 268 (1), 1-11
- 116 Van Tassel, P.R., Viot, P. and Tarjus, G. (1996) A kinetic model of partially reversible protein adsorption. *J. Chem. Phys.* 106 (2), 761-770
- 117 Cerofolini, G.F. (2003) Adsorption-desorption equilibrium and kinetics on surfaces undergoing self-similar reversible reconstruction. *J. Chem. Phys.* 118 (22), 10203-10211
- 118 Kastl, K., Herrig, A., Lüthgens, E., Janshoff, A. and Steinem, C. (2004) Scrutiny of annexin A1 mediated membrane-membrane interaction by means of a thickness shear mode resonator and computer simulations. *Langmuir* 20 (17), 7246-7253
- 119 Lüthgens, E. *Dissertation* Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

- 120 Plant, A.L. (1993) Self-Assembled Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. *Langmuir* 9, 2764-2767
- 121 Plant, A.L., Gueguetchkeri, M. and Yap, W. (1994) Supported Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Membranes: Insulating Properties. *Biophys. J.* 67, 1126 - 1133
- 122 Meers, P. (1992) Annexin binding to lipid assemblies. In *Annexins: Molecular structure to cellular function* (Seaton, B.A., ed.), pp. 97-119, Chapman & Hall
- 123 Andree, H.A.M., Reutelingsperger, C.P.M., Hauptmann, P., Hemker, H.C., Hermens, W.T. and Willems, G.M. (1990) Binding of Vascular Anticoagulant α -(VAC α) to Planar Phospholipid Bilayers. *J. Biol. Chem.* 265 (9), 4923-4928
- 124 Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C. (2003) Membrane Composition Affects the Reversibility of Annexin A2t Binding to Solid Supported Membranes: A QCM Study. *Biochemistry* 42 (10), 3131 - 3141
- 125 Brisson, A., Mosser, G. and Huber, R. (1991) Structure of soluble and membrane-bound annexin V. *J. Mol. Biol.* 220, 199-203
- 126 Menke, M., Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C. (2004) The molecular arrangement of membrane-bound annexin A2-S100A10 tetramer as revealed by scanning force microscopy. *ChemBioChem* 5 (7), 1003-1006
- 127 Evans, T.C. and Nelsestuen, G.L. (1994) Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II. *Biochemistry* 33, 13231-13238
- 128 Bazzi, M.D. and Nelsestuen, G.L. (1991) Highly sequential binding of protein kinase C and related proteins to membranes. *Biochemistry* 30, 7970-7977
- 129 Becker, T., Weber, K. and Johnsson, N. (1990) Protein-protein recognition via short amphiphilic helices; a mutational analysis of the binding site of annexin II for p11. *Embo. J.* 9, 4207-4213
- 130 Gerke, V. and Weber, K. (1985) The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S100 protein of glial cells. *EMBO Journal* 4 (11), 2917-2920
- 131 Kang, H.-M., Kassam, G., Jarvis, S.E., Fitzpatrick, S.L. and Waisman, D.M. (1997) Characterization of Human Recombinant Annexin II Tetramer Purified from Bacteria: Role of N-Terminal Acetylation. *Biochemistry* 36, 2041 - 2050
- 132 Jost, M., Thiel, C., Weber, K. and Gerke, V. (1992) Mapping of three unique calcium-binding sites in human annexin II. *Eur. J. Biochem.* 207 (3), 923-930
- 133 Jost, M., Weber, K. and Gerke, V. (1994) Annexin II contains two types of Ca^{2+} -binding sites. *Biochem. J.* 298 (3), 553 - 559

- 134 Thiel, C., Osborn, M. and Gerke, V. (1992) The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca^{2+} -binding sites. *Journal of Cell Science* 103, 733-742
- 135 Ayala-Sanmartin, J., Gouache, P. and Henry, J.-P. (2000) N-Terminal Domain of Annexin 2 Regulates Ca^{2+} -Dependent Membrane Aggregation by the Core Domain: A Site Directed mutagenesis Study. *Biochemistry* 39, 15190-15198
- 136 Yoon, M.K., Park, S.H., Won, H.S., Na, D.S. and Lee, B.J. (2000) Solution structure and membrane-binding property of the N-terminal tail domain of human annexin I. *FEBS Lett.* 484 (3), 241-245
- 137 Keller, C.A., Glasmästar, K., Zhdanov, V.P. and Kasemo, B. (2000) Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Phys. Rev. Lett.* 84 (23), 5443-5446
- 138 Reimhult, E., Höök, F. and Kasemo, B. (2002) Vesicle adsorption on SiO_2 and TiO_2 : Dependence on vesicle size. *J. Chem. Phys.* 117 (16), 7401 - 7404
- 139 Reimhult, E., Höök, F. and Kasemo, B. (2003) Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure. *Langmuir* 19, 1681 - 1691
- 140 Faiss, S., Lüthgens, E. and Janshoff, A. (2004) Adhesion and rupture of liposomes mediated by electrostatic interaction mediated by thickness shear mode resonators. *European Biophysical Journal* 33 (6), 555-561
- 141 Seifert, U. (1997) Configurations of fluid membranes and vesicles. *Adv. Phys.* 46, 13-137
- 142 Adamczyk, Z. and Werónski, P. (1999) Application of the DLVO theory for particle deposition problems. *Adv. Colloid Interface Sci.* 83 (1-3), 137-226
- 143 Ruckenstein, E. (1978) Reversible rate of adsorption or coagulation of brownian particles - effect of the shape of the interaction potential. *J. Colloid Interface Sci.* 66, 531-543
- 144 Adamczyk, Z., Siwek, B., Weronski, P. and Jaszczołt, K. (2003) Particle deposition at electrostatically heterogeneous surfaces. *Colloids and Surfaces A*: 222, 15-25

7 ANHANG

7.1 Bestimmung des Vesikeldurchmessers

Der Durchmesser der unilamellaren Vesikel wurde mittels quasielastischer Lichtstreuung (Zetasizer 1000/3000, Malvern Instruments, U.K.) in Puffer Ca₁ von PD Dr. N. Kröger, Institut für Biochemie der Universität Regensburg, ermittelt. Die präparierten Vesikel hatten einen mittleren geometrischen Durchmesser von (120 ± 40) nm.

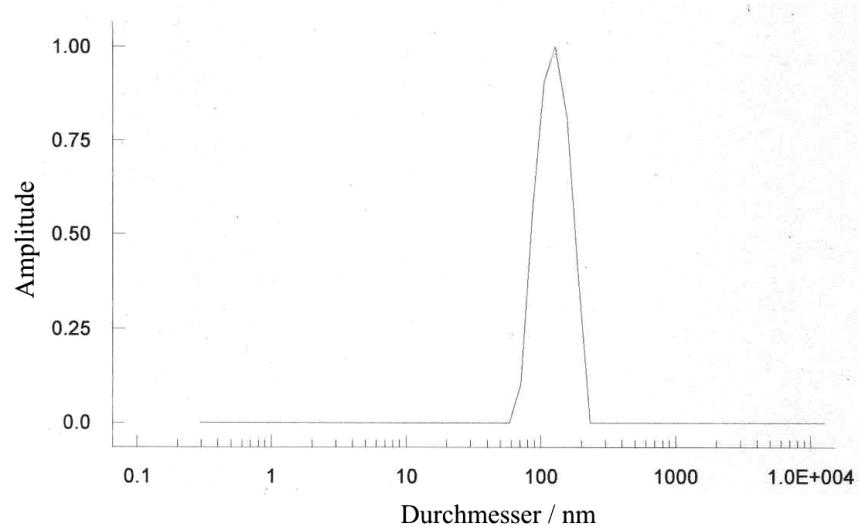


Abbildung 79: Größenverteilung des Durchmessers der unilamellaren Vesikel.

7.2 Berücksichtigung der Elektrostatik bei der Größe der Vesikel

Der geometrische Radius a der Vesikel wird durch den effektiven Radius a^* ersetzt:¹⁴⁴

$$a^* = a + h, \quad \text{GL- 51}$$

wobei h_s den Bereich für die spezifischen/elektrostatischen Wechselwirkungen durch:

$$h_s = \frac{1}{2} \kappa^{-1} \left(\ln \left(\frac{\phi_0}{\phi_{ch}} \right) - (\kappa a)^{-1} \ln \left(1 + \frac{1}{2} (\kappa a)^{-1} \ln \left(\frac{\phi_0}{\phi_{ch}} \right) \right) \right) \quad \text{GL-52}$$

mit

$$\phi_0 = 32\pi\epsilon_0\epsilon \left(\frac{kT}{e}\right)^2 \tanh^2\left(\frac{e\Psi}{4kT}\right) \quad \text{GL- 53}$$

und

$$\phi_{\text{ch}} = \frac{3}{2}kT \quad \text{GL- 54}$$

wiedergibt.

Ψ ist das Oberflächenpotential des Partikels, $(\kappa a)^{-1}$ ist die dimensionslose Dicke der Doppelschicht mit der Debye-Länge κ^{-1} , ϵ ist die Dielektrizitätskonstante von Wasser, e ist die Elementarladung, I ist die Ionenstärke der Lösung, ϕ_0 das Wechselwirkungspotential zwischen den bereits adsorbierten Partikel und denen in Lösung. ϕ_{ch} ($\phi_{\text{ch}} = 1.5kT$) ist das charakteristische Potential.¹⁴² Der effektive Radius a^* ist bei den in diesen Studien verwendeten Bedingungen typischerweise ein paar Nanometer (1-5 nm) größer als a (≈ 60 nm).

7.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-Bisacrylamid (30%)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Antikörper:	
Mouse Ig, HRP-linked	Amersham Biosciences, Freiburg
Rabbit Ig, HRP-linked	Amersham Biosciences, Freiburg
APS	Merck, Darmstadt
Argon	Linde AG, Höllriegelskreuth
Asolectin	Fluka, Neu-Ulm
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biotin-X-DHPE	Molecular Probes, Eugene (USA)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchloriddihydrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chrom	Bal Tec, Balzers (FL)
Coomassie Blue G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Blue R250	Serva, Heidelberg
Dithiotreitol, DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
E-64	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Na-Salz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA (Na-Salz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Entwicklerlösung	Eastman Kodak Company, Rochester (USA)
Essigsäure, Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol, reinst	Baker, Deventer (NL)
Fixierlösung	Eastman Kodak Company, Rochester (USA)
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Gold	Cressington über Elektronen-Optik-Service GmbH, Dortmund
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iod, I_2	Merck, Darmstadt
IPTG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhexacyanoferrat (II), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	Merck, Darmstadt
Kaliumiodid, KI	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lumigen TM TMA6 Lösung A und B	Amersham Biosciences, Freiburg
Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Mes	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol, reinst	Merck, Darmstadt
Mucasol [®]	Merck, Darmstadt
Natriumazid, NaN_3	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
1-Oktanthiol	Fluka, Neu-Ulm
Phosphorsäure H ₃ PO ₄ 85%	Merck, Darmstadt
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
POPG	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
POPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Proteinmarker (<i>wide range, low range</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure, HCl	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
Streptavidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sucrose, Saccharose	Merck, Darmstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	USB, Cleveland (USA)
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-InhibitorT9253	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Tween20	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt

7.4 Materialien

5-MHz-AT-cut Quarze	KVG, Neckarbischofsheim
Cantilever CSC37/Al BS	MikroMasch, Portland (USA)
Cellophan	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
DE-52-Material	VWR International, Darmstadt
Dialyseschläuche VISKING Typ 27/32	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Einwegküvetten Plastikbrand	Brand, Wertheim
Filterpapier	BioRad, Hercules (USA)
Glimmer-Plättchen	Plano
Hydroxyapatit, BioGel [®] HT Gel	BioRad, Hercules (USA)
Kalrez [®] -Dichtringe	Du Pont Company, Wilmington (USA)
Magermilchpulver	VWR International, Darmstadt
Mikroliterspritze	Hamilton, Bonaduz (CH)
Mono-S-HR5/5	Amershan Biosciences, Freiburg
Nitrozellulose	BioRad, Hercules (USA)
Phenylsepharose-Material	Amershan Biosciences, Freiburg
Photopapier	Eastman Kodak Company, Rochester (USA)
Platindraht	Good Fellow, Cambridge (GB)
Polycarbonatmembranen, (Porendurchmesser 100 nm)	Avestin, Ottawa (USA)
Q-Sepharose TM -Fast Flow	Amershan Biosciences, Freiburg
Quarzküvetten	Hellma GmbH, Mühlheim

SephacrylS-200-HR
 Silberleitkleber
 Stopper-Schläuche, Tygon
 Teflonschläuche
 Trocknungsrahmen für Gele

Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Konrad, Weiden
 Ismatec, Wertheim-Mondfeld
 VWR International, Darmstadt
 Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

7.5 Geräte

Aufdampfanlage

Balzers BAE 250 coating system

Bal-Tec, Schalksmühle

Impedanzspektrometer

Impedance Gain-Phase Analyzer SI1260

Solartron Instruments, Farnborough (GB)

Proteinaufreinigung

FPLC-System:
 Conductivity monitor
 Control Unit UV-1
 Dual-Channel Recorder Rec102
 Fraktionssammler SuperFracTM
 Gradient Programmer GP-250 Plus
 High Precision Pump P-500
 Mixer
 Optical Unit UV-1
 Superloop 150 ml
 Valve V-7

Amersham Biosciences, Freiburg

1-Channel recorder
 Fraktionssammler Ultronac
 Glas-Teflon-Homogenisator:

Zell-Homogenisator
 Potter[®]S
 Kühlkabinett Unichromat
 Messerhomogenisator
 Mikro-Tip Branson Sonifier 250

Ultrazentrifugen

UV-Detektor Uvicords
 Zentrifugen

QCM-D

QCM

Frequenzzähler 53181A
 Netzteil HP E3630A
 Oszillatorschaltkreis

LKB, Bromma (S)
 LKB, Bromma (S)

Colora Messtechnik GmbH, Lorch
 B. Braun, Biotech International
 UniEquip, Martinsried
 Waring Products, New Hartford (USA)
 Branson, über G. Heinemann
 Laborchemikalien, Schwäbisch Gmünd
 Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
 Kontron, München
 LKB, Bromma (S)
 Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
 Sorvall, über Kendro Laboratory Products
 GmbH, Langenselbold

Eigenbau AK Steinem

Hewlett-Packard, San Diego (USA)
 Hewlett-Packard, San Diego (USA)
 Texas Instruments, Dallas (USA)

TTL SN74LS124N	
Magnetrührer	Neo Lab, Heidelberg
Peristaltikpumpe	Reglo Digital
Thermostat	RM6
	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
	Lauda, Königshofen
Rasterkraftmikroskopie	
NanoWizard Rasterkraftmikroskop	JPK Instruments, Berlin
Reinstwasseranlage	
MilliQ plus 185	Millipore, Eschborn
Milli RO 3 plus	Millipore, Eschborn
Sonstiges	
Drehschieberpumpe	Vacuubrand GmbH, Wertheim
Feinwaage	Ohaus, Giessen
Gelektrophorese-Apparatur	LTF Labortechnik, Wasserburg
Thermo EC120	
Spannungsquelle Consort E844	Avestin, Ottawa (USA)
Minieextruder, Liposofast®	Knick, Berlin
pH-Meter <i>Calimatic</i> 766	Knick, Berlin
pH-Einstabsmesskette SE100	Harrick, New York (USA)
Plasmareiniger	Heidolph, Schwabach
Schüttler Reax	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge S5415R	BioRad, Hercules (USA)
Trans-Blot® SB	
Semi-Dry Transfer Cell	Bandelin, Berlin
Spannungsquelle PowerPac200	Varian, Palo Alto (USA)
Ultraschallbad Sonorex	Binder, Tuttlingen
UV-Spektrometer Cary50	analytics GmbH, Neu-Ulm
Vakuumtrockenschrank	
Wasserbad Ecotherm	

7.6 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic force microscopy</i>)
AL	<i>Acoustic-Load</i>
Ala	Alanin
Anx	Annexin
Anx A1	Annexin A1
Anx A1 _{ac}	N-terminal acetyliertes Annexin A1 aus Schweinelunge
Anx A1 _{n-ac}	nicht-acetyliertes Annexin A1 aus <i>E.coli</i>
Anx A2m	Annexin A2-Monomer
Anx A2t	(Annexin A2) ₂ -(S100A10) ₂ -Heterotetramer
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Biotin-X-DHPE	N-((6-(biotinoyl)-amino)hexanoyl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin,

BSA	Rinderserumalbumin
BVD	Butterworth van Dyke
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPS	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin
DTT	1,4-Dithiotreitol
E-64	trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-Guonidino)-butan
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ESI	Elektrosprayionisation
FPLC	Flüssigchromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
GL	Gleichung
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i>
LFM	Reibungskraftmikroskopie (<i>lateral force microscopy</i>)
LUV	große unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicles</i>)
Lys	Lysin
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption/-ionisation (<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>)
Mes	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Met	Methionin
min	Minute
MLV	multilamellare Vesikel
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
OT	1-Oktanthiol
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PG	Phosphoglycerol
PI	Phosphoinositol
pI	isoelektrischer Punkt
PKC	Protein Kinase C
PL	Phospholipid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
POPS	1-Palmitoyl-2-Oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidfluorid
rpm	<i>rounds per minute</i>
QCM	Quarzmikrowaage (Quartz Crystal Microbalance)
QCM-D	Dissipative Quarzmikrowaage-Technik
SAW	Oberflächenschwinger (<i>surface acoustic wave</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFM	Rasterkraftmikroskop (<i>scanning force microscopy</i>)
SPR	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>)
SSM	festkörperunterstützte Membran (<i>solid supported membrane</i>)
TL	<i>Transmission-Line</i>

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TSM	Dickenscherschwinger (<i>thickness shear mode</i>)

7.7 Symbolverzeichnis

a	Radius	N	Materialkonstante
c	Konzentration	Q	Ladung, Güte
d	Dicke, Abstand	R	Radius, Widerstand
e	Elementarladung	Re	Realteil einer komplexen Zahl
f	Frequenz	T	absolute Temperatur
h	Höhe, Korrektur des Vesikelradius	U	Spannung
k	Federkonstante, Ratenkonstante, Boltzmannkonstante	V	Volumen, akust. Faktor
m	Masse	Z	Impedanz
n	Laufzahl, Stoffmenge	α	Dämpfungskonstante
r	Radius	$\bar{\alpha}$	Flussintensitätsparameter
t	Zeit	δ	Abklinglänge
v	Geschwindigkeit	ε	Extinktionskoeffizient
z	Koordinate, Ladung	ε_0	elektrische Feldkonstante
A	Fläche	ε_r	Dielektrizitätskonstante
C	Kapazität	ϕ	Potentialbarriere
C_f	Schichtwäge-empfindlichkeit	η	Viskosität
D	Dissipationsfaktor	φ	Phasenverschiebung
	Diffusionskonstante	λ	Wellenlänge
E	Extinktion	μ	Schermodul, Chemisches Potential
G	freie Enthalpie, Schermodulus	ρ	Dichte
I	Strom, Ionenstärke	θ	Belegungsgrad
Im	Imaginärteil einer komplexen Zahl	τ	Abklingzeit
J	Fluss	ω	Kreisfrequenz
K	Gleichgewichtskonstante	Γ	Oberflächenkonzentration
L	Induktivität, Ligand	Δ	Differenz, Änderung
M	molare Masse, Masseeffekt	Φ	Oberflächenblockierungsfunktion
		ψ	Oberflächenpotential
			Wahrscheinlichkeit

Lebenslauf

Name	Katja Franziska Kastl
geboren	27.06.1977 in Kötzing
Eltern	Johann Kastl und Maria Kastl (geb. Fischer)
Schulbildung	Grundschule Rimbach von 09/1983 bis 07/1987 Benedikt-Stattler Gymnasium Kötzing von 09/1987 bis 06/1996 <u>Allgemeine Hochschulreife am 28.06.1996</u>
Studium	Studium der Chemie an der Universität Regensburg von 10/1996 bis 12/2001 <u>Vordiplom im Fach Chemie am 20.10.1998</u> Diplomarbeit am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg in Kooperation mit dem Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem von 04/2001 bis 12/2001 <u>Diplom im Fach Chemie am 18.12.2001</u>
Tätigkeiten	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie der WWU Münster von 04/2001 bis 09/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg von 01/2002 bis 05/2002 und von 06/2004 bis 02/2005
Förderungen	Mitglied des Graduiertenkollegs GRK 760 „Medizinische Chemie: Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft von 04/2002 bis 02/2005 Stipendiatin des Graduiertenkollegs von 06/2002 bis 05/2004
Dissertation	Beginn der Dissertation am 01.01.2002 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem

Liste der Publikationen und Poster

Publikationen:

Kastl, K., Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C. Kinetics and Thermodynamics of Annexin A1 Binding to Solid-Supported Membranes: A QCM-Study. *Biochemistry* **2002**, 41(31), 10087-10094

Kastl, K., Herrig, A., Luethgens, E., Janshoff, A. and Steinem, C. Scrutiny of annexin A1 mediated membrane-membrane interaction by means of a thickness shear mode resonator and computer simulations. *Langmuir* **2004**, 20 (17), 7246-7253

Luethgens, E., Herrig, A., Kastl, K., Steinem, C., Reiss, B., Wegener, J., Pignataro, B. and Janshoff, A. Adhesion of liposomes: A quartz crystal microbalance study. *Measurement Science and Technology* **2003**, 14(11), 1865-1875.

Kastl, K., Faiss, S., Luethgens, E., Janshoff, A. and Steinem, C. Reversibility and organization of the interaction of annexin A1 with solid supported membranes. in preparation

Posterpräsentationen:

„Interactions of Annexin A1 with artificial membrane systems“
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik / NanoBioTec, September 2001, Münster

„Influence of cholesterol on the binding of annexin A1 to solid supported membranes“
International Workshof on Lipid-Peptide / Lipid-Protein Interactions, März 2002, Gomadingen

„Quantification of Phospholipid Binding and Membrane Aggregation of Annexin A1 by Means of the Quartz Crystal Microbalance“
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2002, Dresden

„Interaction of Annexin A1 with S100A11 and their role in membrane aggregation“
Summer School „Medicinal Chemistry“, September 2002, Regensburg

„Membrane Aggregation and Ca^{2+} -dependent Phospholipid Binding Reversibility of Annexin A1“
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2004, Freiburg und Summer School „Medicinal Chemistry“, Oktober 2004, Regensburg

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle

Prof. Dr. Claudia Steinem für die Bereitstellung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und die uneingeschränkte Unterstützung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Volker Gerke vom Institut für Medizinische Biochemie der WWU Münster für die Diskussionsbereitschaft, die Bereitstellung der transformierten Bakterien und dass ich die Proteinisolierungen mehrfach in seinem Arbeitskreis vornehmen konnte.

Prof. Dr. Andreas Janshoff vom Institut für Physikalische Chemie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, und seinen Mitarbeitern Eike Lüthgens und Simon Faiss für die Durchführung der Computersimulationen und ihre Diskussionsbereitschaft.

allen Leuten, die Messungen für mich durchgeführt haben:

E. Hochmuth vom Arbeitskreis Prof. Deutzmann, Institut für Biochemie, Genetik und Molekularbiologie der Universität Regensburg, für die Aufnahme der Massenspektren und die Proteinsequenzierungen.

PD Dr. N. Kröger vom Institut für Biochemie, Genetik und Molekularbiologie der Universität Regensburg für die Durchführung der Lichtstreuungsexperimente.

allen Helfern (Michaela, Manuela, Alexander, Melanie, Christian, Simon, Claudia P., Björn und den Mitarbeitern des AK Gerke) bei den Proteinisolierungen, besonders Michaela Meyer (geb. Ross), dass sie mir die biochemischen und biophysikalischen Techniken beigebracht hat, und Manuela Menke für tage- und nächtelanges Mitkämpfen um die Annexine. Außerdem möchte ich mich bei Manuela besonders für die hilfreichen Annexin-Diskussionen und ihre Unterstützung bei den SFM-Messungen bedanken.

Alex, Manuela, Christian, Eva und Marion fürs Korrekturlesen.

allen meinen Laborkollegen für die stetige Hilfsbereitschaft und die lockere Stimmung in- und außerhalb des Labors, sowie für die vielen auflockernden, spontanen Kaffeeraum-, Raucherecken- und Grillsessions. Besonders bedanken möchte ich mich bei Natascha, Winni, Manuela, Alexander, Claudia, Christian, Michaela und Janine für ihre ständigen Aufmunterungen.

meinen Studienkollegen, mit denen ich eine unvergessliche Studienzeit verbringen durfte.

meiner Familie, die immer hinter mir steht und mich unterstützt.

Conclusion

Annexin A1, like all annexins, binds to negatively charged phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner and is also able to aggregate membranes.

In this study it was possible to investigate the Annexin A1's primary, Ca^{2+} -dependent interaction to negatively charged, solid supported phospholipid membranes separated from the secondary membrane interaction. The interaction was visualised by means of scanning force microscopy (SFM) and quantified by the quartz crystal microbalance (QCM)-technique. Solid supported membranes, immobilised on the gold electrode of a 5 MHz quartz plate, were used, composed of a chemisorbed octanethiol (OT) monolayer and a second POPC/POPS (4:1)-phospholipid layer. QCM data reveal that annexin A1 adsorbs on POPC/POPS (4:1)-membranes in a Ca^{2+} -dependent manner and desorbs after complexing the Ca^{2+} -ions. The surface coverage after adsorption increases with increasing Ca^{2+} -concentrations. Monitoring the adsorption and desorption in various different Ca^{2+} -concentrations demonstrated that only part of the protein binds in a reversible fashion while most protein (60-80 %) binds irreversibly. Imaging POPC/POPS (4:1)-bilayers, immobilised on mica, after protein incubation by means of SFM, two-dimensional clusters of irreversibly bound Annexin A1 was visualised that varies in size and distribution. Based on these results a model for the Annexin A1-membrane interaction is proposed, where the protein adsorbs irreversibly on Ca^{2+} -induced, PS-enriched domains in the membrane while it binds to the other part of the membrane in a reversible manner. Within this picture the rate constants of the different interaction modes were determined by means of computer simulations. Adsorption rates for the irreversible adsorption process $k_{\text{on}}^{\text{irr}}$ revealed to be one or two orders of magnitude larger than rate constants for the reversible adsorption k_{on} . Increasing the Ca^{2+} -concentrations resulted in a faster irreversible adsorption and higher affinity of the reversible interaction.

Binding studies of vesicles to annexin A1, bound to a solid supported membrane, were carried out to investigate the second membrane binding event separated from the first one. The dissipative quartz crystal microbalance-technique (QCM-D) allowed to not only quantify the amount of adsorbed vesicles but dissipation monitoring indicated that bound vesicles stay always intact on the surface and do not rupture. The vesicle adsorption process turned out to be fully irreversible and is mediated by two-dimensional annexin clusters. As the amount of bound vesicles to N-terminally truncated Δ^{1-29} Annexin A1 is significantly diminished, it is conducted that the N-terminus plays a crucial role in the membrane aggregation process. Supported by computer simulations, the results demonstrate that the vesicle adsorption process is in part electrostatically driven but compared to sole electrostatic binding the rate constants

of adsorption are by one to two orders of magnitudes smaller indicating the presence of a potential barrier of about $(5.0 \pm 1.5) kT$.

Finally, the interaction of Annexin A1 with its cellular ligand S100A11 was investigated. By means of ligand blotting and vesicle assays it was shown that S100A11 interacts with Annexin A1 in a Ca^{2+} -dependent manner, but not with N-terminally truncated Δ^{1-29} Annexin A1. In contrast to literature, the N-terminal acetylation of Annexin A1 turned out not to be essential for the interaction with S100A11. The selectivity of the interaction of Annexin A1 with S100A11 was rather poor, since binding was also observed between Annexin A2 and S100A11. QCM-measurements showed that neither S100A11 binds to membrane-bound Annexin A1, nor the structurally related S100A10 binds to membrane-bound Annexin A2. It is conducted that the S100-binding sites are blocked due to lateral aggregation of membrane-bound Annexin. Thus, it is proposed that S100A11 is only able to interact with Annexin A1 in solution and the Annexin A1-S100A11 complex exhibits a smaller affinity to POPC/POPS (4:1)-membranes than monomeric Annexin A1. Furthermore, it was shown that S100A11 reduces the kinetics of tryptic proteolysis of the Annexin A1's N-terminus. Therefore, it is assumed that S100A11 does not only affect the membrane binding of Annexin A1 but also regulates proteolysis and consequently might be involved in the regulation of the cellular localisation of Annexin A1.