

**Dynamik einer lokalen Strukturregion von  
Phospholipase A<sub>2</sub> aus Schweinepankreas und ihr  
Einfluss auf die Stabilität des Proteins**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des akademischen Grades**

**Doctor rerum naturalium (Dr. rer. Nat.)**

**vorgelegt der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie**

von Knut Kölbel

geb. am 14.08.1977 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann
2. Prof. Dr. R. Seckler

Halle (Saale), den 08.11.2006

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung und Aufgabenstellung.....	5
2 Theoretischer Teil.....	7
2.1 Stabilität von Proteinen.....	7
2.2 Bestimmung der Stabilitätsparameter.....	8
2.2.1 Denaturanzinduzierte Übergänge.....	9
2.2.2 Thermische Übergangskurven.....	11
2.2.3 Bestimmung kinetischer Stabilitätsparameter.....	12
2.2.4 Temperaturabhängigkeit von $k_u$ .....	15
2.2.5 Messungen der Entfaltung mittels HD-Austausch.....	16
2.2.6 Entfaltungsmessungen mittels limitierter Proteolyse.....	17
2.3 Phospholipase A <sub>2</sub> aus Schweinepankreas.....	21
2.3.1 Übersicht über die Phospholipase A <sub>2</sub> -Familie.....	21
2.3.2 Übersicht der Eigenschaften von PLA <sub>2</sub> .....	23
2.3.3 Aktivierung von PLA <sub>2</sub> durch Bindung an Phospholipidgrenzflächen.....	23
2.3.4 Prämicellare Mischaggregation.....	26
2.3.5 PLA <sub>2</sub> -katalysierte Hydrolyse.....	27
2.3.6 Bindung und Umsatz artifizieller Liganden und Substrate durch PLA <sub>2</sub> .....	29
2.3.7 Stabilität von PLA <sub>2</sub> .....	31
3 Materialien und Methoden.....	33
3.1 Verwendete Materialien.....	33
3.2 Methoden.....	34
3.2.1 Reinigung der PLA <sub>2</sub> .....	34
3.2.2 Synthese von NOB.....	35
3.2.3 Messung der Größe der NOB-Partikel.....	35
3.2.4 Messung der enzymatischen Aktivität von PLA <sub>2</sub> gegen NOB.....	35
3.2.5 CD-Spektroskopie.....	36
3.2.6 Fluoreszenzspektroskopie.....	37
3.2.7 Messungen mittels <i>stopped-flow</i> -Fluoreszenz.....	38
3.2.8 Messung thermischer Übergangskurven mittels UV/Vis-Spektroskopie.....	39
3.2.9 Limitierte Proteolyse.....	39
3.2.10 NMR-Spektroskopie.....	41

---

4 Ergebnisse und Diskussion .....	44
4.1. Charakterisierung nativer PLA <sub>2</sub> .....	44
4.1.1 Besonderheiten der Aktivität von PLA <sub>2</sub> gegen NOB.....	44
4.1.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivierung von PLA <sub>2</sub> .....	47
4.1.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung von Liganden.....	49
4.1.3 Einfluss des pH-Wertes auf die native Struktur von PLA <sub>2</sub> .....	51
4.1.4 NMR-Spektren von PLA <sub>2</sub> .....	57
4.1.5 Zusammenfassende Diskussion .....	62
4.2 Thermodynamische Stabilität von PLA <sub>2</sub> .....	64
4.2.1 Einfluss von GuHCl auf Struktur und Stabilität von PLA <sub>2</sub> .....	64
4.2.2 Thermische Übergangskurven in Gegenwart von GuHCl .....	69
4.2.3 GuHSCN-induzierte Übergangskurven.....	70
4.2.4 Stabilitätsbestimmung mittels HD-Austausch .....	72
4.2.4 Einfluss des pH-Wertes auf die thermische Stabilität .....	75
4.2.5 Zusammenfassende Diskussion .....	78
4.3 Kinetische Stabilität von PLA <sub>2</sub> .....	81
4.3.1 Spektroskopisch verfolgte mittels manueller Mischung gestartete Messungen.....	81
4.3.2 Entfaltungsmessungen von PLA <sub>2</sub> mittels <i>stopped-flow</i> -Fluoreszenz.....	82
4.3.3 Rückfaltungsmessungen von PLA <sub>2</sub> mittels <i>stopped-flow</i> -Fluoreszenz .....	84
4.3.4 Entfaltungsmessungen mittels limitierter Proteolyse.....	86
4.3.5 Entfaltungsmessungen in Anwesenheit von GuHSCN .....	90
4.3.6 Einfluss der Temperatur auf die kinetischen Stabilitätsparameter von PLA <sub>2</sub> .....	92
5 Zusammenfassende Diskussion.....	96
6. Tabellarischer Anhang.....	101
6.1. Einfluss des pH-Wertes auf native PLA <sub>2</sub> .....	101
6.2 Thermodynamische Stabilitätsparameter von PLA <sub>2</sub> .....	102
6.3 Entfaltungskonstanten von PLA <sub>2</sub> .....	105
6.4 NMR-Spektren von PLA <sub>2</sub> .....	106
Literaturverzeichnis.....	111
Danksagung .....	120
Erklärung.....	120
Lebenslauf.....	121

## Abkürzungsverzeichnis

ANS	1-Anilino-8-naphtalensulfonat
apoPLA <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup> -freie PLA <sub>2</sub>
bpPLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas
bvPLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> aus dem Gift der Europäischen Honigbiene
CD	Circulardichroismus
<i>cmc</i>	Kritische Micellbildungskonzentration
D	Denturans
[D]	Denaturationskonzentration
$\Delta G$	Änderung der freien Enthalpie
$\Delta H$	Enthalpieänderung
$\Delta C_p$	Änderung der spezifischen Wärmekapazität
$\Delta S$	Entropieänderung
$\Delta Y$	Signaländerung
$\Delta Y^{\text{tot}}$	Gesamtänderung des Signals
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GuHSCN	Guanidiniumisothiocyanat
holoPLA <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup> -haltige PLA <sub>2</sub>
HNB	4-Hydroxy-3-nitrobenzoat
HD	Protium/Deuterium
KE	Kunitz-Einheiten
<i>irs</i>	<i>interface recognition site</i>
<i>m</i>	Abhängigkeit eines Stabilitätsparameters von [D]
N	nativer Zustand
N <sup>E</sup>	<i>exposed</i> , nativer Zustand mit exponiertem Tryptophan
N <sup>R</sup>	<i>rigid</i> , nativer Zustand mit rigiderer Struktur
NOB	4-Nitro-3-octanoyloxybenzoat
NaDOC	Natriumdesoxychololat
NOE	<i>nuklear Overhauser enhancement</i>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> aus dem Schweinepankreas
RF <sub>350 nm</sub>	relative Fluoreszenzintensität bei 350 nm
SASA	<i>solvent accessible surface area</i> , lösungsmittelzugängliche Proteinoberfläche
$\Delta$ SASA	entfaltungsbedingte Änderung der lösungsmittelzugänglichen Proteinoberfläche

SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
$T$	Temperatur
U	entfalteter Zustand
Y	gemessenes Signal
$Y_N$	für N repräsentatives Signal
$Y_U$	für U repräsentatives Signal

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Untersuchung der Faltungs- und Entfaltungsereignisse von Proteinen erfolgt aus verschiedenen Fragestellungen heraus. Zunächst ist die Frage, wie aus der linearen Aminosäureabfolge die in ihr festgelegte komplexe dreidimensionale Raumstruktur eines korrekt gefalteten Proteins entsteht, von grundsätzlichem Interesse. Weiterhin hat die Stabilität eines Proteins sowohl wirtschaftliche Bedeutung, z.B. im Hinblick auf Lagerung, Transport und Einsatz von in industriellen Prozessen verwendeten Enzymen, als auch bei Erkrankungen, die auf Fehlfaltungen von Proteinen zurückgeführt werden konnten, wie z.B. BSE, Alzheimer oder Parkinson, zunehmende medizinische Relevanz.

Phospholipase A<sub>2</sub> aus der Pankreasflüssigkeit des Schweins (PLA<sub>2</sub>) ist, nicht zuletzt wegen ihrer leichten Verfügbarkeit, ihrer hohen Löslichkeit und ihrer Robustheit gegenüber denaturierenden Einflüssen, ein für industrielle Prozesse und enzymkinetische Untersuchungen gern verwendetes und strukturell gut charakterisiertes Protein. Darüber hinaus verfügt sie, wie andere sekretorische Phospholipasen A<sub>2</sub> auch, über einige Besonderheiten, die in interessanten kinetischen Verhaltensweisen resultieren und sie aufgrund der erwähnten Vorzüge stellvertretend für viele mehr oder minder ähnliche Enzyme zum Studienobjekt für Grenzflächenaktivierung werden ließen. Untersuchungen zur Stabilität dieses Proteins, aber auch des mit ihm eng verwandten Vertreters aus dem Rinderpankreas (bpPLA<sub>2</sub>), den Giften der Europäischen Honigbiene (bvPLA<sub>2</sub>) oder verschiedener Schlangen erfolgten jedoch eher selten und mit wenigen Ausnahmen <sup>2; 3; 4</sup> im Rahmen von Untersuchungen der Auswirkungen von Aminosäureaustauschen auf den Reaktionsmechanismus <sup>5; 6; 7</sup> oder die Grenzflächenaktivierung <sup>8</sup>. Jedoch bieten gerade die Besonderheiten des Enzyms, wie seine Calciumabhängigkeit oder die strukturelle Basis seiner Aktivierung durch Bindung an Phospholipidgrenzflächen, interessante Ansatzpunkte und Fragestellungen für Untersuchungen zum Faltungs- bzw. Entfaltungsvorgang. Solchen Fragestellungen widmet sich die dieser Arbeit vorangegangene Diplomarbeit <sup>9</sup>. So wurde beispielsweise festgestellt, dass die PLA<sub>2</sub> im Vergleich zu bvPLA<sub>2</sub> zwar deutlich resistenter gegenüber Denaturanzien, jedoch aufgrund einer geringeren Kooperativität der Entfaltung thermodynamisch instabiler ist. Als Erklärung wurde ein stabiles Intermediat im Übergangsbereich diskutiert; seine Existenz konnte indes weder schlüssig nachgewiesen noch ausgeschlossen werden.

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Promotionsarbeit bestand daher darin, den Faltungs- bzw. Entfaltungsvorgang von PLA<sub>2</sub> eingehend zu charakterisieren. Dies beinhaltete den konkreten Nachweis für einen Zweizustandsmechanismus oder gegebenenfalls für das Vorkommen von Faltungsintermediaten. Weiterhin waren Erklärungen für die vergleichsweise geringe Kooperativität des Entfaltungsvorganges und die Stabilisierung durch den Cofaktor Ca<sup>2+</sup> zu suchen.

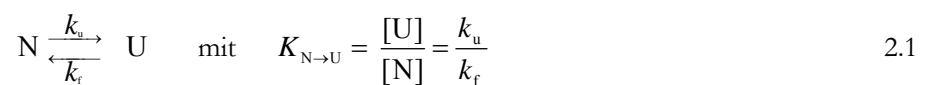
Hierfür bedurfte es differenzierter Techniken, um die entsprechenden Reaktionen in adäquater zeitlicher Auflösung zu verfolgen und die korrekten thermodynamischen wie auch kinetischen Stabilitätsparameter

zu ermitteln. Ein weiteres Ziel war, die jeweiligen Proteinspezies und Vorgänge möglichst auf der Ebene der einzelnen Aminosäuren zu charakterisieren. Daher wurden für Messungen des gesamten Molekülensembles die herkömmlichen spektroskopischen Verfahren auch in Verbindungen mit schnellen Mischtechniken verwendet. Durch den Einsatz hochauflösender Methoden, wie die Messung des HD-Austausches mittels NMR-Spektroskopie und limitierte Proteolyse, gelang es, die gefundenen Ergebnisse zu präzisieren, aber auch Rückschlüsse auf die Natur der nativen Spezies zu ziehen. Dies betrifft insbesondere Regionen im nativen Protein, die sich durch erhöhte Flexibilität und Lösungsmittelzugänglichkeit auszeichnen. Besonders hierfür erwies es sich als vorteilhaft, die Untersuchung über den für Stabilitätsstudien mit PLA<sub>2</sub> verwendeten pH-Bereich auszudehnen und den Einfluss verschiedener pH-Werte auf die Struktur nativer PLA<sub>2</sub> auch in Abwesenheit von Denaturanzien zu untersuchen.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Stabilität von Proteinen

Die Ausbildung bzw. das Vorliegen ihrer korrekt gefalteten dreidimensionalen Struktur ist die Grundvoraussetzung der meisten Proteine für die Ausübung ihrer biologischen Funktion. Die Struktur eines Proteins ist in mehrere Hierarchien gegliedert. Die lineare Aminosäureabfolge wird als Primärstruktur bezeichnet. Die Informationen für die Anordnung des Polypeptidrückgrates (Sekundärstruktur) wie auch die räumliche Orientierung sämtlicher Aminosäuren untereinander (Tertiärstruktur) sind bereits in ihr determiniert<sup>10</sup>. Bei oligomeren Proteinen kommt hierzu noch die Organisation der einzelnen Untereinheiten (Quartärstruktur). Thermodynamisch betrachtet liegt jedes Protein in Lösung auch unter nativen Bedingungen in einem Gleichgewicht zwischen seinem nativ gefalteten und dem entfalteten Zustand vor (Gleichung 2.1). Je nach Komplexität der Proteinstruktur oder des betreffenden Faltungsvorganges können auch teil- oder fehlgefaltete Strukturen hinzukommen. Mit Ausnahme kinetisch stabilisierter Proteine, wie z.B. einiger Proteasen<sup>11; 12</sup> ist davon auszugehen, dass der native Zustand N eines Proteins aufgrund attraktiver Interaktionen zwischen den Aminosäuren das Energieminimum der Energielandskarte von Proteinen darstellt (Abb. 2.1). Im Gegensatz zum vollständig entfalteten Zustand U, der durch das Fehlen jeglicher intramolekularer Interaktionen und Strukturen einerseits, sowie ausgeprägter Heterogenität andererseits geprägt wird, ist N durch die erwähnte hierarchische Struktur und damit verbunden durch einen hohen Ordnungsgrad und eine geringe Populationsbreite gekennzeichnet (Abb. 2.1 B). Gleichung 2.1 beschreibt das Entfaltungsgleichgewicht zwischen N und U mit der Gleichgewichtskonstante  $K_{N \rightarrow U}$  und den Geschwindigkeitskonstanten von Hin- und Rückreaktion,  $k_u$  und  $k_f$ .



Die Differenz der freien Enthalpien von N und U,  $\Delta G_{N \rightarrow U}$ , ist als die thermodynamische Stabilität eines Proteins definiert. Sie ist nach Gleichung 2.2 mit  $K_{N \rightarrow U}$  verbunden.

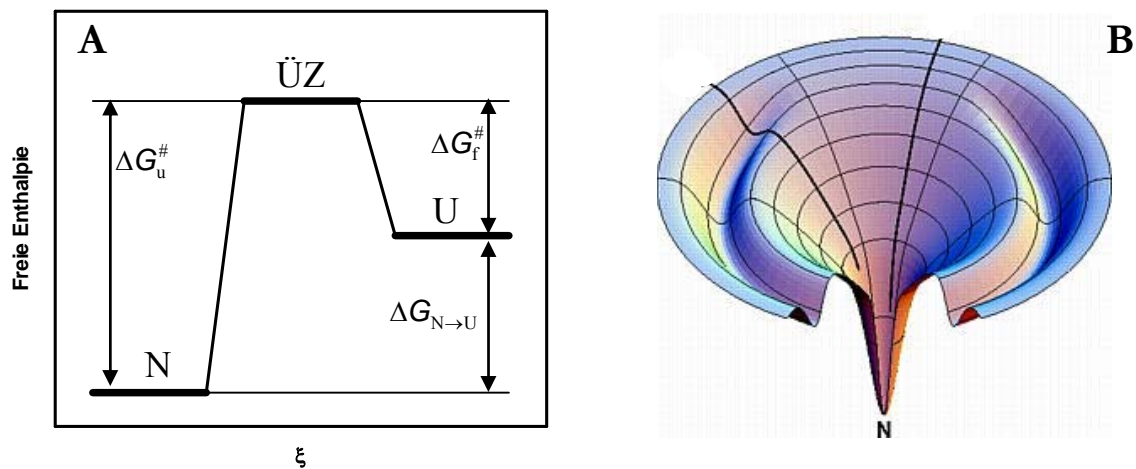
$$\Delta G_{N \rightarrow U} = -RT \ln K_{N \rightarrow U} \quad 2.2$$

Entsprechend der Gibbs-Gleichung setzt sich  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  aus einem enthalpischen ( $\Delta H_{N \rightarrow U}$ ) und einem entropischen ( $\Delta S_{N \rightarrow U}$ ) Term zusammen (Gleichung 2.3).

$$\Delta G_{N \rightarrow U} = \Delta H_{N \rightarrow U} - T\Delta S_{N \rightarrow U} \quad 2.3$$

Typischerweise beträgt  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  für monomere, globuläre Proteine in wässriger Lösung 8-60 kJ·mol<sup>-1</sup><sup>13</sup>. N bzw. U sind über den Übergangszustand ÜZ verbunden, dessen freie Enthalpiebarrieren gegenüber





**Abbildung 2.1** Schematische Darstellungen des Entfaltungsgleichgewichtes von Proteinen. **A:** Auftragung der freien Enthalpien von N, U und ÜZ gegen die Reaktionskoordinate  $\xi$ . Die Bedeutung der anderen Symbole wird im Text erläutert. **B:** Darstellung eines Energietrichters mit N als Minimum. Dabei wurde Enthalpie des Systems gegen die Entropie und eine beliebige weitere Eigenschaft aufgetragen (Quelle: <http://www.dillgroup.ucsf.edu>).

beiden Zuständen,  $\Delta G_f^\#$  bzw.,  $\Delta G_u^\#$ , die auch als kinetische Stabilität bezeichneten freien Aktivierungsenthalpien für Ent- bzw. Rückfaltungsreaktion sind. Sie sind über Gleichung 2.4 definiert. Dabei repräsentiert der Index „x“ die jeweilige Reaktion,  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $k_B$  die Boltzmannkonstante.

$$\Delta G_x^\# = -RT \ln \left( \frac{k_x h}{k_B T} \right) \quad 2.4$$

Wie auch aus Abbildung 2.1 A ersichtlich ist, sind die kinetische und die thermodynamische Stabilität des Systems miteinander über Gleichung 2.5 verbunden. Gleichung 2.3 gilt analog auch für  $\Delta G_u^\#$  und  $\Delta G_f^\#$ .

$$\Delta G_u^\# = \Delta G_f^\# + \Delta G_{N \rightarrow U} \quad 2.5$$

## 2.2 Bestimmung der Stabilitätsparameter

Eine übliche Methode zur Bestimmung der Stabilitätsparameter von Proteinen ist die gezielte Beeinflussung der Lage des Gleichgewichtes durch die äußeren Bedingungen, um messbare Quantitäten von U zu erhalten. Dies kann durch extreme Temperaturen oder pH-Werte, die Anwesenheit denaturierender Chemikalien (Denaturanzien) oder eine Kombination daraus geschehen. Als Konsequenz der geringeren Stabilität von N unter diesen Bedingungen werden je nach Intensität des destabilisierenden Einflusses signifikante Mengen von U populiert, bis hin zur vollständigen Entfaltung des Proteins. Die Menge von N oder U kann dabei mittels verschiedener, beispielsweise spektroskopischer Methoden wie Circular dichroismus (CD), Fluoreszenz, UV/Vis- oder Infrarotspektroskopie detektiert und gegen die Intensität des destabilisierenden Einflusses aufgetragen werden. Die resultierenden, auch Schmelzkurven

genannten Transitionskurven zwischen N und U ermöglichen die Bestimmung von  $K_{N \rightarrow U}$  <sup>14</sup>.

## 2.2.1 Denaturanzinduzierte Übergänge

Der Einsatz denaturierender Agenzien, wie Harnstoff, Guanidiniumchlorid (GuHCl) oder Guanidiniumisothiocyanat (GuHSCN) gehört zu den am häufigsten verwendeten Methoden zur Bestimmung von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$ , nicht zuletzt, da die Aggregation hierfür anfälliger Proteinspezies häufig unterbunden wird. In den meisten Fällen werden für kleine, monomere Proteine keine signifikanten Mengen von Faltungsintermediaten populierte, so dass im Gleichgewicht lediglich N oder U vorliegen und Gleichung 2.1 gilt. Im Übergangsbereich, in dem beide Spezies gleichzeitig populierte werden, ist  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  nach Gleichung 2.6 linear abhängig von der Denaturanzkonzentration  $[D]$  <sup>14</sup>.

$$\Delta G_{N \rightarrow U} = \Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{N \rightarrow U}[D] \quad \text{mit} \quad m_{N \rightarrow U} = \frac{\partial(\Delta G_{N \rightarrow U})}{\partial([D])} \quad 2.6$$

Der Anstieg  $m_{N \rightarrow U}$ , wird häufig als Maß für die Kooperativität des Übergangs herangezogen. Er korreliert mit der entfaltungsbedingten Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface area*) des Proteins ( $\Delta\text{SASA}$ ) und daher auch mit der Änderung der spezifischen Wärmekapazität,  $\Delta C_p$  <sup>15</sup>.

In der direkten Auftragung (Abb. 2.2 A) des gemessenen spektroskopischen Signals  $Y$  sind neben dem Übergang die jeweils den nativen und den entfaltenen Zustand repräsentierenden Signale  $Y_N$  und  $Y_U$  erkennbar. Aufgrund der linearen Abhängigkeit von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  von  $[D]$  im Übergangsbereich, dem Gemisch aus N und U, kann  $K_{N \rightarrow U}$  nach Gleichung 2.7 durch Extrapolation von  $Y_N$  und  $Y_U$  aus den prä- und post-transitionalen Bereichen der Übergangskurve, in denen sie jeweils exklusiv vorliegen, in den Transitionsbereich berechnet werden <sup>14</sup>.

$$K_{N \rightarrow U} = \frac{Y_N - Y}{Y - Y_U} \quad 2.7$$

In der Praxis erweisen sich sowohl  $Y_N$  als auch  $Y_U$  nach Gleichung 2.8 als linear von  $[D]$  abhängig. Der Index „i“ kennzeichnet die jeweilige Spezies. Die Parameter  $m_i$  und  $y_i$  charakterisieren deren Abhängigkeit von  $[D]$  bzw. ihren auf  $[D] = 0$  extrapolierten Wert.

$$Y_i = y_i + m_i[D] \quad 2.8$$

Anstelle der manuellen und oftmals fehlerhaften Zuordnung von  $Y_i$  <sup>16</sup> empfiehlt sich das Einsetzen der Gleichungen 2.6 und 2.7 in Gleichung 2.2, verbunden mit der Umstellung nach  $Y$  zur direkten Anpassung der Daten (Gleichung 2.9). Das Einsetzen von Gleichung 2.8 in Gleichung 2.9 liefert Gleichung 2.10 <sup>17</sup>, die meist verwendete Gleichung zur direkten Anpassung von Übergangskurven <sup>18</sup>.

$$Y = \frac{Y_N + Y_D \cdot e^{-\left(\frac{\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}}{RT} - \frac{m_{N \rightarrow U}[D]}{RT}\right)}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^0}{RT} - \frac{m[D]}{RT}\right)}} \quad 2.9$$

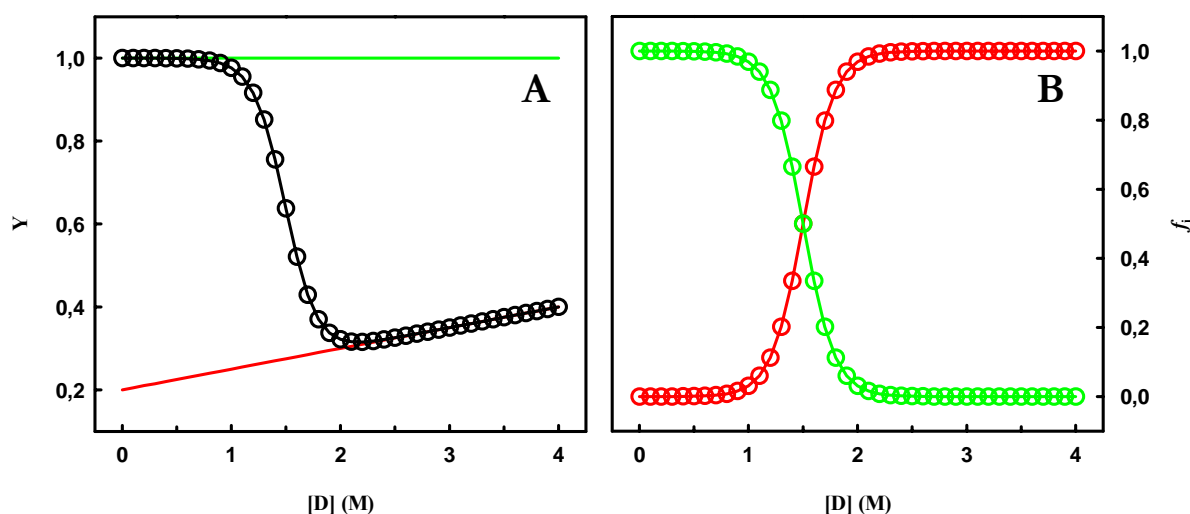


Abbildung 2.2 Modellierte Übergangskurven eines fiktiven Proteins. A: Auftragung des Messsignals  $Y$  ( $\circ$ ), von  $Y_N$  ( $\rightarrow$ ) und von  $Y_U$  ( $\leftarrow$ ). Zugrunde gelegt wurden folgende Parameter:  $Y_N = 1,0 + 0,0[D]$ ,  $Y_U = 0,2 + 0,05[D]$ ,  $m = 16,76 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}} = 25,14 \text{ kJ mol}^{-1}$  <sup>19</sup>. B: Auftragung der korrespondierenden, als  $f_N$ - ( $\circ$ ) bzw.  $f_U$ -Werte ( $\circ$ ) bezeichneten Molenbrüche ( $f_i$ ) von N und U. Die Kurven wurden aus den für Abbildung 2.2 A modellierten Daten nach Gleichung 2.13 berechnet.

$$Y = \frac{(y_N - m_N \cdot [D]) + (y_U - m_U \cdot [D]) \cdot e^{-\left(\frac{\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}}{RT} - \frac{m_{N \rightarrow U} \cdot [D]}{RT}\right)}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}}{RT} - \frac{m_{N \rightarrow U} \cdot [D]}{RT}\right)}} \quad 2.10$$

Ein weiterer bedeutsamer Stabilitätsparameter ist  $[D]_{0,5}$ , welcher die Denaturanzkonzentration bezeichnet, bei der das Protein zu jeweils gleichen Konzentrationen von N und U vorliegt. Nach Gleichung 2.1 bedeutet dies, dass  $K_{N \rightarrow U} = 1$  und somit  $\Delta G_{N \rightarrow U} = 0$  ist. Durch Einsetzen in Gleichung 2.6 ergibt sich somit Gleichung 2.11.

$$[D]_{0,5} = \frac{\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}}{m_{N \rightarrow U}} \quad 2.11$$

Auch die direkte Auswertung der Daten nach Gleichung 2.10 beruht auf linearer Extrapolation aus dem vergleichsweise schmalen Übergangsbereich auf die Abwesenheit von Denaturans. Besonders bei stabileren Proteinen führt diese Prozedur zu vergleichsweise großen Fehlerbreiten, die durch Umstellen von Gleichung 2.11 nach  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$  und anschließendes Einsetzen in Gleichung 2.10 verringert werden können <sup>20</sup>. Die direkte Anpassung der Daten erfolgt dann nach Gleichung 2.12 <sup>20</sup>.

$$Y = \frac{(y_N - m_N \cdot [D]) + (y_U - m_U \cdot [D]) \cdot e^{-\frac{m_{N \rightarrow U} ([D]_{0,5} - [D])}{RT}}}{1 + e^{-\frac{m_{N \rightarrow U} ([D]_{0,5} - [D])}{RT}}} \quad 2.12$$

Zu Vergleichen mit anderen Proteinen ist die Auftragung des Molenbruches des nativen Proteins  $f_N$  oder

des entfalteten Proteins  $f_U$  (Gleichung 2.13) zweckmäßig (Abb. 2.2 B).

$$K_{N \rightarrow U} = \frac{f_U}{f_N} \rightarrow f_N = 1 - f_U = \frac{Y_U - Y}{Y_U - Y_N} \quad 2.13$$

## 2.2.2 Thermische Übergangskurven

Thermische Übergangskurven bieten die Möglichkeit einer direkten Bestimmung thermodynamischer Stabilitätsparameter wie  $\Delta H_{N \rightarrow U}$  und  $\Delta S_{N \rightarrow U}$  trotz des erhöhten Risikos unerwünschter Nebenreaktionen wie z.B. Aggregation und des Fehlens eines einfachen linearen Zusammenhanges zwischen  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  und der Temperatur wie in Gleichung 2.6 (Abb. 2.3 A). Die Temperaturabhängigkeit von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  wird durch die modifizierte Gibbs-Helmholtz-Gleichung (2.14) beschrieben (Abb. 2.3 A).

$$\Delta G_{N \rightarrow U}^T = \Delta H_m \left( 1 - \frac{T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left[ (T_m - T) + T \ln \left( \frac{T}{T_m} \right) \right] \quad 2.14$$

Hierbei repräsentiert  $\Delta G_{N \rightarrow U}^T$  den Wert der freien Enthalpie zur jeweiligen Temperatur  $T$ ,  $T_m$  die Temperatur, bei der analog zu  $[D]_{0,5}$  N und U zu gleichen Teilen vorliegen, und  $\Delta H_m$  den Wert von  $\Delta H_{N \rightarrow U}$  bei dieser Temperatur. Die direkte Bestimmung von  $\Delta C_p$  und  $\Delta H_m$  sowie die Berechnung von  $\Delta S_m$ , dem Wert von  $\Delta S_{N \rightarrow U}$  bei  $T = T_m$  nach Gleichung 2.15 ist mittels *differential scanning calorimetry* möglich <sup>21; 22; 23</sup>.

$$\Delta S_m = \Delta H_m / T_m \quad 2.15$$

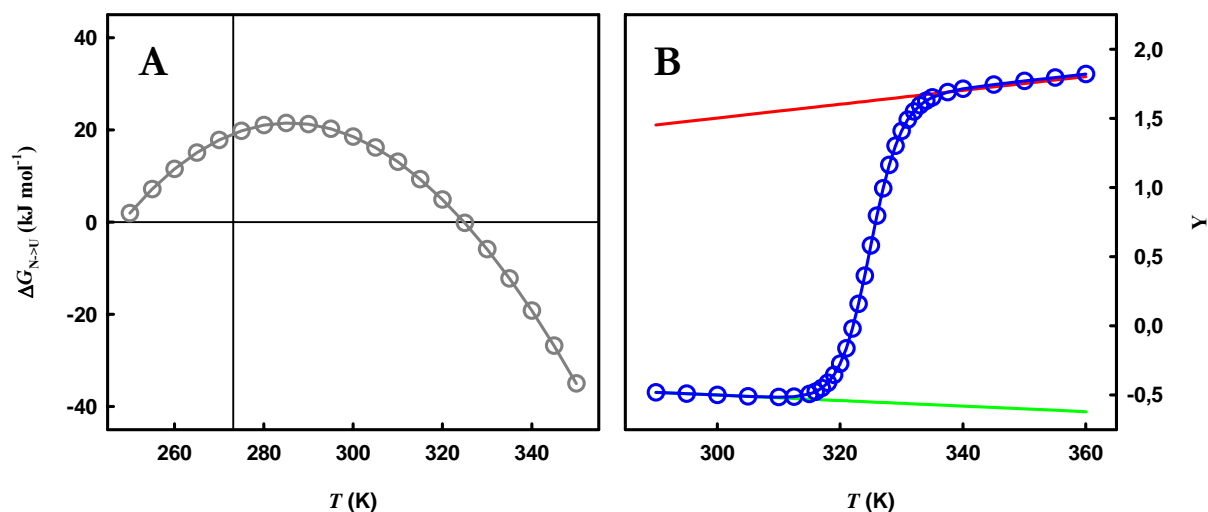
Die bei kalorimetrischen Messungen unvermeidbare Ungenauigkeit der Bestimmung von  $\Delta C_p$  <sup>24</sup> lässt sich durch die Messung von  $\Delta H_m$  unter verschiedenen Bedingungen umgehen. Dies können verschiedene pH-Werte oder geringe Denaturationskonzentrationen sein. Nach der Kirchoff-Gleichung (Gleichung 2.16) ergibt sich  $\Delta C_p$  dann aus der Auftragung von  $\Delta H_m$  gegen  $T_m$ .

$$\Delta C_p = \partial(\Delta H_m) / \partial(T_m) \quad 2.16$$

Alternativ zu kalorimetrischen Methoden ist es auch möglich, Übergangskurven unter verschiedenen Bedingungen spektroskopisch zu bestimmen (Abb. 2.3 B) und  $\Delta C_p$  nach Gleichung 2.16 zu berechnen. Die hierfür nötigen Werte von  $T_m$  und  $\Delta H_m$  können durch direkte Anpassung der Daten analog zu Gleichung 2.10 mittels nichtlinearer Regression nach Gleichung 2.17 gewonnen werden <sup>24</sup>.

$$Y = \frac{(y_N - m_N \cdot T) + (y_U - m_U \cdot T) \cdot e^{\frac{\Delta H_m + T - T_m}{RT + T_m}}}{1 + e^{\frac{\Delta H_m + T - T_m}{RT + T_m}}} \quad 2.17$$

Unter der Bedingung, dass  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  im Übergangsbereich linear von  $T$  abhängig ist <sup>25</sup>, entspricht der aus der Form bzw. der Steilheit des Übergangs spektroskopisch gemessener Kurven ermittelte Wert von  $\Delta H_m$



**Abbildung 2.3** Modellierte Auftragung thermodynamischer Parameter und der thermischen Entfaltung eines fiktiven Proteins. **A:** Auftragung der Abhängigkeit von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  von  $T$  nach Gleichung 2.14. Zugrunde gelegt wurden folgende Parameter:  $\Delta C_p = 8,38 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta H_m = 349,45 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $T_m = 324,85 \text{ K}$ <sup>26</sup>. **B:** Auftragung des Messsignals  $Y$  ( $\circ$ ), von  $Y_N$  ( $\leftarrow$ ) und von  $Y_U$  ( $\rightarrow$ ) einer modellierten spektroskopisch bestimmten Übergangskurve der thermischen Entfaltung desselben Proteins. Zugrunde gelegt wurden die gleichen thermodynamischen Parameter wie für Abbildung 2.3A sowie folgende spektroskopische Parameter:  $Y_N = 0,1 - 0,002T$  und  $Y_U = 0,02 + 0,005T$ .

dem der van't Hoff'schen Reaktionsenthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}$  (Gleichung 2.18).

$$\left( \frac{\partial(\Delta G_{N \rightarrow U}/T)}{\partial(T)} \right) = - \left( \frac{\Delta H_{\text{vH}}}{T} \right) \quad \text{mit} \quad \left( \frac{\partial(\ln K_{N \rightarrow U})}{\partial(T)} \right) = \frac{\Delta H_{\text{vH}}}{RT^2} \quad \text{und} \quad \Delta H_{\text{vH}} = -T \left( \frac{\partial(\ln K_{N \rightarrow U} T)}{\partial(1/T)} \right) \quad 2.18$$

Eine Übereinstimmung von  $\Delta H_{\text{vH}}$  und der kalorimetrisch bestimmten Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_{\text{cal}}$  gilt auch als Beleg für die Abwesenheit stabiler Intermediate, also das Zutreffen des Zweizustandsmodells<sup>27</sup>. In diesem Fall ist es möglich, durch die Kombination der Werte von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  aus dem Übergangsbereich einer thermischen Übergangskurve und den  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werten chemisch induzierter Übergangskurven bei verschiedenen Temperaturen  $\Delta C_p$  sowie die komplette Stabilitätskurve in Abhängigkeit von der Temperatur nach Gleichung 2.14 zu berechnen<sup>25</sup>.

### 2.2.3 Bestimmung kinetischer Stabilitätsparameter

Während die bisher beschriebenen Parameter Aussagen über das System nach Einstellung des Gleichgewichtes liefern, bieten kinetische Messungen die Möglichkeit, den Weg zur Einstellung des Gleichgewichtes zu verfolgen und somit Aussagen über den vorliegenden Faltungsmechanismus zu gewinnen. Die Entfaltungsreaktion kleiner monomerer Proteine erscheint oftmals als durch einen einfach-exponentiellen, auf die Existenz eines einzelnen Übergangszustandes hinweisenden Verlauf charakterisiert<sup>19</sup>. Bei der Rückfaltungsreaktion dagegen ist die Population energetisch zwischen N und U liegender Intermediate, die das Durchlaufen der entsprechenden Übergangszustände implizieren, nicht ungewöhnlich, und wird durch mehrfach exponentielle Zeitverläufe<sup>19</sup> angezeigt. Im nachfolgenden soll

zunächst nur auf den einfachsten Fall, der Abwesenheit kinetischer Intermediate (Gleichung 2.1, Abb. 2.4) näher eingegangen werden.

Wie in Abbildung 2.1 gezeigt, verläuft die Reaktion zwischen den Endzuständen N und U über den Übergangszustand ÜZ mit den entsprechenden freien Enthalpiebarrieren  $\Delta G_u^\#$  bzw.  $\Delta G_f^\#$ , die über Gleichung 2.4 mit der jeweiligen Geschwindigkeitskonstante  $k_u$  bzw.  $k_f$  verbunden sind. Da nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität Hin- und Rückreaktion eines Gleichgewichts über denselben Übergangszustand verlaufen müssen, ist die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  die Summe aus den Geschwindigkeitskonstanten von Hin- und Rückreaktion (Gleichung 2.19).

$$k_{\text{obs}} = k_u + k_f \quad 2.19$$

Demzufolge wird das zeitabhängige Messsignal  $Y(t)$  durch Gleichung 2.20 beschrieben. Dabei repräsentiert  $k_{\text{obs}}$  die beobachtete Geschwindigkeitskonstante,  $\Delta Y$  die Signaländerung und  $Y(\infty)$  das auf  $t \rightarrow \infty$  extrapolierte Signal.

$$Y(t) = Y(\infty) + \Delta Y e^{-k_{\text{obs}} t} \quad 2.20$$

Im betrachteten Fall des strikten Zweizustandsmodells ist  $k_{\text{obs}}$  der Faltungs- und Entfaltungsreaktion bei Sprüngen in Endkonzentrationen von  $[D] \ll [D]_{0,5}$  bzw.  $[D] \gg [D]_{0,5}$  in der halblogarithmischen Auftragung, dem so genannten *chevron plot*, nach Gleichung 2.21 linear von der Denaturationskonzentration abhängig (Abbildung 2.4 B)

$$\lg(k_{\text{obs}}) = \lg(k_x^0) + m_{\text{kx}} [D] \quad \text{mit} \quad m_{\text{kx}} = \frac{\partial(k_{\text{obs}})}{\partial([D])} \quad 2.21$$

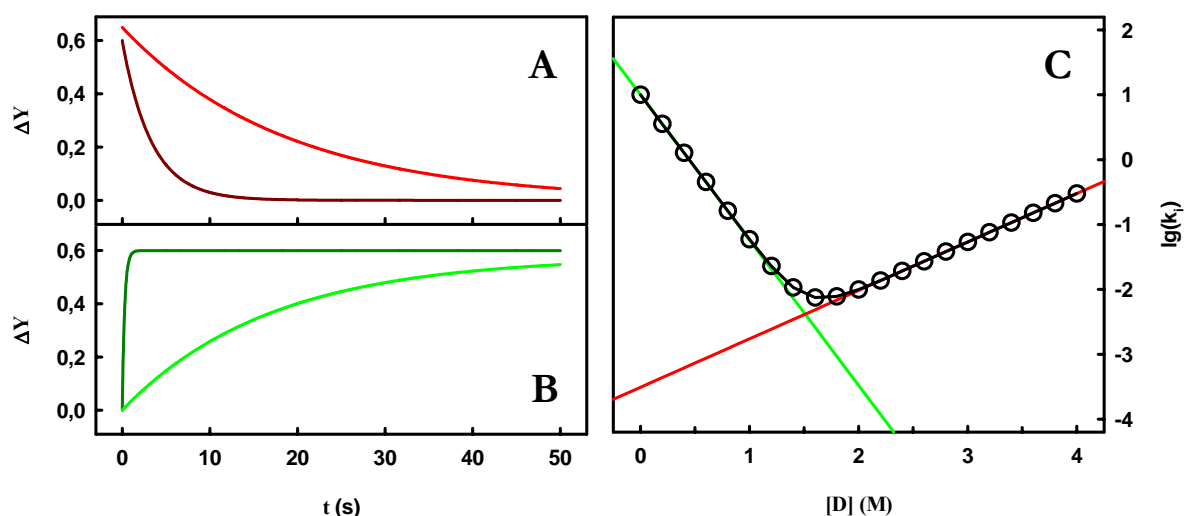
Der Index „x“ kennzeichnet dabei die jeweilige Reaktion, der Parameter  $k_x^0$  den Wert von  $k_x$  in Abwesenheit des Denaturans. Die in Gleichung 2.6 für  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  beschriebene lineare freie Enthalpiebeziehung lässt sich auch auf  $\Delta G_u^\#$  und  $\Delta G_f^\#$  übertragen (Gleichung 2.22).

$$\Delta G_x^\# = \Delta G_x^{\#\text{H}_2\text{O}} - m_x [D] \quad \text{mit} \quad m_x = \frac{\partial(\Delta G_x^\#)}{\partial([D])} \quad 2.22$$

Auch hier kennzeichnen „x“ die jeweilige Reaktion und  $\Delta G_x^{\#\text{H}_2\text{O}}$  die zugehörige freie Aktivierungsenthalpie in Abwesenheit des Denaturans. Analog zu Gleichung 2.3 setzt sich  $\Delta G_x^\#$  aus den jeweiligen Enthalpie- und Entropietermen zusammen. Durch die Kombination der Gleichungen 2.4, 2.21 und 2.22 zu Gleichung 2.23 kann  $m_x$  bestimmt werden.

$$m_x = RT \cdot m_{\text{kx}} \quad 2.23$$

Der die Abhängigkeit der freien Enthalpie des Übergangszustandes von  $[D]$  repräsentierende Parameter  $m_x$  beschreibt analog zu seinem thermodynamischen Pendant  $m_{N \rightarrow U}$  die Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche von ÜZ gegenüber dem jeweiligen Ausgangszustand.



**Abbildung 2.4** Modellierter Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken eines fiktiven Proteins sowie seiner kinetischen Parameter. **A:** Modellierter Entfaltungskinetiken, gestartet durch Sprünge aus 0 M nach 3 M (—), bzw. aus 0 M nach 4 M Denaturanz (—). Zugrunde gelegt wurden die den Sprüngen entsprechenden Amplituden aus Abbildung 2.2 sowie Geschwindigkeitskonstanten von  $0,054 \text{ s}^{-1}$ , bzw. von  $0,301 \text{ s}^{-1}$ . **B:** Modellierter Rückfaltungskinetiken, initiiert durch Sprünge aus 4 M nach 1 M (—), bzw. aus 4 M nach 0,2 M Denaturanz (—). Zugrunde gelegt wurden die den Sprüngen entsprechenden Amplituden aus Abbildung 2.2 sowie Geschwindigkeitskonstanten von  $0,059 \text{ s}^{-1}$ , bzw. von  $3,57 \text{ s}^{-1}$ . **C:** Modellierter halb-logarithmischer Auftragung der Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante ( $\circ$ ) sowie der Geschwindigkeitskonstanten von Faltungs- (—) und Entfaltungsreaktion (—) von der Denaturanzkonzentration. Zugrunde gelegt wurden die thermodynamischen Parameter aus Abbildung 2.2, sowie folgende kinetische Parameter:  $k_f(0\text{M}) = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $m_f = 12,57 \text{ kJ mol}^{-1}$ , sowie  $m_u = 4,19 \text{ kJ mol}^{-1}$  <sup>19</sup>.

Da bei Sprüngen in Endkonzentrationen von  $[D] \ll [D]_{0,5}$  bzw.  $[D] \gg [D]_{0,5}$  die Geschwindigkeit der jeweiligen Rückreaktion vernachlässigbar klein ist, gilt nach Gleichung 2.19  $k_{\text{obs}} = k_x$  <sup>19</sup>. Im Übergangsbereich hingegen sind sowohl Hin- als auch Rückreaktion gleichzeitig zu beobachten (Abb. 2.4 C). Im Übergangsmittelpunkt sollten die Geschwindigkeitskonstanten beider Reaktionen trotz unterschiedlicher, die Ausgangsbedingungen reflektierender Amplitudenvorzeichen gleich groß sein <sup>28</sup>. Durch Kombination der Gleichungen 2.19, 2.21 und 2.23 zu Gleichung 2.24 kann  $k_x$  bei beliebigen  $[D]$  direkt aus dem *chevron plot* durch nichtlineare Regression ermittelt werden.

$$\lg(k_{\text{obs}}) = \lg\left(k_f^0 e^{-\frac{m_f[D]}{2,303RT}} + k_u^0 e^{\frac{m_u[D]}{2,303RT}}\right) \quad 2.24$$

Der thermodynamische Parameter  $m_{N \rightarrow U}$  ist mit seinen kinetischen Pendanten  $m_f$  und  $m_u$  über Gleichung 2.25 verbunden.

$$m_{N \rightarrow U} = m_f + m_u \quad 2.25$$

Alle die Tertiärstruktur eines Proteins definierenden Informationen sind bereits, wie zu Beginn erwähnt, in der Aminosäureabfolge enthalten. Davon ausgehend stellte sich schon früh die Frage, wie die entfaltete Polypeptidkette in der vergleichsweise kurzen Zeitspanne, die der Faltungsvorgang kleiner, monomerer Proteine in der Regel umfasst, zu ihrer korrekt gefalteten, nativen Konformation gelangt. Diese

Fragestellung wurde anhand eines fiktiven Fallbeispiels, dem so genannten Levinthal-Paradoxon demonstriert. Ein aus 100 Aminosäuren bestehendes Protein hätte demzufolge unter der vereinfachenden Annahme von zwei Konformationen pro Aminosäure  $2^{100}$  mögliche Konformationen. Eine zufällige Suche durch alle möglichen Konformationen würde bei einer diffusionslimitierten Umwandlungsdauer ( $10^{-12}$  s/Ereignis) circa  $10^{10}$  Jahre dauern. Die daraus gezogene Schlussfolgerung ist die Existenz beschleunigender Faltungswege<sup>29; 30</sup>, die mit einer Kette obligatorisch zu durchlaufender Faltungsintermediate gleichgesetzt werden.

Neuere theoretische Studien resultierten in widersprüchlichen Ergebnissen zur Bedeutung von Faltungsintermediaten. Während Computersimulationen zufolge Intermediate als kinetische Fallen, die vom eigentlichen Faltungsprozess wegführen und ihn verlangsamen, anzusehen sind<sup>31; 32</sup>, wurde in einer anderen Publikation der produktive, prozessbeschleunigende Charakter demonstriert<sup>33</sup>.

Die Existenz intermediärer Zustände kann sich experimentell durch die bereits erwähnten mehrfach exponentiellen Kinetiken<sup>19, 34</sup> oder durch ein Abknicken von  $k_{\text{obs}}$  im *chevron plot*<sup>34; 35; 36</sup> äußern. Im ersten Fall wird Gleichung 2.20 zu Gleichung 2.26 erweitert.

$$Y(t) = Y(\infty) + \sum \Delta Y_i e^{-k_i t} \quad 2.26$$

Dem Auftreten eines Intermediates muss entsprechend seiner Detektion durch Einbeziehung in Gleichung 2.19 oder einer separaten Auswertung Rechnung getragen werden<sup>37</sup>. Der Charakter des Intermediates bestimmt den jeweiligen Faltungsmechanismus. Es können obligatorisch durchlaufene *online*- oder durch Nebenreaktionen verlaufende *offline*-Intermediate, parallele Faltungswege und langsame Isomerisierungen im nativen und/oder entfalteten Zustand unterschieden werden<sup>28; 36; 38</sup>.

Entfaltungszeitverläufe hingegen werden im Allgemeinen nach Transfer in hohe Denaturationskonzentrationen gemessen. Unter diesen Bedingungen sind eventuell auftretende Intermediate deutlich instabiler und entfalten somit deutlich schneller als N<sup>34; 39; 40; 41</sup>. Daher ist die Entfaltungskinetik meist durch einfach exponentielle Verläufe (Gleichung 2.20) auswertbar. Abweichungen hiervon sind in seltenen Fällen ebenfalls auf langsame Isomerisierungen zurückzuführen. Im einfachsten Fall hingegen erfolgt der Entfaltungssprung aus Bedingungen, unter denen N in verschiedenen Konformationen vorliegt.

## 2.2.4 Temperaturabhängigkeit von $k_u$

Wie die Geschwindigkeit aller enzymkatalysierten und nicht katalysierten Reaktionen steigt die Geschwindigkeit der Entfaltungsreaktion mit der Temperatur. Bei einer Erhöhung um 10 K ist von einer Steigerung um das jeweils zwei- bis dreifache auszugehen<sup>42</sup>. Diese Abhängigkeit ist mit der empirisch gefundenen Arrhenius-Gleichung (Gleichung 2.27) beschreibbar.

$$k_u = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad 2.27$$

Während die Konstante  $A$  die Wahrscheinlichkeit des Reaktionsvorganges beschreibt, repräsentiert  $E_a$  die



freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltungsreaktion, ist aber eine aus diversen Teilprozessen zusammengesetzte Größe. Die Herleitung erfolgte analog zur van't Hoff'schen Reaktionsisobaren (Gleichung 2.18). Für gezielte Untersuchungen des Faltungs-/Entfaltungsverhaltens von Proteinen ist die Analyse nach Eyring geeigneter. Die Eyring-Auftragung, d.h. die Linearisierung der Temperaturabhängigkeit von  $k_u$  durch die Auftragung von  $\ln(k_u/T)$  gegen die reziproke absolute Temperatur mit dem Anstieg „-r“ und dem Ordinatenschnittpunkt „s“, bietet die Möglichkeit, die temperaturabhängige freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltungsreaktion,  $\Delta G_u^\#$ , sowie die enthalpischen und entropischen Beiträge,  $\Delta H_u^\#$  und  $\Delta S_u^\#$ , nach Gleichung 2.28 zu ermitteln. Diese entsteht durch Einsetzen der Gibbs- (Gleichung 2.3) in die Eyring-Gleichung (Gleichung 2.4).

$$\ln\left(\frac{k_u}{T}\right) = -\frac{\Delta H_x^\#}{RT} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S_x^\#}{R} \quad \text{mit: } \Delta H_x^\# = R \cdot r \quad \text{und} \quad \Delta S_x^\# = R\left(s - \ln\left(\frac{k_B}{h}\right)\right) \quad 2.28$$

Für die Untersuchungen mit  $k_u$  wird allerdings anstelle der Boltzmann-Konstante ( $k_B = 1,3806 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ) die Verwendung von  $k = [2,2224 \cdot 10^{-29}; 2,2224 \cdot 10^{-28}] \text{ J K}^{-1}$  empfohlen<sup>43</sup>. Dies wird damit begründet, dass die ursprüngliche Eyring-Theorie von der Schwingungsfrequenz einer kovalenten Bindung ausgeht ( $6 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$  bei  $25^\circ\text{C}$ ), die (nicht reduktive) Entfaltung von Proteinen im Gegensatz zu herkömmlichen chemischen Reaktionen aber lediglich das Lösen schwacher, nicht kovalenter Bindungen beinhaltet. Die Verwendung dieser Konstanten führt laut Gleichung 2.28 zu entsprechend höheren Werten von  $\Delta S_u^\#$ .

## 2.2.5 Messungen der Entfaltung mittels HD-Austausch

Wie alle Protonen geladener Gruppen in Proteinen befinden sich auch die Amidprotonen der Peptidbindungen im Gleichgewicht mit dem sie umgebenden Lösungsmittel. Dies führt zu einem permanenten, durch  $\text{H}_3\text{O}^+$  oder  $\text{OH}^-$  katalysierten, aufgrund ihrer hohen  $\text{pK}_a$ -Werte jedoch langsamen Austausch, der nach Transfer des Proteins in  $\text{D}_2\text{O}$  beispielsweise NMR-spektroskopisch anhand des verschwindenden  $^1\text{H}$ -NMR-Signals des jeweils ausgetauschten Amidprotons verfolgt werden kann<sup>44</sup>. Ist die betreffende Amidbindung durch Involvierung in eine Wasserstoffbrücke geschützt, wird dieser Austausch bis zur Unterbrechung der Wechselwirkung durch ein lokales oder globales Entfaltungsereignis unterbunden. Für den Austausch geschützter Amidprotonen gilt das in Gleichung 2.29 dargestellte Reaktionsschema mit  $\text{NH}^{\text{cl}}$  als geschützten,  $\text{NH}^{\text{op}}$  als nicht geschützten und  $\text{ND}$  als ausgetauschten Amidprotonen,  $K_{\text{op}}$  als Gleichgewichtskonstante der Öffnungs- sowie  $k_{\text{op}}$ ,  $k_{\text{cl}}$  und  $k_{\text{ch}}$  als Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungs-, Faltungs- und Austauschreaktionen.



Die intrinsische Geschwindigkeitskonstante des Austauschs der Amidprotonen,  $k_{\text{ch}}$ , wird durch die benachbarten Seitenketten beeinflusst und wurde mithilfe entsprechender Modellpeptide für alle 20

proteinogenen Aminosäuren und unter verschiedenen Bedingungen bestimmt <sup>45</sup>.

Unter *steady-state*-Bedingungen wird die gemessene Austauschkonstante,  $k_{\text{ex}}$ , durch Gleichung 2.30 beschrieben <sup>46</sup>. Unter der Annahme, dass die vor dem Austausch schützende Struktur stabil ist ( $k_{\text{op}} \ll k_{\text{cl}}$ ), vereinfacht sich diese zu Gleichung 2.31 <sup>44</sup>.

$$k_{\text{ex}} = K_{\text{op}} k_{\text{ch}} \frac{k_{\text{op}} k_{\text{ch}}}{k_{\text{op}} + k_{\text{cl}} + k_{\text{ch}}} \quad 2.30$$

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}} k_{\text{ch}}}{k_{\text{cl}} + k_{\text{ch}}} \quad 2.31$$

Wenn die Austauschkonstante nicht geschwindigkeitsbestimmend ist ( $k_{\text{ch}} \gg k_{\text{cl}}$ ), folgt der Austausch einer monomolekularen Reaktion, dem so genannten EX1-Mechanismus <sup>46</sup>. Dies ist häufig bei stark basischen pH-Werten, hoher Temperatur oder in Anwesenheit von Denaturanzien der Fall <sup>44</sup>. Dann gilt:

$$k_{\text{ex}}^{\text{EX1}} = k_{\text{op}} \quad 2.32$$

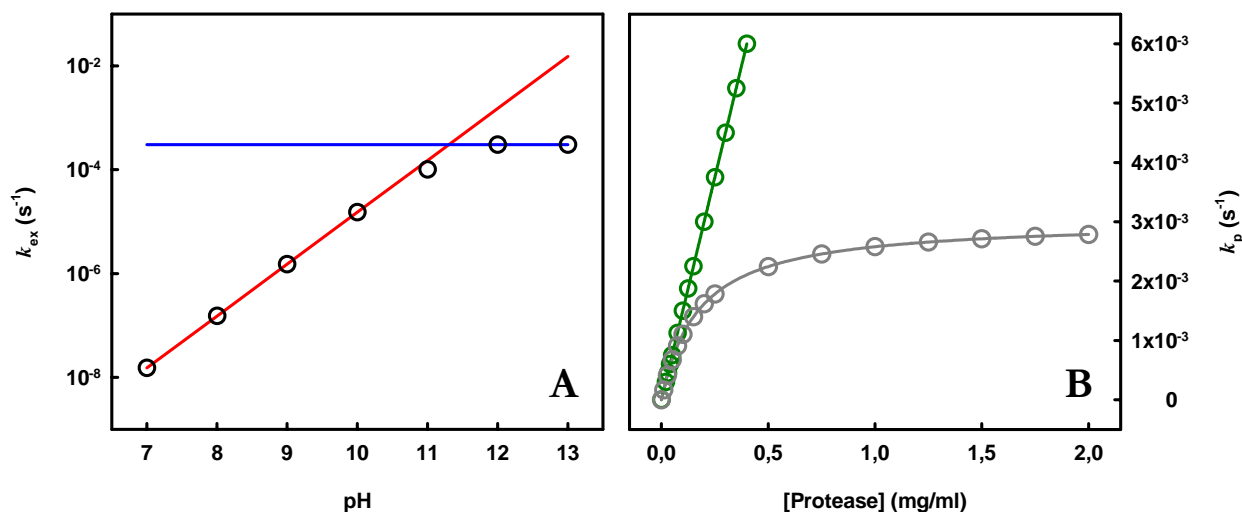
Andernfalls ( $k_{\text{cl}} \gg k_{\text{ch}}$ ) erfolgt der Austausch nach einer bimolekularen Reaktion, dem sogenannten EX2-Mechanismus. Hier vereinfacht sich Gleichung 2.31 zu Gleichung 2.33 <sup>46</sup> mit  $\Delta G_{\text{HX}}$  als der freien Enthalpie der Öffnungsreaktion.

$$k_{\text{ex}}^{\text{EX2}} = \frac{k_{\text{op}} k_{\text{ch}}}{k_{\text{cl}}} = K_{\text{op}} k_{\text{ch}} \quad \text{mit} \quad \Delta G_{\text{HX}} = -RT \ln K_{\text{op}} \quad 2.33$$

Ein Unterscheidungskriterium zwischen EX1- und EX2-Mechanismus ist die pH-Abhängigkeit von  $k_{\text{ex}}$ . Die Zunahme von  $k_{\text{ex}}^{\text{EX2}}$  beträgt  $\approx 10$  <sup>45</sup> mit jeder Steigerung des pH-Wertes um eine pH-Einheit, bis sie in  $k_{\text{ex}}^{\text{EX1}}$  übergeht, wenn das weitgehend pH-unabhängige EX1-Limit erreicht wird (Abb. 2.5 A) <sup>44</sup>. Sofern sich das Faltungsgleichgewicht des betreffenden Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert nicht grundsätzlich ändert, können somit bei hohen pH-Werten kinetische Informationen zum Entfaltungsprozess gewonnen, bei moderaten pH-Werten hingegen thermodynamische Aussagen getroffen werden <sup>44</sup>. Letztere lassen sich durch Zusatz nicht denaturierender Denaturanzkonzentrationen (*native state exchange*) anhand sich vereinigender  $\Delta G_{\text{HX}}$ -Werte verschiedener Amide in Abhängigkeit von der Denaturanzkonzentration auch auf unabhängige submolekulare Faltungseinheiten (*foldons*) ausdehnen <sup>47</sup>.

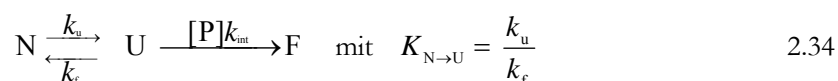
## 2.2.6 Entfaltungsmessungen mittels limitierter Proteolyse

Die Methode der limitierten Proteolyse dient zur Detektion der proteolytischen Angreifbarkeit von Peptidbindungen. Diese ist einerseits von der Spezifität der angreifenden Protease hinsichtlich der Sequenz der zu schneidenden Polypeptidkette sowie der Flexibilität und Exposition der anzugreifenden Peptidbindung <sup>48</sup> andererseits abhängig. Gefaltete Proteine weisen, begünstigt durch stabilisierende Inter-



**Abbildung 2.5** Modellierte HD-Austausch- und limitierte Proteolysereaktionen eines fiktiven Proteins. **A:** Abhängigkeit der modellierten Geschwindigkeitskonstanten des HD-Austauschs eines fiktiven Amidprotons vom pH-Wert. Der Modellierung wurden die thermodynamische Stabilität aus Abbildung 2.2 sowie  $k_{op} = k_u = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Abb. 2.4) zugrunde gelegt.  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$  und  $k_u$  wurden als unabhängig vom pH-Wert definiert. Als Startwert von  $k_{ex}$  bei pH 7,0 wurde  $1,5 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$  angenommen. Für den EX2-Grenzfall (—) wurde für  $k_{ex}$  eine Steigung von  $1 \text{ s}^{-1}$  pro pH-Einheit vorgegeben. Für den EX1-Grenzfall (—) wurde  $k_{ex} = k_u$  definiert. Die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten (○) entstanden durch Kombination dieser Vorgaben mit frei variierten Werten von  $k_{ch}$  zwischen  $1,5 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$  und  $1,0 \text{ s}^{-1}$ . **B:** Abhängigkeit der Abbaukonstante des fiktiven Proteins durch zwei Proteasen verschiedener Spezifität. Für die das Protein im nativen Zustand abbauende Protease (○) wurde eine Steigerung von  $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  vorgegeben. Für die das Protein aus dem entfalteten Zustand abbauende Protease (○) wurde eine Halbsättigungskonzentration von  $0,2 \text{ mg/ml}$  und als Maximalwert die Entfaltungskonstante von  $k_u = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  angenommen.

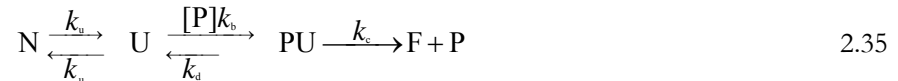
aktionen und Abschirmung großer Teile des Peptidrückgrates vom Solvens, auch für unspezifische Proteasen keine oder nur wenige Schnittstellen auf. Sie werden daher kaum oder gar nicht proteolytisch abgebaut. Im Zuge globaler oder lokaler Entfaltungsvorgänge steigt deren Anzahl mit der erhöhten Flexibilität des Polypeptidrückgrates und der Solvensexposition vorher unzugänglicher Bereiche stark an, so dass entfaltete Proteine schnell hydrolysiert werden. Dieser in Gleichung 2.34 dargestellte Vorgang gestaltet den an sich reversiblen Entfaltungsvorgang irreversibel. Dabei bezeichnet N den nativen, nicht angreifbaren und U den entfalteten, angreifbaren Zustand des Proteins, F und P jeweils Fragmente und angreifende Protease sowie  $K_{N \rightarrow U}$ ,  $k_u$  und  $k_f$  jeweils Gleichgewichtskonstante und Geschwindigkeitskonstanten von Hin- und Rückreaktion des Entfaltungsgleichgewichtes sowie  $k_{int}$  die katalytische Konstante der Proteolysereaktion.



Für die Bestimmung von  $k_u$  geeignete Proteasen müssen mehrere Bedingungen erfüllen. Sofern nicht gezielt das Verhalten einer speziellen Region des Zielproteins untersucht werden soll, sollte die eingesetzte Protease hinsichtlich der zu schneidenden Sequenz möglichst unspezifisch sein. Trotzdem sollte die entfaltete, also ungeschützte selektiv gegenüber der gefalteten, geschützten Spezies ungeachtet derer

inhärenten Heterogenität abgebaut werden. Weiterhin muss die Protease stabil genug sein, um ihre Aktivität über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant aufrechtzuerhalten.

Zunächst wurde das in Gleichung 2.34 dargestellte grundsätzliche Reaktionsschema um die Bindung und Hydrolyse der angegriffenen Peptidbindung durch die Protease zu Gleichung 2.35 mit PU als Protease-Substrat-Komplex sowie  $k_b$ ,  $k_d$  und  $k_c$  als Geschwindigkeitskonstanten seiner Assoziation bzw. Dissoziation und Umsetzung erweitert <sup>49</sup>.



Unter *steady state*-Bedingungen ( $\partial[\text{U}]/\partial t = 0$  und  $\partial[\text{PU}]/\partial t = 0$ ) gilt Gleichung 2.36 mit  $K_p$  als Dissoziationskonstante des Protease-Substrat-Komplexes <sup>49</sup>.

$$\partial[\text{N}]/\partial t = k_c[\text{PU}] = \frac{(k_u/k_f)k_c[\text{P}][\text{N}]}{(k_d+k_c)/k_b + (k_c/k_f)[\text{P}]} = \frac{k_c K_{\text{N} \rightarrow \text{U}}[\text{P}][\text{N}]}{K_p + (k_c/k_f)[\text{P}]} \quad 2.36$$

Unter der Annahme, dass unter nichtdenaturierenden Bedingungen die Konzentrationen von U und PU vernachlässigbar klein sind, können  $[\text{N}]$  und  $[\text{P}]$  jeweils mit der Konzentration von nicht verdaulichem N und der totalen Proteasekonzentration  $[\text{P}]^t$  gleichgesetzt werden. Für die gemessene Geschwindigkeitskonstante des proteolytischen Abbaus  $k_p$ , die beispielsweise aus der Abnahme der densitometrisch ermittelten Intensität von Coomassie-gefärbten Banden des intakten Proteins in SDS-Polyacrylamidgelen oder auch mittels *reversed-phase*-HPLC ermittelt werden kann, gilt in Abhängigkeit von  $[\text{P}]^t$  Gleichung 2.37.

$$k_p = \frac{k_u[\text{P}]^t}{\text{B} + [\text{P}]^t} \quad \text{mit} \quad \text{B} = \frac{(k_d+k_c)k_f}{k_b k_c} \quad 2.37$$

Demnach folgt  $k_p$  mit steigender Proteasekonzentration einer hyperbolen Funktion und erreicht  $k_u$  bei  $[\text{P}]^t \rightarrow \infty$  (Abb. 2.5 B). Erfüllt die Protease die oben genannte Bedingung des selektiven Abbaus von U nicht, sondern greift auch N an, würde in Gleichung 2.35 der Faltungs-/Entfaltungsschritt mit  $k_u$  und  $k_f$  entfallen. Das Ergebnis entspräche dem herkömmlichen Michaelis-Menten-Reaktionsschema. Wenn die Konzentration der Protease diejenige von U deutlich übertrifft und der limitierende Schritt die eigentliche Proteolyse ist, wird also eine lineare Abhängigkeit der katalytischen Konstante  $k_c$  nach Gleichung 2.38 erwartet (Abb. 2.5 B).

$$k_p = k_c[\text{P}]^t \quad 2.38$$

Eine alternative, dem HD-Austausch analoge Behandlung von  $k_p$  wurde vor kurzem veröffentlicht <sup>50</sup>. Der Ausgangspunkt ist wiederum das in Gleichung 2.34 dargestellte Reaktionsschema. Daraus leitet sich Gleichung 2.39 mit der intrinsischen Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse  $k_{\text{int}}$  ab.

$$k_p = \frac{k_{\text{op}}k_{\text{int}}}{k_{\text{cl}} + k_{\text{int}}} \quad 2.39$$

Dabei wird wiederum zwischen EX1- und EX2-analogen Extremen unterschieden. Sofern der Proteolyse-

schritt den limitierenden Faktor darstellt (EX2,  $k_{cl} \gg k_{int}$ ), gilt Gleichung 2.40.

$$k_p^{EX2} = \frac{k_u k_{int}}{k_f} = K_{N \rightarrow U} k_{int} \quad 2.40$$

In diesem Fall ist eine lineare Abhängigkeit der beobachteten Proteolysekonstante von der eingesetzten Proteasekonzentration zu erwarten, die makroskopisch allerdings nicht vom Abbau aus dem nativen Zustand unterscheidbar ist. Die daraus gewonnenen Informationen sind die Gleichgewichtskonstante  $K_{N \rightarrow U}$  bzw. die freie Enthalpie  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  der betrachteten Entfaltungsreaktion.

Die untersuchte Entfaltungsreaktion kann auf globalem oder lokalem Niveau <sup>50</sup> stattfinden. Im anderen Extrem (EX1,  $k_f \ll k_{int}$ ) ist die gemessene Proteolysekonstante durch die Entfaltungskonstante  $k_u$  bestimmt (Gleichung 2.41).

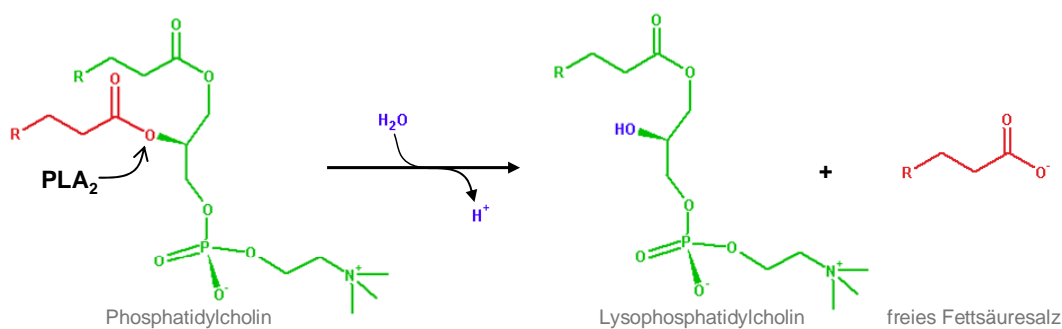
$$k_p^{EX1} = k_u \quad 2.41$$

Dies ist bei hohen Proteasekonzentrationen der Fall und resultiert in einem Sättigungsverhalten der gemessenen Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteasekonzentration, die wiederum analog zu Gleichung 2.37 zur Bestimmung von  $k_u$  genutzt werden kann.

## 2.3 Phospholipase A<sub>2</sub> aus Schweinepankreas

### 2.3.1 Übersicht über die Phospholipase A<sub>2</sub>-Familie

Phospholipasen A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4) sind ubiquitäre Acylhydrolasen, die die spezifische hydrolytische Spaltung der *sn*-2-Esterbindung von 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phospholipiden, im Folgenden Phospholipide genannt, zu den entsprechenden freien Fettsäuren und Lysophospholipiden katalysieren (Abb. 2.6) <sup>51</sup>.



**Abbildung 2.6** Schematische Darstellung der durch Phospholipasen A<sub>2</sub> katalysierten Hydrolyse von Phospholipiden am Beispiel des Phosphatidylcholins. Die unvollständig dargestellten Fettsäurereste werden hierbei durch „R“ repräsentiert.

Da die Notwendigkeit dieser Reaktion in der Natur häufig auftritt, sind Phospholipasen A<sub>2</sub> in viele verschiedene Prozesse involviert. Das Spektrum dieser Prozesse reicht von rein digestiven Vorgängen, wie dem Abbau von in der Nahrung enthaltenen Phospholipiden, über regulatorische Prozesse, wie die Freisetzung von Signalmolekülen wie Arachidonsäure und der die Konsistenz der Zellmembranen beeinflussenden Lysophospholipide, bis hin zur Zerstörung der Membranen von Bakterien oder eukaryontischer Zellen <sup>52; 53; 54; 55; 56</sup>. Die Involvierung sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub> in weitere komplexe Vorgänge wie die Abwehr eingedrungener Bakterien <sup>55; 56</sup> und Entzündungsreaktionen <sup>53; 57</sup> ist mittlerweile ebenfalls nachgewiesen. Das Vorkommen sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub> in den Giften diverser Schlangen <sup>51</sup>, mariner Schnecken <sup>58</sup>, Skorpione <sup>51</sup>, Eidechsen <sup>59; 60</sup> und Insekten <sup>61</sup> impliziert im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen eine nach außen gerichtete Wirkung und ist mit einer Vielzahl toxischer Wirkungen erklärbar <sup>62</sup>.

Sekretorische Phospholipasen A<sub>2</sub> wurden bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts aus den Giften von Kobras isoliert <sup>51</sup>. Die bald danach gefundenen pankreatischen Phospholipasen A<sub>2</sub> wiesen zum Teil sehr ähnliche Eigenschaften auf, konnten naturgemäß aber in größeren Mengen gewonnen werden. Ersteres gilt mit einigen Einschränkungen auch für den Vertreter aus dem Gift der Honigbiene <sup>63</sup>. Die Entdeckung strukturell stark abweichender cytosolischer Phospholipasen A<sub>2</sub> brachte die Notwendigkeit einer ausgereiften Klassifizierung mit sich <sup>1; 51</sup>. Die Möglichkeit hierfür bot sich mit dem Fortschreiten rekombinanter DNA-Technologien. Die in Tabelle 2.1 vorgestellte Klassifizierung in 12 Hauptgruppen

Tabelle 2.1 Klassifizierung bekannter Phospholipasen A<sub>2</sub> (Stand 2005) nach <sup>1</sup>

Hauptgruppe	Untergruppe	Vorkommen	Größe (kDa)	Anzahl der Disulfidbrücken	Calciumbedarf	Strukturelle Charakteristika	Lokalisierung
I	A	Kobra-, Natterngift	13-15	7	mM	H-D-Diade	sekretorisch
	B	Säugerpankreas	13-15	7	mM	H-D-Diade	sekretorisch
II	A	Gelenkflüssigkeit, Gift der Klapperschlangen	13-15	7	mM	H-D-Diade	sekretorisch
	B	Gabuuviper	13-15	6	mM	H-D-Diade	sekretorisch
	C	Ratten-/Mäusehoden	15	8	mM	H-D-Diade	sekretorisch
	D	Mensch, Maus Pankreas, Milz	14-15	7	mM	H-D-Diade	sekretorisch
III	E	Mensch, Maus Gehirn, Herz, Uterus	14-15	7	mM	H-D-Diade	sekretorisch
	F	Maus Hoden/Embryo	16-17	7	mM	H-D-Diade	sekretorisch
		Gifte von Biene, Skorpion, Eidechsen	15-18	5	mM	H-D-Diade	sekretorisch
IV	A	U937-Zelllinie	85	-	μM	C2-Domäne, S505	cytosolisch
	B	Mensch Gehirn	100	-	μM	C2-Domäne	cytosolisch
	C	Mensch Herz-, Skellettmuskel	65	-	-	Isoprenylierung	cytosolisch
V		Mensch, Ratte, Maus Herz, Lunge P388D <sub>1</sub> Makrophagen	14	6	mM	H-D-Diade	sekretorisch
VI		P388D <sub>1</sub> Makrophagen	80-85	-	-	ATP-Bindungsmotiv	cytosolisch
VII	A	Mensch Plasma	45	-	-	-	sekretorisch
	B	Rind Gehirn	42	-	-	N-terminal myristyliert	cytosolisch
VIII		Rind Gehirn	29	-	-	S74	cytosolisch
IX		Gift der Kegelschnecke	14	6	μM	H-D-Diade	sekretorisch
X		Mensch Leukozyten	14	7	mM	H-D-Diade	sekretorisch
XI	A	Reis	12,4	6	mM	H-D-Diade	sekretorisch
	B	Reis	12,9	6	mM	H-D-Diade	sekretorisch
XII		Herz-, Skellettmuskel	16	7	mM	H-D-Diade	sekretorisch

mit diversen Untergruppen ist anhand verschiedener struktureller Merkmale aufgebaut. Die Tabelle wurde der Dissertation von Y. Markert <sup>1</sup> entnommen. Seit neuerem sind auch Phospholipasen A<sub>2</sub> bakterieller <sup>64</sup> sowie achäaler Herkunft bekannt <sup>65</sup>. Darunter sind sowohl membranständige <sup>66</sup>, als auch sekretorische <sup>67</sup> Vertreter.

Interessant ist auch die Tatsache, dass in den Toxinen diverser Giftschlangen nicht nur Isoformen mit verschiedenen pH-Aktivitäts-Optima sondern auch Isoenzyme vorkommen, die sich von ihrer Urform nur durch die Substitution des für die Calciumbindung essentiellen Aspartats 49 durch Lysin unterscheiden <sup>68; 69; 70</sup>. Diese Formen sind nicht katalytisch aktiv, besitzen aber dennoch die Fähigkeit, an Membranen zu binden und eine cytotoxische Aktivität auszuüben <sup>70</sup>. Darüber hinaus wurden zumindest sekretorische Phospholipasen A<sub>2</sub> als Liganden für zwei verschiedene Rezeptoren identifiziert, was einen Großteil ihrer toxischen Wirkungen verursacht <sup>62</sup>. Nach der Art des bindenden Rezeptors können sie auch in N- (neural) oder M-Typ (muskulär) klassifiziert werden <sup>71</sup>.

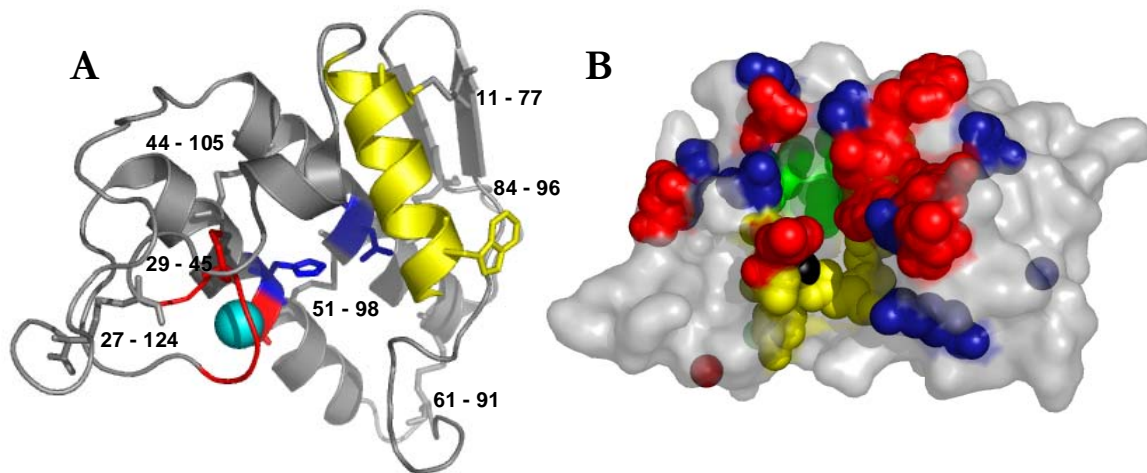
### 2.3.2 Übersicht der Eigenschaften von PLA<sub>2</sub>

PLA<sub>2</sub> ist einer der ersten bekannten Vertreter sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub>. Das Enzym kann aufgrund der ausgeprägten strukturellen Homogenität der Hauptgruppen I, II, V und IX bis XII sowie mit Einschränkungen auch der Hauptgruppe III in Verbindung mit vielen gemeinsamen Eigenschaften als prototypisch für die sekretorischen Phospholipasen A<sub>2</sub> betrachtet werden. Es wird in den Bauchspeicheldrüsen des Schweins als Proenzym produziert, welches durch proteolytische Abspaltung eines N-terminalen, aus sieben Aminosäuren bestehenden Propeptides zum reifen Enzym aktiviert wird <sup>63</sup>. Dessen Größe beträgt 13,9 kDa, sein isoelektrischer Punkt 7,5 <sup>63</sup>. Es besteht aus 124 Aminosäuren, von denen vor allem die 14 Cysteine, welche die sieben Disulfidbrücken des Proteins bilden, die Aminosäuren 27-33, deren Peptidbindungen gemeinsam mit der Carboxylgruppe von D49 das für die Katalyse essentielle Calciumion koordinieren, sowie die katalytische Dyade aus H48 und D99 hervorzuheben sind (Abb. 2.7 A). Von besonderer Relevanz für Stabilitätsuntersuchungen ist ein Wasserstoffbrückennetzwerk, das A1 und Q4 am N-Terminus, H48, Y52 und D99 in den beiden zentralen  $\alpha$ -Helices, Y69 in einer *loop*-Region sowie E71 und Y73 als Beginn des kleinen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes miteinander verbindet (Abb. 2.10 A).

### 2.3.3 Aktivierung von PLA<sub>2</sub> durch Bindung an Phospholipidgrenzflächen

Wie viele an Grenzflächen aktive Enzyme im Allgemeinen und sekretorische Phospholipasen A<sub>2</sub> im Besonderen zeigt PLA<sub>2</sub> ein charakteristisches Aktivierungsverhalten bei der Bindung an hydrophil-hydrophobe Phospholipid-Wasser-Grenzflächen. Für diese Bindung ist im Falle der sekretorischen



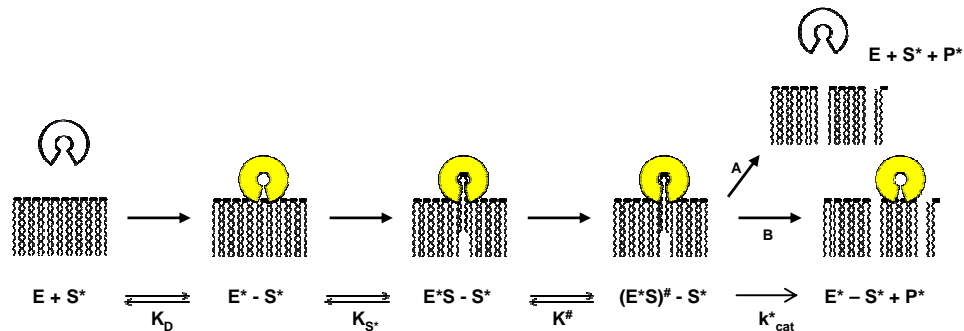


**Abbildung 2.7** Tertiärstruktur von PLA<sub>2</sub>. **A:** Schematische Darstellung der Röntgenkristallstruktur von PLA<sub>2</sub>. Das Polypeptidrückgrat wurde grau, die N-terminale α-Helix mit W3 gelb gefärbt. Die Disulfidbrücken wurden ebenfalls grau gefärbt, sofern sie nicht Bestandteile eines anderweitig hervorgehobenen Strukturelementes sind. Die zugeordneten Ziffern kennzeichnen die Positionen des jeweiligen Cysteinpaars in der Aminosäuresequenz. Der Calciumbindungs-loop und das das Ca<sup>2+</sup>-Ion (türkis) koordinierende D49 wurden rot hervorgehoben und die katalytische Diade (H48-D99) blau gefärbt. **B:** Darstellung der PLA<sub>2</sub>-Oberfläche mit den für die Katalyse relevanten Struktur-regionen. Das Calciumion wurde schwarz, die Oberflächen der für die Calciumbindung verantwortlichen Aminosäuren (siehe Abb. 2.7 A) sowie der katalytischen Dyade gelb dargestellt. Der hydrophobe Kanal wurde grün, die Oberflächen der die *irs* konstituierenden Aminosäuren dagegen entsprechend ihres hydrophoben bzw. basischen Charakters jeweils rot bzw. blau gefärbt. Für beide Darstellungen wurden die Koordinaten aus der pdb-Datei 4P2P<sup>72</sup> der Brookhaven-Datenbank entnommen und mit der Visualisierungssoftware Pymol bearbeitet.

Phospholipasen A<sub>2</sub> eine vom aktiven Zentrum zu unterscheidende Oberflächenregion, die so genannte *interface recognition site (irs)* verantwortlich, die mit dem aktiven Zentrum über einen hydrophoben Kanal verbunden ist, der auch die hydrophoben Fettsäurereste gebundener Substratmoleküle aufnimmt (Abb. 2.7 B)<sup>73; 74</sup>. Die *irs* ist ein Ring hydrophober und basischer Reste um die Öffnung des hydrophoben Kanals<sup>75</sup>. Die exakte Zusammenstellung dieser Aminosäuren bzw. das sich daraus ergebende Ladungsmuster der Bindungsfläche wird für die abweichenden Affinitäten verschiedener sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub> zu Partikeln, die aus jeweils unterschiedlich geladenen Phospholipiden bestehen, verantwortlich gemacht<sup>76; 77; 78; 79</sup>. Die präferentielle Bindung an anionische Phospholipidpartikel scheint allerdings nicht ausschließlich von elektrostatischen Interaktionen auszugehen, da für das Enzym aus dem Bienengift gezeigt wurde, dass sich der Austausch einzelner wie auch mehrerer basischer Aminosäuren der *irs* nicht signifikant auf das Bindungsverhalten des Proteins auswirkt<sup>77</sup>.

Wie oben erwähnt, führt die Bindung von PLA<sub>2</sub> an Phospholipid-Wasser-Grenzflächen zu einer charakteristischen Aktivierung. Die resultierende Reaktionsgeschwindigkeit ist bis zu drei Größenordnungen höher als die Hydrolyse monomerer Substrate<sup>80</sup>. Im Falle micellbildender Phospholipide führt dies zu einer drastischen Änderung der v/S-Charakteristik bei der kritischen Micellbildungskonzentration (*cmc*) in Form eines Aufwärtsknickes.

Mechanistisch wird die Grenzflächenaktivierung durch ein den eigentlichen Substratbindungs- und



**Abbildung 2.8** Schematische Darstellung der Aktivierung von PLA<sub>2</sub> durch Bindung an Phospholipidgrenzflächen. Die Anordnung der Spezies erfolgte nach <sup>81</sup>. Bei sämtlichen Enzymspezies wird die Calciumsättigung vorausgesetzt. Mit „\*“ gekennzeichnete Bezeichnungen repräsentieren jeweils sich in oder an Membranen befindliche Moleküle.

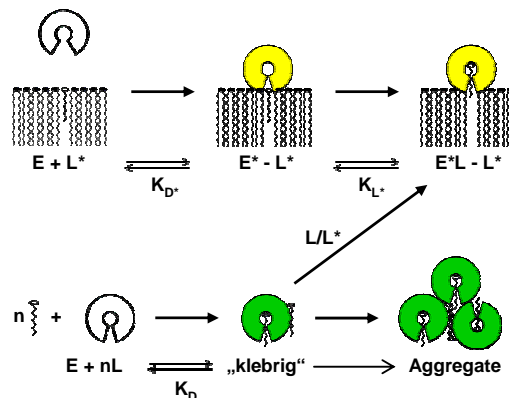
Katalysevorgängen vorgelagertes Gleichgewicht erklärt (Abb. 2.8). Nach der Bindung an die Grenzfläche ist zumindest die N-terminale  $\alpha$ -Helix in einer rigideren Form und in einer weniger solvensexponierten Umgebung. Zusätzlich werden, wie auch durch die Bindung des Cofaktors Ca<sup>2+</sup>, Wassermoleküle aus der Umgebung des N-terminal lokalisierten Tryptophans W3 verdrängt <sup>82; 83; 84</sup>.

Einer der verschiedenen für sekretorische, speziell pankreatische Phospholipasen A<sub>2</sub> hergeleiteten Reaktionsmechanismen ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Der mit „A“ gekennzeichnete, nicht prozessive Weg wird als *hopping mode*, der mit „B“ markierte, prozessive Weg dagegen als *scooting mode* bezeichnet. Die Entscheidung zwischen beiden ist spezifisch für jedes Enzym-Substrat-Paar und von der durch „K<sub>D</sub>“ beschriebenen Affinität der jeweiligen Phospholipase zur aktuell vorliegenden Oberfläche abhängig. Die Eigenschaften letzterer können durch die Aktion des Enzyms signifikant verändert werden, so dass auch Wechsel zwischen beiden Modi möglich sind. Sie können aber auch durch den Einsatz so genannter Mischmicellen gezielt moduliert werden. Ein hoher Anteil anionischer Amphiphiler, wie z.B. SDS, gilt als Garant für einen exklusiv vorliegenden *scooting mode* <sup>85</sup>. Dies führt im Extremfall zu einem *surface dilution* genannten Phänomenen, welches sich in einer lokalen Substratverarmung in Verbindung mit einer extrem festen Bindung des Enzyms an das Partikel sogar ohne die Möglichkeit einer lateralen Diffusion äußern kann <sup>85</sup>.

Die enzymkinetische Behandlung des grenzflächenaktiven Verhaltens sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub> ist entsprechend komplex und mit herkömmlichen Methoden nicht oder nur teilweise möglich, da verschiedene Voraussetzungen für eine Auswertung nach Michaelis-Menten oder ähnliche Verfahren, wie eine im gesamten Reaktionsraum gleiche und über den Zeitraum konstante bzw. nicht signifikant verringerte Substratkonzentration besonders im *scooting mode* nicht erfüllt sind. Die Bestimmung der jeweiligen Konstanten erfolgt daher nach eigenen Schemata <sup>86</sup>.

### 2.3.4 Prämicellare Mischaggregation

Prämicellare Aggregation ist ein Phänomen sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub>, speziell der pankreatischen, das bisher vor allem in Gegenwart nicht hydrolysierbarer, kurzkettiger Amphiphile beobachtet wurde und sich in Form nicht hyperbolischer Bindungsisothermen äußert<sup>87; 88; 89</sup>. Auch kurzkettige Substrate können unterhalb ihrer *cmc* zu ungewöhnlichen  $v/S$ -Charakteristiken von PLA<sub>2</sub> führen<sup>90; 91</sup>. In beiden Fällen können dabei mehrphasige Kurven entstehen. Zusätzlich zu den komplexen Bindungskurven fiel eine ausgeprägte Aggregationsanfälligkeit von PLA<sub>2</sub> in Gegenwart der erwähnten Amphiphile, nicht jedoch in deren Abwesenheit auf<sup>87</sup>. Aufgrund dieser Tendenz zur Ausbildung gemischter Aggregate ist die biophysikalische Charakterisierung des Vorgangs problematisch. So führte beispielsweise die Größenbestimmung solcher Mischaggregate mittels analytischer Gelfiltration<sup>88</sup> nicht immer zu verwertbaren Ergebnissen. Obwohl ebenfalls die Aggregation detektierend, sind Messungen der intrinsischen Fluoreszenz oder des Resonanzenergietransfers zu einem externen Akzeptor geeigneter und führten in Verbindung mit kalorimetrischen Messungen zu dem in Abbildung 2.9 dargestellten mechanistischen Modell<sup>89</sup>.



**Abbildung 2.9** Schematische Darstellung des Verhaltens von PLA<sub>2</sub> in Gegenwart nicht hydrolysierbarer Amphiphile. Die Abbildung basiert im wesentlichen (siehe Text) auf Abbildung 1 in<sup>88</sup>. Die mit „\*“ markierten und in gelb dargestellten Spezies repräsentieren jeweils sich in oder an Membranen befindliche Moleküle. Die grün gefärbten Spezies bezeichnen aggregierte oder aggregationskompetente Moleküle.

Demzufolge würde sich das bindende Enzymmolekül wie während der Grenzflächenaktivierung verhalten, sofern sich das entsprechende Amphiphil in einer Membranumgebung befindet (Abb. 2.9, obere Hälfte). Ist dies nicht der Fall, kann es einerseits als einzelner Ligand im aktiven Zentrum binden oder andererseits auf der Proteinoberfläche im Ensemble mit weiteren Molekülen hydrophobe Cluster bilden. Die solchermaßen erhöhte Hydrophobizität vergrößert die unter normalen Bedingungen geringe Tendenz von PLA<sub>2</sub> zur Aggregation wesentlich. Diese Eigenschaft führte zu der Bezeichnung „klebrig“ („sticky“) für diese Vorstufe zur Aggregation<sup>88</sup>.

Die aus der Literatur<sup>88</sup> entnommene Vorlage für Abbildung 2.9 wurde in einigen Punkten verändert, um dem experimentellen Befund Rechnung zu tragen, dass PLA<sub>2</sub> auch in (misch-) aggregierter Form noch

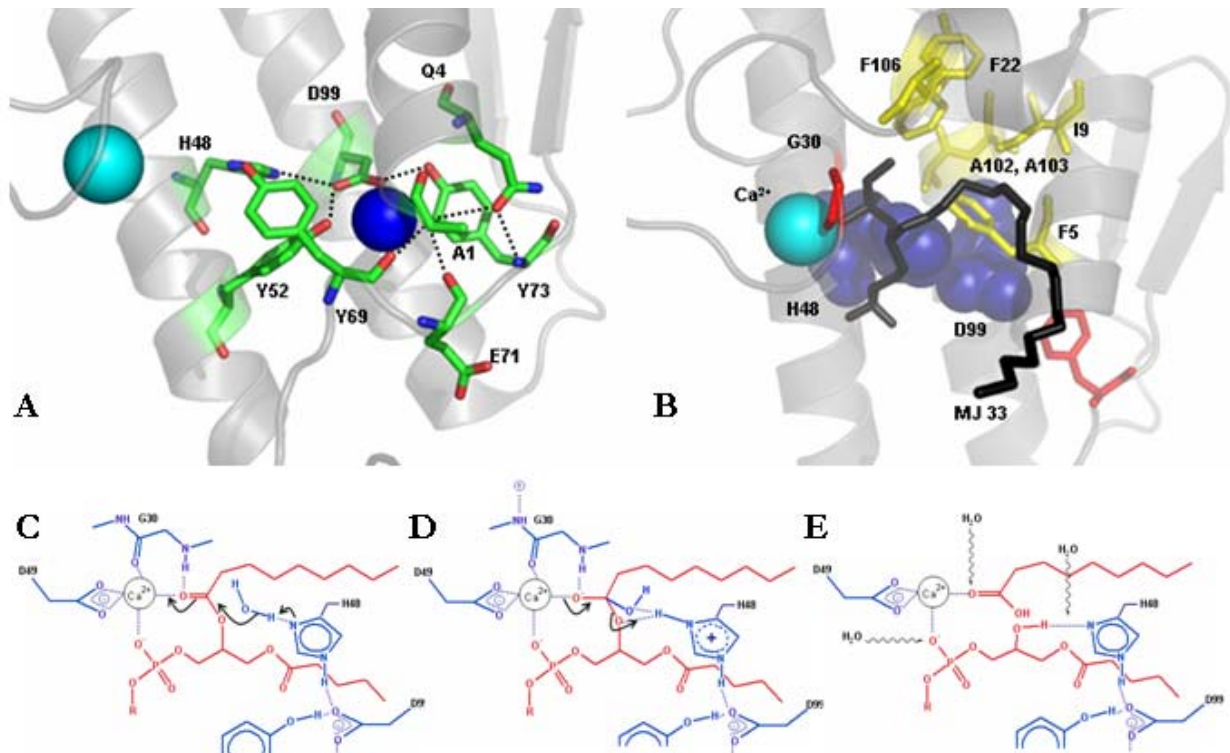
aktiv ist und dass dieser Vorgang die spezifische Aktivität des Enzyms erhöht, wenn auch nicht in dem Maße, wie die Bindung an eine echte Grenzfläche<sup>90; 91</sup>. Da eine messbare Aktivität die Bindung eines Substrates im aktiven Zentrum voraussetzt und die gefundene Aktivierung kleiner als die durch Grenzflächen induzierte zu sein scheint, wurde ersteres in das Schema integriert und die Aggregate, bzw. deren Vorstufe, farblich anders hervorgehoben (vergleiche Abb. 2.8).

Die Hydrolyse von Amphiphilen, die in einer wie der oben beschriebenen prämicellaren Form vorliegen, ist visuell vom Abbau tatsächlich monomer vorliegender Substrate schwer zu unterscheiden, sofern die Größe der Mischaggregate eine gewisse Schwelle nicht überschreitet. Im Zusammenhang mit weiteren experimentellen Befunden wurde geschlossen, dass die messbare Aktivität von PLA<sub>2</sub> gegen Substrate unterhalb ihrer *cmc* in Wirklichkeit auf prämicellaren Aggregaten an Luftblasen oder den Gefäßwänden beruht. Daraus folgte die Annahme, dass alle kurzkettigen Phospholipide unterhalb ihrer *cmc*, wenn diese durch PLA<sub>2</sub> abgebaut werden, nicht in monomerer Form vorliegen und somit das Enzym für echte monomere Substrate nicht aktiv sei<sup>92</sup>.

### 2.3.5 PLA<sub>2</sub>-katalysierte Hydrolyse

Das aktive Zentrum von PLA<sub>2</sub> (Abb. 2.7) besteht aus dem hydrophoben Kanal zur Aufnahme der Fettsäurereste, dem durch die Peptidbindungen des Calciumbindungs-*loops* (25-33) sowie die Carboxylgruppe von D49 koordinierten Calciumion und der katalytischen Dyade H48-D99. Die Dyade H48-D99 bzw. ihre Bedeutung für die PLA<sub>2</sub>-katalysierte Reaktion erschloss sich bereits aus der ersten bekannten Röntgenkristallstruktur von bpPLA<sub>2</sub><sup>93</sup>. Die Ähnlichkeit zur katalytischen Triade von Serinproteasen ist trotz des um 180° gedrehten Imidazolringes von H48 augenfällig. Dementsprechend ähnlich ist der Katalysemechanismus, wobei die Rolle des Serins der Proteasen bei den sekretorischen Phospholipasen A<sub>2</sub> durch ein Wassermolekül übernommen wird und die Reaktion nicht über ein gebundenes Acylintermediat verläuft. Die in Abbildung 2.10 C-E gezeigte und nachfolgend beschriebene Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte wurde der Literatur<sup>80</sup> entnommen.

Im Zuge des ersten Reaktionsschrittes, der so genannten produktiven Substratbindung, bindet das Substratmolekül im aktiven Zentrum. Dabei werden die hydrophoben Fettsäurereste vom hydrophoben Kanal aufgenommen (Abb. 2.10 B). Die Carbonylgruppe der zu spaltenden Esterbindung bildet eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem Calciumion aus und verdrängt eines der beiden Wassermoleküle aus der ursprünglichen Ligandensphäre (Abb. 2.10 B, C). Die Bindung wird weiterhin über ionische Wechselwirkungen mit den Stickstoffatomen der Peptidbindung der Aminosäuren 30 und 32 stabilisiert. Die Wechselwirkung des Ca<sup>2+</sup> mit einem weiteren Sauerstoff des Substrates verdrängt das andere Wassermolekül. Dies erklärt auch die Stereospezifität des Enzyms für Phospholipide mit Glycerinrückgrat. Interaktionen des Proteins mit dem *sn*-3-Substituenten sind von dessen Natur abhängig aber zumindest im



**Abbildung 2.10** Aktives Zentrum und Katalysemechanismus von PLA<sub>2</sub>. **A:** Aktives Zentrum von PLA<sub>2</sub> (Ausschnitt). Die Abbildung zeigt das Wasserstoffbrückennetzwerk, welches das aktive Zentrum mit dem N-Terminus verbindet, das Calciumion (türkisfarbene Kugel) und ein gebundenes Wassermolekül (blaue Kugel). Die Wasserstoffbrücken wurden mit Ausnahme der beiden weggelassenen (D99-H<sub>2</sub>O und N-H<sub>2</sub>O) als gepunktete Linien dargestellt, die beteiligten Aminosäuren als Stäbchen vor dem Hintergrund der schematischen Darstellung des Polypeptidrückgrates. Diese wurden anhand ihrer atomaren Zusammensetzung (C grün, O rot und N blau) gefärbt. Als Basis dienen die Koordinaten der pdb-Datei 4P2P<sup>72</sup> der Brookhaven-Datenbank. **B:** Aktives Zentrum von ProPLA<sub>2</sub> mit dem gebundenen phospholipidanalogen Inhibitor MJ 33 (schwarze Stäbchen). Die roten Stäbchen repräsentieren die an der Katalyse nur mittelbar beteiligten Aminosäuren, die gelben Stäbchen den hydrophoben Kanal. Die katalytische Dyade (H48-D99) wird in Form blauer Kugeln, das Calciumion als türkisfarbene Kugel gezeigt. Als Basis dienen die Koordinaten der pdb-Datei 1HN4<sup>94</sup> der Brookhaven-Datenbank. Beide Abbildungen wurden mithilfe der Visualisierungssoftware Pymol bearbeitet. **C-E:** Abfolge der Hauptschritte der PLA<sub>2</sub>-katalysierten Reaktion. Das Schema wurde nach<sup>80</sup> erstellt, die Proteinkomponente blau, die Phospholipidkomponente dunkelrot gefärbt. Das Umklappen von Bindungen und die zur Dissoziation der Produkte führenden Angriffe von Wassermolekülen werden jeweils durch schwarz bzw. geschlängelt dargestellte Pfeile symbolisiert.

*scooting mode* nicht von Bedeutung.

Während des zweiten Schrittes (Abb. 2.10 C) fungiert der Imidazolrest von H48 als Brønsted-Base und entzieht dem das Serin ersetzenden Wassermolekül ein Proton. Das sich über D99 ausbreitende extensive Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert die zusätzlich aufgenommene positive Ladung und ermöglicht so den nucleophilen Angriff des Wassers auf die Carbonylgruppe des Substrates (Abb. 2.10 C). Das dadurch entstehende tetrahedrale Intermediat wird durch die Bindung an das Calciumion und die Wechselwirkung mit einem weiteren Elektrophil stabilisiert (Abb. 2.10 D). Das von H48 aufgenommene Proton ist 2,6 Å vom tetrahedralen Intermediat entfernt und gilt als der Auslöser von dessen Kollaps durch Protonierung des *sn*-2-Sauerstoffs (Abb. 2.10 D). Als letztes dissoziieren die Produkte, während das für die Hydrolysereaktion verbrauchte Wassermolekül bei H48 ersetzt wird und die beiden durch die

Substratbindung verdrängten Wassermoleküle ihren Platz in der Koordinationssphäre des  $\text{Ca}^{2+}$  wieder einnehmen (Abb. 2.10 E).

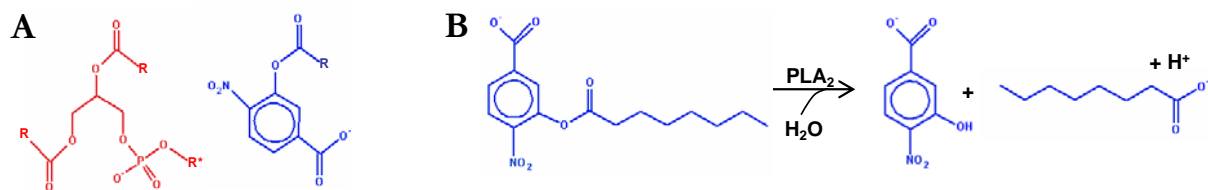
Wie anhand der gefundenen enzymatischen Aktivität entsprechender Varianten festgestellt wurde, ist den in Abbildung 2.10 A gezeigten Tyrosinen eher eine das aktive Zentrum strukturell unterstützende als eine katalytisch aktive Rolle zu unterstellen <sup>6; 95</sup>. Die beschriebene Wasserstoffbrücke zwischen der Imidazoliumform von H48 von bpPLA<sub>2</sub> bzw. H34 von bvPLA<sub>2</sub> und dem tetrahedralen Intermediat (Abb. 2.10 D) wurde mithilfe der Phosphonatgruppe der Phospholipidanaloga MG14 und HK32 simuliert. Durch NMR-Spektren wurde nachgewiesen, dass sie die Eigenschaften so genannter *low barrier hydrogen bridges* aufweist, wie sie auch in den aktiven Zentren von Serinproteasen auftreten <sup>96</sup>. Es wurde geschlussfolgert, dass der solchermaßen erzielte Energiegewinn zur Stabilisierung des Reaktionsintermediates oder des Übergangszustandes beitragen könnte. Die sich aus dem gezeigten Reaktionsverlauf ergebende positive Partialladung von D99 konnte in derselben Studie ebenfalls belegt werden <sup>96</sup>. Der Austausch von H48 durch Lysin oder Arginin führte zu der Annahme, dass die Wasserstoffbrücke zwischen H48 und D99 (Abb. 2.10 A) 5,2 kJ mol<sup>-1</sup> zur globalen Proteinstabilität von PLA<sub>2</sub> beiträgt <sup>5</sup>.

## 2.3.6 Bindung und Umsatz artifizierlicher Liganden und Substrate durch PLA<sub>2</sub>

### 2.3.6.1 NOB-Hydrolyse durch PLA<sub>2</sub>

Die Messung der katalytischen Aktivität von PLA<sub>2</sub> ist mittels gekoppelter Fluoreszenzmessungen <sup>97; 98</sup> oder auch direkter Messungen des Umsatzes fluoreszenzmarkierter Substrate <sup>99; 100</sup> möglich. Diese Tests sind aber einerseits vergleichsweise teuer und andererseits verhältnismäßig anfällig gegen Umgebungseinflüsse. Die weit verbreitete pH-stat-Methode, welche die Freisetzung von Protonen durch eine hydrolytische Reaktion detektiert, setzt das Vorhandensein eines pH-stat-Gerätes voraus und ist auch hinsichtlich der Unempfindlichkeit vor allem in Gegenwart chaotroper Salze limitiert. Letzteres gilt auch für die ansonsten sehr bequeme Verwendung von Thiophosphatidylcholinen <sup>101; 102; 103</sup>. Dagegen verspricht der Einsatz von 3-Octanoyloxy-4-nitrobenzoat (NOB) einen stabilen, relativ preiswerten und reproduzierbaren Aktivitätstest <sup>104; 105; 106; 107</sup>.

NOB wurde unter im Hinblick auf die produktive Substratbindung des Glyceringerüsts im aktiven Zentrum entwickelt <sup>104</sup>. Auch wenn sich die Strukturen von Phospholipiden und NOB nur bedingt ähneln, ist doch eine gewisse Ähnlichkeit der Molekülformen erkennbar (Abb. 2.11 A). Daher wird NOB durch eine Vielzahl sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub> gebunden und zu 3-Hydroxy-4-nitrobenzoat (HNB) hydrolysiert (Abb. 2.11 B) <sup>107</sup>. Die Konzentration von HNB ist anhand der UV-Absorption bei 425 nm leicht zu bestimmen. Der Test kann sowohl diskontinuierlich <sup>105; 107</sup> als auch kontinuierlich <sup>9; 108</sup> durchgeführt werden. Aufgrund des einfachen Versuchsaufbaus, seiner Unempfindlichkeit und

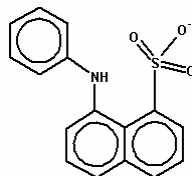


**Abbildung 2.11 Design und Hydrolyse von NOB. A: Vergleich der Strukturformeln von Phospholipiden (rot) und NOB (blau). Dabei bezeichnet „R“ die Fettsäurereste, während „R“ die polare Kopfgruppe repräsentiert. B: Schematische Darstellung der PLA<sub>2</sub>-katalysierten Hydrolyse von NOB.**

Reproduzierbarkeit wie auch der leichten Verfügbarkeit des Substrates ist der Aktivitätstest sowohl für *screenings* in kleinem <sup>107</sup> und großem Maßstab <sup>105</sup> als auch für Messungen in Gegenwart perturbierender Substanzen geeignet.

### 2.3.6.2 ANS-Bindung von PLA<sub>2</sub>

Der Fluoreszenzfarbstoff 1-Anilino-8-naphtalensulfonat (ANS) wird am passendsten als amphiphiles Salz beschrieben (Abb. 2.12). Das aromatische Ringsystem vermittelt eine beträchtliche Hydrophobizität, was auch die Wasserlöslichkeit der Verbindung limitiert. Wegen der Sulfonsäuregruppe weist die Substanz allerdings auch eindeutig polare Eigenschaften auf.



**Abbildung 2.12 Strukturformel von ANS. Aufgrund der niedrigen pK<sub>a</sub>-Wertes von Naphtalensulfonaten (-1 bis 2) wird die deprotonierte Form dargestellt.**

Tatsächlich scheint die Bindung von ANS an Proteine sogar bevorzugt über ionische Interaktionen vermittelt zu werden. Im Falle des Rinderserumalbumins wurde mittels kalorimetrischer Methoden festgestellt, dass pro Proteinmolekül mehr als 100 ANS-Moleküle gebunden werden, ANS sich also eher als klassisches Salz denn als spezifischer Ligand verhält <sup>109</sup>. In dem genannten Fall führen lediglich fünf der über 100 Bindungsereignisse zu dem bekannten Effekt der hypsochromen und drastisch erhöhten maximalen Fluoreszenz <sup>110</sup>. Dieser lässt sich auf die orthogonale Fixierung der beiden aromatischen Ringe durch die Anlagerung an hydrophobe Oberflächen des bindenden Proteins zurückführen <sup>111</sup>.

Für Studien mit Proteinen gibt es zwei verschiedene Anwendungen der ANS-Fluoreszenz. Einerseits binden viele Proteine ANS im nativen Zustand. Dies kann <sup>111</sup>; <sup>112</sup>; <sup>113</sup>, muss aber keineswegs <sup>114</sup> im aktiven Zentrum geschehen. Bekannte Beispiele für solche Proteine sind  $\beta$ -Lactoglobulin <sup>115</sup>, Rinderserumalbumin <sup>110</sup>,  $\alpha$ -Chymotrypsin <sup>114</sup> und vor allem Apomyoglobin <sup>116</sup>. Besonders die Fluoreszenz des Komplexes von ANS und Apomyoglobin ist ein häufig verwendeter Parameter für strukturelle Untersuchungen <sup>117</sup> und



auch für Faltungs-/Entfaltungsstudien <sup>117; 118</sup>. Die Messungen der ANS-Fluoreszenz in Gegenwart denaturierender Agenzien ist in solchen Fällen mit Aktivitätsmessungen vergleichbar.

Die zweite Anwendung betrifft Proteine, die im nativen Zustand kein ANS binden, im Zuge des Faltungs- bzw. Entfaltungsvorganges aber transiente <sup>119</sup> oder stabile <sup>120; 121</sup> ANS-bindende Intermediate akkumulieren. Weiterhin sind auch Fälle bekannt, in denen sowohl der native, als auch ein teilentfalteter Zustand ANS bzw. bisANS binden <sup>122</sup>. In beiden Fällen kann die ANS-Bindung genutzt werden, um die Existenz eines Intermediates festzustellen aber auch um einen Faltungsweg zu untersuchen. In jedem Fall ist bei der Verwendung von ANS für Faltungsuntersuchungen jedoch Vorsicht geboten, da die Verbindung kinetische Konstanten <sup>123</sup> oder auch in ihrer Rolle als Ligand allgemein die Lage des Entfaltungsgleichgewichtes <sup>16</sup> beeinflussen kann. Darüber hinaus kann die Substanz auch präzipitierend wirken <sup>124</sup>. Oberhalb kritischer Konzentrationen kann es, besonders in Gegenwart von Kationen, auch zu Selbstassoziationen <sup>125</sup> kommen, was auch die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes verändern kann.

Aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Affinität zu ANS ist dies auch für PLA<sub>2</sub> zu beachten <sup>73</sup>. Diese ist eindeutig der zuerst erwähnten Gruppe von Proteinen zuzuordnen, die ANS im nativen Zustand binden. Die ANS-Bindung durch verschiedene sekretorische Phospholipasen A<sub>2</sub> <sup>126</sup>, speziell auch durch PLA<sub>2</sub> <sup>73</sup>, ist seit längerem bekannt. Dabei findet ein Resonanzenergietransfer vom Tryptophan des Proteins zum gebundenen Farbstoff statt <sup>127</sup>. Die pH-Abhängigkeit der ANS-Fluoreszenz (siehe auch Abschnitt 4.1) <sup>126; 128; 129</sup>, ihre Abhängigkeit von der Calciumkonzentration <sup>73; 129</sup> und der Befund, dass das katalytisch essentielle Histidin für die ANS-Bindung intakt vorliegen muss <sup>130</sup>, legen die Vermutung nahe, dass ANS im aktiven Zentrum von PLA<sub>2</sub> gebunden wird und mit Teilen des N-Terminus interagiert.

### 2.3.7 Stabilität von PLA<sub>2</sub>

Obwohl PLA<sub>2</sub> wie viele sekretorische Phospholipasen A<sub>2</sub> strukturell und kinetisch gut charakterisiert ist, sind verhältnismäßig wenig verlässliche Daten zur Stabilität des Proteins bekannt. Ähnliches gilt für die eng verwandte bpPLA<sub>2</sub>. Prinzipielle Merkmale, wie z.B. die hohe Resistenz von PLA<sub>2</sub> gegen denaturierende Einflüsse sind allerdings seit längerem bekannt <sup>131</sup>. Vor allem im Rahmen enzymkinetisch motivierter Aminosäureaustausche wurden konkrete thermodynamische Stabilitätsparameter beider Enzyme veröffentlicht <sup>4; 5; 6; 95; 132</sup>. Gezielte Stabilitätsstudien sind dagegen vergleichsweise selten <sup>3; 133</sup>. Lediglich der hohe Grad der Disulfidverbrückung und das innerhalb der verschiedenen Hauptgruppen divergierende Disulfidbrückenmuster führten zu Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von Anzahl und Verteilung der Disulfidbrücken auf die thermodynamische Stabilität sowie das kinetische Verhalten von PLA<sub>2</sub> <sup>2</sup> und bpPLA<sub>2</sub> <sup>133; 134</sup>. Alle genannten Studien haben die Verwendung von GuHCl als Denaturans gemein. Leider werden in den wenigsten Fällen <sup>2; 3; 6</sup> Übergangskurven gezeigt. Angesichts der sich jeweils ähnelnden



Halbdenaturationskonzentrationen dürften jedoch alle Studien durch die fehlenden, für U repräsentativen Basislinien (siehe auch Abschnitt 4.2) in ihrer Aussagekraft hinsichtlich der korrekten  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werte, zumindest der Wildtypenzyme, limitiert sein. Dementsprechend schwanken die Angaben für  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$  zwischen  $19 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $39,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ , obwohl in allen angegebenen Fällen die Werte von  $[D]_{0,5}$  zwischen 6,1 und 6,4 liegen. Der naheliegende stabilisierende Einfluss des Cofaktors  $\text{Ca}^{2+}$  wurde im Rahmen einer Untersuchung mittels *disulphide scrambling* festgestellt<sup>133</sup>. Auch wurde hier erstmals GuHSCN als Denaturans verwendet, aber leider sind keine thermodynamischen Parameter für dieses System angegeben. Aus derselben Studie geht hervor, dass die Disulfidbrücken ca. 70 % zur apparenten thermodynamischen Stabilität beitragen. Diese These wird durch den Befund gestützt, dass die Einführung einer weiteren Disulfidbrücke nach dem Vorbild der Hauptgruppe II-Enzyme die Stabilität erhöht. Weiterhin scheinen C11-C77 und C61-C91 für Struktur und Stabilität von PLA<sub>2</sub> besonders wichtig<sup>2</sup>. Aus den NMR-Spektren einer ähnlichen Studie<sup>134</sup> mit bpPLA<sub>2</sub> geht dagegen hervor, dass C11-C77 und C44-C105 für die Ausbildung einer wildtypartigen nativen Struktur nötig sind und die Eliminierung von C84-C96 die Faltung des Proteins verhindert. Die Stabilitätsmessungen zeigten jedoch, dass der Beitrag von C61-C91 zur Gesamtstabilität dem von C44-C105 entspricht. Der Beitrag der einzelnen Disulfidbrücken zur Gesamtstabilität scheint in nachstehender Reihenfolge zu steigen: C27-C123 (Eliminierung führt zur Stabilisierung) < C29-C45 (entspricht Wildtyp) < C51-C98 < C61-C91 < C44-C105 < C11-C77 < C84-C96. Darüber hinaus ist auch eine bedeutende Rolle des in Abbildung 2.10 A gezeigten Wasserstoffbrückennetzwerkes für die thermodynamische Stabilität wahrscheinlich, da der Austausch von H48<sup>5; 91</sup> und D99<sup>132</sup> sowie Y52 und Y73<sup>6</sup> zu drastischen Destabilisierungen führt. Ein Wechsel an Position 9, einem Bestandteil des hydrophoben Kanals, destabilisiert bvPLA<sub>2</sub> ebenfalls erheblich<sup>91</sup>. Weniger drastisch wirken sich Austausche an den Positionen 89 und 92 aus<sup>3; 4</sup>. Da aber die meisten der genannten Studien mit enzymkinetischen Fragestellungen durchgeführt wurden und deshalb vorwiegend in die Katalyse involvierte Aminosäuren ausgetauscht wurden, kann aus den zitierten Daten mit Ausnahme der einzelnen Disulfidbrücken nicht auf eine bestimmte Tendenz hinsichtlich eines konkreten Einflusses einzelner Regionen auf die Gesamtstabilität oder den Faltungs-/Entfaltungsvorgang geschlossen werden.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Verwendete Materialien

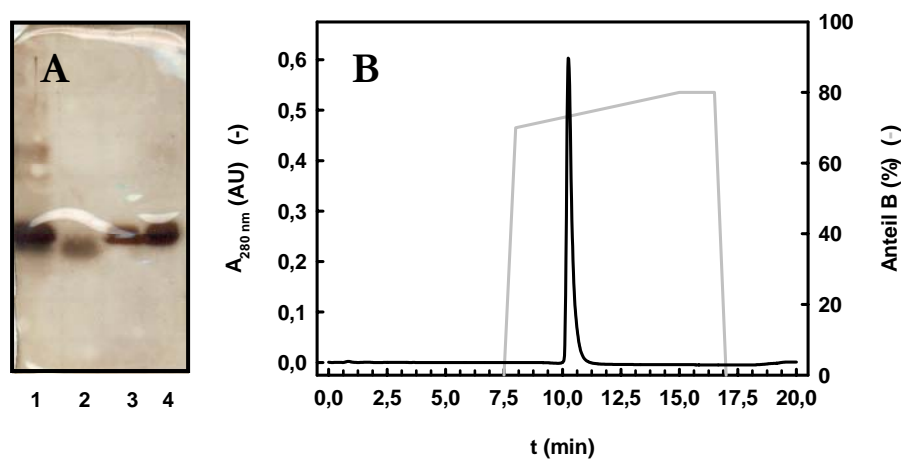
ANS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Serva, Heidelberg
CaCl <sub>2</sub>	AppliChem, Darmstadt
Caprylsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Casein	Merck, Darmstadt
Chymotrypsin	Serva, Heidelberg
DCl	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
D <sub>2</sub> O	Euriso-Top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
GuHCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
GuHSCN	Sigma-Aldrich, Steinheim
HNB	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaOD	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
N-Acetyltryptophanamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Acetyltyrosinamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
NOB	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
bvPLA <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Alle weiteren, für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in der Regel von Sigma (Steinheim) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen und waren von größtmöglicher Reinheit.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Reinigung der PLA<sub>2</sub>

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde zunächst freundlicherweise PLA<sub>2</sub> (Lecitase™, Novo Nordisk AIS, Bagsvaerd, Dänemark) von der Lipoid GmbH (Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt. Später wurde käuflich erworbene PLA<sub>2</sub> (Sigma, Steinheim) verwendet. Beide Enzyme lagen gelöst vor und wiesen noch geringfügige Verunreinigungen auf (Abb. 3.1 A). In der Lösung enthaltene Salze wurden durch Dialyse entfernt. Zur Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie diente eine Mono S™ 5/50 GL-FPLC-Säule (Amersham Biosciences, Uppsala) die in einer HPLC-Anlage (Niedrigdruckgradientenpumpe K-1001, UV-Detektor K-2600, Knauer, Kulmbach) montiert war. Die PLA<sub>2</sub> wurde mit 50 mM NaOAc/50 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 5,3 an das Säulenmaterial gebunden und nach dem Durchlauf der nicht bindenden Verunreinigungen mit 2 M NaCl/50 mM TrisOAc/50 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,5 (Puffer B) eluiert. Die gereinigte PLA<sub>2</sub> lief in der SDS-PAGE als einzelne Bande (Abb. 3.1 A) und wies auch in der Rechromatographie keinerlei Verunreinigungen mehr auf (Abb. 3.1 B). Die gesammelten Fraktionen wurden in einer Amicon 8050-Ultrafiltrationszelle (Millipore, Bedford, USA) an einer Omega-3K-Membran (Pall Life Sciences, Ann Arbor, USA) konzentriert und mit 10 mM TrisHCl, pH 8,0 gewaschen. Die erhaltene Lösung war bei 4 °C über Monate hinweg stabil und konnte ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Für bestimmte Messungen, z.B. von NMR-Spektren, wurde sie gegen Wasser dialysiert und in einem Beta 1-16 Lyophilisator (Christ, Osterode am Harz) lyophilisiert. Wieder gelöstes Lyophilisat besaß die gleiche spezifische Aktivität gegen NOB wie die nicht lyophilisierte Stammlösung (siehe 3.2.4). Die Konzentration von PLA<sub>2</sub> wurde grundsätzlich spektrophotometrisch anhand des spezifischen Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1,3\text{ ml mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  <sup>135</sup> bestimmt.



**Abbildung 3.1 Überprüfung der Reinheit von PLA<sub>2</sub>.** A: Silbergefärbtes 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen wurden das ungereinigte Protein (1), die nichtbindenden Fraktionen (2, 3) und die eluierte Fraktion (4). B: HPLC-Chromatogramm des gegen den Laufpuffer dialysierten Eluates.

### 3.2.2 Synthese von NOB

Nachdem das ursprünglich von Sigma erworbene NOB nicht mehr erhältlich war, wurde es nach <sup>104</sup> aus HNB und Caprylsäurechlorid (beide von Sigma, Steinheim) synthetisiert. Die einzige Veränderung gegenüber der Originalvorschrift bestand im Einsatz einer konventionellen Kieselgelsäule ohne externe Druckzufuhr anstelle der ursprünglich verwendeten *flash*-Chromatographie. Die spezifische Aktivität von PLA<sub>2</sub> gegen beide Präparate war unter Standardbedingungen identisch.

### 3.2.3 Messung der Größe der NOB-Partikel

Die Gyrationsradien der NOB-Partikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung mit großzügiger Erlaubnis von Prof. Dr. A. Blume und freundlicher Hilfe von M.Sc. Appl. Polym. Sci. Ahmad Arouri am Institut für Physikalische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem dort befindlichen High Performance Particle Sizer (ALV-Laser, Langen) bestimmt. Für ein typisches Experiment wurden je 100 µl 0,3 - 9 mM NOB in Acetonitril zu je 1 ml Standardreaktionspuffer (10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0) pipettiert, durch kräftiges Schütteln gemischt und bei einer Wellenlänge von 632,8 nm und einer Temperatur von 25 °C gemessen.

### 3.2.4 Messung der enzymatischen Aktivität von PLA<sub>2</sub> gegen NOB

Die durch PLA<sub>2</sub> katalysierte hydrolytische Spaltung von NOB zu HNB und Caprylat wurde UV-spektrophotometrisch bei 425 nm und 25°C mit Hilfe eines Ultrospec 3000 UV/Vis-Spektrophotometers (Pharmacia LKB Biotechnologie, Freiburg) oder eines Uvikon 942-Spektrophotometers (Bio-Tek Kontron, Neufahrn) kontinuierlich verfolgt. Hierfür wurde das Enzym in je 1 ml des jeweiligen Puffers vorgelegt (Tab. 3.1), je 100 µl 1,5 bis 30 mM NOB in Acetonitril zugegeben und die Reaktion durch kräftiges Schütteln der Küvette gestartet. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 3.1 angeführt.

**Tabelle 3.1 Reaktionspuffer der Messung der NOB-Hydrolyse durch PLA<sub>2</sub>.**

pH-Wert	Puffer	[CaCl <sub>2</sub> ] (mM)
5	25 mM NaOAc	100
6	25 mM MES	100
7	10 mM MOPS	50
8	10 mM TrisHCl	25
9	10 mM NaBO <sub>3</sub>	25

Die Konzentration des freigesetzten HNB wurde anhand des molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon_{425\text{ nm}} = 4900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) <sup>106</sup> bestimmt und die gemessene Anfangsgeschwindigkeit auf die eingesetzte Enzymmenge bezogen. Die Auswertung erfolgte wie in allen Fällen mit Hilfe der SigmaPlot-Software (Systat Software Inc., Richmond, USA)

### 3.2.5 CD-Spektroskopie

Zur Messung von CD-Spektren diente zunächst ein CD-Spektrometer 62 ADS (AVIV, Lakewood, N.J.) später ein J-810 Spektropolarimeter (Jasco Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt). Alle Messungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei 20 °C durchgeführt. Die auf die Anzahl der Aminosäurereste bezogene molare Elliptizität  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  in (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) wurde aus den CD-Spektren nach Gleichung 3.1 ermittelt.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot M_r}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A} \quad 3.1$$

Dabei repräsentieren  $\Theta$  das gemessene Signal in (mdeg),  $M_r$  die Molare Masse des Proteins,  $c$  die Proteinkonzentration in (mg/ml),  $d$  die optische Weglänge in (cm) und  $N_A$  die Anzahl der Aminosäuren des Proteins. Fern-UV-CD-Spektren wurden entweder in 1 mm- oder 0,1 mm-Küvetten, Nah-UV-CD-Spektren dagegen grundsätzlich in einer 1 cm-Küvette gemessen.

#### 3.2.5.1 CD-Spektren nativer PLA<sub>2</sub> bei verschiedenen pH-Werten

Für die Messung des Einflusses des pH-Wertes auf die Struktur von PLA<sub>2</sub> wurde lyophilisierte PLA<sub>2</sub> im jeweils verwendeten Puffer gelöst und die Konzentration (71 μM bis 101 μM) spektrophotometrisch ermittelt. Für die pH-Werte von 1,0 - 3,0 wurde Gly-, und für pH 4,0 sowie pH 5,0 NaOAc-, für pH 6,0 bzw. pH 7,0 jeweils MES- und MOPS-, für pH 8,0 und 9,0 NaBO<sub>3</sub>- und für die pH-Werte von 10,0 - 13,0 wiederum Gly-Puffer verwendet. Die Pufferkonzentration betrug in allen Fällen 50 mM. Weiterhin enthielten die Puffer 2 mM EDTA. Für die CD-Spektren wurden 10 Einzelspektren mit einer Geschwindigkeit von 20 nm/min und einer Integrationszeit von einer Sekunde sowie einer Bandbreite von 1 nm und einer optischen Weglänge von 0,1 mm (Fern-UV-CD), bzw. 1 cm (Nah-UV-CD) akkumuliert. Ein Glätten der Spektren war nicht erforderlich.

#### 3.2.5.2 GuHCl-induzierte Übergangskurven

Für die Messung GuHCl-induzierter Übergangskurven wurden 7 μM Enzym zunächst für mehrere Stunden in jeweils 10 mM NaBO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 10 mM NaBO<sub>3</sub>/8,5 M GuHCl, pH 8,0 inkubiert und dann aus beiden Lösungen eine Mischung mit der gewünschten GuHCl-Konzentration hergestellt. Die Lösungen für holoPLA<sub>2</sub> enthielten zusätzlich je 25 mM CaCl<sub>2</sub>. Danach wurde die Elliptizität bei 222 nm 10 min lang kontinuierlich mit einer Integrationszeit von 10 Sekunden pro Punkt und einer Bandbreite von 1 nm vermessen. Die optische Weglänge betrug 1 mm. Da sich das Signal, abgesehen von der gerätebedingten Streuung, innerhalb des Messzeitraumes nicht veränderte, wurde es zur Auswertung über den Messzeitraum arithmetisch gemittelt. Die exakte GuHCl-Konzentration wurde refraktometrisch mit Hilfe der aus der Literatur<sup>136</sup> entnommenen Konzentrationsabhängigkeit des refraktometrischen Index von GuHCl bestimmt.

### 3.2.5.3 Messung der Faltungs-/Entfaltungsreaktionen

Für kinetische Entfaltungsmessungen wurden 15  $\mu\text{l}$  0,5 mM PLA<sub>2</sub> in 10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub> mit 135  $\mu\text{l}$  desselben Puffers, der zusätzlich 0 bis 5 M GuHSCN enthielt, gemischt. Für kinetische Rückfaltungsmessungen wurden 0,5 mM PLA<sub>2</sub> in 10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>/5 M GuHSCN über Nacht inkubiert. Die Messung wurde durch Mischen von 15  $\mu\text{l}$  dieser Lösung mit 135  $\mu\text{l}$  von 10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>/0-5 M GuHSCN gestartet. Die Reaktion wurde bis zu 3 min lang bei einer Wellenlänge von 280 nm und einer Bandbreite von 1 nm verfolgt. Die Zeitintervalle betragen 0,5 s.

### 3.2.5.4 Messung thermischer Übergangskurven

Die Puffer für die Messung thermischer Übergangskurven von apoPLA<sub>2</sub> glichen den in 3.2.5.1 genannten mit Ausnahme des Zusatzes von 1-5 M GuHCl. Die Puffer für holoPLA<sub>2</sub> enthielten anstelle von EDTA 25 mM (pH 8,0 – pH 10,0) bzw. 50 mM (pH 7,0) CaCl<sub>2</sub>. Gemessen wurde bei 287,5 nm, in Intervallen von 1 K, 60 s Inkubation pro Messpunkt und einer Heizgeschwindigkeit von 1 K/min.

## 3.2.6 Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung von Fluoreszenzspektren erfolgte mit einem FluoroMax-2- oder einem mit Peltierelement ausgestatteten FluoroMax-3-Spektrometer (Horiba Jobin Yvon, München) in einer reduzierten Quarzglas-küvette (4×10 mm Grundfläche). Sofern nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 278 nm, Anregungs- und Emissionspaltbreiten von jeweils 5 nm sowie einer Integrationszeit von 0,4 oder 0,6 Sekunden bei 20 °C durchgeführt. Dabei wurden je drei bis fünf Einzelspektren akkumuliert.

### 3.2.6.1 Fluoreszenzspektren nativer PLA<sub>2</sub> bei verschiedenen pH-Werten

71  $\mu\text{M}$  PLA<sub>2</sub> wurden im Mischpuffer (jeweils 10 mM Gly/10 mM NaOAc/10 mM MES/10 mM MOPS/10 mM Tris/2 mM EDTA, pH 1,5 bis pH 12,5 (apoPLA<sub>2</sub>) bzw. 10 mM MES/10 mM MOPS/10 mM Tris/10 mM Gly und 25 bis 100 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,0 bis pH 12,3 (holoPLA<sub>2</sub>)) inkubiert und wie oben beschrieben gemessen.

### 3.2.6.2 Messung der Fluoreszenz des ANS-PLA<sub>2</sub>-Komplexes

Um die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes ANS an PLA<sub>2</sub> zu detektieren, wurde jeweils eine frische ANS-Stammlösung hergestellt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch anhand des molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{350\text{ nm}} = 4950\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (in Wasser)<sup>137</sup>. Die ANS-Bindungsmessungen erfolgten in 10 mM TrisHCl/10 mM EDTA, pH 8,0 (apoPLA<sub>2</sub>) bzw. 10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 (holoPLA<sub>2</sub>) sowie in 50 mM NaOAc/2 mM EDTA, pH 4,0. Alternativ wurden auch die

unter 3.2.6.1 beschriebenen Puffer verwendet. Typischerweise enthielt ein Ansatz 1  $\mu\text{M}$  PLA<sub>2</sub> und, sofern bei konstanter Konzentration gemessen wurde, 10  $\mu\text{M}$  ANS. Die Anregung erfolgte bei 360 nm, ausgewertet wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität bei 470 nm.

### 3.2.6.3 GuHCl-induzierte Übergangskurven

Für die Messung GuHCl-induzierter Übergangskurven wurden 2  $\mu\text{M}$  bis 7  $\mu\text{M}$  des Enzyms zunächst in jeweils 10 mM TrisHCl, pH 8,0 und 10 mM TrisHCl/8,5 M GuHCl, pH 8,0 (apoPLA<sub>2</sub>) bzw. 10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 und 10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>/8,5 M GuHCl, pH 8,0 (holoPLA<sub>2</sub>) inkubiert und aus dem jeweiligen Paar eine Mischung mit der gewünschten GuHCl-Konzentration hergestellt. Die Proben wurden üblicherweise vor der Messung über Nacht inkubiert. Die exakte Denaturationskonzentration wurde wie unter 3.2.5.2 beschrieben bestimmt.

### 3.2.6.4 GuHSCN-induzierte Übergangskurven

Die Messung GuHSCN-induzierter Übergangskurven erfolgte wie unter 3.2.6.3 beschrieben, aber in Gegenwart von 0-5,5 M GuHSCN. Die Bestimmung der exakten GuHSCN-Konzentration erfolgte mangels veröffentlichter Daten mit Hilfe einer eigenen Eichkurve<sup>9</sup>. Außerdem erfolgte die Auswertung in Abhängigkeit von der Denaturationsaktivität anstelle der Konzentration<sup>9</sup>.

### 3.2.7 Messungen mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz

Entfaltung und Rückfaltung von PLA<sub>2</sub> unter verschiedenen Bedingungen wurde mit einem BioSequential DX.17 MV *stopped-flow*-Spektrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, GB) typischerweise mithilfe der Integralfluoreszenz oberhalb von 305 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt.

Die Entfaltung nativer apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 erfolgte durch Verdünnung von 0,2-0,8 mM PLA<sub>2</sub> in 10 mM TrisHCl/10 mM EDTA, pH 8,0 in denselben Puffer, der zusätzlich 2-5,5 M GuHSCN enthält. Für holoPLA<sub>2</sub> enthielten die Lösungen jeweils 25 mM CaCl<sub>2</sub> anstelle von EDTA. Für Entfaltungsmessungen bei pH 4,0 wurden 0,8 mM PLA<sub>2</sub> in 50 mM NaOAc/2 mM EDTA, pH 4,0 in 50 mM NaOAc/2 mM EDTA/2-5,5 M GuHSCN, pH 4,0 verdünnt. Für die Messung der Rückfaltungsreaktionen von apo-, bzw. holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 und apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 wurden 0,2-0,8 mM PLA<sub>2</sub> mindestens zwei Stunden in jeweils 10 mM TrisHCl/10 mM EDTA/5 M GuHSCN, pH 8,0 oder 10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>/5 M GuHSCN oder 50 mM NaOAc/2 mM EDTA/5 M GuHSCN, pH 4,0 inkubiert. Die Rückfaltungsreaktion wurde durch Verdünnung in die jeweiligen Puffer mit 0-3 M GuHSCN gestartet. Das Probenvolumen betrug immer 150  $\mu\text{l}$ , wobei jeweils ein Volumenteil natives bzw. entfaltetes Protein mit zehn Volumenteil Ent- bzw. Rückfaltungspuffer gemischt wurden. Die Temperatur wurde mittels Wasserbad und Temperaturmessfühler auf 20 °C justiert. Typischerweise wurden vier bis sieben einzelne Progresskurven gemittelt. Die Daten wurden je nach Anzahl der auftretenden Phasen nach einer

Gleichung für eine einfach-, zweifach- oder dreifach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung, nach Bedarf mit wechselndem Vorzeichen der Amplitude angepasst.

### **3.2.8 Messung thermischer Übergangskurven mittels UV/Vis-Spektroskopie**

Für thermische Übergangskurven wurde die Absorption von 40  $\mu\text{M}$  PLA<sub>2</sub> in 50 mM NaOAc/100 mM KCl/5 mM EDTA/1-5 M GuHCl, pH 6,0 (apoPLA<sub>2</sub>) bzw. 50 mM NaOAc/100 mM KCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>/1-5 M GuHCl, pH 6,0 (holoPLA<sub>2</sub>) bei 287,5 nm mit Hilfe eines mit Wasserbad ausgestatteten U-2000 Spektrophotometers (Hitachi, Tokyo, Japan) in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Die in der Küvette vorliegende Temperatur wurde mittels eines P510-Temperaturmessfühlers (Temperature Products, Schöneck) festgestellt. Das Signal wurde als Funktion der Zeit verfolgt. Die Einstellung des jeweiligen Gleichgewichtes galt als sichergestellt, wenn sich das Signal nach Erreichen der gewünschten Temperatur mindestens 1 min lang nicht mehr änderte. Zum Beweis der Reversibilität der Entfaltung wurden vor dem Hochheizen des Thermostats und nach dem Abkühlen der Lösung UV-Spektren gemessen und verglichen.

### **3.2.9 Limitierte Proteolyse**

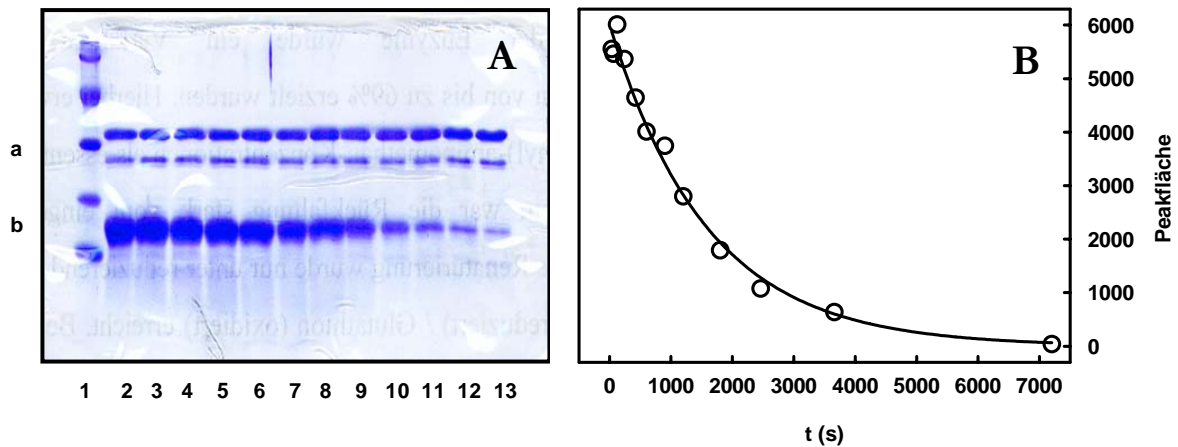
#### **3.2.9.1 Aktivitätstests mit Proteinase K und Pepsin**

Die intrinsische Aktivität von Proteinase K und Pepsin in An- und Abwesenheit von GuHSCN wurde mit Kuhmilchcasein (Merck, Darmstadt) als Modellsubstrat getestet. Hierfür wurden 250  $\mu\text{l}$  einer 0,5 %igen Caseinlösung in 50 mM NaOAc, pH 4,0 für Messungen mit Pepsin, bzw. einer 1 %-igen Caseinlösung in 10 mM TrisHCl/10 mM EDTA, pH 8,0 für den Abbau durch Proteinase K mit 250  $\mu\text{l}$  jeweils desselben Puffers gemischt, der die entsprechende Protease und das Doppelte der vorgesehenen GuHSCN-Konzentration (0-1 M) enthielt. Die Temperatur wurde mittels eines thermostatierbaren Wasserbades konstant bei 20 °C gehalten. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurde die Reaktion mittels Fällung des nicht abgebauten Caseins mit 500  $\mu\text{l}$  0,1 M TCA/0,22 M NaOAc/0,33 M AcOH gestoppt. Die Proteolyseprodukte verblieben nach der sich anschließenden halbstündigen Inkubation und 15-minütigen Zentrifugation bei 21000 $\times$ g in Lösung und wurden anhand ihrer Absorption bei 275 nm quantifiziert. Für die Herstellung der Blindproben erfolgte die Zugabe der Fällungslösung vor der des Caseins. Nach Abzug der Blindwerte wurden die Messwerte nach einer Reaktion 1. Ordnung ausgewertet.

#### **3.2.9.2 Proteolytischer Abbau von PLA<sub>2</sub>**

Der proteolytische Abbau von PLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 wurde in 10 mM TrisHCl/10 mM EDTA, pH 8,0, (apoPLA<sub>2</sub>) bzw. in 10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 (holoPLA<sub>2</sub>) durchgeführt. Die Proteolyse von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 fand in 50 mM NaOAc/2 mM EDTA, pH 4,0 statt. Mit Ausnahme von





**Abbildung 3.2** Limitierte Proteolyse von PLA<sub>2</sub>. **A:** Repräsentatives 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel des Abbaus von 33 µM holoPLA<sub>2</sub> durch Proteinase K (2,8 KE/ml). Die mit „a“ gekennzeichneten Banden zeigen Proteinase K, die mit „b“ markierten PLA<sub>2</sub>. In Spur 1 wurde LMW-Größenstandard (Pierce) und in den anderen die nach 33 s (2), 61 s (3), 121 s (4), 4 min (5), 7 min (6), 10 min (7), 15 min (8), 20 min (9), 30 min (10), 41 min (11), 1 h (12) und 2 h (13) entnommenen Proben aufgetragen. **B:** Auftragung der integrierten Bandenintensität der PLA<sub>2</sub>-Banden des in Abbildung 3.2 A gezeigten Gels gegen die Zeit.

Proteinase K, die als Suspension nach persönlicher Mitteilung von Dr. J. Köditz mit einer spezifischen Aktivität von 220 Kunitz-Einheiten pro ml (KE/ml) vorlag, wurde die Protease im jeweils einzusetzenden Puffer gelöst und die Proteasekonzentration anhand der der *homepage* von Worthington Biochemicals (<http://www.worthington-biochem.com>) entnommenen spezifischen Absorptionskoeffizienten (Trypsin  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1,43\text{ ml mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , Chymotrypsin  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 2,04\text{ ml mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , Pepsin  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1,47\text{ ml mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der PLA<sub>2</sub> gestartet. Mit Ausnahme der Messungen der Temperaturabhängigkeit von  $k_u$  wurde die Temperatur mit Hilfe eines Wasserbades mit Thermometereinsatz und Thermostat stets bei 20 °C gehalten. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden den Reaktionsansätzen Proben entnommen und die Reaktion mittels vorgelegter 50 mM PMSF-Lösung in Isopropanol gestoppt. Im Falle von Pepsin erfolgte das Abstoppen mittels vorgelegten Sammelgelpuffers (0,625 M Tris/HCl, pH 6,8). Die Proben wurden getrocknet und in SDS-Probenpuffer (20 % (v/v) Glycerin/1,15 % (w/v) SDS /78 mM TrisHCl/0,01% (w/v) Bromphenolblau /7,5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und mittels einer *Mighty-Small II electrophoresis unit* (Hoefer, San Francisco, USA) in 0,75 mm-SDS-Polyacrylamidgelen mit 15 %igem Trenn- und 10 %igem Sammelgel getrennt. Für die Proben aus den Proteolysen mit Pepsin wurde der Probenpuffer 1/3 verdünnt. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mit 0,25 % (w/v) Coomassie-R250/42,5 % (v/v) Ethanol/5 % (v/v) Methanol/10 % (v/v) AcOH. Nach dem Entfärben der Gele in 20 % (v/v) Ethanol/7 % (v/v) AcOH wurde die Intensität der Proteinbanden mithilfe eines CD 60-Densitometers (Desaga, Darmstadt) densitometrisch quantifiziert. Die integrierte Peakfläche der PLA<sub>2</sub>-Bande wurde grundsätzlich nach einer einfach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung angepasst, wie in Abbildung 3.2 B beispielhaft dargestellt.

### 3.2.9.3 Limitierte Proteolyse in Anwesenheit von GuHSCN

Die Reaktion erfolgte, wie unter 3.2.9.1 beschrieben, nur, dass die Reaktionsansätze bis zu 1,5 M GuHSCN enthielten. Da die Gegenwart von Guanidiniumionen die Aufnahme der Proben in SDS enthaltenden Probenpuffer ausschließt, wurden die Proteine mittels einer modifizierten NaDOC- Fällung (Natriumdesoxycholat) <sup>138</sup> aus der Lösung extrahiert. Hierfür wurden die abgestoppten Proben in 250  $\mu$ l einer 0,1 %igen NaDOC-Lösung aufgenommen und mit 50  $\mu$ l einer 50 %igen TCA-Lösung gefällt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 21000 $\times$ g wurden die gefällten Fraktionen mit eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet und wie unter 3.2.9.1 beschrieben weiterverarbeitet.

## 3.2.10 NMR-Spektroskopie

### 3.2.10.1 NMR-Spektren

Die NMR-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Carmen Mrestani-Klaus aus der Abteilung Naturstoffbiochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Alle Spektren wurden auf einem AVANCE 400 Spektrometer mit z-Gradienten-Elektronik (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten/Karlsruhe) gemessen. Die NMR-Proben enthielten typischerweise 1,5 mM PLA<sub>2</sub> in 95 % H<sub>2</sub>O/5 % D<sub>2</sub>O mit 50 mM CaCl<sub>2</sub> und 150 mM NaCl. Der pH-Wert wurde vor Zugabe der 5 % D<sub>2</sub>O eingestellt. Die Experimente wurden überwiegend bei 40 °C durchgeführt. Die Wasserunterdrückung konnte durch Vorsättigung (*presaturation*) der Wasserresonanz für 1,2 s erzielt werden. Die <sup>1</sup>H-chemischen Verschiebungen wurden gegen den externen Standard 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS, Merck, Darmstadt) kalibriert. Die Frequenzbreite (*sweep width*) betrug in allen Spektren 16 ppm.

Alle eindimensionalen Protonenspektren wurden mit dem Bruker-Pulsprogramm „zgpr“ bei 293, 298, 300 und 313 K aufgenommen. Für ein Spektrum wurden 128 bis 512 Durchläufe (*scans*) mit jeweils 4096 Datenpunkten summiert.

Die zweidimensionalen Spektren wurden im *pure-phase*-Absorptionsmodus unter Verwendung der TPPI-Methode (*time proportional phase increments*) <sup>139</sup> im TOCSY bzw. der *states*-TPPI-Methode im COSY (*correlated spectroscopy*) und NOESY mit 2048 x 512 Datenpunkten gemessen und mit 2048 x 512, 1024 oder 2048 Datenpunkten prozessiert. Daraufhin wurden sie mit einer um  $\pi/4$ -verschobenen Sinusquadratfunktion in beiden Dimensionen Fourier-transformiert. Anschließend wurde jeweils eine Basislinienkorrektur in  $f_2$  auf der linken und rechten Seite der H<sub>2</sub>O-Linie durchgeführt.

Für die 2D (zweidimensionalen) Clean-TOCSY (*total correlated spectroscopy*)-Spektren wurde eine MLEV-17-Mischsequenz <sup>140</sup> mit Mischzeiten von 80, 60, 50, 40, 30 und 6,6 ms verwendet. Das HDO-Signal wurde sowohl im COSY <sup>141</sup>, als auch im TOCSY durch Vorsättigung unterdrückt. Es wurden in beiden 2D-Experimenten jeweils 192 *scans* pro Inkrement akkumuliert.

2D NOESY (*nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*)-Spektren wurden mit Mischzeiten von 200, 150, 100, 50 und 25 ms und 96 *scans* pro Inkrement aufgenommen. Die Wasserunterdrückung wurde hier durch Anwendung einer WATERGATE-Sequenz <sup>142</sup> erzielt. Alle NMR-Spektren wurden auf einer mit dem NMR-Spektrometer gekoppelten Silicon Graphics O2 Workstation unter Verwendung der Software XWINNMR (Bruker) prozessiert und mit der Software FELIX-ND für PC (Accelrys, San Diego) analysiert.

### 3.2.10.2 Messung des HD-Austausches

Der Wasserstoff-Deuterium-Austausch der Amidprotonen von PLA<sub>2</sub> wurde unmittelbar nach Auflösen des lyophilisierten Proteins in D<sub>2</sub>O-Puffer durch Messung einer Serie von 512 nacheinander geschalteten eindimensionalen Protonenspektren verfolgt, die in einer zweidimensionalen Matrix angeordnet wurden. Alle Experimente wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Wasserunterdrückung wurde durch Vorsättigung der Wasserresonanz erzielt. Für die Messungen bei verschiedenen pD-Werten wurden jeweils 104 *scans* (Gesamtdauer 22 h 31 min), für die bei pH 4,0 jeweils 208 *scans* pro Inkrement (Gesamtdauer 45 h) mit jeweils 4096 Datenpunkten summiert.

Die eingesetzten Puffer, CaCl<sub>2</sub>- und PLA<sub>2</sub>-Konzentrationen sind in Tabelle 3.2 angegeben. Die jeweilige Pufferkonzentration betrug 25 mM. Jeder Ansatz enthielt weiterhin 150 mM NaCl. Die Puffersubstanzen wurden entsprechend der vorgesehenen Konzentration abgewogen und in D<sub>2</sub>O gelöst. Der gewünschte pD-Wert wurde anschließend mit NaOD sowie DCl (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) eingestellt und nach erfolgter Reaktion nochmals kontrolliert. Für die quantitative Auswertung wurde der mittels pH-Elektrode bestimmte Wert um 0,4 korrigiert.

**Tabelle 3.2 Puffer für die HD-Austauschmessungen**

vorgesehener pD-Wert	Puffer *	[CaCl <sub>2</sub> ] (mM)	[PLA <sub>2</sub> ] (mM)
4	NaOAc	0 - 500	1,5
5	NaOAc	50	1,5
6	MES	50	1,5
7	MOPS	50	1,5
8	NaBO <sub>3</sub>	50	1,5
9	NaBO <sub>3</sub>	50	1,5
10	Gly	50	2
11	Gly	50	2

\*) Die Konzentration aller Puffersubstanzen betrug 25 mM. Weiterhin waren 150 mM NaCl enthalten

Die Prozessierung, Auswertung und Visualisierung der Daten erfolgte mithilfe des Programmes FELIX-ND für PC. Zur Basislinienkorrektur, Integration der NMR-Signale und Darstellung der integrierten Signale als Funktion der Zeit dienten in die FELIX-ND-Software implementierte Makros, die freundlicherweise von Prof. Dr. J. Balbach, Fachgruppe Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt wurden. Die Zeitskala wurde nachträglich anhand der Anzahl der Einzelspektren einer Matrix und der jeweiligen Messzeit für ein Einzelspektrum unter Berücksichtigung der manuell bestimmten Totzeit, die sich aus der Probenvorbereitung, Temperaturkalibrierung, Stabilisierung des NMR-*lock*-Signals und einem kurzen *shimming* ergab, berechnet. Die zugeordneten zeitabhängigen Einzelsignale wurden nach einer Reaktion 1. Ordnung ausgewertet. Aus der so gewonnenen beobachteten Geschwindigkeitskonstante des Austausches  $k_{\text{ex}}$  wurde  $\Delta G_{\text{HX}}$  unter Annahme eines EX2-Mechanismus nach Gleichung 2.33 berechnet. Dies geschah mit einer ebenfalls durch Prof. Dr. J. Balbach, Fachgruppe Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellten Makrodatei, die auch die jeweils zur Berechnung der Schutzfaktoren nötigen pH- und temperaturabhängigen  $k_{\text{ch}}$ -Werte enthielt.

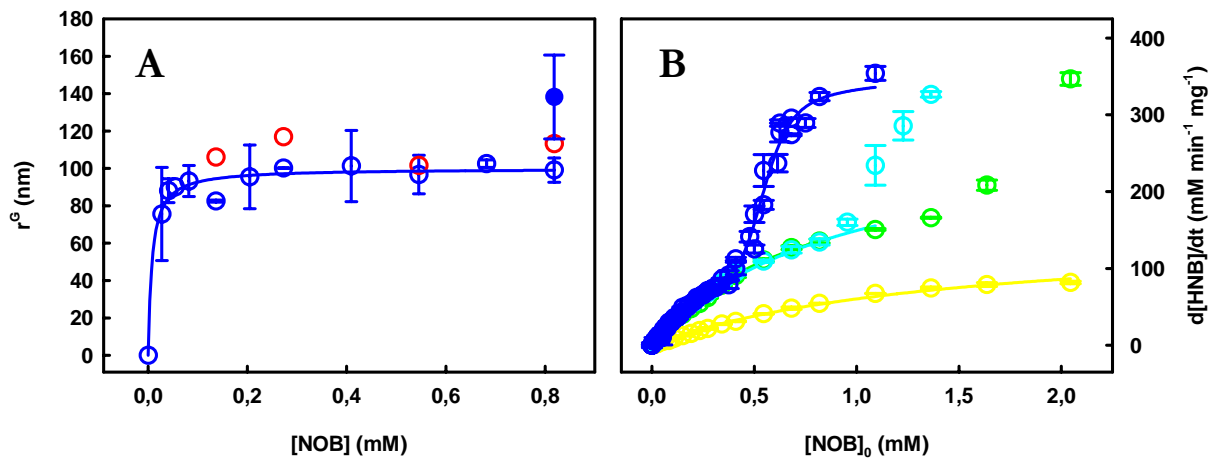
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Charakterisierung nativer PLA<sub>2</sub>

#### 4.1.1 Besonderheiten der Aktivität von PLA<sub>2</sub> gegen NOB

Da sich die kinetischen Untersuchungen von PLA<sub>2</sub> ausschließlich auf das aktive Zentrum bzw. den Einfluss von Denaturanzien hierauf beschränken sollten, erschien eine Entkopplung der verfolgten Hydrolysereaktion vom vorgelagerten Bindungsgleichgewicht an Phospholipid-Wassergrenzflächen sinnvoll. Das im Rahmen dieser Arbeit benutzte Substrat NOB wurde ursprünglich als monomer beschrieben<sup>104</sup>. Dies war auch der Anlass für seine routinemäßige Verwendung für die vorliegende Arbeit. Die bereits früher gefundene Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms gegen NOB von der NaCl-Konzentration, die als Anzeichen einer verstärkten Affinität zu Phospholipid-Wassergrenzflächen gilt<sup>78</sup>, bot einen ersten Hinweis, aber noch keinen hinreichenden Grund, am monomeren Zustand des NOB in wässriger Lösung zu zweifeln. Nach Messung der  $v/S$ -Charakteristiken von PLA<sub>2</sub> gegen NOB (Abb. 4.1 B und 4.3 A) stand jedoch fest, dass bei diesem Substrat von einem komplexeren, wahrscheinlich auf Partikelbindung basierendem kinetischen Verhalten ausgegangen werden muss. Ein erster Schritt, um den Reaktionsmechanismus der NOB-Hydrolyse durch PLA<sub>2</sub> aufzuklären, war der Nachweis und die Charakterisierung der NOB-Partikel.

Abbildung 4.1 A zeigt die Auftragung der mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen Gyrationradien von NOB-Partikeln bei pH 6,0 und 8,0. Hierbei ist erkennbar, dass NOB im gesamten Messbereich in nichtmonomerer Form vorliegt. Dieses Verhalten ist unabhängig vom pH-Wert. Da im Rahmen dieser Arbeit weder die exakte Größe und Gestalt der vorliegenden Partikel genauer untersucht werden konnten, es sich aber definitiv um eine aus mehreren Einzelmolekülen zusammengesetzte Form handelt, wird im folgenden die Bezeichnung Aggregat, bzw. aggregierte Spezies verwendet. Die in Abbildung 4.1 B gezeigten  $v/S$ -Charakteristiken bei pH 8,0 in Gegenwart steigender, für PLA<sub>2</sub> nichtdenaturierender GuHSCN-Konzentrationen zeigen keinerlei Ähnlichkeiten mit dem gefundenen Verlauf. Vielmehr tritt hier in Abwesenheit von GuHSCN nach einer anfänglich apparent hyperbolen Abhängigkeit der Aktivität von der eingesetzten Substratkonzentration eine apparent sigmoide Aktivierungsphase auf, die durch zunehmende GuHSCN-Konzentrationen zunächst verschoben und dann gänzlich unterdrückt wird. Ein solches aufwärts gerichtetes Abknicken ist ein Anzeichen für einen Phasenübergang des Substrates bei dieser Konzentration in Verbindung mit einer sich aktivierend auswirkenden Bindung des Enzyms an die entstandene Grenzfläche. Die Unterdrückung der Aktivierung durch das chaotrope Salz GuHSCN unterstreicht ihren intermolekularen, wahrscheinlich auf Partikelbindung beruhenden Charakter. Dass NOB im gesamten Messbereich als Aggregat vorliegt, spricht jedoch eindeutig gegen die Annahme einer aktivierenden Micellbildung bei  $\approx 0,5$  mM NOB.



**Abbildung 4.1** Einfluss der NOB-Konzentration auf die Partikelgröße von NOB sowie von Denaturans auf die Aktivierung von PLA<sub>2</sub>. **A:** Auftragung des mittels Lichtstreuung ermittelten Gyrationradius gegen die NOB-Konzentration. Die Radien der NOB-Partikel bei pH 6,0 (○) sowie bei pH 8,0 in Abwesenheit (○) und Gegenwart (●) von PLA<sub>2</sub> wurden wie unter 3.2.3 beschrieben bestimmt. Die angegebenen Fehlerbreiten kennzeichnen den Standardfehler aus 2 bis 3 Einzelmessungen. **B:** Einfluss von GuHSCN auf die Aktivität von PLA<sub>2</sub> gegen NOB bei pH 8,0. Die Aktivität von PLA<sub>2</sub> gegen verschiedene NOB-Ausgangskonzentrationen in Gegenwart von 0 M (○), 0,1 M (○), 0,3 M (○) bzw. 0,9 M GuHSCN (○) wurde wie unter 3.2.4 beschrieben bestimmt und gegen die eingesetzte Konzentration von NOB aufgetragen. Die angegebenen Fehlerbreiten kennzeichnen den Standardfehler aus 3 bis 5 Einzelmessungen.

Die Diskrepanz zwischen den veröffentlichten und den eigenen Resultaten bezüglich des Organisationsgrades von NOB ist vermutlich mit den unterschiedlichen Messmethoden zu erklären. Die in der ursprünglichen Publikation<sup>104</sup> veröffentlichte Aussage bezüglich der Abwesenheit von NOB-Aggregaten basiert auf nicht näher beschriebenen Leitfähigkeitsmessungen<sup>104</sup>. Bei dieser Methode wird ein Phasenübergang als abwärtsgerichtetes Abweichen von der ursprünglich linearen Abhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit von der Konzentration detektiert (pers. Mitteilung von Prof. Dr. A. Blume). Da das NOB über einen breiten Konzentrationsbereich hinweg offensichtlich bereits oligomer vorliegt, ist es möglich, dass die Partikel im verwendeten Konzentrationsbereich der Detektion durch die Leitfähigkeitsmessungen entgingen. Ein durch eventuelle synthesebedingte Verunreinigungen verursachtes Artefakt kann ausgeschlossen werden, da unter den Standardbedingungen (10 mM TrisHCl/25 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0) kein Unterschied zwischen dem erworbenen und dem selbst synthetisierten Substrat gefunden werden konnte (nicht gezeigt).

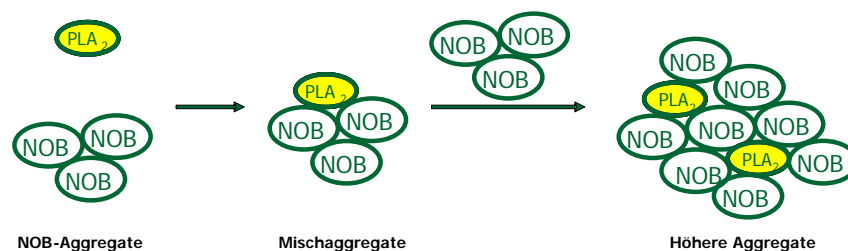
Da eine Änderung des Organisationsgrades des bereits aggregiert vorliegenden NOB nicht als Begründung für das Auftreten der Aktivierung dienen kann, muss es eine alternative Erklärung geben. Das Vorkommen nichtmicellarer bzw. nichtvesikulärer Aggregate kurzkettiger Substrate ist seit längerem bekannt. Solche Aggregate bilden sich bevorzugt an Luftblasen oder den Gefäßwänden und werden dort durch PLA<sub>2</sub> abgebaut<sup>92</sup>.

Von Interesse ist weiterhin, dass bei pH 8,0 die Hydrolysegeschwindigkeit von 0,27 mM NOB linear, von 1,09 mM NOB hingegen nichtlinear von der PLA<sub>2</sub>-Konzentration abhängig ist (nicht gezeigt). Dies legt

die Annahme eines höheren Oligomerisierungsgrades von PLA<sub>2</sub> in Gegenwart der entsprechenden NOB-Konzentrationen nahe. Mehreren Publikationen zufolge tendiert PLA<sub>2</sub> in stärkerem Maße als andere Phospholipasen A<sub>2</sub> zur Aggregation in Gegenwart kurzkettiger, nichtmicellarer Amphiphile<sup>87;90</sup>. Dies wird mit einer Besonderheit von PLA<sub>2</sub>, der Bildung co- oder auch prämicellarer Mischaggregate erklärt<sup>88; 89</sup> (Abschnitt 2.2.4). Dieses Phänomen bedingt allerdings, dass die kurzkettigen Amphiphile in Abwesenheit des Enzyms unterhalb ihrer *cmc* nicht oder kaum aggregieren, weshalb beide als Erklärung für das vorliegende Verhalten ausscheiden.

Eine weitere, in Abbildung 4.1 B erkennbare Auffälligkeit ist, dass der Wert der apparenten Halbsättigungskonzentration der ersten Phase im Gegensatz zur erreichten Maximalgeschwindigkeit durch die Anwesenheit nichtdenaturierender GuHSCN-Konzentrationen nicht beeinflusst wird. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurden die Punkte der ersten Phase nach einer hyperbolen Gleichung angepasst (Tab. 6.1). Den erhaltenen Parametern zufolge ist das der ersten Phase vorausgehende, durch die apparente Dissoziationskonstante  $K_{D^*}$  charakterisierte Bindungsereignis weitgehend unbeeinflusst durch die Anwesenheit chaotroper Salze, was prinzipiell für die Bindung einzelner Moleküle spricht.

Diese Ergebnisse können, wie folgt zusammengefasst werden. Die Hydrolyse von NOB durch PLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 erfolgt nach einem komplexen Mechanismus, der sich aus einer durch Einzelmolekülbindung dominierten ersten Phase und einer zweiten, durch einen erhöhten Organisationsgrad bestimmten Phase zusammensetzt. Letzterer betrifft auch die PLA<sub>2</sub> selbst. Beide Phasen korrelieren nicht mit dem Organisationsgrad des Substrates in Abwesenheit des Enzyms.



**Abbildung 4.2** Mögliches Reaktionsschema der Aktivierung von PLA<sub>2</sub> ( $[NOB] \geq 0,5 \text{ mM}$ ).

Vorbehaltlich weiterer Messungen der Partikelgrößen von NOB, vor allem in Anwesenheit von PLA<sub>2</sub> sowie von Denaturanzien und bei verschiedenen pH-Werten, kann vorläufig das in Abbildung 4.2 dargestellte Schema zur Erklärung der Aktivierung durch hohe NOB-Konzentrationen dienen. Demzufolge würde NOB *per se*, wie anhand der Lichtstreuung nachgewiesen, in aggregierter Form vorliegen und PLA<sub>2</sub> an diese Partikel binden, diesen analog zur herkömmlichen Grenzflächenbindung (Abb. 2.8) einzelne NOB-Moleküle entziehen, um den Enzym-Substrat-Komplex zu bilden und die Hydrolysereaktion zu katalysieren. Sind aufgrund erhöhter NOB-Konzentrationen genügend solcher gemischter Aggregate vorhanden, könnten sich diese zu höheren Aggregaten zusammenlagern. Ein unterstützender Einfluss des freigesetzten Produktes Caprylat hierfür ist plausibel und könnte mittels

*stopped-flow*-Messungen anhand einer eventuell während der Progresskurven auftretenden *lag*-Phase oder den Zusatz verschiedener Mengen von Caprylat in den Reaktionsansatz charakterisiert werden.

Ein anderes Modell zur Aktivierung von Phospholipasen A<sub>2</sub> speziell durch NOB beinhaltet die kovalente Acylierung eines Lysinrestes und bedingt durch die damit verbundene erhöhte Hydrophobizität eine vergrößerte Bindungskompetenz<sup>108</sup>. Diese Annahme basiert auf dem apparent irreversiblen<sup>108</sup>, von anderen Gruppen mit ähnlichen Substraten aber als vollkommen reversibel befundenen Charakter der beobachteten Aktivierung<sup>89</sup> sowie der Beobachtung, dass in verschiedenen Enzymfraktionen massenspektrometrisch Caprylat nachgewiesen wurde<sup>108</sup>. Mechanistisch ist eine solche Selbstacylierung jedoch nur schwer vorstellbar und ist in aktuelleren Untersuchungen zum Thema auch nicht mehr erwähnt. Weiterhin können die experimentellen Befunde ebenfalls mit dem vorgestellten Modell einer nicht kovalenten Mischaggregation erklärt werden.

Festzuhalten bleibt, dass unabhängig vom Aggregationszustand des NOB bei basischen pH-Werten ein Aktivierungsvorgang stattfindet. Auf diesen Einfluss des pH-Wertes wird im Folgenden näher eingegangen werden.

#### 4.1.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivierung von PLA<sub>2</sub>

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivierung von PLA<sub>2</sub> zu charakterisieren, wurden *v*/*S*-Charakteristiken bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Der mögliche pH-Bereich wird durch die geringe Stabilität von NOB im basischen, durch die niedrige Calciumaffinität von PLA<sub>2</sub> im sauren in Verbindung mit der geringen Löslichkeit von NOB in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen auf den Bereich von pH 5,0 bis pH 9,0 eingeschränkt. Die Ergebnisse der Messungen in diesem Bereich sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

Da NOB unter den verwendeten Bedingungen nicht in monomerer Form vorliegt (Abb. 4.1 A), ist eine grundlegende Bedingung für die herkömmliche enzymkinetische Evaluierung nach Michaelis-Menten, dass die freie Substratkonzentration an jedem Punkt des Reaktionsraumes gleich und konstant sein muss, nicht erfüllt. Da die vorliegenden Daten auch keine Rückschlüsse über die Vollständigkeit der NOB-Aggregation erlauben, ist eine Auswertung nach den Regeln der Grenzflächenbindung und -aktivierung ebenfalls nicht angebracht. Daher wurden die erhaltenen Daten vorläufig nach Gleichung 4.1 angepasst.

$$Y = \frac{v_{\max 1} \cdot [\text{NOB}]_0}{K_1 + [\text{NOB}]_0} + \frac{v_{\max 2} \cdot [\text{NOB}]_0^n}{K_2^n + [\text{NOB}]_0^n} \quad 4.1$$

Hierbei sind *Y* die gemessene Initialgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration  $[\text{NOB}]_0$ ,  $v_{\max 1}$  und  $v_{\max 2}$  die jeweils auf  $[\text{NOB}]_0 \rightarrow \infty$  extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten sowie  $K_1$  und  $K_2$  die korrespondierenden Halbsättigungskonzentrationen der gefundenen Phasen. Der Parameter *n* entspricht dem Hillischen Kooperativitätsindex und beschreibt den Übergang und die



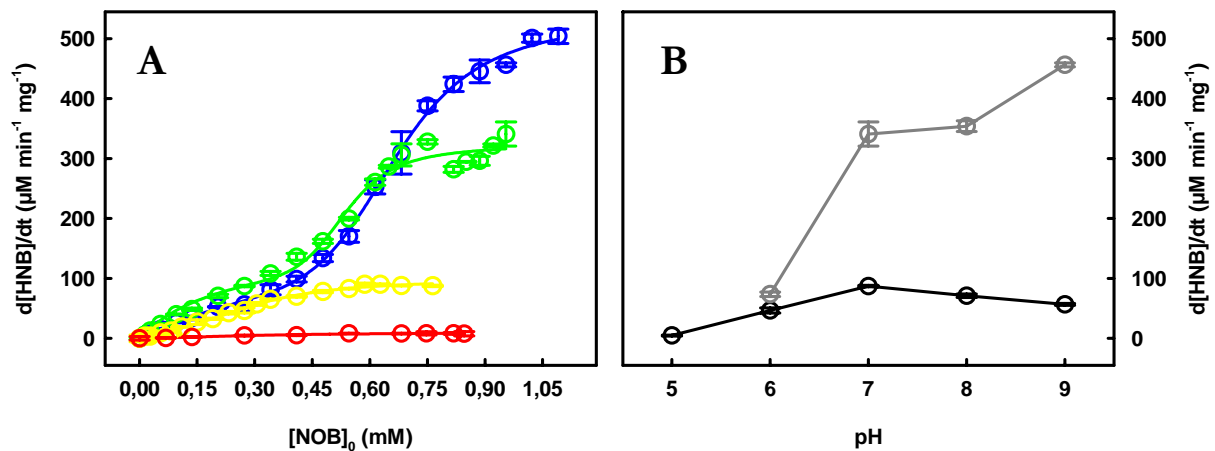


Abbildung 4.3 Einfluss des pH-Wertes auf die apparenten kinetischen Konstanten von PLA<sub>2</sub>. A: Abhängigkeit der Aktivität von PLA<sub>2</sub> von [NOB] bei verschiedenen pH-Werten. Die Aktivität von PLA<sub>2</sub> bei pH 9,0 (○), pH 7,0 (○), pH 6,0 (○) bzw. pH 5,0 (○) gegen NOB wurde bestimmt, wie unter 3.2.4 beschrieben und gegen die eingesetzte Konzentration von NOB aufgetragen. Die angegebenen Fehlerbreiten kennzeichnen den Standardfehler aus 3 bis 5 Einzelmessungen. B: Geschwindigkeit der Hydrolyse von 0,27 mM NOB (○) und 1,0 mM NOB (○) durch PLA<sub>2</sub>. Die Punkte und Fehlerbreiten basieren auf den in den Abbildungen 4.3 A und 4.1 B gezeigten Daten.

Steilheit der zweiten Phase. Zunächst wurde aus dem Verlauf der  $v/S$ -Charakteristiken die absolute Maximalgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  bestimmt. Für die nichtlineare Anpassung der Daten nach Gleichung 4.1 galt als Ausgangsbedingung  $v_{\text{max}} = v_{\text{max}1} + v_{\text{max}2}$ . Es ist unbedingt hervorzuheben, dass Gleichung 4.1 keinerlei inhaltliche Aussagen liefern kann, sondern lediglich zur Quantifizierung von  $v_{\text{max}1}$  und  $K_1$  bzw. von, sofern messbar,  $K_2$  und  $v_{\text{max}2}$  dient. Die aus den  $v/S$ -Charakteristiken gewonnenen apparenten Konstanten wurden in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

Die in Abbildung 4.3 B gezeigten Reaktionsgeschwindigkeiten im Bereich der ersten und der zweiten Phase zeigen sehr unterschiedliche pH-Abhängigkeiten. Die erreichte Geschwindigkeit in der ersten Phase durchläuft ein Maximum bei pH 7,0, während das Maximum der zweiten Phase bei pH 9,0 noch nicht erreicht scheint. Die Inhibierung durch niedrige pH-Werte ist sehr wahrscheinlich auf die Protonierung von H48 und von D49 zurückzuführen, was sich direkt auf die Katalyse und die Calciumbindung auswirkt. Interessanterweise tritt die zweite Phase bei diesen pH-Werten nicht auf. Da nach Abbildung 4.1 NOB auch unter diesen Bedingungen oligomer vorliegt, und eine nichtlineare Abhängigkeit der Aktivität gegen 1,09 mM NOB bei pH 8,0 von der Enzymkonzentration gefunden wurde (nicht gezeigt), muss dies auf eine Veränderung der PLA<sub>2</sub> zurückzuführen sein.

Eine elektrostatische Abstoßung erscheint als alleinige Erklärung für die Unterdrückung höherer Mischoligomere nicht plausibel, da NOB als Benzoessäurederivat ( $\text{pK}_a = 4,32$ ) unter allen verwendeten Bedingungen deprotoniert, also negativ geladen vorliegt, während die positive Nettoladung von PLA<sub>2</sub> ( $\text{pI} = 7,5$ )<sup>63</sup> gerade unter den nicht aktivierenden Bedingungen zunimmt. Globale Entfaltungsereignisse scheiden als Begründung ebenfalls aus, da, wie später erläutert, PLA<sub>2</sub> unter allen Bedingungen nativ

gefaltet ist (Tab. 6.12). Die nahezu unveränderte apparente Substrataffinität (Tab. 6.2) legt außerdem nahe, dass, sofern lokale Entfaltungseignisse die Mischoligomerisierung oder auch deren Unterdrückung verursachen, diese nicht das aktive Zentrum, betreffen. Die Richtigkeit der oben angestellten allgemeinen Überlegungen bezüglich der Aktivierung vorausgesetzt, bedeutet dies, dass PLA<sub>2</sub> durch Deprotonierung an einer mit dem aktiven Zentrum wahrscheinlich nicht identischen Region strukturell so verändert wird, dass sie in Gegenwart kurzkettiger Amphiphile zur Bildung höherer Mischoligomere neigt.

#### 4.1.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung von Liganden

Die Bindung des amphiphilen Fluoreszenzfarbstoffes ANS an Phospholipasen A<sub>2</sub> im nativen Zustand ist seit längerem bekannt. Die Fluoreszenz des resultierenden Komplexes kann zur Verfolgung der Calciumbindung von PLA<sub>2</sub> genutzt werden<sup>73</sup>. Entsprechende Daten von Phospholipasen A<sub>2</sub> anderer Herkunft<sup>129; 143</sup> legen nahe, dass dies im aktiven Zentrum des Enzyms geschieht. Mittels der ANS-Fluoreszenz sollte es daher möglich sein, die Besetzung des aktiven Zentrums auch außerhalb der für die Aktivitätsmessungen geltenden pH-Grenzen zu beobachten.

ANS-Bindungsisothermen wurden zunächst bei pH 8,0 gemessen (Abb. 4.4 C). Die Sättigung des Enzyms scheint sich erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen des Liganden einzustellen und konnte nicht erreicht werden, da ANS bei hohen Konzentrationen zur Clusterbildung neigt<sup>125</sup>. Dies scheint auch die wahrscheinlichste Erklärung der gefundenen Abnahme der Fluoreszenz bei höheren ANS-Konzentrationen (nicht gezeigt) zu sein. Mit sinkendem pH-Wert wird diese Tendenz noch verstärkt (nicht gezeigt). Klar erkennbar ist hingegen die bereits in der Literatur erwähnte<sup>73</sup> größere Fluoreszenzintensität des Komplexes in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> (Abb. 4.4 C). Da die apparente Affinität von PLA<sub>2</sub> zu ANS durch Calciumionen offenbar nicht vergrößert wird, scheint dies keine strukturellen, das heißt auf die globale Konformation des Proteins zurückzuführenden Gründe zu haben. Vermutlich beruht dieser Effekt eher auf der direkten Umgebung des gebundenen Liganden. Da die Quantenausbeute von ANS sowohl durch die Rotation des Phenylringes<sup>111</sup> als auch allgemein durch die Anwesenheit von Wasser verringert wird (nicht gezeigt), könnte der Effekt auf eine durch die Bindung des Cofaktors Ca<sup>2+</sup> verstärkte Abschirmung des aktiven Zentrums vom wässrigen Lösungsmittel und durch die zusätzlichen ionischen Interaktionen eingeschränkte Bewegungsfreiheit des Fluorophors zurückgehen.

Die Inkubation von PLA<sub>2</sub> mit 4-Bromphenacylbromid in Abwesenheit von Calcium führt zu einer schnellen, vollständigen und irreversiblen Inaktivierung des Enzyms (nicht gezeigt) aufgrund der kovalenten Modifikation von H48<sup>73</sup>. Der am Histidin verbleibende 4-Bromphenacylrest sollte das aktive Zentrum sterisch blockieren und somit die Bindung von ANS an dieser Stelle unterbinden. Wie in Abbildung 4.4 C erkennbar, ist dies nur teilweise der Fall. Eine unvollständige Blockierungsreaktion konnte anhand der vollständigen enzymatischen Inaktivität (nicht gezeigt) ausgeschlossen werden. Daher

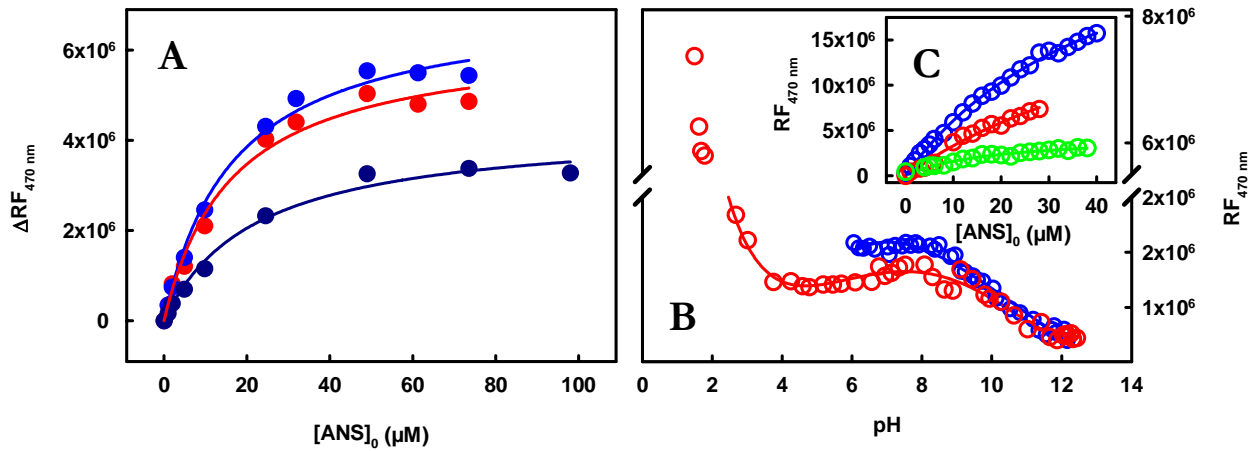


Abbildung 4.4 Einfluss des pH-Wertes auf die ANS-Bindung. A: Bindungsisothermen von ANS und apoPLA<sub>2</sub> bei verschiedenen pH-Werten. Die Kurven bei pH 4,5 (●), pH 8,0 (●) und pH 10,7 (●) wurden wie unter 3.2.6.2 beschrieben bestimmt. B: Einfluss des pH-Wertes auf die Fluoreszenzemission des ANS-PLA<sub>2</sub>-Komplexes. Die Fluoreszenz des Komplexes von ANS mit apoPLA<sub>2</sub> (○) und holoPLA<sub>2</sub> (○) wurde wie unter 3.2.6.2 beschrieben gemessen. C: Bindungsisothermen von ANS und PLA<sub>2</sub> bei pH 8,0. Die ANS-Bindung von holoPLA<sub>2</sub> (○), apoPLA<sub>2</sub> (○) und 4-Bromphenacyl-apoPLA<sub>2</sub> (○) wurde wie unter 3.2.6.2 beschrieben verfolgt.

muss davon ausgegangen werden, dass neben dem aktiven Zentrum noch weitere Bindungsstellen existieren, deren Besetzung zur ANS-Fluoreszenz führt. Da der größere Teil der Fluoreszenz jedoch durch die Blockierung des aktiven Zentrums verloren geht (Abb. 4.4 C), scheint das im nicht modifizierten Enzym an dieser Stelle gebundene ANS hauptsächlich für die ANS-Fluoreszenz verantwortlich zu sein. Weiterhin führte die Anwesenheit von Calciumionen während der Inkubation des Enzyms mit 4-Bromphenacylbromid zu einer gleichermaßen nur leichten Inaktivierung und Verringerung der ANS-Fluoreszenz (nicht gezeigt). Dies und die identisch verlaufenden Abnahmen von Aktivität gegen NOB und ANS-Fluoreszenz in Gegenwart steigender GuHCl- und GuHSCN-Konzentrationen (Abb. 4.11 A, bzw. nicht gezeigt) belegen den Zusammenhang zwischen ANS-Bindung und dem Zustand des aktiven Zentrums von PLA<sub>2</sub>. Die spektroskopisch nicht separierbare Bindung mehrerer Liganden könnte allerdings die Ursache für die hohe Halbsättigungskonzentration und die sich daraus ergebende, vergleichsweise niedrige apparente Affinität des Enzyms zu ANS sein.

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die mit der Aktivität korrelierenden Bindungsparameter zu ermitteln, wurden ANS-Bindungsisothermen über ein breites pH-Spektrum gemessen. Die resultierenden Daten sind in Abbildung 4.4 A und Tabelle 6.3 zusammengefasst. Wie daraus ersichtlich, ist die apparente Affinität von PLA<sub>2</sub> zu ANS unabhängig vom pH-Wert. Die in Abschnitt 4.1.1 bereits festgestellte pH-unabhängige Affinität des aktiven Zentrums von PLA<sub>2</sub> zum Substrat NOB im niedrigen Konzentrationsbereich ist demzufolge für einen substratähnlichen Liganden auch auf einen wesentlich breiteren pH-Bereich übertragbar. Jedoch ist die maximal erreichte Fluoreszenzintensität bei pH 10,7 deutlich, bei pH 4,5 leicht geringer als bei pH 8,0 (Abb. 4.4 A).

Um dies näher zu untersuchen, wurde die Fluoreszenzintensität von apo- und holoPLA<sub>2</sub> mit einem

Überschuss von ANS in Abhängigkeit vom pH-Wert gemessen (Abb. 4.4 B). Für apoPLA<sub>2</sub> wurde dabei eine exponentiell erscheinende Abnahme mit steigendem pH-Wert im Bereich von 1,5 bis 6 gefunden, an die sich eine Zunahme der Fluoreszenz um pH 8,0, gefolgt von einer weiteren exponentiell erscheinenden Abnahme anschließt. In verringertem Maße zeigt der Komplex aus holoPLA<sub>2</sub> und ANS im basischen Milieu das gleiche Verhalten. Aufgrund der bereits erwähnten, im gesamten betrachteten pH-Bereich unveränderten Affinität der PLA<sub>2</sub> zu ANS kann eine Dissoziation des Liganden aufgrund der Deprotonierung oder durch die Deprotonierung bedingte strukturelle Veränderungen des Enzyms als Ursache für die veränderte Fluoreszenz ausgeschlossen werden. Die Übergänge konnten jeweils einzeln normiert und getrennt nach Gleichung 4.2<sup>144</sup> angepasst werden.

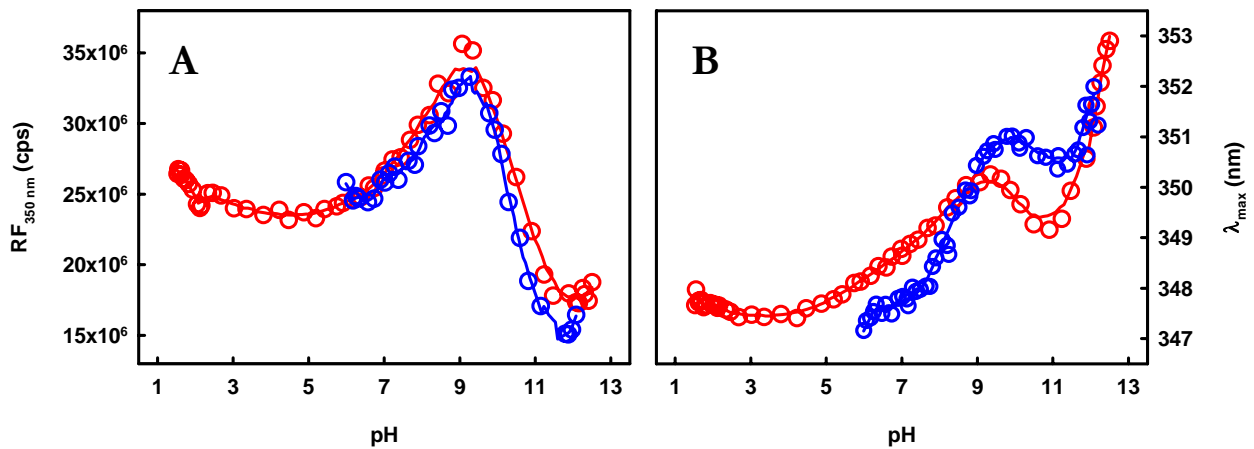
$$Y = \frac{A}{1 + K_a / [H^+]} \quad 4.2$$

Dabei repräsentiert Y das gemessene normierte Signal, und A die Amplitude. Dies ergab einen pK<sub>a</sub>-Wert von 6,9 für den ersten und 10,2 für den zweiten Übergang von apoPLA<sub>2</sub> sowie von 10,0 für den Übergang von holoPLA<sub>2</sub>. Die gleiche Operation mit den in Abbildung 4.3 B dargestellten Werten der Aktivität von PLA<sub>2</sub> gegen 1,05 mM NOB ergab einem pK<sub>a</sub>-Wert von 6,6, der allerdings aufgrund der wenigen zur Verfügung stehenden Datenpunkte als unsicher anzusehen ist.

Eine solche exponentiell erscheinende Abnahme der Fluoreszenzemission des ANS-Proteinkomplexes bei pH-unabhängigen Dissoziationskonstanten wurde bereits im Fall des  $\alpha$ -Chymotrypsins gefunden. Aufgrund der mittels Fluoreszenzpolarisation nachgewiesenen ebenfalls unveränderten Orientierung des gebundenen Liganden wurde die Abnahme der Fluoreszenz auf *fluorescence quenching*, das heißt auf rein spektroskopische Effekte von ANS selbst zurückgeführt<sup>144</sup>. Im Falle des  $\alpha$ -Chymotrypsins, wie auch der PLA<sub>2</sub> ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität des jeweiligen ANS-Komplexes mit einer Rotverschiebung von  $\lambda_{\max}$  verbunden (nicht gezeigt). Dies ist an sich kein Merkmal typischen *quench*-Verhaltens. Ein weiterer Unterschied ist das zumindest bei apoPLA<sub>2</sub> erkennbare Maximum der pH-abhängigen Fluoreszenzintensität. Akzeptiert man die scheinbar exponentielle Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigenden pH-Werten als rein spektroskopischen Effekt, ist dieses Maximum ein deutliches Anzeichen einer zweiten Spezies des ANS-PLA<sub>2</sub>-Komplexes mit veränderten spektroskopischen Eigenschaften. Darüber hinaus scheint diese Spezies bei den gleichen pH-Werten akkumuliert zu werden, wie die in Abschnitt 4.1.2 diskutierte aktivierungskompetente Spezies.

### 4.1.3 Einfluss des pH-Wertes auf die native Struktur von PLA<sub>2</sub>

Um die anhand von Aktivität und ANS-Fluoreszenz gefundenen verschiedenen Spezies nativer PLA<sub>2</sub> schlüssig nachzuweisen und zu charakterisieren wurden die intrinsische Fluoreszenz von PLA<sub>2</sub> in An- und Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> in Abhängigkeit vom pH-Wert sowie CD-Spektren von apoPLA<sub>2</sub> bei



**Abbildung 4.5** Einfluss des pH-Wertes auf die Tryptophanfluoreszenz von PLA<sub>2</sub>. **A:** Fluoreszenzintensität bei 350 nm von apoPLA<sub>2</sub> (○) und holoPLA<sub>2</sub> (○) in Abhängigkeit vom pH-Wert. **B:** Maximale Emissionswellenlänge in Abhängigkeit vom pH-Wert. Beide Abbildungen beruhen jeweils auf denselben Fluoreszenzspektren. Diese wurden wie unter 3.2.6.1 beschrieben gemessen.

verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Resultate sind in den Abbildungen 4.5 und 4.6 dargestellt. Hinsichtlich seiner möglichen strukturellen Bedeutung ist der Einfluss des pH-Wertes auf die Tryptophanfluoreszenz von PLA<sub>2</sub> besonders interessant. Während für die Tyrosinfluoreszenz bei 303 nm keine derartige Abhängigkeit gefunden wurde (nicht gezeigt), steigt die Fluoreszenzintensität bei 350 nm von apoPLA<sub>2</sub> nach einem Plateau von pH 3,0 bis pH 6,0 stark an. Danach folgt ein ebenso abruptes Absinken auf circa die Hälfte des Ausgangswertes (Abb. 4.5 A). Zumindest die beiden Übergänge verlaufen bei holoPLA<sub>2</sub> nahezu identisch. Interessanterweise sind die Veränderungen der Fluoreszenzintensität mit ähnlich verlaufenden Zu- und Abnahmen der maximalen Emissionswellenlänge  $\lambda_{\max}$  verbunden (Abb. 4.5 B). Dies spricht gegen ein dynamisches (externes) *fluorescence quenching* durch H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>- oder OH<sup>-</sup>-Ionen, da mittels Acrylamid-*quenching* nachgewiesen werden konnte, dass dynamisches *fluorescence quenching* sich auf  $\lambda_{\max}$  nicht auswirkt (nicht gezeigt). Aus dem gleichen Grunde scheidet *fluorescence quenching* durch den protonierten N-Terminus aus. Aufgrund der CaCl<sub>2</sub>-abhängig voneinander abweichenden pK<sub>a</sub>-Werte der Übergänge (8,4 in Ab- und 9,3 in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> <sup>145</sup>) sind die gefundenen Kurven darüber hinaus nur mit diesem Prozess nicht zu erklären.

Die Normierung und Auswertung der einzelnen Übergänge nach Gleichung 4.2 ergab apparente pK<sub>a</sub>-Werte von jeweils 7,7 bzw. 10,2 für apoPLA<sub>2</sub> und 7,6 bzw. 10,1 für holoPLA<sub>2</sub> (Tab. 4.1). Da sich der einzige Tryptophanrest von PLA<sub>2</sub>, W3, in der N-terminalen Helix des Proteinmoleküls befindet, muss diese zumindest partiell in die die Fluoreszenzintensität verursachenden strukturellen Vorgänge involviert sein. Im nativen Zustand ist die Quantenausbeute von W3 aufgrund von *fluorescence quenching* durch räumlich nahe liegende Disulfidbrücken oder die protonierte Amidgruppe des N-Terminus bereits stark verringert. So führt der Verlust der räumlichen Nähe zu diesen Gruppen durch GuHCl-induzierte Entfaltung zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 350 nm (nicht gezeigt). Daher ist ein

Zusammenhang zwischen der Protonierung des N-Terminus und dem ersten Übergang durchaus denkbar, nicht jedoch mit dem zweiten Übergang. Dieser ist darüber hinaus durch ähnliche  $pK_a$ -Werte charakterisiert, wie die mittels ANS-Fluoreszenz verfolgten Übergänge im basischen Bereich (Abb.4.4 B).

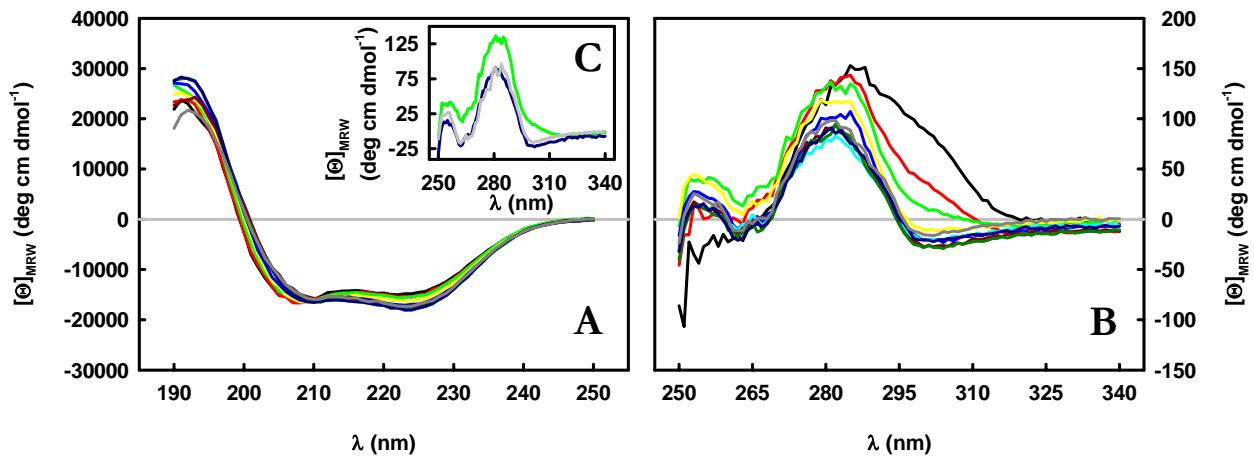
Wie bereits erwähnt, lässt sich ein ähnliches Verhalten auch anhand von  $\lambda_{\max}$  nachweisen (Abb. 4.5 B). Die apparenten  $pK_a$ -Werte des ersten Überganges betragen allerdings 7,3 für apoPLA<sub>2</sub> und 8,1 für holoPLA<sub>2</sub>. Trotz dieser Diskrepanz sind diese Daten ein Beleg für einen strukturellen Hintergrund auch des ersten mittels Fluoreszenzintensität gemessenen Überganges. Die apparenten  $pK_a$ -Werte des zweiten Überganges betragen 10,1 für apoPLA<sub>2</sub> und 10,3 für holoPLA<sub>2</sub>. Dies stimmt wiederum gut mit den aus der Intensität von ANS- und Tryptophanfluoreszenz bestimmten Werten überein. Da sie eine verstärkte Polarität der Umgebung des Fluorophors W3 anzeigen, sind die im Bereich von pH 7 bis pH 11 erhöhten Werte von  $\lambda_{\max}$  darüberhinaus ein eindeutiges Argument gegen einen strahlungslosen Energietransfer von Tyrosin auf Tryptophan als alleinige Ursache für die im selben pH-Bereich gestiegene Fluoreszenzintensität. Vielmehr müssen beide Übergänge auf strukturelle Veränderungen des Proteinmoleküls zurückzuführen sein. Die weitere Zunahme von  $\lambda_{\max}$  bei pH-Werten über 11,0 ist anhand der erreichten sehr hohen Werte wahrscheinlich auf eine durch extreme pH-Werte verursachte, beginnende Entfaltung zurückzuführen.

Während der zweite Übergang also unabhängig von der eingesetzten Messmethode und der Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>, ANS oder NOB einen konstanten  $pK_a$ -Wert von 10,0-10,3 aufweist, variieren die  $pK_a$ -Werte des ersteren abhängig vom gemessenen Parameter zum Teil sehr stark, selbst wenn man eine Beeinflussung des zugrunde liegenden Gleichgewichtes durch die Bindung von Substrat oder Liganden in Betracht zieht und deshalb nur die mittels beider Parameter der intrinsischen Fluoreszenz bestimmten Kurven (Abb. 4.5) berücksichtigt werden (Tab. 4.1).

**Tabelle 4.1 Apparente  $pK_a$ -Werte der mittels intrinsischer Fluoreszenz der PLA<sub>2</sub> bestimmten pH-induzierten Übergänge von PLA<sub>2</sub>.**

Übergang	RF <sub>350 nm</sub>	$\lambda_{\max}$
$pK_{a1}$ (apoPLA <sub>2</sub> )	7,7	7,3
$pK_{a2}$ (apoPLA <sub>2</sub> )	10,2	10,1
$pK_{a1}$ (holoPLA <sub>2</sub> )	7,6	8,1
$pK_{a2}$ (holoPLA <sub>2</sub> )	10,1	10,3

Dies legt die Annahme nahe, dass dieser erste Übergang auf mehreren Ereignissen beruht, die zum Teil durch Liganden- oder Substratbindung beeinflusst werden. Der erste und auch der zweite Übergang müssen auf eine W3 umfassende Konformationsänderung von PLA<sub>2</sub> zurückzuführen sein, da es sich nicht nur um eine Veränderung der Fluoreszenzintensität handelt, sondern, wie durch die ähnlich verlaufende Abhängigkeit von  $\lambda_{\max}$  bewiesen wird, sich der Grad der Lösungsmittlexponierung von W3 ändert.



**Abbildung 4.6** Einfluss des pH-Wertes auf Sekundär- und Tertiärstruktur von apoPLA<sub>2</sub>. **A:** Fern-UV-CD-Spektren bei verschiedenen pH-Werten. **B:** Nah-UV-CD-Spektren bei verschiedenen pH-Werten. **C:** Nah-UV-CD-Spektren von apoPLA<sub>2</sub> bei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen. Die Spektren wurden bei den pH-Werten 12,0 (—), 11,0 (—), 10,0 (—), 9,0 (—), 8,0 (—), 7,0 (—), 6,0 (—), 5,0 (—), 4,0 (—) und 3,0 (—) gemessen (siehe 3.2.5.1). Ein weiteres Spektrum (Abb. 4.6 C) wurde bei pH 10,0 und in Anwesenheit von 1 M KCl (—) bestimmt, die beiden anderen entstammen Abbildung 4.6 B.

Die in Abbildung 4.6 dargestellten Fern- und Nah-UV-CD-Spektren von apoPLA<sub>2</sub> bei unterschiedlichen pH-Werten erhärten die Annahme einer strukturellen Änderung des Proteinmoleküls. Während aus der pH-abhängigen Änderung des Nah-UV-CD-Spektrums eine Veränderung der chiralen Umgebung mindestens eines aromatischen Chromophores hervorgeht, sind die Fern-UV-CD-Spektren in diesem Punkt nicht eindeutig. Im gesamten gezeigten pH-Bereich ist das Fern-UV-CD-Spektrum von apoPLA<sub>2</sub> in Übereinstimmung mit der bekannten Struktur des Proteins typisch für ein überwiegend  $\alpha$ -helikales Protein mit einem ausgeprägten positiven Extremum zwischen 180 nm und 200 nm sowie zwei deutlichen negativen Extrema bei 208 nm und 222 nm. Während sich das Extremum bei 208 nm als unabhängig vom pH-Wert erweist, nimmt die Signalintensität bei 222 nm mit fallendem pH-Wert zu. Dieses gegensätzliche Verhalten resultiert in einem isodichroischen Punkt bei 210 nm (Abb. 4.6 A).

Einerseits könnte dies rein spektroskopische Gründe haben. So ist z.B. der Einfluss aromatischer Aminosäuren, vor allem von Tryptophan, auch auf das Fern-UV-CD-Spektrum bereits bekannt, wenn auch selten berücksichtigt. Die Modifizierung des Indolringes eines Tryptophans bzw. seiner Umgebung kann sich durchaus auf das Minimum bei 222 nm auswirken<sup>146;147</sup>.

Andererseits wurde bereits beschrieben, dass die im ungebundenen Zustand flexible N-terminale  $\alpha$ -Helix von PLA<sub>2</sub> durch die Bindung an Substratpartikel rigider wird<sup>148;149</sup>. Bei einer humanen Phospholipase A<sub>2</sub> der Gruppe IIB führt genau diese Festigung zu einer Veränderung des Fern-UV-CD-Spektrums<sup>150;151</sup>, welche der oben beschriebenen stark ähnelt. Eine endgültige Entscheidung zwischen beiden möglichen Erklärungen ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, auch wenn der oben erwähnte isodichroische Punkt zumindest für letzteres spricht, da isodichroische Punkte als spektroskopischer Beleg für die Validität eines Zweizustandsmodells gelten<sup>152;153;154</sup>. Dies führt im Umkehrschluss zu der, jedoch nicht eindeutig belegbaren, Annahme eines Gleichgewichtes zweier Konformationen.

In den Nah-UV-CD-Spektren sind, wie erwähnt, mehrere Veränderungen zu erkennen. Die auffälligste Änderung betrifft das Extremum bei ca. 285 nm, das mit steigendem pH-Wert zunimmt und eine deutliche Rotverschiebung aufweist. Darüberhinaus zeigt sich eine Invertierung der Kurvenkrümmung im Bereich von 290-310 nm. Dadurch entsteht ein negatives Extremum bei ca. 305 nm (Abb. 4.6 B). Weiterhin steigt mit abnehmenden pH-Werten die Signalintensität im Bereich von 250-270 nm, besonders im Maximum bei 255 nm an. Deren Auftragung gegen den pH-Wert stimmt mit der in Abbildung 4.5 A gezeigten Kurve überein (nicht gezeigt).

Auch wenn im Gegensatz zu den Fluoreszenzsignalen Nah-UV-CD-Banden aufgrund der teilweisen Überlappung nicht immer eindeutig den jeweiligen Chromophoren zugeordnet werden können, lässt der Vergleich mit bereits veröffentlichten gemessenen oder auch berechneten Spektren von Proteinen oder Modellpeptiden durchaus Schlussfolgerungen bezüglich der involvierten Chromophore zu. So sind scharfe und gut aufgelöste Banden zwischen 255 nm und 270 nm auf den  $L_b$ -Zustand von Phenylalanin zurückzuführen<sup>147</sup>. Der  $L_b$ -Zustand von Tyrosin kann sich in einer ausgeprägten Bande bei ca. 280 nm äußern<sup>147</sup>. Beide können sowohl positiv als auch negativ sein<sup>155</sup>. Die ausgeprägte Schulter bei 295 nm (Abb. 4.6 B) ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die ionisierte Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes (Tyrosinat) zurückzuführen. Dafür spricht, dass die Hydroxylgruppe exponierter Tyrosinreste bei pH-Werten oberhalb von 9,5 dissoziieren kann, was zu einer Rotverschiebung der  $L_b$ -Bande auf 295 nm führt<sup>147</sup>. Das Verschwinden der 295-nm-Schulter in den Nah-UV-CD-Spektren von PLA<sub>2</sub> bei pH-Werten unterhalb von 10,0 würde sich in der erwähnten Invertierung der Kurvenkrümmung äußern. Charakteristisch für Tryptophan hingegen sind Banden bei 275 nm ( $L_a$ ) und 290 nm ( $L_b$ )<sup>147</sup>. Eine schwache negative Bande bei 305 nm wie in Abbildung 4.6 wurde im Falle von Lysozym als ebenfalls zu Tryptophan gehörend diskutiert<sup>147</sup>. Das Nah-UV-CD-Spektrum von Colicin E1 enthält positive Banden bei 284 nm und 292 nm, die gleichfalls Tryptophan zugeordnet wurden<sup>155</sup>.

Vor diesem Hintergrund können die Nah-UV-CD-Spektren von apoPLA<sub>2</sub> wie folgt interpretiert werden. Zum einen nimmt mit sinkendem pH-Wert die Chiralität der Umgebung mindestens eines Phenylalaninrestes zu. Zum anderen führt die Protonierung eines exponierten Tyrosinats zum Verschwinden der Schulter bei 295 nm. Als Konsequenz wird ein Tryptophansignal bei 305 nm sichtbar. Weiterhin nimmt die Intensität der Bande um 290 nm ab, die mit hoher Wahrscheinlichkeit aus überlappenden Einzelbanden von Tyrosin und Tryptophan zusammengesetzt aber durch Tryptophan dominiert wird, und wird mit fallendem pH-Wert von 287 nm zu kleineren Wellenlängen verschoben. PLA<sub>2</sub> besitzt acht über das ganze Molekül verteilte Tyrosin- und fünf Phenylalaninreste, von denen sich F5 in unmittelbarer Nähe zu W3 befindet. Dessen Umgebung weist, wie bereits anhand der Fluoreszenzspektren erkennbar war, erhöhte Polarität in Gegenwart moderat alkalischer pH-Werte auf. Die Annahme, dass sich im Zuge des gleichen Ereignisses die Umgebung zumindest auch von F5 verändert, erscheint plausibel.

Die nachstehende Zusammenfassung von veröffentlichten und den beschriebenen eigenen Ergebnissen



führt zu einem, ohne weitere strukturelle Charakterisierung allerdings noch vorläufigen Modell. Im Zusammenhang mit pH-induzierten Konformationsänderungen von PLA<sub>2</sub> ist der Einfluss des pH-Wertes auf die im theoretischen Teil beschriebene, von der Bindung an Grenzflächen abhängige Aktivierung des Enzyms von besonderer Bedeutung, da diese in besonderem Maße von der Konformation des N-Terminus abhängt. Dieser ist ein wichtiger Bestandteil der schon früh postulierten <sup>73</sup>, vom aktiven Zentrum räumlich verschiedenen und für die initiale Bindung an Phospholipid-Wasser-Grenzflächen verantwortlichen *its* <sup>156</sup>. Die Deprotonierung der Aminogruppe des N-terminalen Alanins führt zum Verlust einer Wasserstoffbrücke mit einer Carboxylgruppe. Als Konsequenz liegt der N-Terminus von apoPLA<sub>2</sub> bei pH-Werten oberhalb von 8,1 in einer veränderten Konformation mit verringerter Affinität zu Micellen vor <sup>74</sup>. Der Verlust der Wasserstoffbrücke bei basischen pH-Werten kann interessanterweise durch die Bindung des Cofaktors Ca<sup>2+</sup> ausgeglichen werden. Als Erklärung hierfür wurde die Existenz zweier Spezies (E und E') mit verschiedenen Konformationen des N-Terminus postuliert <sup>156</sup>.

Das nicht prozessierte Proenzym, das zusätzlich ein kurzes N-terminales Propeptid enthält, unterscheidet sich hinsichtlich der Aktivität gegen monomere Substrate kaum und seiner Affinität zu Ca<sup>2+</sup> gar nicht von PLA<sub>2</sub> <sup>73</sup>, ist aber nicht in der Lage, an Grenzflächen zu binden <sup>74; 94; 156</sup>. Interessanterweise ähneln sich die spektroskopischen Unterschiede (leicht verschobene maximale Emissionswellenlänge und deutlich verschiedene Quantenausbeuten der Tryptophanfluoreszenz <sup>131</sup>) zwischen ProPLA<sub>2</sub> und PLA<sub>2</sub> sowie zwischen PLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 und pH 9,0 stark. Die in beiden Fällen („ProPLA<sub>2</sub>/PLA<sub>2</sub>“ und „PLA<sub>2</sub> bei pH 9,0/pH 4,0“) unveränderte Architektur des aktiven Zentrums <sup>74</sup> trotz des jeweils entfallenden Wasserstoffbrückennetzwerkes zum N-Terminus ist gleichfalls hervorzuheben.

Verschiedene fluoreszenzspektroskopische Studien konnten in Hinblick auf die Dynamik speziell des N-Terminus des freien und des gebundenen Enzyms wie auch des Proenzymen weiteren Aufschluss bringen. Zum einen wurden die bereits erwähnten Unterschiede zwischen ProPLA<sub>2</sub> und PLA<sub>2</sub> hinsichtlich  $\lambda_{\max}$  und der Quantenausbeute bestätigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass  $\lambda_{\max}$  des Tryptophans von PLA<sub>2</sub> im Komplex mit Micellen noch weiter hypsochrom verschoben ist. Dies spiegelt sich auch in den mittels Acrylamid-*quenching* gefundenen Stern-Volmer-Konstanten wieder, die im Falle der ProPLA<sub>2</sub> deutlich größer ist als bei PLA<sub>2</sub> <sup>83</sup>. Aus der geringeren Fluoreszenzanisotropie von ProPLA<sub>2</sub> wurde auf eine höhere Mobilität des Indolrings geschlossen. Folgerichtig wird diese durch Bindung von PLA<sub>2</sub> an Micellen noch weiter eingeschränkt <sup>84</sup>. Aus den komplexen *fluorescence lifetime decays*, die sich nach der Bindung von Inhibitoren vereinfachen, wurde auf eine ausgeprägt heterogene und stark fluktuierende, bzw. kaum definierte Struktur des N-Terminus von PLA<sub>2</sub> geschlossen, die durch die Bindung an Micellen immobilisiert wird. Dies wird auch durch die Regulation der Grenzflächenbindung sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub> durch den Status der N-terminalen  $\alpha$ -Helix bestätigt, die mittels einer Kombination aus Infrarotspektroskopie, CD und Modellierung gefunden wurde <sup>151</sup>.

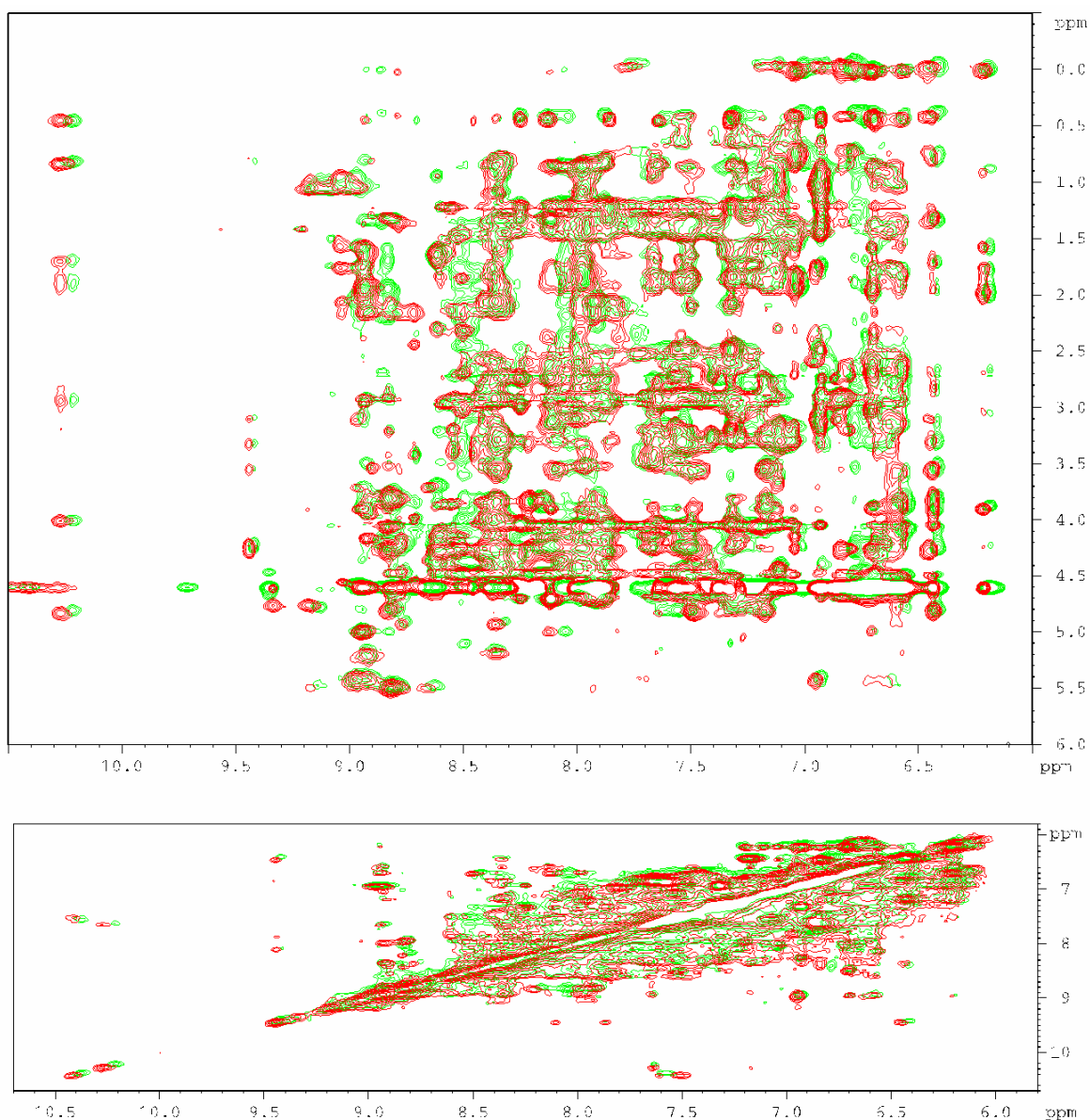
In Titrationsstudien einzelner Histidinreste mittels NMR-Spektroskopie wurde weiterhin festgestellt, dass

die Aktivierung von ProPLA<sub>2</sub> zu PLA<sub>2</sub> auch die direkte Umgebung von H17 verändert <sup>157</sup>. Im Falle der mit PLA<sub>2</sub> eng verwandten bpPLA<sub>2</sub> wurde aufgrund der Linienbreiten der NMR-Signale von Y25, L41, F106, Y111, die in PLA<sub>2</sub> auch vorhanden sind, bzw. aus deren Abhängigkeit von Temperatur und Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ein Gleichgewicht aus zwei nativen Zuständen postuliert. Bei PLA<sub>2</sub> sind diese Effekte allerdings nicht so ausgeprägt wie bei bpPLA<sub>2</sub> <sup>158</sup>. Hierzu ist anzumerken, dass diese Messungen bei pH-Werten unterhalb von 8,0 stattfanden, so dass hier kein zwingender Gegensatz besteht. Aus der Tatsache, dass H17 die einzige, nicht gleichzeitig in bpPLA<sub>2</sub> und PLA<sub>2</sub> vorkommende Aminosäure in räumlicher Nähe zu den oben angeführten Resten ist, schlossen die Autoren, dass die H17 beinhaltende Helix in das von ihnen postulierte Gleichgewicht involviert sein muss <sup>158</sup>. Bei pH 4,25 wurden im Rahmen einer anderen Studie für die Aminosäurereste 1-6 der N-terminalen  $\alpha$ -Helix keine NOE-Signale gefunden <sup>159</sup>. Die Messungen der als nächstes zu erwähnenden Studie erfolgten, wie die meisten Strukturuntersuchungen mittels NMR-Spektroskopie, bei einem pH-Wert von 4,3 <sup>148</sup>. In den Einzelspektren dieser Studie waren N-Terminus und A1 nicht sichtbar, das Polypeptidrückgrat lag erst ab der vierten Aminosäure in helikaler Konformation vor und eine hohe Mobilität des Indolringes von W3 war erkennbar. Nach Bindung eines übergangszustandsanalogen Inhibitors und an Micellen wurden Wasserstoffbrücken vom N-Terminus zu E71, Q4 und D99 sowie von H48 und Y52 zu D99 gefunden <sup>149</sup>. Im Falle von bpPLA<sub>2</sub> sind ebenfalls Wasserstoffbrücken vom N-Terminus zur Seitenkette von Q4 sowie von Q4 zu den im  $\beta$ -Faltblatt befindlichen N71 und Y73 bekannt. Darüberhinaus ist F5 über hydrophobe Interaktionen mit F106 verbunden <sup>160</sup>.

Die oben beschriebenen spektroskopischen Untersuchungen, sowohl mit CD als auch mittels intrinsischer Fluoreszenz, zeigen zweifelsfrei die Existenz mindestens zweier verschiedener Spezies, von denen eine um pH 9,0 und die andere unter neutralen bis leicht sauren pH-Werten akkumuliert wird. Aus den eingangs beschriebenen Aktivitätsmessungen bei verschiedenen pH-Werten ist erkennbar, dass die Aktivität von PLA<sub>2</sub> bei pH 5,0 sehr gering ist. Die Erhöhung der Calciumkonzentration als Ausgleich für die verringerte Calciumaffinität des Enzyms bei niedrigen pH-Werten änderte nichts an diesem Verhalten. Dies erlaubt jedoch keine Aussage über den nativen oder nicht nativen Zustand des Proteins unter diesen Bedingungen, da die Inaktivierung auch ausschließlich aus der Protonierung von H48 resultieren kann. Der ihm entsprechende Histidinrest in bpPLA<sub>2</sub> hat einen pK<sub>a</sub>-Wert von 5,7 <sup>96</sup>. Vielmehr legt die unveränderte Affinität des Proteins zu ANS nahe, dass die hauptverantwortliche Bindungsstelle für ANS, das aktive Zentrum, unverändert vorliegt.

#### 4.1.4 NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub>

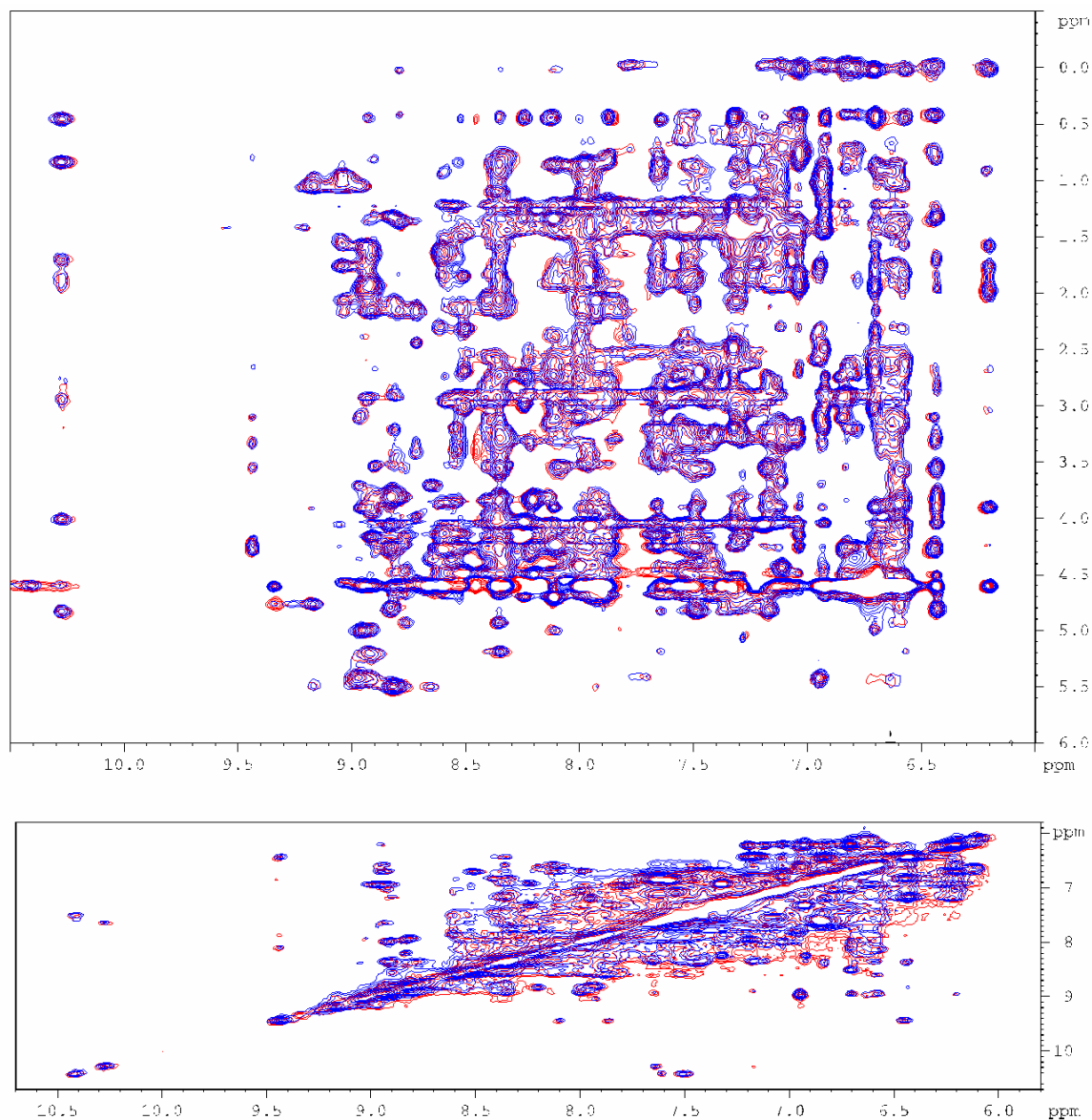
Um den strukturellen Hintergrund der oben beschriebenen spektroskopisch und funktionell gefundenen Resultate aufzuklären bzw. zu erhärten, wurden zweidimensionale NOESY-NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub>



**Abbildung 4.7** Vergleich ausgewählter Regionen der 2D-NOESY-NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub> bei pH 4,3. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich der NOESY-Spektren. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektren. Die NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub> bei pH 4,3 in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub> (rot) bzw. 500 mM CaCl<sub>2</sub> (grün) wurden wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Zum Zeitpunkt des Abfassens dieser Arbeit war die Zuordnung der einzelnen NOE-Kreuzsignale leider noch nicht abgeschlossen. Die Diskussion muss daher auf eine visuelle Analyse der Spektren beschränkt werden. Ausschnitte der Einzelspektren von PLA<sub>2</sub> bei pH 4,3 in Gegenwart von 2 mM EDTA, 50 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. 500 mM CaCl<sub>2</sub> und bei pH 8,0 in Anwesenheit von 2 mM EDTA bzw. 50 mM CaCl<sub>2</sub> werden im Anhang gezeigt (Abb. 6.1-5).

Abbildung 4.7 zeigt übereinander gelegte Ausschnitte der Spektren von PLA<sub>2</sub> bei pH 4,3 in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub> und 500 mM CaCl<sub>2</sub>. Die Ausgangsbedingungen (150 mM NaCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 4,3)



**Abbildung 4.8** Vergleich ausgewählter Regionen der 2D-NOESY-NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub> in Anwesenheit von 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich der NOESY-Spektren. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektren. Die NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub> in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub> bei pH 4,3 (rot) bzw. bei pH 8,0 (blau) wurden wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

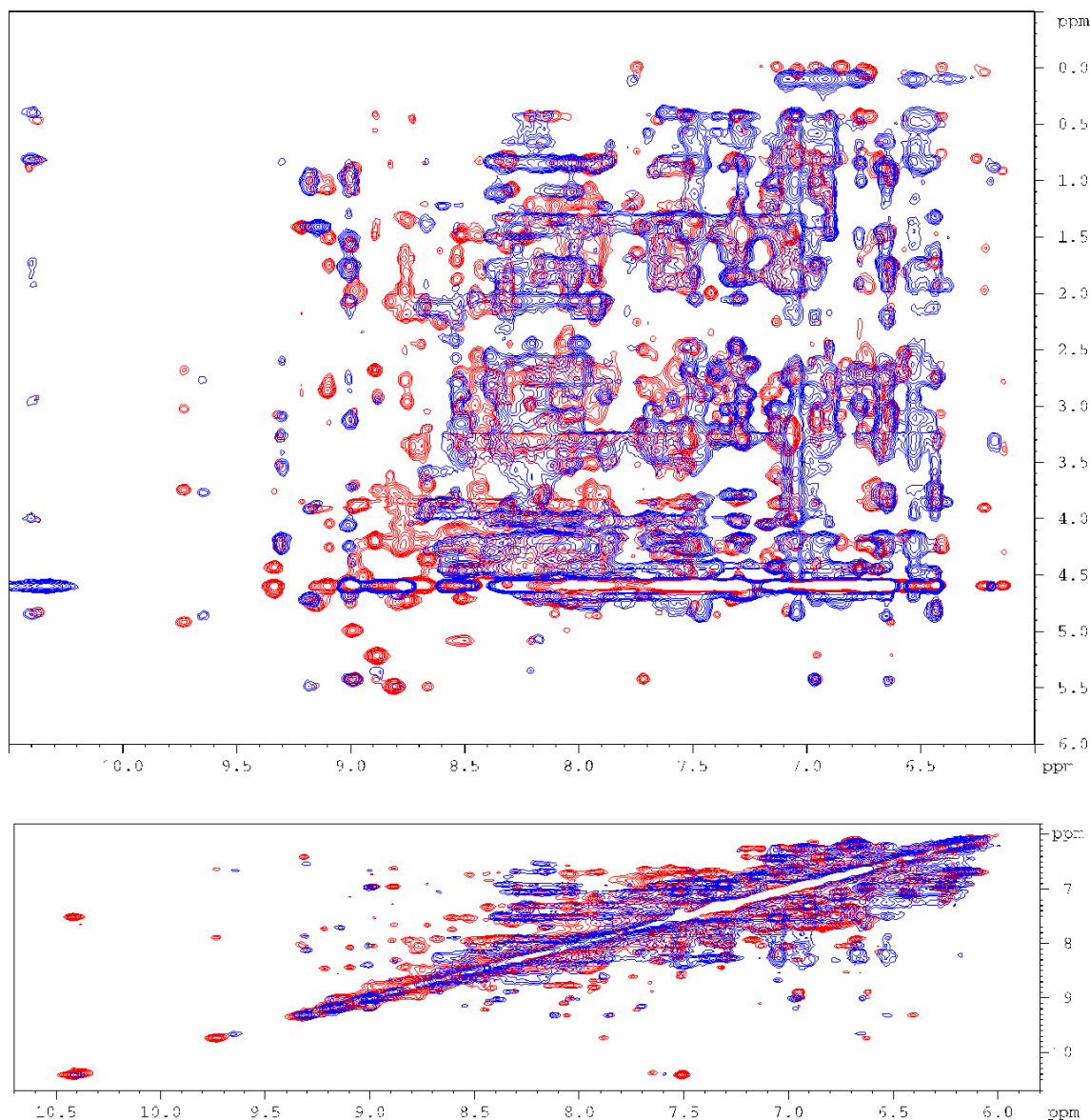
orientierten sich an den Bedingungen, unter denen die Spektren zur Bestimmung der Lösungsstruktur des Enzyms gemessen wurden <sup>159</sup>. Bei pH 4,3 und 50 mM CaCl<sub>2</sub> sollte das Enzym aufgrund der unter diesen Bedingungen niedrigen Affinität zum Cofaktor nicht mit Ca<sup>2+</sup> gesättigt sein. In Gegenwart von 500 mM des Cofaktors kann dagegen von einer weitgehenden Sättigung ausgegangen werden. Dies wird auch durch die geringe Stabilisierung des Proteins durch 50 mM CaCl<sub>2</sub> bei pH 4,0 verglichen mit dem deutlichen Effekt von 500 mM des Salzes bei gleichem pH verdeutlicht. Bei pH 8,0 sind 50 mM CaCl<sub>2</sub> dagegen mehr als ausreichend für eine vollständige Sättigung <sup>73</sup> des Enzyms mit dem Cofaktor.

Die in den Abbildungen 4.7 und 4.8 gezeigten NOESY-Spektren zeigen keine dramatischen Unterschiede hinsichtlich der NOE-Kreuzsignale höherer Intensität. Dies demonstriert den nativen Zustand von PLA<sub>2</sub> unter den gewählten Bedingungen. Die Spektren in Gegenwart von 50 mM Ca<sup>2+</sup> bei pH 4,0 und pH 8,0 sind sogar als weitgehend identisch anzusehen (Abb. 4.8). Die genauere Analyse der Spektren bei gleichem pH-Wert und verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Abb. 4.7) offenbart aber für Signale niedriger und mittlerer Intensität teilweise deutliche Intensitätsunterschiede und Verschiebungseffekte, was auf lokale Konformationsänderungen hindeutet. Die Signale höherer Intensität sind hiervon jedoch nicht betroffen. Letzteres lässt darauf schließen, dass die globale Faltung von PLA<sub>2</sub>, vor allem die Sekundärstruktur, unbeeinflusst von den jeweiligen Bedingungen erhalten bleibt.

Die vorangegangenen fluoreszenzspektroskopischen Messungen legten die Annahme nahe, dass unabhängig von der Calciumbindung bei pH-Werten von 8,0 bis 11,0 eine Enzymspezies akkumuliert wird, die sich anhand eines verstärkt solvensexponierten Tryptophanrestes von der bei anderen pH-Werten vorherrschenden Form unterscheidet. Für apoPLA<sub>2</sub> wurde mittels CD-Spektroskopie gezeigt, dass die zugrunde liegenden strukturellen Änderungen mit hoher Wahrscheinlichkeit die N-terminale  $\alpha$ -Helix betreffen (Abb. 4.6 A). Die Ligandenbindungs- und Aktivitätsstudien belegten auch funktionell unterschiedliche Enzymspezies unter den jeweiligen Bedingungen.

Die gefundenen Unterschiede in den einzelnen NOESY-Spektren sind im Hinblick auf die eingangs diskutierte Calciumsättigung und die bereits gezeigten Daten zum Einfluss des pH-Wertes auf die native Struktur von besonderem Interesse. Wie bereits beschrieben, fanden die NMR-Messungen unter grundsätzlich zu unterscheidenden Bedingungen statt. Die Referenzprobe wurde bei pH 4,3 in Anwesenheit von 50 mM CaCl<sub>2</sub> gemessen. Unter diesen Bedingungen ist PLA<sub>2</sub> nicht Ca<sup>2+</sup>-gesättigt, die fragliche N-terminal exponierte bzw. flexible Spezies wurde mittels CD- oder Fluoreszenzspektroskopie nicht nachgewiesen, da wegen der hier sehr geringen Ca<sup>2+</sup>-Affinität von PLA<sub>2</sub> unter diesen Bedingungen keine Experimente durchgeführt wurden. Die zweite Probe wurde bei pH 8,0 in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub> gemessen. Den fluoreszenzspektroskopischen Daten zufolge wird unter diesen Bedingungen die N-terminal flexiblere Spezies akkumuliert, ist aber vollständig mit Ca<sup>2+</sup> gesättigt. Die dritte Probe wurde bei pH 4,3 in Anwesenheit von 500 mM CaCl<sub>2</sub> untersucht, was bei diesem pH-Wert eine nahezu vollständige Ca<sup>2+</sup>-Sättigung gewährleistet. Wie später gezeigt wird ist PLA<sub>2</sub> unter diesen Bedingungen deutlich stabiler als in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>, aber auch stabiler als in Gegenwart von lediglich 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Die fluoreszenz- und CD-spektroskopisch gefundenen Daten, und auch die Ergebnisse der ANS-Bindungsstudien von apoPLA<sub>2</sub> legten nahe, dass bei diesem pH-Wert eine Spezies mit einer weniger solvensexponierten N-terminalen  $\alpha$ -Helix vorherrscht.

Interessanterweise kann aus den gezeigten NMR-Spektren die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Strukturen von Ca<sup>2+</sup>-ungesättigter PLA<sub>2</sub> bei pH 4,3 und Ca<sup>2+</sup>-gesättigter PLA<sub>2</sub> bei pH 8,0, also mit flexiblerem und stärker solvensexponiertem N-Terminus weitestgehend identisch sind. Unter moderat



**Abbildung 4.9** Vergleich ausgewählter Regionen der 2D-NOESY-NMR-Spektren von apoPLA<sub>2</sub> in Gegenwart verschiedener pH-Werte. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich der NOESY-Spektren. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektren. Die NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub> in Gegenwart von 2 mM EDTA bei pH 4,3 (rot) bzw. bei pH 8,0 (blau) wurden wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

sauren Bedingungen, wenn der N-Terminus von apoPLA<sub>2</sub> mehr Solvensabschirmung und Rigidität erfährt, führt Calciumsättigung dagegen zu nachweisbaren Unterschieden in den zweidimensionalen NOESY-NMR-Spektren.

Im Vergleich zu holoPLA<sub>2</sub> sind die NOE-Kreuzsignale von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,3 und pH 8,0 (Abb. 4.9) von geringerer Intensität und zeigen eine größere Linienbreite. Dies ist vermutlich auf eine stark erhöhte Flexibilität der apoPLA<sub>2</sub> zurückzuführen. Weiterhin sind die pH-induzierten Unterschiede sowohl im Amid- und Aromatenbereich, als auch im Amid- und Aliphatenbereich deutlicher als bei holoPLA<sub>2</sub>.

### 4.1.5 Zusammenfassende Diskussion

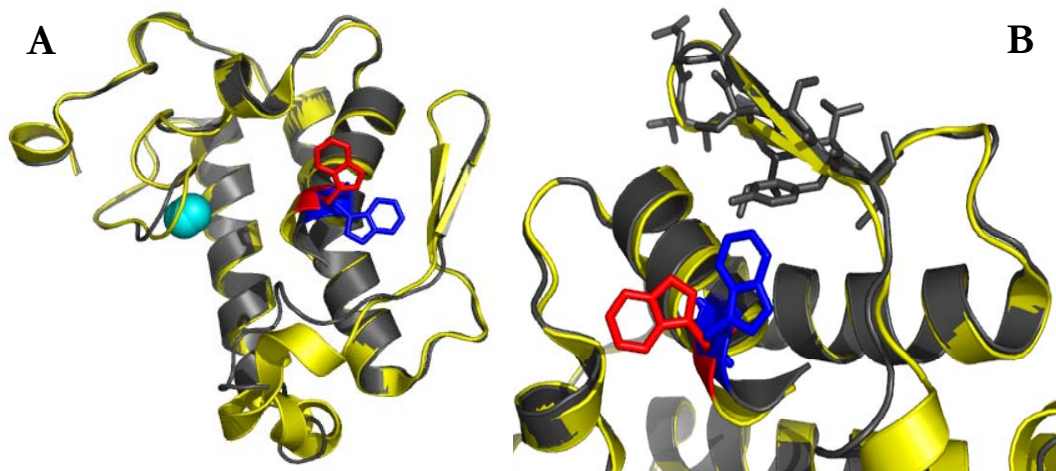
Die bisherigen Befunde können wie folgt zusammengefasst werden. Bei bestimmten pH-Werten wird eine native und aktive PLA<sub>2</sub>-Spezies mit flexibler und exponierter  $\alpha$ -Helix 1-13 akkumuliert, die mittels optischer spektroskopischer Techniken nachweisbar ist. Dies ist auch beim Ca<sup>2+</sup>-gesättigten Enzym der Fall (Abb 4.5). Bei anderen pH-Werten kann diese Spezies NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden, sofern keine Ca<sup>2+</sup>-Sättigung vorliegt.

Als Illustration der Unterschiede zwischen beiden Spezies könnte ProPLA<sub>2</sub> (Abb. 4.10) dienen, für die trotz des entfallenen Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen N-Terminus und aktivem Zentrum anhand der identischen Calciumaffinität und der kaum verminderten Aktivität gegen monomere Substrate ein intaktes aktives Zentrum nachgewiesen wurde<sup>74</sup>. Dies konnte anhand der Röntgenkristallstruktur bestätigt werden<sup>94</sup>, die nur geringfügige Unterschiede zu PLA<sub>2</sub> zeigt (Abb. 4.10). Trotz dieser nur geringen Unterschiede ist ProPLA<sub>2</sub> nicht nur aufgrund der sterischen Hinderung durch das Propeptid, sondern auch wegen des gestörten Wasserstoffbrückennetzwerkes nicht in der Lage, an Phospholipidgrenzflächen zu binden. Diese Störung ist jedoch nicht stark genug, um die Ausbildung der N-terminalen  $\alpha$ -Helix unter den Kristallisierungsbedingungen zu unterbinden. Dennoch erscheint die  $\alpha$ -Helix in der Kristallstruktur leicht aufgeweitet. Eine weitere Konsequenz ist die Orientierung von W3 in eine deutlich solvensexponiertere Position (Abb. 4.10 B).

In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die bereits diskutierte prämicellare Aggregation von PLA<sub>2</sub> mit kurzkettigen Substratanaloga verwiesen, deren Bindungsisotherme<sup>87</sup> teilweise verblüffende Ähnlichkeiten mit in den Abbildungen 4.1 B und 4.3 A gezeigten v/S-Charakteristiken aufweisen. Hinsichtlich der strukturellen Konsequenzen des pH-Wertes ist hier von Bedeutung, dass Existenz und Ausmaß der zweiten Phase vom Ladungszustand der zur *irs* gehörenden Seitenketten von R6 und der H17 (in PLA<sub>2</sub>) abhängig zu sein scheinen<sup>161; 162</sup>. Im Zuge der verbesserten Kenntnisse der Tertiärstruktur sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub> erwiesen sich auch andere Aminosäuren als bedeutsam für diese besondere Form der Grenzflächenaktivierung, die interessanterweise zum großen Teil der  $\alpha$ -Helix 1-13 angehören<sup>160</sup>.

Auch die Bindung von PLA<sub>2</sub> an vorhandene Micellen ist abhängig von pH-Wert und Calciumsättigung<sup>156; 163</sup>. Das Resumé der zitierten Bindungsstudien ist die Existenz zweier Formen, einer bindungskompetenten, die vorrangig bei neutralen pH-Werten akkumuliert wird, und einer nicht bindungskompetenten, bei basischen pH-Werten vorkommenden Form. Der Übergang zwischen beiden Formen hat einen pK<sub>a</sub>-Wert, der mit dem der N-terminalen Aminogruppe identisch ist. Interessanterweise kann die Fähigkeit Micellen zu binden auch unter basischen pH-Werten aufrechterhalten werden, sofern Ca<sup>2+</sup> anwesend ist. In diesem Zusammenhang scheint von Bedeutung, dass die pH-induzierten Unterschiede in den NOESY-Spektren bei apoPLA<sub>2</sub> wesentlich drastischer ausfallen als bei holoPLA<sub>2</sub>. Hier besteht eine Parallele zwischen der Fähigkeit Micellen zu binden, die ein intaktes Wasserstoffbrückennetzwerk voraus-





**Abbildung 4.10** Vergleich der Raumstrukturen von PLA<sub>2</sub> und ProPLA<sub>2</sub>. **A:** Schematische Darstellung der übereinandergelegten Raumstrukturen von PLA<sub>2</sub> und der Aminosäuren 1-124 von ProPLA<sub>2</sub>. **B:** Ausschnitt aus Abbildung 4.10 A mit hinzugefügten Seitenketten des  $\beta$ -Faltblattes. Die Koordinaten für die Struktur von PLA<sub>2</sub> wurden der pdb-Datei 4P2P<sup>72</sup>, für ProPLA<sub>2</sub> der pdb-Datei 1HN4<sup>94</sup> (beide Brookhaven-Datenbank) entnommen und mit der Visualisierungssoftware Pymol bearbeitet. Dabei wurde das Polypeptidrückgrat von ProPLA<sub>2</sub> gelb und W3 von ProPLA<sub>2</sub> rot gefärbt. Das Polypeptidrückgrat von PLA<sub>2</sub> ist grau, W3 blau dargestellt.

setzt, und den mittels optischer spektroskopischer Techniken und NMR-Spektroskopie detektierten lokalen Strukturänderungen. Beides sind pH-abhängige, den N-Terminus betreffende Prozesse, die durch Calciumbindung beeinflusst werden. Dabei ist anzumerken, dass die Calciumbindung nicht am N-Terminus, sondern in dem über das erwähnte Wasserstoffbrückennetzwerk mit letzterem verbundenen aktiven Zentrum erfolgt.

Die Hypothese zweier nativer Spezies fortführend, werden die bisherigen Daten dahingehend interpretiert, dass in Abhängigkeit vom aktuellen pH-Wert zwei verschiedene native Enzymspezies vorliegen können. Die Annahme des nativen Charakters beider Spezies wird durch die spektroskopischen Daten, vor allem die CD- und NMR-Spektren gestützt. Da die Fluoreszenz- und CD-Spektren dahingehend interpretiert wurden, dass sich die beiden Spezies hinsichtlich der Solvenszugänglichkeit von W3 und F5 sowie der Rigidität bzw. Flexibilität mindestens einer  $\alpha$ -Helix unterscheiden, wird die bei moderat sauren bis neutralen pH-Werten dominierende Spezies im folgenden als N<sup>R</sup> („rigid“), die um pH 9,0 akkumulierte Spezies als N<sup>E</sup> („exponiert“) bezeichnet werden.

Die exklusiv bei alkalischen pH-Werten auftretende Aktivierung durch bzw. gegen NOB (Abb. 4.3) könnte im Sinne der in Abbildung 4.2 vorgeschlagenen Mischoligomerisierung als Konsequenz der durch die erhöhte Zugänglichkeit apolarer Reste wie von W3 und F5 verstärkten Hydrophobizität der Protein-oberfläche von N<sup>E</sup> betrachtet werden. Dagegen würde sich N<sup>R</sup> aufgrund des korrekt gefalteten N-Terminus durch einen weniger exponierten Tryptophanrest sowie eine ausgeprägtere bzw. stabilere  $\alpha$ -Helix 1-13 von N<sup>E</sup> unterscheiden. Die Konsequenz hieraus könnte die erwähnte Bindungskompetenz an Micellen sein.



## 4.2 Thermodynamische Stabilität von PLA<sub>2</sub>

### 4.2.1 Einfluss von GuHCl auf Struktur und Stabilität von PLA<sub>2</sub>

Der Ausgangspunkt einer die Proteinfaltung thematisierenden Arbeit ist die Messung von Übergangskurven zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilitätsparameter, beispielsweise mittels Fluoreszenz und Fern-UV-CD-Spektroskopie <sup>19</sup>. Zunächst wurden daher Übergangskurven in Abhängigkeit von der GuHCl-Konzentration bestimmt (Abb. 4.11 B). Diese zeigen mehrere Auffälligkeiten. Während die auf strukturellen Eigenschaften basierenden Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Übergangskurven von apo- und holoPLA<sub>2</sub> jeweils übereinstimmen, was als hinreichendes Kriterium eines Zweizustandsmodells gilt <sup>27</sup>, nimmt die Fluoreszenz des ANS-apoPLA<sub>2</sub>-Komplexes nicht deckungsgleich mit den jeweiligen Tryptophanfluoreszenz- bzw. Fern-UV-CD-Übergangskurven ab, sondern scheint vielmehr einem exponentiell abnehmenden Verlauf zu folgen (Abb. 4.11 A). Gleiches gilt mit Ausnahme einer gewissen Verschiebung auch für den ANS-holoPLA<sub>2</sub>-Komplex.

Die spezifische Aktivität nimmt zunächst zu, folgt dann aber scheinbar demselben exponentiellen Verlauf (Abb. 4.11 A). Die Zunahme der Aktivität in Gegenwart geringer Denaturanzkonzentrationen ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf den Salzcharakter von GuHCl zurückzuführen, zumal sie in Anwesenheit entsprechender NaCl-Konzentrationen in gleichem Maße steigt (nicht gezeigt).

Die deckungsgleichen Verläufe der Abnahme der ANS-Fluoreszenz und der enzymatischen Aktivität legen ebenso wie die unter 4.1.2 diskutierten Ergebnisse nahe, dass die mittels ANS-Fluoreszenz detektierten Vorgänge vorrangig im aktiven Zentrum des Enzyms stattfinden. Eine Inaktivierung bei subdenaturierenden Konzentrationen von Denaturanzien ist nicht ungewöhnlich. Sie wurde bisher entweder als schwache Inhibierung <sup>164</sup>, eine lokale Entfaltung des naturgemäß flexibleren aktiven Zentrums <sup>165</sup> oder als Einfluss des Denaturans auf den Übergangszustand der durch das jeweilige Enzym katalysierten Reaktion interpretiert <sup>50</sup>. Ersteres lässt sich in diesem Fall weder widerlegen noch bestätigen. Die zweite Annahme ist aufgrund der in Gegenwart von Denaturanzien nicht wesentlich veränderten apparenten Dissoziationskonstante von PLA<sub>2</sub> und NOB (Tab. 6.1/Abb. 4.1 B) bzw. ANS in Gegenwart moderater Denaturanzkonzentrationen unwahrscheinlich. Diese nahezu unveränderten Affinitäten belegen darüber hinaus, dass das aktive Zentrum von PLA<sub>2</sub> zumindest in Gegenwart von Liganden trotz der abnehmenden Signalintensität bis zum Einsetzen der globalen Entfaltung bindungskompetent und somit intakt bleibt. Im letzteren Fall kann eine lineare freie Enthalpiebeziehung angenommen werden, mit deren Hilfe der Einfluss der Denaturanzkonzentration auf die freie Enthalpie des Übergangszustandes aus der linearen Abnahme der Aktivität in Abhängigkeit von [D] in der halblogarithmischen Auftragung berechnet werden kann <sup>50</sup>. Der resultierende Anstieg enthält indirekte Informationen über die Solvenz Zugänglichkeit der Ligandenbindungsstelle des gefalteten Proteins. Im Falle der PLA<sub>2</sub> bedeutet dies, dass das aktive Zentrum

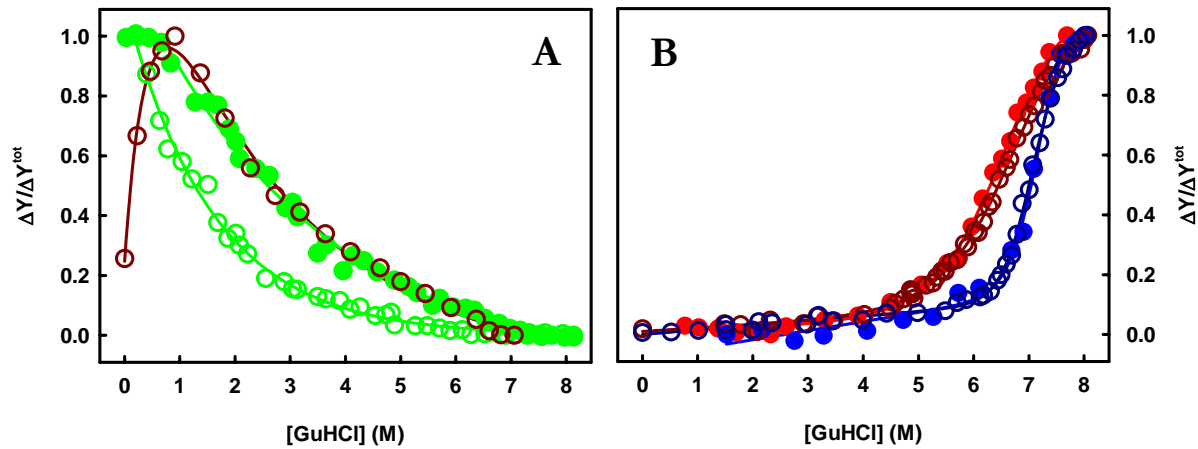
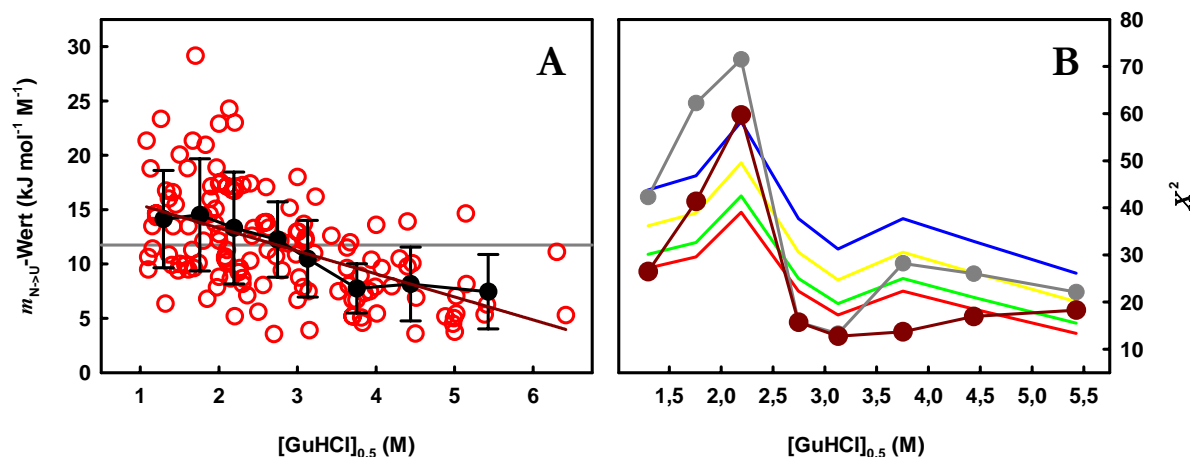


Abbildung 4.11 Einfluss von GuHCl auf das aktive Zentrum und die Struktur von PLA<sub>2</sub> bei pH 8,0. A: Aktivität von holoPLA<sub>2</sub> und Fluoreszenz des ANS-PLA<sub>2</sub>-Komplexes. Die Hydrolysegeschwindigkeiten von PLA<sub>2</sub> gegen 0,27 mM NOB wurden wie unter 3.2.4 beschrieben in Gegenwart der gezeigten GuHCl-Konzentrationen bestimmt, auf die maximalen Werte normiert und gegen die GuHCl-Konzentration aufgetragen (○). Die Fluoreszenz von ANS in Anwesenheit der angegebenen GuHCl-Konzentrationen sowie apoPLA<sub>2</sub> (○) bzw. holoPLA<sub>2</sub> (●) wurde wie unter 3.2.6.2 beschrieben ermittelt und auf die maximalen Werte normiert. B: Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Übergangskurven von PLA<sub>2</sub>. Die Fluoreszenzübergangskurven von apoPLA<sub>2</sub> (○) bzw. holoPLA<sub>2</sub> (○) wurden wie unter 3.2.6.3 beschrieben, die Fern-UV-CD-Übergangskurven von apoPLA<sub>2</sub> (●) bzw. holoPLA<sub>2</sub> (●) wie unter 3.2.5.2 beschrieben bestimmt und auf die Endwerte normiert.

von apoPLA<sub>2</sub> im Vergleich zu holoPLA<sub>2</sub> stärker lösungsmittel exponiert ist (nicht gezeigt). Dies bestätigt die in Abschnitt 4.1.2 aus der unterschiedlichen Quantenausbeute des ANS-Komplexes von apo- bzw. holoPLA<sub>2</sub> gezogenen Schlussfolgerungen. Die Abhängigkeit der ANS-Fluoreszenz von der GuHSCN-Aktivität entspricht den in Abbildung 4.11 A gezeigten Resultaten (nicht gezeigt).

Die in Abbildung 4.11 B gezeigten Übergangskurven weisen gegenüber denen bekannter Modellproteine mehrere Besonderheiten auf. Zunächst fällt die sehr hohe Halbdaturanzkonzentration auf. Aufgrund der limitierten Löslichkeit von GuHCl können keine kompletten, für U repräsentativen Basislinien erreicht werden, was das Berechnen korrekter thermodynamischer Parameter ausschließt. Aus diesem Grunde wurde für die weiteren Untersuchungen auf das spektroskopisch ungünstige, dafür aber stärker denaturierend wirkende GuHSCN zurückgegriffen. Die ohnehin hohe Halbdaturanzkonzentration von apoPLA<sub>2</sub> wird durch holoPLA<sub>2</sub> noch deutlich übertroffen. Dies ist nicht überraschend und kann beispielsweise mit zusätzlichen attraktiven ionischen Interaktionen erklärt werden, die den Wert der freien Enthalpie von N gegenüber der von U noch weiter verringern<sup>16</sup>. Weiterhin fällt die geringe Steilheit des Übergangs auf. Unter der Annahme, dass sich die virtuellen Basislinien von U nicht drastisch von denen von N unterscheiden, kann, besonders für apoPLA<sub>2</sub>, von einem niedrigen  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert ausgegangen werden. Dieses auch unter anderen Bedingungen gefundene Ergebnis führt zu dem paradox anmutenden Ergebnis, dass PLA<sub>2</sub> aufgrund des niedrigen  $m_{N \rightarrow U}$ -Wertes trotz der hohen Halbdaturanzkonzentration deutlich geringere  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$ -Werte aufweist, als beispielsweise das Enzym aus dem Gift der europäischen Honigbiene (vgl. Tab. 6.12 und <sup>9</sup>) oder Ribonuklease A<sup>166</sup>, die beide zur Entfaltung wesentlich geringere



**Abbildung 4.12** Abhängigkeit des  $m_{N \rightarrow U}$ -Wertes vom  $[D]_{0,5}$ -Wert. **A:** Auftragung der  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte von 138 Proteinen in Abhängigkeit vom  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$ -Wert. Die der Literatur entnommenen Daten ( $\circ$ ) wurden nach Gleichung 4.3 ( $-$ ) angepasst, die Abszisse in Intervalle eingeteilt und für jedes Intervall das arithmetische Mittel der Ordinatenwerte gegen das arithmetische Mittel der im Intervall enthaltenen Abszissenwerte aufgetragen ( $\bullet$ ). Die Fehlerbreiten repräsentieren die jeweilige Standardabweichung. Zu Vergleichszwecken wurde das arithmetische Mittel aller Ordinatenwerte eingefügt ( $-$ ). **B:** Ergebnisse der  $\chi^2$ -Tests für die einzelnen Intervalle. Die kritischen  $\chi^2$ -Werte für  $\alpha$ -Werte von 0,1 ( $-$ ), 0,05 ( $-$ ), 0,01 ( $-$ ) und 0,001 ( $-$ ) wurden entsprechend der Anzahl der Freiheitsgrade im jeweiligen Konzentrationsintervall der Literatur<sup>167</sup> entnommen. Die  $\chi^2$ -Werte für die Nullhypothesen  $H_{0A}$  ( $\bullet$ ) und  $H_{0B}$  ( $\bullet$ ) (siehe Text) werden miteinander und den kritischen  $\chi^2$ -Werten ihrer Freiheitsgrade verglichen.

Denaturationskonzentrationen benötigen. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine grundsätzliche Tendenz handelt, wurden, ausgehend von einer vorhandenen Datensammlung<sup>168</sup>, die in der Fachliteratur veröffentlichten thermodynamischen Stabilitätsparameter von 138 Proteinen verglichen. Dabei galten die nachstehend genannten Auswahlkriterien. Zunächst mussten die Parameter mittels GuHCl-induzierter Entfaltung bestimmt worden sein. Die Anzahl der Disulfidbrücken des Proteins musste bekannt sein. Weiterhin musste das betreffende Protein die Kriterien der Zweizustandsfaltung im Gleichgewicht erfüllen. Von der Auswertung ausgeschlossen wurden auch Proteine mit  $[D]_{0,5}$ -Werten von größer als 6,5 M oder kleiner als 1 M GuHCl, da deren Stabilitätsparameter aufgrund fehlender bzw. unvollständiger Basislinien ebenso fehlerhaft wie die von PLA<sub>2</sub> sein mussten und, aufgrund ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit zu PLA<sub>2</sub>, alle Phospholipasen A<sub>2</sub> der Hauptgruppe I. Während weder die gefundenen  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte noch  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$  oder  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$  eine erkennbare Korrelation mit der Anzahl der Disulfidbrücken aufweisen (nicht gezeigt), ist in der Auftragung der gefundenen  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte gegen  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$  trotz der starken Streuung eine Korrelation mit negativem Anstieg sichtbar (Abb. 4.12 A). Dies wird durch einen Vergleich der Werte mit ihrem als waagerechte graue Linie gezeigten Mittelwert deutlich. Hier zeigt sich, dass die Werte im Konzentrationsbereich oberhalb von 3 M GuHCl mit lediglich fünf Ausnahmen alle kleiner als der Mittelwert sind, sich jedoch unterhalb von 3 M GuHCl fast gleichmäßig um ihn verteilen. Die  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte erwiesen sich anhand linearer Regression der Daten nach Gleichung 4.3 als mit  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$  korrelierend, der Korrelationskoeffizient  $r$  erschien verhältnismäßig gering, war aber aufgrund des Stichprobenumfangs nicht zu niedrig.

$$y = 17,54 - 2,11 \cdot x ; r = 0,52 \quad 4.3$$

Für einen  $\chi^2$ -Test wurden zwei alternative Nullhypothesen aufgestellt, die im Folgenden als  $H_{0A}$  und  $H_{0B}$  bezeichnet werden. Nach  $H_{0A}$  sollte  $m_{N \rightarrow U}$  unabhängig von  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$  sein. Abweichungen vom Mittelwert dürften dementsprechend nicht signifikant sein. Nach  $H_{0B}$  sollte  $m_{N \rightarrow U}$  hingegen linear abhängig von  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$  sein. Demzufolge dürften die Abweichungen von dem durch Gleichung 4.3 ermittelten Erwartungswert nicht signifikant sein. Der  $\chi^2$ -Test führte zu folgenden Resultaten:  $\chi^2 (H_{0A}) = 280,65$  und  $\chi^2 (H_{0B}) = 205,63$ . Da die üblichen Statistiktabelle für die aus dem Probenumfang von 138 Proteinen resultierenden 137 Freiheitsgrade keine kritischen  $\chi^2$ -Werte enthalten, kann, abgesehen von den deutlichen Unterschieden, nicht sicher auf die statistische Signifikanz geschlossen werden. Die Unterteilung der Abszissenachse in die in Tabelle 4.2 angegebenen Intervalle  $I_1$  bis  $I_8$  reduzierte die Anzahl der Freiheitsgrade in jedem Intervall auf Werte zwischen 7 und 30. Die Mittelwerte sämtlicher Punktepaarungen innerhalb dieser Intervalle werden in Abbildung 4.12 A gezeigt.  $H_{0A}$  und  $H_{0B}$  wurden unverändert für jedes Intervall übernommen. In Tabelle 4.2 ist den Konzentrationsintervallen die Anzahl der Freiheitsgrade zugeordnet. Die zur jeweiligen Anzahl der Freiheitsgrade ( $|FG|$ ) gehörigen kritischen  $\chi^2$ -Werte für verschiedene Signifikanzniveaus  $p$  werden in Abbildung 4.12 B mit den  $\chi^2$ -Werten für  $H_{0A}$  und  $H_{0B}$  verglichen.

**Tabelle 4.2: Zuordnung der Anzahl der Freiheitsgrade (FG) zu den Intervallen I nach  $|FG| = |(x; y)| - 1$**

I	[1;0 1,5]	[1,5; 2,0]	[2,0; 2,5]	[2,5; 3,0]	[3,0; 3,5]	[3,5; 4,0]	[4,0; 5,0]	[5,0; 6,5]
$ FG $	19	21	29	15	11	15	12	8

Dabei fällt auf, dass  $\chi^2 (H_{0A})$  mit zwei Ausnahmen generell höher ist als  $\chi^2 (H_{0B})$ . Beide Ausnahmen sind jedoch in genau den Intervallen zu finden, in denen die gefundenen Werte am nächsten beim Mittelwert liegen, so dass hier von vornherein kein signifikanter Unterschied angenommen werden kann. Ein weiterer Unterschied ist, dass  $\chi^2 (H_{0B})$  in fünf von acht Fällen unterhalb der kritischen  $\chi^2$ -Werte des zwingendsten Signifikanzniveaus liegt,  $\chi^2 (H_{0A})$  nur in den beiden erwähnten Ausnahmefällen. Da  $\chi^2 (H_{0A})$  im Gegenzug in sechs von acht Intervallen, also bis auf die beiden erwähnten Ausnahmen, den kritischen  $\chi^2$ -Wert für  $p = 0,05$  überschreitet, erscheint es legitim,  $H_{0A}$  zu verwerfen. Die Wahrscheinlichkeit, dass dies irrtümlich geschieht, liegt laut Definition bei 5 %<sup>167</sup>. Möglicherweise wird die Abhängigkeit der  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte von  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$  durch eine lineare Gleichung nicht adäquat beschrieben, da  $\chi^2 (H_{0B})$  in immerhin drei Fällen die kritischen  $\chi^2$ -Werte für  $p = 0,05$  überschreitet, wobei die starke Streuung der Proben eine Gleichung mit mehr Parametern jedoch als nicht sinnvoll erscheinen lässt. Die grundsätzliche Annahme der Hypothese, dass die  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte in Abhängigkeit von  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$  abnehmen, ist jedoch angesichts der gegenüber  $\chi^2 (H_{0A})$  größtenteils stark verringerten Werte von  $\chi^2 (H_{0B})$  und der Tatsache, dass diese mehrheitlich unter den kritischen  $\chi^2$ -Werten auch des kleinsten Signifikanzniveaus liegen

legitim. Bei dieser Evaluierung wurde der pH-Wert bzw. sein Einfluss auf die Stabilität nicht explizit berücksichtigt. Der Einfluss des pH-Wertes auf die thermodynamische Stabilität von PLA<sub>2</sub> wird in Abschnitt 4.2.2 diskutiert. Akzeptiert man den allgemeinen Trend von Proteinen zu abnehmender Kooperativität der Faltung/Entfaltung mit steigenden [D]<sub>0,5</sub>-Werten, gibt es zwei mögliche, grundsätzlich verschiedene Erklärungen.

Zunächst könnte eine Tendenz zur Akkumulation stabiler Intermediate angenommen werden, die sich spektroskopisch von N oder U nicht deutlich genug unterscheiden, um in den Übergangskurven als eigene Spezies aufzutreten. Im Falle einer Variante der Ribonuklease HI aus *Escherichia coli* konnte ein solches Intermediat anhand der Diskrepanz von  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$ -Werten aus kinetischer Analyse und Gleichgewichtsübergangskurven nachgewiesen werden<sup>169</sup>. Mittels theoretischer Berechnungen wurde gezeigt, dass nicht detektierte Intermediate den spektroskopisch beobachteten einphasigen Übergang verbreitern und so drastisch verringerte  $m_{N \rightarrow U}$ - und  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$ -Werte vortäuschen<sup>16</sup>. Abhängig von Populationsgröße und  $m$ -Wert des N-I-, bzw. des I-U-Überganges kann ein nicht detektiertes stabiles Intermediat zu einer Unterbewertung von 50 % des  $m$ -Wertes und von 35 % der thermodynamischen Stabilität führen<sup>170</sup>. Die Übereinstimmung möglichst vieler mit verschiedenen Techniken gemessener Übergangskurven gilt als Beleg für die Validität der Zweizustandsannahme<sup>16; 27</sup>. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Übereinstimmung lediglich zweier Übergangskurven die Möglichkeit noch nicht ausschließt, dass ein Intermediat der Detektion entgeht. Dies wird mit steigender Anzahl der eingesetzten Techniken allerdings deutlich unwahrscheinlicher<sup>16</sup>. Im vorliegenden Fall bedeutet dies, dass die visuell beobachtete Übereinstimmung der jeweils mittels Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Spektroskopie bestimmten Übergangskurven in Abbildung 4.10 B einen Hinweis, aufgrund der nicht erreichten, für GuHCl-entfaltete PLA<sub>2</sub> repräsentativen Basislinien allerdings keinen endgültigen Beweis für die Validität des Zweizustandsmodells für dieses Proteins liefert. Die Existenz stabiler, nicht detektierter Intermediate kann allerdings unter Hinzuziehung weiterer, in Abschnitt 4.2 diskutierter Ergebnisse als Erklärung für die geringen  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte von PLA<sub>2</sub> ausgeschlossen werden.

Der  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert, der im mathematischen Sinn die Abhängigkeit von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  von [D] ist und experimentell die Abruptheit des Übergangs zwischen den Zuständen N und U beschreibt, steht phänomenologisch betrachtet für das Verhältnis der solvenszugänglichen Oberflächen dieser Zustände<sup>15</sup>. Eine unveränderte native Struktur vorausgesetzt, kann ein veränderter  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert eines Proteins, beispielsweise nach einem Aminosäureaustausch, auf der veränderten Ausdehnung von U beruhen<sup>171</sup>. Stabile Reststrukturen, das heißt eine im Verhältnis zur theoretisch möglichen, infolge unvollständiger Entfaltung aber vergleichsweise kleine solvenszugängliche Oberfläche von U wirkt sich demzufolge in Form eines niedrigen  $m_{N \rightarrow U}$ -Wertes aus. Im Fall der Nuklease aus *Staphylococcus spec.* und ihrer Varianten korrelieren die Änderungen von thermodynamischer Stabilität und  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert<sup>171</sup>. Gerade für Proteine mit hoher

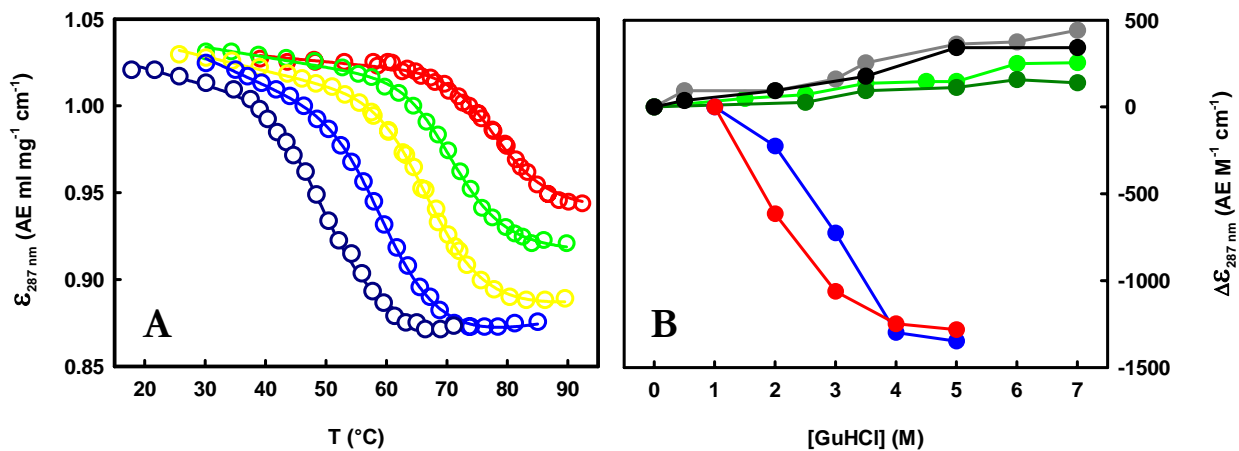


Abbildung 4.13 Thermische Übergangskurven von PLA<sub>2</sub> bei pH 6,0 und verschiedenen GuHCl-Konzentrationen sowie UV-Absorption der PLA<sub>2</sub> und ihrer Chromophoren in Abhängigkeit von der GuHCl-Konzentration. A: Thermische Übergangskurven von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 6,0 in Anwesenheit von 1 M (○), 2 M (○), 3 M (○), 4 M (○) und 5 M (○) GuHCl. Die Kurven wurden wie unter 3.2.8 beschrieben bestimmt, nach Gleichung 2.18 ausgewertet und zur Anschauung gegen eine Temperaturskala in (°C) aufgetragen. B: Änderung der Molaren Extinktionskoeffizienten von N-Acetyltyrosinamid bei 25 °C (●) und 75 °C (●), N-Acetyltryptophanamid bei 25 °C (●) und 75 °C (●) sowie der entfalteten Zustände von apoPLA<sub>2</sub> (●) und holoPLA<sub>2</sub> (●) mit steigenden GuHCl-Konzentrationen. Die Extinktion der Chromophore wurde in mit der der PLA<sub>2</sub> vergleichbaren Konzentration wie unter 3.2.8 für PLA<sub>2</sub> beschrieben bestimmt, die der entfalteten Proteine den Übergangskurven entnommen. Zum Vergleich wurden die Messwerte in die molaren Extinktionskoeffizienten umgerechnet und auf den jeweiligen Anfangswert normiert.

Denaturanzresistenz sind ebenso resistente Reststrukturen gut vorstellbar. Die aufgrund ihrer sieben Disulfidbrücken anzunehmende starke Limitierung der Entfaltung von PLA<sub>2</sub> ist somit potentiell eine Begründung für den geringen  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert von apoPLA<sub>2</sub>, auch wenn im Gegensatz zur oben diskutierten Korrelation von  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert und  $[\text{GuHCl}]_{0,5}$  keine derartige Abhängigkeit von der Anzahl der Disulfidbrücken gefunden werden konnte (nicht gezeigt).

#### 4.2.2 Thermische Übergangskurven in Gegenwart von GuHCl

Da die Temperatur einerseits direkten Einfluss auf die Quantenausbeute von Tryptophan hat, was eine eindeutige Unterscheidung spektroskopischer Artefakte von strukturelevanten Signalen erschwert, und andererseits durch GuHCl kein vollständig entfalteter Zustand erreicht werden kann, wurden für den Nachweis von Reststrukturen bei der Entfaltung von PLA<sub>2</sub> thermische Übergangskurven in Gegenwart von GuHCl mittels UV-Absorption anstelle von Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Die aus den Kurven bestimmten thermodynamischen Parameter sind in den Tabellen 6.5 und 6.8 aufgeführt.

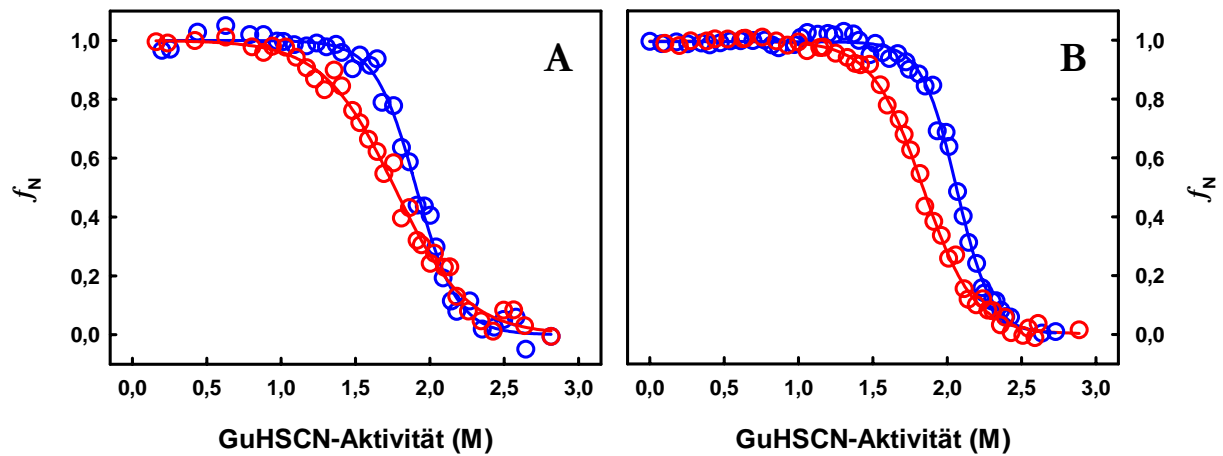
Die in Abbildung 4.13 A gezeigten thermischen Übergangskurven von apoPLA<sub>2</sub> wie auch die von holoPLA<sub>2</sub> (nicht gezeigt) in Gegenwart verschiedener GuHCl-Konzentrationen verdeutlichen den Einfluss von GuHCl auf das für U repräsentative Signal, ohne dass solch ein Einfluss auf die N repräsentierende Basislinie erkennbar wäre. Da dies, wie in Abbildung 4.13 B erkennbar, nicht auf spektroskopische Einflüsse der Temperatur oder von GuHCl auf die Chromophore zurückzuführen ist, weist die mit

steigender Denaturanzkonzentration weiter abnehmende UV-Absorption von U eindeutig auf das Vorhandensein von Reststrukturen hin. Der energetische Zusammenhang zwischen Reststrukturen und  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert bzw. thermodynamischer Stabilität wurde in der bereits mehrfach erwähnten theoretischen Studie mathematisch demonstriert <sup>16</sup>. Hierbei ist allerdings zwischen strukturell distinkten makroskopischen entfalteten Zuständen ( $U_1 - U_n$ ) und Subpopulationen von U, also mikroskopischen Unterzuständen zu unterscheiden. Erstere haben jeweils vergleichbare SASA und sind durch Enthalpiebarrieren voneinander getrennt, was mit steigender Denaturanzkonzentration zu sigmoiden Übergängen zwischen den Populationen führt <sup>16</sup>. Letztere sind durch keine Enthalpiebarrieren getrennt und weisen mit steigender Denaturanzkonzentration eine bis zur maximalen Ausdehnung stetig zunehmende SASA auf, ohne dass ein kooperativer Übergang stattfindet. Vielmehr findet eine Verschiebung von der Unterpopulation mit der geringsten zu der mit der größten SASA statt, die im Allgemeinen in der linearen Abhängigkeit des für U repräsentativen Signals von [D] in spektroskopisch bestimmten Übergangskurven verschwindet <sup>16</sup>, es sei denn, sie wird durch die Einführung einer zweiten Perturbationsachse, das heißt eines zweiten denaturierenden Einflusses hervorgehoben <sup>16; 26</sup>.

Die allgemein verwendete Methode der linearen Extrapolation zur Bestimmung von  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$  (Abschnitt 2.2.1) berücksichtigt aufgrund der Extrapolation von  $K_{N \rightarrow U}$  aus dem Übergangsbereich auf die Abwesenheit von Denaturanz auch theoretisch nur den Übergang von der nativen Population zur ersten entfalteten Subpopulation, das heißt der mit der geringsten SASA. Da diese von den anderen Subpopulationen nicht durch Energiebarrieren getrennt ist, ist eine weitere Verschiebung innerhalb der einzelnen Subpopulationen thermodynamisch nicht relevant. Sofern es einen Einfluss der Existenz verschiedener entfalteter Subpopulationen auf die thermodynamischen Stabilitätsparameter gibt, besteht er eher in einer Überschätzung <sup>16</sup>. Die, wie in Abbildung 4.13 B ersichtlich, mit steigender Denaturanzkonzentration graduell verschwindenden Reststrukturen von PLA<sub>2</sub> (vergl. Abb. 4 in <sup>26</sup>) sind letzterer Kategorie zuzuordnen und somit für die thermodynamischen Parameter von PLA<sub>2</sub> irrelevant.

### 4.2.3 GuHSCN-induzierte Übergangskurven

Da im Falle von PLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 weder stabile Intermediate noch distinkte Formen von U als Erklärung für den geringen  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert in Frage kommen, muss diese zwangsläufig in der nativen Population zu finden sein. Um verlässliche Aussagen über die thermodynamische Stabilität von PLA<sub>2</sub> zu erlangen, wurde für die weiteren chemisch induzierten Übergangskurven GuHSCN aufgrund seiner stärker denaturierenden Wirkung verwendet. Aufgrund seiner spektroskopischen Eigenschaften sind Fern-UV-CD-Messungen in Gegenwart hoher GuHSCN-Konzentrationen allerdings nicht möglich. Daher beschränken sich die vorgestellten Ergebnisse auf die Tertiärstruktur von PLA<sub>2</sub>. Weiterhin ist zu beachten,



**Abbildung 4.14** Exemplarische Übergangskurven von PLA<sub>2</sub> bei verschiedenen pH-Werten. A: Übergangskurven von apoPLA<sub>2</sub> (○) bzw. holoPLA<sub>2</sub> (○) bei pH 8,0. B: Übergangskurven von apoPLA<sub>2</sub> (○) bzw. holoPLA<sub>2</sub> (○) bei pH 4,0. Alle Kurven wurden wie in 3.2.6.4 beschrieben mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt, nach den Gleichungen 2.12 und 2.11 ausgewertet und mittels Gleichung 2.13 in  $f_N$ -Kurven umgewandelt.

dass sich konzentrierte wässrige GuHSCN-Lösungen mit steigender Konzentration zunehmend vom Zustand einer idealen Lösung entfernen. Dies bedeutet, dass mit steigender Konzentration zwischen-ionische Interaktionen überproportional zunehmen, wodurch die auch Aktivität genannte wirksame Konzentration niedriger als die wahre Konzentration ist. Für die Bestimmung der GuHSCN-Aktivität wurde eine empirisch entwickelte Methode verwendet, die auf der denaturationsabhängigen Solvation von Aminosäureresten beruht<sup>172; 173</sup>. Die Verwendung dieser artifiziellen Abszisse für Übergangskurven ist durch die Übereinstimmung der Werte von  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$  aus GuHCl- und GuHSCN-Übergangskurven, wenn letztere gegen die GuHSCN-Aktivität aufgetragen wurden, gerechtfertigt<sup>9; 174</sup>. Die gezeigten Daten basieren daher auf der Auftragung gegen die GuHSCN-Aktivität, die nach der erwähnten Methode<sup>173; 174</sup> aus der GuHSCN-Konzentration berechnet wurde. Dementsprechend sind auch die angegebenen  $[D]_{0,5}$ -Werte GuHSCN-Aktivitäten. In Abbildung 4.14 sind exemplarische GuHSCN-induzierte Übergangskurven dargestellt, die erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 6.12 aufgeführt.

Die Kurven bei pH 8,0 (Abb. 4.14 A) stimmen qualitativ mit den GuHCl-induzierten Übergangskurven (Abb. 4.11 B) hinsichtlich der hohen  $[D]_{0,5}$ - und der vergleichsweise niedrigen  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte, besonders von apoPLA<sub>2</sub>, überein. Zum Vergleich sind in Tabelle 6.12 die thermodynamischen Stabilitätsparameter der GuHSCN-induzierten Entfaltung von bvPLA<sub>2</sub>, ebenfalls bei pH 8,0 und in Abwesenheit des Cofaktors Ca<sup>2+</sup> aufgeführt. Ein Vergleich der Parameter beider Enzyme reflektiert die diskutierte grundsätzliche Tendenz von Proteinen mit hohen  $[GuHCl]_{0,5}$ -Werten zu niedrigen  $m_{N \rightarrow U}$ -Werten. Die erhaltenen thermodynamischen Parameter belegen auch den bereits bei der GuHCl-induzierten Entfaltung erkennbaren Einfluss von Ca<sup>2+</sup> auf  $[D]_{0,5}$  und bestätigen die in Abschnitt 4.2.1 getätigte Annahme hinsichtlich des durch Calciumbindung erhöhten  $m_{N \rightarrow U}$ -Wertes. Das aktive Zentrum von PLA<sub>2</sub> hat bei pH 8,0 eine



Calciumdissoziationskonstante von 0,25 mM, bei pH 4,0 liegt ihr Wert aufgrund der Protonierung der Carboxylfunktionen der für die Calciumkoordinierung verantwortlichen Peptidbindungen und vor allem von D49 deutlich über 12 mM <sup>73</sup>. Die Tatsache, dass bei pH 4,0 für einen vergleichbaren Effekt extrem hohe CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen benötigt werden (Tab. 6.12), ist ein Beleg für die Annahme, dass diese Stabilisierung durch spezifisch gebundenes Ca<sup>2+</sup> erfolgt. Bemerkenswert ist weiterhin, dass, obwohl die jeweiligen [D]<sub>0,5</sub>-Werte von apo- und holoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 nur marginal höher sind als bei pH 8,0, durch die deutlich erhöhten  $m_{N \rightarrow U}$ -Werte bei pH 4,0 erheblich höhere  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$ -Werte erreicht werden (Tab. 6.12).

Prinzipiell ist ein Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von Reststrukturen bei entfalteter PLA<sub>2</sub> durch die Einführung zusätzlicher, sich abstoßender positiver Ladungen plausibel. Eine spezifische Destabilisierung von U würde den Wert von  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$  erhöhen. Da jedoch GuHSCN bereits eines der stärksten Denaturanzien ist und sich die Reststrukturen thermisch entfalteter PLA<sub>2</sub> als thermodynamisch irrelevant erwiesen, ist unter Berücksichtigung des oben vorgestellten pH-abhängigen Gleichgewichtes zwischen zwei verschiedenen nativen Spezies N<sup>R</sup> und N<sup>E</sup> (Abschnitt 4.1.4) die Annahme einer gezielten Stabilisierung von N durch niedrige pH-Werte plausibler.

#### 4.2.4 Stabilitätsbestimmung mittels HD-Austausch

Messungen des HD-Austausches der Amidprotonen von Peptidbindungen bieten die Möglichkeit, die Entfaltungsreaktionen von Proteinen auch unter nativen Bedingungen zu studieren. Wie in Abschnitt 2.2.5 dargelegt, ist unter der Voraussetzung, dass die intrinsische HD-Austauschkonstante für die gemessene HD-Austauschkonstante limitierend ist (EX2-Mechanismus), die Bestimmung von  $K_{op}$  möglich. Ist das beobachtete Amidproton im nativen Zustand vor dem Austausch geschützt und sind die den Austausch ermöglichenden lokalen sowie die globalen Entfaltungsreaktionen identisch, gilt  $K_{op} = K_{N \rightarrow U}$

Die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen von C27, Y28, V38 und S74 in Protonen-NMR-Spektren von apo- und holoPLA<sub>2</sub> konnten identifiziert und zugeordnet werden. Die aus der zeitabhängigen Abnahme der Intensitäten der Protonensignale von C27, Y28, V38 und S74 gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten des Austausches  $k_{ex}$  sind in Abbildung 4.15 A in halblogarithmischer Darstellung gegen den korrigierten pD-Wert aufgetragen. In dem gezeigten pD-Bereich beträgt die Steigung von  $k_{ex}$  durchschnittlich 0,6 min<sup>-1</sup> pH-Einheit<sup>-1</sup>. Dieser Anstieg rechtfertigt die Annahme des EX2-Mechanismus und somit eine Evaluierung der Daten nach Gleichung 2.33. Da sich die ursprünglich verwendeten Puffer an den aus der Literatur bekannten Daten orientierten <sup>158; 159</sup>, wurden zunächst auch bei niedrigen pD-Werten 50 mM CaCl<sub>2</sub> eingesetzt. Unter diesen Bedingungen ist die gemessene Geschwindigkeitskonstante deutlich höher als bei pD 5,6 und ebenfalls 50 mM CaCl<sub>2</sub> (nicht gezeigt). Als Erklärung kam u.a. ein H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-katalysierter HD-Austausch in Frage, was aber angesichts dieser pD-Werte

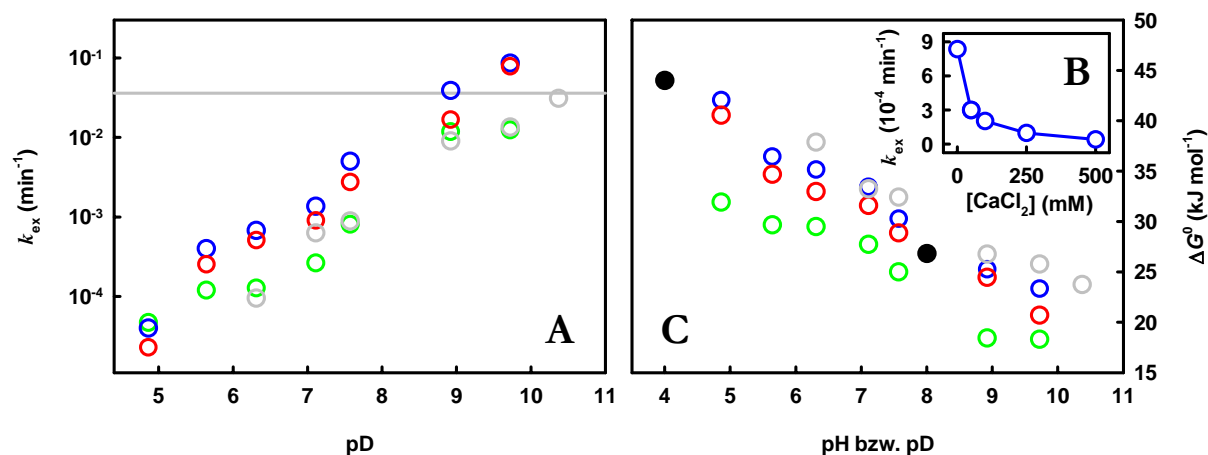


Abbildung 4.15 Einfluss des pD-Wertes und der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration auf die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten des HD-Austausches und die zugehörigen freien Enthalpien. A: Halblogarithmische Auftragung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten des HD-Austausches der Amidprotonen von C27 ( $\circ$ ), Y28 ( $\circ$ ), V38 ( $\circ$ ) und S74 ( $\circ$ ) gegen den korrigierten pD-Wert. Die Werte wurden wie unter 3.2.10.2 beschrieben bestimmt. Die graue Linie repräsentiert die mittels limitierter Proteolyse bestimmte Geschwindigkeitskonstante der globalen Entfaltung (Abschnitt 4.3.4). B: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des HD-Austausches des Amidprotons von C27 bei pD 4,9 von der eingesetzten Calciumkonzentration. Die Werte wurden wie unter 3.2.10.1 beschrieben bestimmt. C: Vergleich von  $\Delta G_{\text{N}\rightarrow\text{U}}$  und  $\Delta G_{\text{ex}}$ . Die in Abbildung 4.15 A gezeigten Austauschkonstanten wurden nach Gleichung 2.33 evaluiert. Die verwendeten Symbole entsprechen denen in Abbildung 4.15 A. Zum Vergleich werden die aus den Fluoreszenzübergangskurven (Abb. 4.14) berechneten Werte von  $\Delta G_{\text{N}\rightarrow\text{U}}^{\text{H}_2\text{O}}$  ( $\bullet$ ) gezeigt.

jedoch unwahrscheinlich erschien (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Balbach). Die alternativ erwogene Möglichkeit, dass die Verringerung von  $\Delta G_{\text{HX}}$  analog zur geringeren thermodynamischen Stabilität von apoPLA<sub>2</sub> aus der unvollständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sättigung des Proteins durch 50 mM  $\text{CaCl}_2$  bei diesem pD-Wert resultieren könnte, wurde durch Messungen mit erhöhter Calciumkonzentration bei gleich bleibendem pD-Wert bestätigt, was zur deutlichen Verringerung der Geschwindigkeitskonstante führte (Abb. 4.15 B). Die Evaluierung der HD-Austauschkonstanten nach Gleichung 2.33 lieferte die Werte der zugehörigen freien Enthalpien der den Austausch ermöglichenden Öffnungsreaktion (Abb. 4.15 C). Hier ist eine scheinbar lineare Abhängigkeit vom pD-Wert mit negativem Anstieg erkennbar. Dabei stimmen die Werte von C27, Y28 und S74 jeweils überein, während die das Amidproton von V38 schützende Struktur bei allen pD-Werten konstant um etwa den gleichen Betrag instabiler erscheint. Der Vergleich mit den aus den Fluoreszenzübergangskurven gewonnenen Werten der thermodynamischen Stabilität von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 und pH 8,0 zeigt, dass  $\Delta G_{\text{HX}}$  und  $\Delta G_{\text{N}\rightarrow\text{U}}^{\text{H}_2\text{O}}$  für alle verfolgten Amidprotonen zumindest dem gleichen Trend folgen. Im Falle von C27, Y28 und S74 ist darüber hinaus eine klare Übereinstimmung erkennbar. Somit ist davon auszugehen, dass globale Entfaltung und die lokalen Öffnungsreaktionen, die den Austausch der Amidprotonen der besagten Aminosäuren ermöglichen, miteinander einhergehen oder identisch sind. Dies ist angesichts der Position dieser Aminosäuren in der Tertiärstruktur von PLA<sub>2</sub> (Abb. 4.15 C) nicht überraschend. Während C27 und Y28 zum Calciumbindungs-loop gehören, ist V38 in einer eher ungeordneten Struktur am N-cap einer der beiden zentralen  $\alpha$ -Helices lokalisiert. Eine

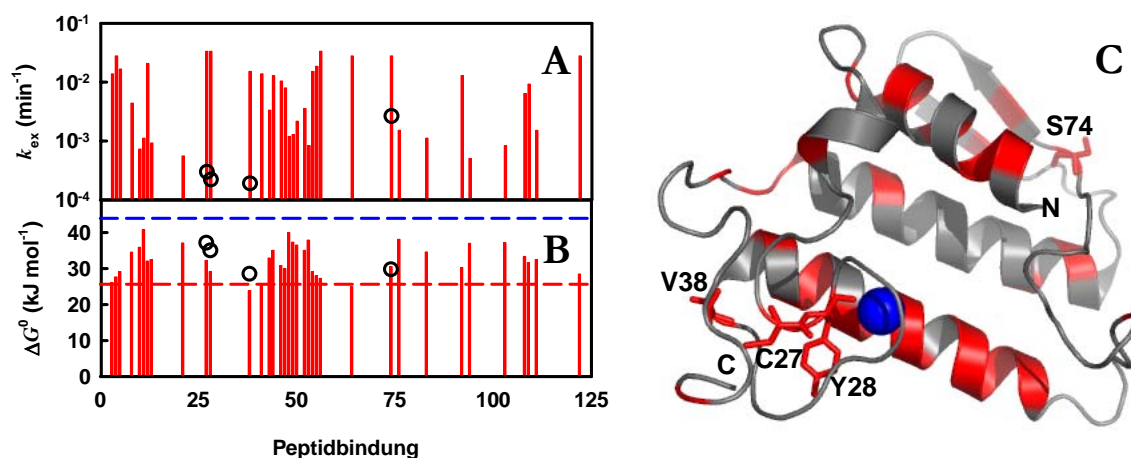


Abbildung 4.16 HD-Austausch von PLA<sub>2</sub> in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub> bei 293 K bzw. 313 K und strukturelle Einordnung der verfolgten Amidprotonen in die Tertiärstruktur. A: Vergleich der HD-Austauschkonstanten bei 293 K und pD 4,9 mit denen bei 313 K und pD 4,3. Die Geschwindigkeitskonstanten des HD-Austauschs bei 293 K (○) wurden wie unter 3.2.10.2 beschrieben bestimmt. Die Austauschkonstanten bei 413 K (■) wurden aus veröffentlichten Halbwertszeiten<sup>159</sup> berechnet. B: Vergleich der aus den Austauschkonstanten resultierenden Werte von  $\Delta G_{ex}^0$ . Die in Abbildung 4.15 A gezeigten Austauschkonstanten wurden nach Gleichung 2.33 evaluiert. Die verwendeten Symbole entsprechen denen in Abbildung 4.16 A. Zum Vergleich sind die Werte der thermodynamische Stabilität von holoPLA<sub>2</sub> (---) bzw. apoPLA<sub>2</sub> (---) bei pH 4,0 eingefügt. Diese entstammen den weiter oben gezeigten Fluoreszenzübergangskurven (Abb. 4.13 B). C: Schematische Darstellung der Struktur von PLA<sub>2</sub>. Das Polypeptidrückgrat ist grau dargestellt, im Bereich der in<sup>159</sup> verfolgten Peptidbindungen dagegen rot gefärbt. Die Aminosäurereste und Peptidbindungen von C27, Y28, V38 und S74 wurden ebenfalls rot, das Calciumion blau gefärbt. Hierfür wurden die Koordinaten der pdb-Datei 4P2P<sup>72</sup> aus der Brookhaven-Datenbank entnommen und mit der Visualisierungssoftware Pymol bearbeitet.

gegenüber der globalen Entfaltung verringerte Stabilität dieser Umgebung erscheint plausibel. Dagegen geht aus den GuHSCN-induzierten Übergangskurven hervor (Abb. 4.14), dass Ca<sup>2+</sup> bis zur globalen Entfaltung gebunden bleibt. Somit ist der Calciumbindungs-*loop* trotz seiner inhärenten Flexibilität bis zu der mit der globalen Entfaltung einhergehenden Dissoziation des Calciums in einer vergleichsweise fixierten Position arrangiert, was die Übereinstimmung von  $K_{op}$  mit  $K_{N \rightarrow U}$  hinreichend erklärt. S74 befindet sich räumlich gesehen an der entgegengesetzten Seite des Proteinmoleküls (Abb. 4.16 C). In Abhängigkeit von der verwendeten Visualisierungssoftware (z.B. SwissProt-pdb-Viewer oder Pymol) gilt es als Bestandteil oder als Nichtbestandteil des in dieser Region befindlichen  $\beta$ -Faltblattes. Im ersteren Fall erscheint aufgrund der typischen Wasserstoffverbrückung eines  $\beta$ -Faltblattes ein mit der globalen Entfaltung zusammengehendes Öffnen der Umgebung von S74 ebenfalls plausibel.

Bereits früher wurden im Rahmen von NMR-spektroskopischen Untersuchungen zur Bestimmung der Lösungsstruktur von PLA<sub>2</sub> die Austauschreaktionen verschiedener Amidprotonen bei 40°C verfolgt<sup>159</sup>. Die dabei verwendeten Bedingungen waren hinsichtlich der Auflösung der Signale in den NMR-Spektren optimiert worden. Aus dieser Optimierung resultierte ein pD-Wert von 4,3 bei 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Die jener Arbeit entnommenen Halbwertszeiten wurden zu Vergleichszwecken in die zugehörigen Austauschkonstanten umgerechnet (Abb. 4.16 A) und unter der Annahme, dass der HD-Austausch bei 40°C ebenso wie bei 20°C nach dem EX2-Mechanismus stattfindet, nach Gleichung 2.33 in die jeweilige

thermodynamische Stabilität überführt (Abb. 4.16 B). In Abbildung 4.16 A und B sind diese Werte im Vergleich mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstandenen Daten dargestellt. Letztere wurden unter ähnlichen Bedingungen (pD 4,9, 50 mM CaCl<sub>2</sub>), allerdings bei deutlich geringerer Temperatur (20°C) bestimmt, was sich in deutlich niedrigeren Austauschkonstanten niederschlägt. Aus Abbildung 4.16 B geht dagegen hervor, dass sich die erhöhte Temperatur offenbar nicht oder nur sehr geringfügig auf die Stabilität der die betrachteten Bindungen schützenden Struktur auswirkt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass beide Temperaturen etwa gleich weit von der Temperatur der maximalen Stabilität ( $\approx 31^\circ\text{C}$ , siehe Kapitel 4.2.4) entfernt sind. Aus der guten Übereinstimmung beider Datensätze und der Tatsache, dass sich kaum einer der Werte außerhalb der durch die beiden Linien gekennzeichneten, aus den Fluoreszenzübergangskurven bestimmten  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werte befindet, wird offensichtlich, dass sich die Stabilität des Proteins auch auf dem Niveau einzelner Peptidbindungen trotz teilweise deutlicher, auf die jeweilige Sekundärstruktur (Abb. 4.15 C) zurückgehender Unterschiede zwischen den durch die globalen Entfaltungsmessungen erhaltenen Grenzen bewegt. Auf den Einfluss der Temperatur auf die globale Stabilität wird im nachstehenden Abschnitt noch näher eingegangen werden.

#### 4.2.4 Einfluss des pH-Wertes auf die thermische Stabilität

Analog zu den in Abbildung 4.13 A dargestellten UV-spektroskopisch bestimmten thermischen Übergangskurven wurden weitere Kurven sowohl von apo-, als auch holoPLA<sub>2</sub> mittels Nah-UV-CD-Spektroskopie bei verschiedenen pH-Werten und in Anwesenheit von 1-5 M GuHCl gemessen. Einige Beispiele werden in Abbildung 4.17 A gezeigt, die aus den Kurven resultierenden thermodynamischen Stabilitätsparameter in den Tabellen 6.4, 6.6 und 6.7 sowie 6.9 bis 6.11 aufgeführt. Im Gegensatz zu den UV-spektroskopisch bestimmten Kurven waren eventuell vorhandene Reststrukturen mit dieser Technik allerdings nur anhand des Anstiegs der für U repräsentativen Basislinie zu identifizieren (nicht gezeigt).

In den Fällen, in denen mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie der Verlust der Sekundärstruktur mit steigender Temperatur verfolgt wurde, konnten keine nennenswerten Abweichungen von dem mittels Nah-UV-CD-Spektroskopie bestimmten Verhalten gefunden werden (nicht gezeigt). Dies legte die Annahme eines Zweizustandsmodells für die thermische Entfaltung zumindest im Gleichgewicht nahe. Hierfür spricht auch die Übereinstimmung des auf 0 M Denaturans extrapolierten Schmelzpunktes mit dem mittels *differential scanning calorimetry* bestimmten (nicht gezeigt). Letzteres kann jedoch nur als Indiz, aufgrund des wegen der hohen Schmelztemperatur unvollständigen Thermogramms und der Aggregationsanfälligkeit von PLA<sub>2</sub> unter den für die *differential scanning calorimetry* verwendeten Bedingungen nicht als endgültiger Beweis angesehen werden.

Da andererseits keinerlei Hinweise auf eine Abweichung vom Zweizustandsverhalten vorlagen, wurden die aus den mittels optischer Techniken bestimmten Übergangskurven gewonnenen Werte von  $\Delta H_{\text{vH}}$  mit

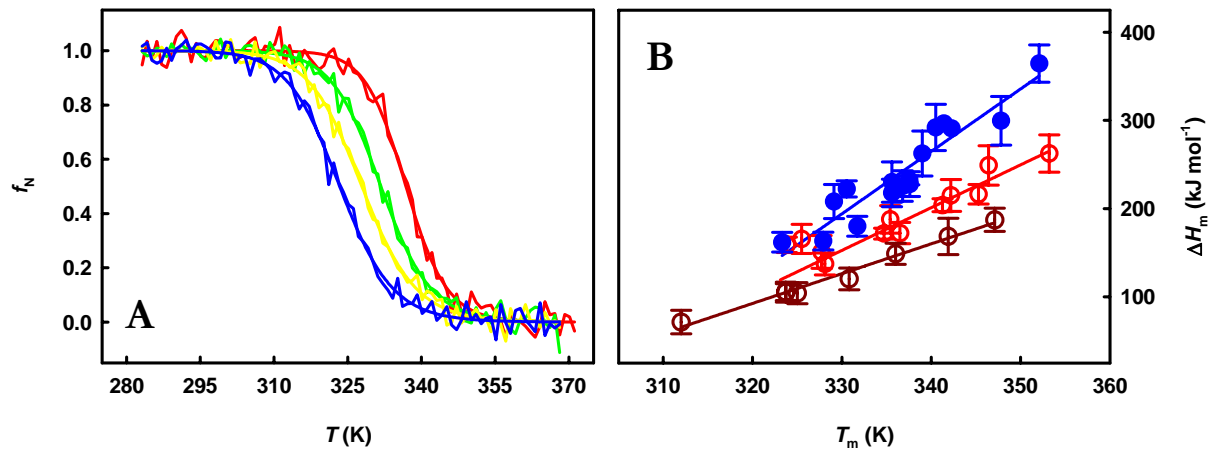


Abbildung 4.17 Einfluss von pH-Wert und GuHCl-Konzentration auf die thermische Stabilität von PLA<sub>2</sub>. A: Thermische Übergangskurven von holoPLA<sub>2</sub> in Gegenwart von 5 M GuHCl. Die Kurven bei pH 7,0 (—), pH 8,0 (—), pH 9,0 (—) und pH 10,0 (—) wurden wie unter 3.2.5.4 beschrieben bestimmt und nach Gleichung 2.17 ausgewertet. B: Auftragung von  $\Delta H_m$  gegen  $T_m$  zur Bestimmung von  $\Delta C_p$ . Die aus Übergangskurven, wie den in Abbildung 4.16 A dargestellten gewonnenen thermodynamischen Stabilitätsparameter von holoPLA<sub>2</sub> in Gegenwart von 1-5 M GuHCl, pH 7,0-10,0 (●), von apoPLA<sub>2</sub> in Gegenwart von 1-5 M GuHCl, pH 4,0-7,0 (○), bzw. pH 8,0-9,0 (○) wurden nach Gleichung 2.16 ausgewertet. Hierfür wurde  $\Delta H_{vH}$  unter Annahme eines Zweizustandsmodells mit  $\Delta H_m$  gleichgesetzt.

$\Delta H_m$  gleichgesetzt und gegen die Schmelztemperatur aufgetragen (Abb. 4.17 B). Im Falle von holoPLA<sub>2</sub> scheinen die Werte im gesamten pH- und GuHCl-Konzentrationsbereich linear von der Temperatur abhängig zu sein, so dass nach Gleichung 2.16 der Wert von  $\Delta C_p$  mit  $(7,1 \pm 0,7)$  kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> bestimmt werden konnte. Im Falle von apoPLA<sub>2</sub> war dieses Vorgehen nicht möglich, ohne die Qualität der linearen Anpassung signifikant zu verschlechtern. Wurden die Werte allerdings jeweils für die pH-Bereiche von pH 4,0 bis pH 7,0 und von pH 8,0 bis pH 10,0 separat aufgetragen, war die lineare Abhängigkeit der resultierenden Auftragungen wieder deutlich erhöht (Abb. 4.16 B). Dadurch konnte für apoPLA<sub>2</sub> im Bereich von pH 4,0 bis 7,0 ein Wert von  $\Delta C_p$  mit  $(4,3 \pm 0,4)$  kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>, im Bereich von pH 8,0 bis 10,0 dagegen mit  $(3,4 \pm 0,2)$  kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> bestimmt werden.

Zunächst bestätigt sich damit die weiter oben getätigte Annahme, dass die gefundenen Reststrukturen von PLA<sub>2</sub> thermodynamisch irrelevant sind (siehe Abschnitt 4.2.1). Dies geht daraus hervor, dass über den gesamten pH-Bereich für apoPLA<sub>2</sub> der das Gleichgewicht zwischen N<sup>E</sup> und N<sup>R</sup> beeinflussende pH-Wert die thermische Stabilität wesentlich stärker beeinflusst als die jeweils vorliegende Konzentration der Reststrukturen auflösenden Denaturanz (vgl. Abb. 4.13 A). Andernfalls würden sich die Resultate bei identischen pH-Wert und steigender GuHCl-Konzentration nicht in das jeweilige Gesamtbild einfügen. Dies bedeutet wiederum, dass die GuHCl-Konzentration und somit das Vorhandensein von Reststrukturen keinen Einfluss auf  $\Delta C_p$  hat, was nach <sup>15</sup> gleichbedeutend mit dem Nichtvorhandensein eines Einflusses auf  $m_{N \rightarrow U}$  oder  $\Delta S_{ASA}$  ist. Dagegen kann der aktuelle pH-Wert sehr wohl eine Änderung des  $\Delta C_p$ -Wertes von apoPLA<sub>2</sub> bewirken (Abb. 4.17 B). Da das Vorhandensein von Reststrukturen hierfür aber nicht entscheidend ist, muss zwangsläufig der Protonierungsgrad des nativen Zustandes  $\Delta S_{ASA}$  und

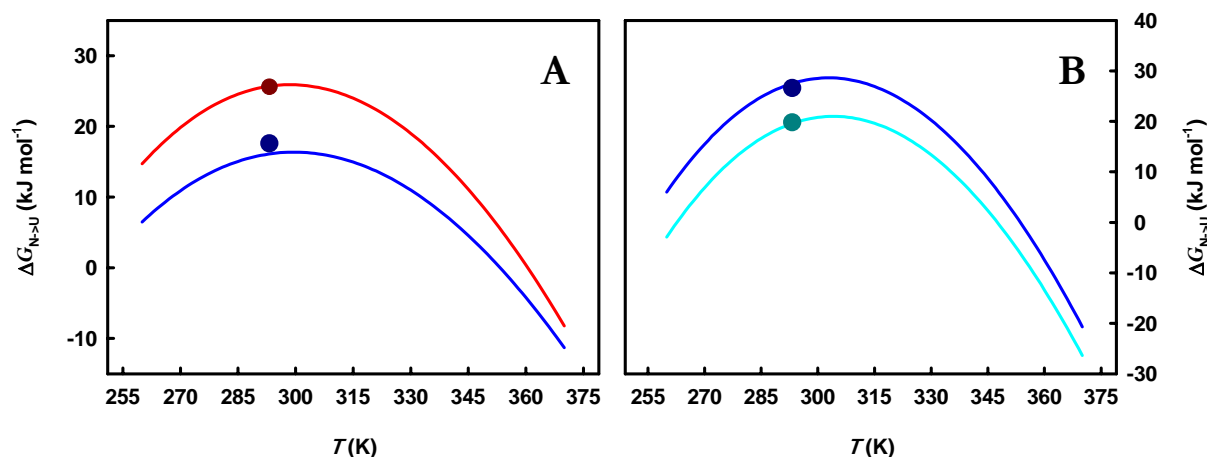


Abbildung 4.18 Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Stabilität von PLA<sub>2</sub>. A: Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Stabilität von apoPLA<sub>2</sub> in Abwesenheit von Denaturans. Die mittels Gleichung 2.14 berechneten temperaturabhängigen Werte von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 (—) und pH 8,0 (—) werden mit den aus Fluoreszenzübergangskurven (Abb. 4.13) bestimmten Werten bei pH 4,0 (●), bzw. pH 8,0 (●) und 20 °C verglichen. B: Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Stabilität von holoPLA<sub>2</sub> in Abwesenheit von Denaturanz. Die mittels Gleichung 2.14 berechneten temperaturabhängigen Werte von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (—) und pH 10,0 (—) werden mit dem aus einer Fluoreszenzübergangskurve (Abb. 4.13 A) bestimmten Wert bei pH 8,0 (●) sowie dem unter Annahme einer linearen Abhängigkeit aus den Werten von  $\Delta G_{HX}$  von C27, Y28 und S74 (Abb. 4.14 B) auf pH 10,0 interpolierten Wert von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 10,0 (●) verglichen. Die für die Berechnung nach Gleichung 2.14 nötigen Werte von  $T_m$  und  $\Delta H_m$  wurden durch lineare Extrapolation der Denaturanz- und pH-abhängigen Stabilitätsparameter aus den thermischen Übergangskurven auf 0 M GuHCl gewonnen.

damit die thermodynamischen Stabilitätsparameter dominieren.

Weiterhin implizieren die pH-abhängigen  $\Delta C_p$ -Werte von apoPLA<sub>2</sub> und der nochmals erhöhten  $\Delta C_p$ -Wert von holoPLA<sub>2</sub>, dass im Falle von ersterer unter nativen Bedingungen bereits bei moderat sauren und neutralen pH-Werten im Vergleich zu holoPLA<sub>2</sub> ein signifikanter Anteil hydrophober Aminosäurereste solvenszugänglich vorliegen muss und dass dieser Anteil bei basischen pH-Werten nochmals erhöht wird. Letzteres ist eine Bestätigung der angestellten Betrachtungen hinsichtlich des unter nativen Bedingungen vorliegenden pH-abhängigen Gleichgewichtes. Die Verringerung von  $\Delta C_p$  korrespondiert gut mit dem dort festgestellten leicht verringerten Anteil helikaler Strukturen an der Gesamtstruktur bei gleichzeitig erhöhter Solvenszugänglichkeit des W3-Restes von N<sup>E</sup> im Vergleich zu N<sup>R</sup>.

Die Extrapolation der in Anwesenheit verschiedener GuHCl-Konzentrationen bestimmten Werte von  $\Delta H_m$  auf 0 M GuHCl ermöglichte unter Verwendung des jeweils adäquaten  $\Delta C_p$ -Wertes die Berechnung der kompletten Temperaturabhängigkeit von  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$  unter den jeweiligen Bedingungen (Abb. 4.18). Die Übereinstimmung dieser Werte mit den aus Fluoreszenzübergangskurven oder mittels HD-Austausch gewonnenen Werten bei 20 °C bestätigt die in diesem Abschnitt getätigten Annahmen bezüglich Zweizustandsmodell, EX2-Mechanismus und des die Entfaltungparameter dominierenden Einflusses der Protonierung von N. Die letztere Schlussfolgerung ist möglich, da zumindest bei pH 10,0 die Entfaltungsmessung mittels HD-Austausch in Abwesenheit von Denaturans, was die

Anwesenheit größtmöglich populierter Reststrukturen nach sich ziehen sollte, und die thermischen Übergangskurven in Anwesenheit verschiedener, Reststrukturen auflösende GuHCl-Konzentrationen übereinstimmende Resultate liefern.

Weiterhin belegen die in Abbildung 4.17 gezeigten Kurven, dass PLA<sub>2</sub> ihre maximale thermodynamische Stabilität bei ≈31 °C aufweist. Die Temperaturen, bei denen die in Abschnitt 4.2.3 diskutierten HD-Austauschmessungen und die im selben Abschnitt zitierten, mittels mehrdimensionaler NMR-Spektren verfolgten HD-Austauschreaktionen durchgeführt wurden, liegen etwa gleich weit von dieser Temperatur entfernt, was die bereits erwähnte Übereinstimmung der aus ihnen resultierenden Werte von  $\Delta G_{\text{HX}}$  erklärt.

#### 4.2.5 Zusammenfassende Diskussion

Die in diesem Kapitel präsentierten Resultate können wie folgt zusammengefasst werden. PLA<sub>2</sub>, insbesondere bei pH 8,0, entfaltet bei vergleichsweise hohen Denaturationskonzentrationen, weist aber wegen des geringen  $m_{\text{N} \rightarrow \text{U}}$ -Wertes eine verhältnismäßig geringe thermodynamische Stabilität auf. Dieses Verhalten scheint Bestandteil einer allgemeinen Tendenz reversibel entfaltender globulärer Eindomänenproteine zu sein. Demnach tendieren Proteine mit steigender Resistenz gegen Denaturanzien, also mit zunehmenden  $[\text{D}]_{0,5}$ -Werten, zu abnehmenden  $m_{\text{N} \rightarrow \text{U}}$ -Werten, was wiederum zu relativ geringen  $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{U}}^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werten führt. Für PLA<sub>2</sub> konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten durch die Eigenschaften des nativen Zustandes determiniert wird.

Überträgt man diese für PLA<sub>2</sub> geltende Feststellung auf die Gesamtheit der untersuchten Probenmenge, und unterstellt man der gefundenen, statistisch belegten Korrelation eine natürliche Gesetzmäßigkeit, kann man die betrachteten 138 Proteine hinsichtlich ihres nativen Zustandes in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe sei hiermit als „nicht-resistent“ bezeichnet. Die Vertreter dieser Gruppe würden durch eine strikt definierte, sehr homogene und durch einen zwingend hohen Grad tertiärer Wechselwirkungen stabilisierte native Struktur charakterisiert. Dieser scharf abgegrenzte native Zustand würde dementsprechend auch durch kleinere Fluktuationen oder lokale Entfaltungseignisse sehr stark destabilisiert, was die globale Entfaltung zur Folge hätte. Die Proteine dieser Gruppe zeigten das für Proteine als typisch angenommene Bild eines heterogenen entfalteten Zustands mit einer extrem hohen Anzahl möglicher Konformationen im Gegensatz zum homogenen nativen Zustand, der, da er nur geringste Abweichungen toleriert, aus vergleichsweise wenigen möglichen Konformationen bestünde. In der schematischen Auftragung der freien Enthalpie gegen die Populationsbreite ergäbe dies ein breites Minimum für U und ein verhältnismäßig schmales für N (Abb. 4.19 A). Die erwähnte bvPLA<sub>2</sub> oder Ribonuklease A wären typische Vertreter dieser Gruppe.

Die zweite Gruppe sei hingegen als „resistent“ bezeichnet. Das Verhalten von PLA<sub>2</sub> wäre beispielhaft für die Eigenschaften dieser Gruppe. Ihr nativer Zustand könnte im Gegensatz zu dem „nicht-resistenten“

Proteine Fluktuationen und lokale Entfaltungsereignisse tolerieren, ohne dass er durch die verlorenen tertiären Interaktionen entscheidend destabilisiert würde. Als Konsequenz wäre dieser „resistente“ native Zustand durch eine erhöhte Anzahl möglicher und tatsächlich eingenommener Konformationen charakterisiert. Das Resultat wäre ein vergleichsweise breites Minimum von N in der schematischen Auftragung der freien Enthalpie gegen die Populationsbreite (Abb. 4.19 B). Eine weitere mögliche Konsequenz aus der höheren Toleranz gegenüber dem Verlust tertiärer Wechselwirkungen wäre daher eine hohe Robustheit gegenüber denaturierenden Einflüssen, wie sie PLA<sub>2</sub> aufweist.

Das in dieser Arbeitsgruppe entwickelte Modell der Entfaltungsregion besagt, dass die globale Entfaltung eines Proteins durch lokale Entfaltungsereignisse stark beeinflussbar ist. Demzufolge führt die selektive Stabilisierung einer instabilen Region, z.B. eines exponierten *loops* zur Stabilisierung der gesamten nativen Struktur<sup>166; 175; 176; 177; 178; 179</sup>. Die Gruppe der „nicht-resistenten“ Proteine fügt sich nahtlos in dieses Bild ein. Ein weiteres Beispiel hierfür ist Barnase, die durch gezielte Einführung zweier Disulfidbrücken deutlich stabilisiert wurde<sup>20</sup>. „Resistente“ Proteine würden dagegen eher geringe Effekte auf derartige, aber auch auf destabilisierende Manipulationen zeigen. So ändert, mit Ausnahme der Entfernung zweier für die Aufrechterhaltung der nativen Struktur essentieller Disulfidbrücken, auch ein verändertes Disulfidbrückenmuster nichts am grundsätzlichen Verhalten von PLA<sub>2</sub><sup>2</sup> oder von bpPLA<sub>2</sub><sup>134</sup>.

Vom energetischen Standpunkt aus wären dem Faltungs-/Entfaltungsgleichgewicht „nicht-resistenter“ Proteine aufgrund der für die Aufrechterhaltung der nativen Struktur nötigen großen Anzahl obligatorischer tertiärer Interaktionen ein hoher  $\Delta H_{N \rightarrow U}$ -Wert zuzuordnen. Wegen der ausgeprägten Homogenität von N ist durch die Entfaltung allerdings auch ein großer Entropieverlust, mithin also ein ebenso verhältnismäßig hoher  $\Delta S_{N \rightarrow U}$ -Wert anzunehmen. Letzterer sollte bei „resistenten“ Proteinen der angenommenen Heterogenität ihres nativen Zustands entsprechend geringer sein. Da dieser laut obiger Definition ein Ensemble mit einer signifikanten Anzahl unterbrochener, wenn auch nur transient gestörter tertiärer, den nativen Zustand stabilisierender Interaktionen wäre, würde im Gegenzug der  $\Delta H_{N \rightarrow U}$ -Wert ebenfalls reduziert. Nach Gleichung 2.3 wäre das Resultat dieser anzunehmenden gegenläufigen Entwicklungen ungefähr gleiche  $\Delta G_{N \rightarrow U}$ -Werte für „resistente“ und „nicht-resistente“ Proteine.

Eine eher allgemeine Illustration der jeweiligen Eigenschaften beider angenommenen Gruppen bieten die in Abbildung 4.19 dargestellten Energieschemata sowie die beigefügten Reaktionsgleichungen und schematischen Zeichnungen. Um die als obligatorisch angenommene hohe Anzahl tertiärer nativer Interaktionen „nicht-resistenter“ Proteine zu symbolisieren, wurde aufgrund der den  $\beta$ -Sekundärstrukturen impliziten hohen Anzahl von Wasserstoffbrücken die native Struktur als überwiegend aus  $\beta$ -Faltblättern bestehend dargestellt (Abb. 4.18 A). Die im Verhältnis zu U sehr schmale Population von N charakterisiert die daraus resultierende ausgeprägte Homogenität von N.

Im Gegensatz dazu wurde die Population des nativen Zustands „resistenter“ Proteine entsprechend breit dargestellt, um dessen Heterogenität als Konsequenz aus der Toleranz gegenüber dem Verlust einiger



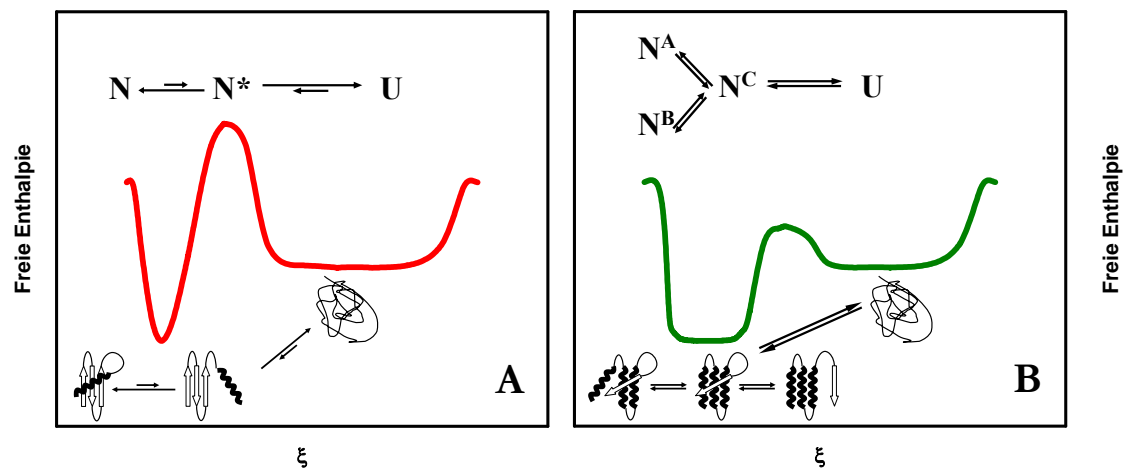


Abbildung 4.19 Schematische Darstellung des Faltungs-/Entfaltungsverhaltens „nicht-resistenter“ (A) und „resistenter“ Proteine (B).

stabilisierender Wechselwirkungen zu zeigen. Um dies strukturell zu verdeutlichen, wurde die native Struktur in Anspielung auf das bekannte *helix fraying*<sup>13; 147</sup> symbolhaft als überwiegend  $\alpha$ -helikal dargestellt (Abb. 4.19 B).

In die schematischen Auftragungen der freien Enthalpie gegen die Reaktionskoordinate (Abb. 4.18) wurden auch die in Kapitel 4.3 vorgestellten und diskutierten Ergebnisse der kinetischen Faltungs- und Entfaltungsmessungen von PLA<sub>2</sub> einbezogen, die für dieses Protein vergleichsweise geringe Werte von  $\Delta G_u^\ddagger$  offenbarten.

Interessanterweise spiegelt PLA<sub>2</sub> selbst als Vertreter der angenommenen Gruppe „resistenter“ Proteine anhand des pH-Einflusses auf die Übergangskurven partiell die hier entwickelten allgemeinen Vorstellungen wider. Bei pH 8,0 liegt der N-Terminus des Proteins exponiert und flexibel vor (Abschnitt 4.1). Bei pH 4,0 ist dies weitaus weniger ausgeprägt und das auf 0 M GuHCl extrapolierte Parameterpaar  $\Delta H_{N \rightarrow U}$  und  $\Delta S_{N \rightarrow U}$  nimmt im Vergleich zu pH 8,0 höhere Werte an (272,1 kJ mol<sup>-1</sup> und 751,0 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> im Vergleich zu 209,6 kJ mol<sup>-1</sup> und 589,90 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>). Auch, wenn sich die  $[D]_{0,5}$ -Werte nicht signifikant ändern (Tab. 6.12), weist N<sup>R</sup> einen deutlich höheren  $m_{N \rightarrow U}$ -Wert auf als N<sup>E</sup>.

Somit kann das hier entwickelte, allerdings lediglich auf der Basis der Annahme stehende und bisher nur durch Indizien gestützte Modell der gegenläufigen Beziehung von resistenter und durch kooperative Interaktionen stabilisierter nativer Struktur eine Antwort auf die eingangs formulierte Fragestellung nach den Ursachen der geringen Kooperativität des Faltungsgleichgewichtes von PLA<sub>2</sub> bieten, bedarf aber noch einer hinreichenden Bestätigung.

## 4.3 Kinetische Stabilität von PLA<sub>2</sub>

### 4.3.1 Spektroskopisch verfolgte mittels manueller Mischung gestartete Messungen

PLA<sub>2</sub> besitzt acht Tyrosinreste und einen Tryptophanrest (Abb. 4.20 A). Aufgrund seiner Lage in einer Vertiefung zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt und der N-terminalen  $\alpha$ -Helix des Proteins erfährt der Indolrest von W3 im nativen Zustand (siehe Abb. 10) einerseits genug Abschirmung vom Lösungsmittel, um anhand der Polarität seiner Umgebung die in Abschnitt 4.1 diskutierte Konformationsänderung des N-Terminus anzuzeigen. Andererseits ist seine Lösungsmittlexposition stark genug, um auch in Faltung-/Entfaltungsmessungen im Gleichgewicht anhand der Intensität der Tryptophanfluoreszenz die Übergänge zwischen Basislinien und eigentlichem Übergangsbereich zu maskieren (nicht gezeigt).

Daher erschien die Messung der Fluoreszenz der acht Tyrosine des Proteins, die sich hinsichtlich ihrer Solvenz Zugänglichkeit untereinander deutlich unterscheiden (Abb. 4.20 A), als mögliche Alternative um die Faltung/Entfaltung von PLA<sub>2</sub> kinetisch zu verfolgen. Zudem war die Tyrosinfluoreszenz von PLA<sub>2</sub> bereits für Stabilitätsmessungen im Gleichgewicht genutzt worden<sup>4</sup>. In der Praxis erwies sich die Methode jedoch als unbrauchbar für kinetische Messungen, da die Zeitverläufe in Gegenwart von GuHSCN unabhängig von Konzentration, Temperatur und Geräteeinstellungen zu stark durch Mischungseffekte und wahrscheinlich auch die Fluoreszenzemission von W3 beeinflusst waren (nicht gezeigt).

Da in Gegenwart von GuHSCN aus spektroskopischen Gründen keine Fern-UV-CD-Messungen möglich sind, verblieb die Nah-UV-CD-Spektroskopie als möglicher Ausweg. Das in Abbildung 4.6 B gezeigte positive Signal bei 285 nm geht im Zuge der GuHSCN-induzierten Entfaltung vollständig verloren. Das resultierende Differenzspektrum hat seine höchste Intensität bei 280 nm (nicht gezeigt). Versuchsweise durchgeführte Messungen sowohl der Entfaltung, als auch der Rückfaltung zeigten im verwendeten Zeitfenster keine zeitabhängigen Signaländerungen (Abb. 4.19 B). In Abhängigkeit von der GuHSCN-Konzentration stimmen die gemittelten zeitabhängigen Messwerte der Entfaltung und auch der Rückfaltung gut mit einer unter ähnlichen Bedingungen entstandenen normierten Gleichgewichtsübergangskurve überein (Abb. 4.19 C). Dies ist nicht nur ein weiterer Beleg für die bereits früher<sup>9</sup> gezeigte vollständige Reversibilität der durch Denaturans induzierten Entfaltung von PLA<sub>2</sub>, sondern auch ein Hinweis darauf, dass die mittels der Elliptizität bei 280 nm messbaren, nach den in Abschnitt 4.1 gezeigten Ergebnissen wahrscheinlich die Umgebung von W3 betreffenden Vorgänge zu schnell für die mittels manueller Mischung gestarteten Messungen verlaufen.

Wie in Kapitel 2.2.5 dargelegt ist es möglich, die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von Proteinen anhand des HD-Austausches von im nativen Zustand geschützten Amidprotonen der Peptidbindungen zu ermitteln, sofern dieser dem EX1-Mechanismus folgt. Dies ist insbesondere bei basischen pH-Werten der Fall. In Kapitel 4.2.4 wurden die Ergebnisse eigener Messungen im Vergleich mit den

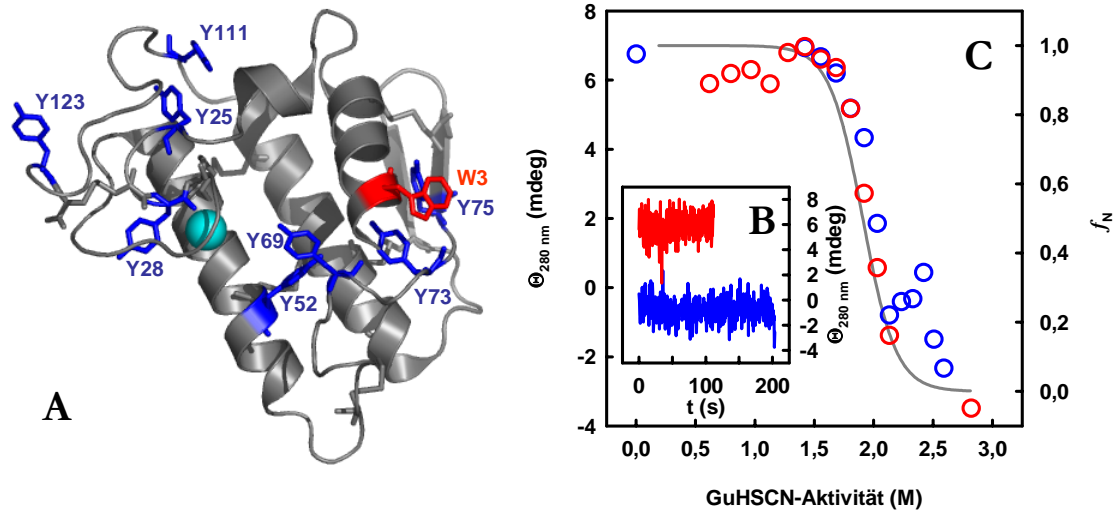


Abbildung 4.20 Fluorophore von PLA<sub>2</sub> sowie mittels Nah-UV-CD und manueller Mischung verfolgte Faltungs- bzw. Entfaltungskinetik in Abhängigkeit von der GuHSCN-Aktivität. A: Schematische Darstellung der Struktur von PLA<sub>2</sub> und der Positionen ihrer Fluorophore. Das Polypeptidrückgrat und die Disulfidbrücken wurden grau, das Tryptophan rot und die Tyrosine blau gefärbt. Die türkisarbene Kugel repräsentiert das Calciumion. Die Koordinaten wurden der pdb-Datei 4P2P<sup>72</sup> aus der Brookhaven-Datenbank entnommen und mit der Visualisierungssoftware Pymol bearbeitet. B: Faltungs- und Entfaltungskinetik von holopLA<sub>2</sub> bei pH 8,0. Die Entfaltungsreaktion (–) wurde durch einen Sprung in 3,2 M GuHSCN, die Rückfaltungsreaktion (–) durch einen Sprung aus 5 M GuHSCN in 1,4 M GuHSCN gestartet. Die Messungen erfolgten wie unter 3.2.5.3 beschrieben. C: Vergleich der Mittelwerte der Signalamplituden von Entfaltung (○) und Rückfaltung (○) von holopLA<sub>2</sub> mit der Gleichgewichtsübergangskurve (–).

Daten einer anderen Gruppe<sup>159</sup> gezeigt. Beide fanden jedoch unter EX2-Bedingungen statt, liefern also thermodynamische Informationen. In Gegenwart höherer pH- bzw. pD-Werte, bei denen wahrscheinlich ein Austausch nach EX1 stattfindet, waren die zugeordneten Signale in den gemessenen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren dagegen für eine Auswertung nicht mehr gut genug aufgelöst (nicht gezeigt), was auf die unter basischen Bedingungen insgesamt verschlechterte Signalqualität und den für manuell gestartete NMR-Messungen möglicherweise zu schnellen Austausch zurückzuführen ist. Daher waren HD-Austauschmessungen für kinetische Entfaltungsmessungen in diesem Zusammenhang unbrauchbar.

### 4.3.2 Entfaltungsmessungen von PLA<sub>2</sub> mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz

Für Messungen der Entfaltungsreaktionen von PLA<sub>2</sub> mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz, wie den nachstehend präsentierten, wurden verschiedene Parameter wie PLA<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur oder Geräteeinstellungen variiert, ohne dass ein Einfluss auf den prinzipiellen Verlauf oder die resultierenden kinetischen Konstanten gefunden wurde. Ebenso wenig konnte ein Einfluss des aktuell verwendeten *cut off*-Filters (320 nm oder 305 nm) auf das Signal gefunden werden. Zusätzlich wurde die Entfaltung von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 in Gegenwart von GuHCl anstelle des sonst verwendeten GuHSCN gemessen (nicht gezeigt). Auch dies führte zu keiner Änderung. Der grundsätzliche Verlauf einer Entfaltungskinetik war vielmehr

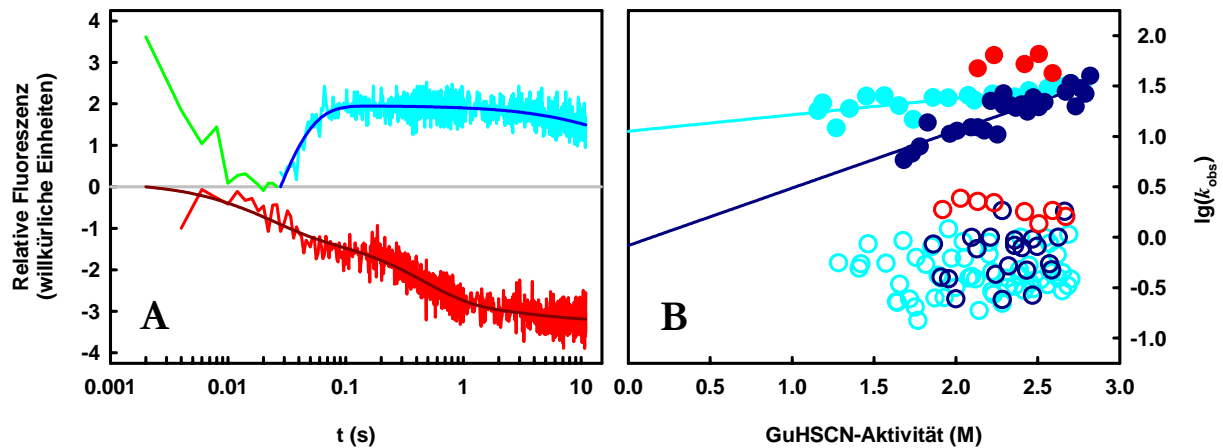


Abbildung 4.21 Mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz gemessene Entfaltung von PLA<sub>2</sub>. A: Fluoreszenzsignale der Entfaltung von apoPLA<sub>2</sub> in 3,1 M GuHSCN bei pH 4,0 (—) bzw. pH 8,0 (—) und (—). Die Reaktionen wurden wie unter 3.2.7 beschrieben verfolgt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die auf 0 s extrapolierten Signale als 0 definiert und die Gesamtamplitude auf die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration normiert. Die anderen Bedingungen waren jeweils identisch. Der erste Teil der Kinetik bei pH 8,0 (—) wurde in die Auswertung nicht mit einbezogen. B: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der GuHSCN-Aktivität. Die Progresskurven wurden nach Reaktionen 1. Ordnung ausgewertet und die ersten beiden der erhaltenen Konstanten halblogarithmisch gegen die GuHSCN-Aktivität aufgetragen. Gezeigt werden die Geschwindigkeitskonstanten der ersten Entfaltungsphase von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (●), sowie von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (●) und bei pH 4,0 (●), bzw. der zweiten Entfaltungsphase von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (○) bzw. von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (○) und pH 4,0 (○).

nur vom pH-Wert abhängig. Die Fluoreszenzsignale der Entfaltung sowohl von apo- als auch von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 nahmen innerhalb weniger Millisekunden sehr schnell ab, durchliefen nach dann einer schnellen, zunehmenden Phase ein Maximum, gefolgt von mindestens einer langsamen abnehmenden Phase (Abb. 4.21 A). Die Mehrphasigkeit der Reaktionsverläufe erschien zunächst überraschend, ebenso wie der Vorzeichenwechsel der Amplitude.

Außer mit der prinzipiell möglichen, Akkumulation eines Entfaltungsintermediates kann die Mehrphasigkeit der Entfaltungsreaktion auch mit einem heterogenen nativen Zustand erklärt werden (siehe Kapitel 2.2.3). Angesichts des in Abschnitt 4.1 diskutierten Gleichgewichtes aus N<sup>R</sup> und N<sup>E</sup> scheint dies die beste Erklärung zu sein. Ein weiteres Indiz hierfür könnte sein, dass besonders bei pH 8,0 das Fluoreszenzsignal innerhalb der ersten 30 ms zunächst abnimmt bevor die erwähnte Fluoreszenzzunahme einsetzt (Abb. 4.21 A). Aufgrund der geringen Reproduzierbarkeit der Intensität dieser Abnahme und der wenigen zur Verfügung stehenden Punkte ist eine fundierte Entscheidung, ob es sich hierbei um ein echtes Signal oder ein Artefakt handelt, allerdings nicht möglich. Der entsprechende Teil der Signalverläufe wurde daher in die Auswertung nicht einbezogen.

Bei pH 4,0 konnten ebenfalls mehrere Phasen detektiert werden, wobei das Fluoreszenzsignal allerdings kontinuierlich abnahm (Abb. 4.21 A). Berücksichtigt man die unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften von N<sup>R</sup> bzw. N<sup>E</sup> (Abb. 4.5) und nimmt man weiterhin an, dass es sich bei der initialen Abnahme der Fluoreszenz bei pH 8,0 um kein Artefakt handelt, könnten die unterschiedlichen Progresskurven bei pH 4,0 und pH 8,0 möglicherweise darauf hindeuten, dass N<sup>R</sup> und N<sup>E</sup> aufgrund der Ionenstärke des Salzes

GuHSCN ineinander umgewandelt werden. Wie aus dem Einfluss von KCl (Abb. 4.6 C) ersichtlich, ist dies zumindest grundsätzlich möglich. Der komplexe Signalverlauf wäre dann das Produkt der  $N^R/N^E$ -Isomerisierung und gleichzeitiger Entfaltung einer oder beider nativer Spezies. Dabei ist weiterhin zu berücksichtigen, dass  $N^E$  bei pH 8,0 nicht exklusiv vorliegt (Abb. 4.5). Vorstellbar wäre daher beispielsweise, dass die initiale Fluoreszenzabnahme auf die salzbedingte Umwandlung von  $N^E$  zu  $N^R$  zurückzuführen ist und über die eigentliche Entfaltung nichts aussagt. Konsequenterweise könnte die Fluoreszenzzunahme ebenso durch die Umwandlung von  $N^R$  zu  $N^E$  verursacht werden. In diesem Falle würden die Fluoreszenzabnahmen die Entfaltungsreaktion anzeigen. Dies würde bedeuten, dass  $N^R$  über  $N^E$  entfaltet, letztere Spezies also trotz ihres nachgewiesenen nativen Charakters die Rolle eines nativähnlichen Intermediates<sup>180</sup> einnähme. Eine endgültige Zuordnung ist jedoch, wie erwähnt, aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich.

In der halblogarithmischen Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten gegen die Denaturansaktivität zeigt sich für die erste Phase der Entfaltung von apoPLA<sub>2</sub> bei beiden pH-Werten eine sehr geringe Abhängigkeit von der GuHSCN-Aktivität. Für die langsamen Phasen gilt dies ebenso und unter allen Bedingungen, jedoch nur eingeschränkt für die schnelle Phase der Entfaltung von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (Abb. 4.20 B). Gerade letzteres erscheint wichtig, belegt es doch aufgrund der bereits nachgewiesenen Stabilisierung durch Ca<sup>2+</sup> (Abschnitt 4.2.2,<sup>133</sup>) den realen Hintergrund der Daten. Die Extrapolation der ersten Phase auf 0 M GuHSCN resultierte vor allem aufgrund der unterschiedlichen Denaturansabhängigkeiten der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten in deutlich verschiedenen apparenten Werten von  $k_u$  für apoPLA<sub>2</sub> (11,3 s<sup>-1</sup>) und holoPLA<sub>2</sub> (0,8 s<sup>-1</sup>). Der Grund für die Bezeichnung als apparente Werte wird nachstehend und in Abschnitt 4.2.4 erläutert werden. Nach Gleichung 2.4 ergeben sich aus den apparenten Entfaltungskonstanten von apoPLA<sub>2</sub> und holoPLA<sub>2</sub>  $\Delta G_u^\ddagger$ -Werte von 65,9 kJ mol<sup>-1</sup> bzw. 72,3 kJ mol<sup>-1</sup> für die Übergangszustände der durch die Fluoreszenzzunahme angezeigten Reaktion. Unter Berücksichtigung der auf Seite 16 dargelegten Argumente hinsichtlich  $k_B$  und  $k_u$ , die auch für diesen Fall gelten sollten, reduzieren sich die  $\Delta G_u^\ddagger$ -Werte jeweils auf 37,5 kJ mol<sup>-1</sup> bzw. 43,9 kJ mol<sup>-1</sup>. Verglichen mit den Werten anderer, transiente Intermediate akkumulierender Proteine<sup>34; 181</sup> erscheinen diese Werte sehr gering. Auch dies kann als Indiz für die oben angestellte Vermutung hinsichtlich einer Umwandlung zwischen  $N^R$  und  $N^E$  gewertet werden.

### 4.3.3 Rückfaltungsmessungen von PLA<sub>2</sub> mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz

Im Gegensatz zur Entfaltung ist der grundsätzliche Verlauf der Rückfaltung von PLA<sub>2</sub> für apo- und holoPLA<sub>2</sub>, bei pH 8,0 und pH 4,0 gleich. Einer schnellen Fluoreszenzabnahme folgt mindestens eine weitere Phase mit dem gleichen Amplitudenvorzeichen (Abb. 4.22 A). Interessanterweise ist die

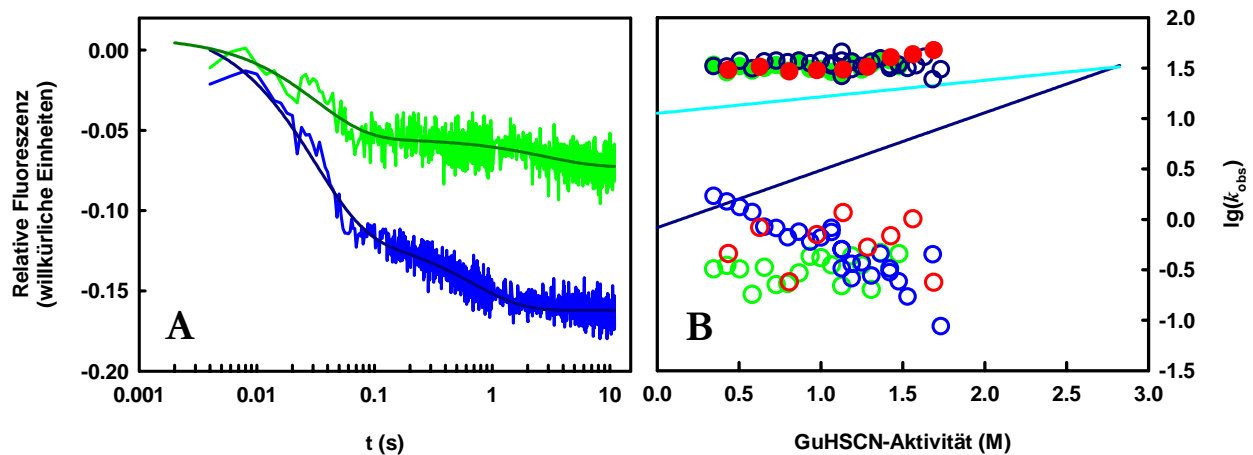


Abbildung 4.22 Mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz gemessene Rückfaltung von PLA<sub>2</sub>. A: Progresskurven der Rückfaltung von PLA<sub>2</sub>. Die Rückfaltung von jeweils 9  $\mu$ M apoPLA<sub>2</sub> (—) bzw. holoPLA<sub>2</sub> (—) bei pH 8,0 wurde durch Sprünge von 4 M GuHSCN nach 0,5 M GuHSCN gestartet und wie unter 3.2.7 beschrieben verfolgt. Zur verbesserten Vergleichbarkeit wurden die auf 0 s extrapolierten Signale als 0 definiert, ansonsten aber nicht verändert. B: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der GuHSCN-Aktivität. Jede Progresskurve wurde nach einer zweifach exponentiellen Gleichung 1. Ordnung angepasst und die erhaltenen Konstanten halblogarithmisch aufgetragen. Die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Rückfaltungsphasen von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (○), von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (●) und pH 4,0 (●) sowie der langsamen Rückfaltungsphasen von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (○), von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (○) und pH 4,0 (○) werden mit den Abhängigkeiten der schnellen Entfaltungsphasen von apoPLA<sub>2</sub> (—) und holoPLA<sub>2</sub> (—) von der GuHSCN-Aktivität (siehe Abb. 4.21 B) verglichen.

Geschwindigkeitskonstante der ersten beobachteten Phase unter den drei Bedingungen gleich und von der Denaturanzaktivität unabhängig (Abb. 4.22 B). Dasselbe gilt auch für die langsame Phase der Rückfaltung von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 und pH 4,0. Im Falle von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 wurde dagegen eine lineare Abnahme der logarithmierten Geschwindigkeitskonstante mit zunehmender Denaturanzaktivität bis zu  $[D]_{0,5}$  gefunden (Abb. 4.22 B). Bei höheren GuHSCN-Aktivitäten steigt sie dagegen wieder an (nicht gezeigt). Die Auftragung des durch die nichtlineare Anpassung vorausgesagten Anfangswertes, also des Fluoreszenzsignales bei 2 ms offenbarte eine im Vergleich zur Gleichgewichtsübergangskurve um rund 1 M gegen geringere GuHSCN-Aktivitäten verschobene, ansonsten aber parallel verlaufende sigmoide Kurve. Dies deutet darauf hin, dass ein beträchtlicher Teil der Rückfaltungsreaktion bereits in der Totzeit des Instruments (2 ms) stattfand. Daher muss davon ausgegangen werden, dass sich die globale Faltung von PLA<sub>2</sub> mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz nicht hinreichend analysieren lässt.

Dagegen ist ein struktureller Hintergrund der gemessenen Fluoreszenzsignale für die Rückfaltung und die Entfaltung von PLA<sub>2</sub> aufgrund der gefundenen Stabilisierung durch Ca<sup>2+</sup> (siehe z. B. Abb. 4.14) unbestreitbar. Die beste Schlussfolgerung aus den bisher gezeigten Ergebnissen scheint daher die nachfolgend beschriebene, auf mehreren Beobachtungen basierende Annahme. Zunächst erscheint die weitgehende Unabhängigkeit der meisten Geschwindigkeitskonstanten von der GuHSCN-Konzentration für die Faltung/Entfaltung eines kompletten Proteins sehr ungewöhnlich. Dies wird durch die Tatsache bekräftigt, dass auch bei einer um 10 °C verringerten Temperatur keine signifikante Änderung der

Geschwindigkeitskonstanten gefunden wurde (nicht gezeigt). Im Hinblick auf die Eigenschaften nativer PLA<sub>2</sub> (Abschnitt 4.1) und unter besonderer Beachtung der Eigenschaften des N-Terminus, der das mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz beobachtete einzige Tryptophan des Proteins enthält, ist es daher denkbar, dass die diskutierten Daten, wie unter 4.2.2 bereits vermutet, auf lokale Faltungs- bzw. Entfaltungseignisse zurückzuführen sind. Auch solche lokalen Ereignisse sind selbstverständlich, speziell bei der Rückfaltung aus dem vollständig entfalteten Zustand, nicht von der globalen Faltung zu trennen. Die während der Entfaltung gemessenen Fluoreszenzsignale könnten somit das Verhalten nur des N-Terminus vor oder während der globalen Entfaltung beschreiben. Die während der Rückfaltung gemessenen Fluoreszenzsignale würden dagegen aus dem Verhalten nur des N-Terminus nach den globalen Faltungseignissen resultieren. PLA<sub>2</sub> enthält 5 Proline, von denen im nativen Zustand zwei in *cis*-Konformation vorliegen. Aufgrund der Geschwindigkeitskonstanten und ihrer extrem ausgeprägten Denaturansunabhängigkeit ist somit auch die Annahme nahe liegend, dass die langsamen Phasen der Rückfaltungsreaktion und möglicherweise auch der Entfaltungsreaktion auf die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolinen zurückzuführen sind.

#### 4.3.4 Entfaltungsmessungen mittels limitierter Proteolyse

Die limitierte Proteolyse von apo- und holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 wurde mit den Proteasen Chymotrypsin, Proteinase K und Trypsin durchgeführt. Alle drei gehören zur Gruppe der Serinproteasen, die zwar divalente Metallionen binden, diese aber nur zur Stabilisierung, nicht aber für ihre enzymatische Aktivität benötigen. Im Hinblick auf die untersuchte Stabilisierung von PLA<sub>2</sub> durch Ca<sup>2+</sup> war dies neben ihren verschiedenen Substratpräferenzen eines der wichtigsten Auswahlkriterien. Die limitierte Proteolyse von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 erfolgte mit Pepsin.

Anhand der Bandenmuster in den SDS-Polyacrylamidgelen, die zur Detektion des proteolytischen Abbaus dienten, waren im Falle des Proteinase K- und des Pepsinverdaus keine PLA<sub>2</sub>-Fragmente erkennbar. Der Verdau mit Trypsin führte zu einem Fragment, welches laut SDS-PAGE und nachfolgender densitometrischer Evaluierung nur geringfügig kleiner als PLA<sub>2</sub> ist. Die nicht näher bestimmte Primärschnittstelle sollte sich also in der Nähe des N- oder C-Terminus befinden. Auch die Chymotrypsinbehandlung führt wahrscheinlich zu einem stabilen proteolytischen PLA<sub>2</sub>-Fragment. Dieses ist deutlich kleiner als intakte PLA<sub>2</sub>. Da sich die zugehörige Bande im SDS-Gel aber von einer der drei Chymotrypsinbanden nicht trennen lässt, ist diesbezüglich keine endgültige Aussage möglich. Die beschriebenen Verhaltensweisen sind unabhängig von der Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>.

Die proteolytische Abbaugeschwindigkeit von apoPLA<sub>2</sub> ist in den drei Fällen, bei denen beide Enzymformen untersucht wurden, deutlich höher als die von holoPLA<sub>2</sub>. Dieser Unterschied wird, wie aus Abbildung 4.23 A, B und C ersichtlich ist, in Gegenwart höherer Proteasekonzentrationen noch stärker.

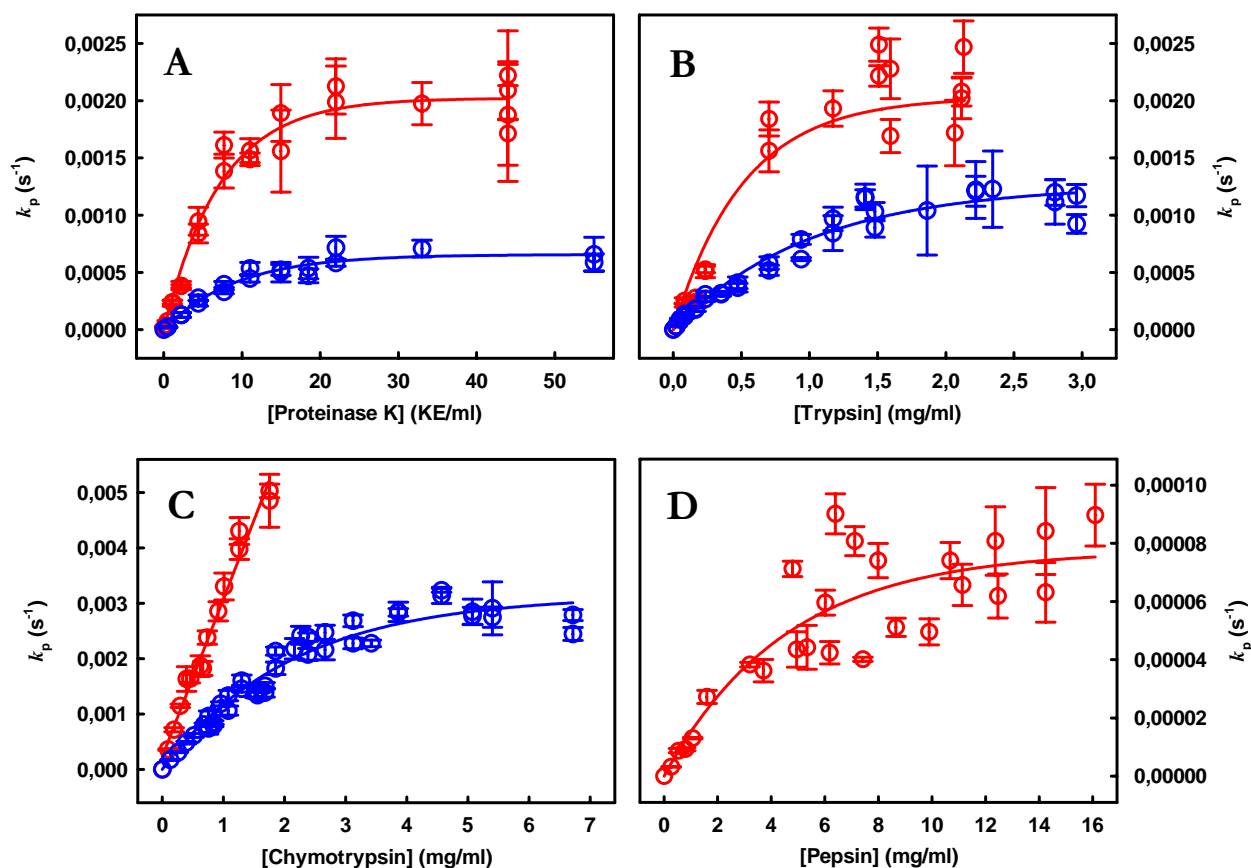


Abbildung 4.23 Limitierte Proteolyse von PLA<sub>2</sub>. Die Geschwindigkeitskonstanten des proteolytischen Abbaus von apoPLA<sub>2</sub> (○) bzw. holoPLA<sub>2</sub> (◐) durch Proteinase K (A), Trypsin (B), Chymotrypsin (C) bei pH 8,0 und Pepsin bei pH 4,0 (D) wurden wie unter 3.2.9.2 beschrieben bestimmt und gegen die jeweilige Konzentration der eingesetzten Protease aufgetragen.

In Abbildung 4.23 ist auch erkennbar, dass  $k_p$  mit Ausnahme des Paares Chymotrypsin/apoPLA<sub>2</sub> mit zunehmenden Proteasekonzentrationen einem hyperbolischen Verlauf folgt. Bei dem genannten Paar ist  $k_p$  offensichtlich linear von der Chymotrypsin-Konzentration abhängig. Dies legt nahe, dass apoPLA<sub>2</sub> durch Chymotrypsin aus dem nativen Zustand abgebaut wird. Aus dem hyperbolischen Verlauf in den anderen sechs Fällen geht dagegen hervor, dass dem Proteolyseschritt ein lokales oder globales Entfaltungsereignis vorangehen muss (Abschnitt 2.2.6). Da zumindest bei pH 8,0 die Abbaukonstanten von apoPLA<sub>2</sub> immer höher sind als die von holoPLA<sub>2</sub>, steht zumindest für letztere fest, dass der hyperbolische Verlauf der Proteaseabhängigkeit von  $k_p$  nicht auf eine Verminderung der Proteaseaktivität bei hohen Proteasekonzentrationen zurückzuführen ist. Anhand der auch in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> um bis zu zwei Größenordnungen höheren Aktivität der Proteasen gegen das unstrukturierte Substrat Casein (nicht gezeigt) konnte endgültig nachgewiesen werden, dass  $k_p$  nicht von der spezifischen Aktivität der Proteasen abhängig ist, sondern durch die Substrateigenschaften von PLA<sub>2</sub> bestimmt wird.

Aus der Abhängigkeit der gemessenen Abbaukonstante  $k_p$  von der jeweiligen Proteasekonzentration



konnten in diesen Fällen Entfaltungskonstanten von PLA<sub>2</sub> wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben berechnet werden (Abb. 4.23). Diese sind in Tabelle 6.13 angeführt. Zusammengefasst ergibt sich folgendes Bild. Die mit Hilfe von Proteinase K und Trypsin bestimmten Entfaltungskonstanten von apoPLA<sub>2</sub> stimmen sehr gut, die von holoPLA<sub>2</sub> im Rahmen der Exaktheit der verwendeten Methode hinreichend gut überein. Die im Vergleich zu den Werten bei pH 8,0 ungleich geringere Entfaltungskonstante von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 passt dagegen zu der aus den Gleichgewichtsübergangskurven gewonnenen Erkenntnis der deutlichen Stabilisierung des Proteins bei diesem pH-Wert. Die allgemein höhere Entfaltungskonstante von apoPLA<sub>2</sub> bestätigt die Hypothese aus Abschnitt 4.1.4 hinsichtlich einer höheren Flexibilität im Vergleich zu holoPLA<sub>2</sub>.

Zunächst scheint der hohe Wert der ebenfalls bei pH 8,0 mit Hilfe von Chymotrypsin bestimmten Entfaltungskonstanten nicht zu den anderen zu passen. Dies kann anhand der nachstehenden Überschlagsrechnung demonstriert werden. Werden die jeweils mit Trypsin und Proteinase K bestimmten Werte gemittelt, ergeben sich für apo- bzw. holoPLA<sub>2</sub> jeweils Entfaltungskonstanten von  $2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Der mit Chymotrypsin bestimmte Wert für holoPLA<sub>2</sub> beträgt aber mehr als das Dreifache des arithmetischen Mittels der anderen beiden Konstanten von holoPLA<sub>2</sub>. Hierzu passt wiederum, dass Chymotrypsin als einzige der vier Proteasen in der Lage ist, apoPLA<sub>2</sub> aus dem nativen Zustand heraus abzubauen. Eine plausible Erklärung für die Diskrepanz der Entfaltungskonstante von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 bietet die Betrachtung der verschiedenen Substratpräferenzen der verwendeten Proteasen und der potentiellen Schnittstellen in PLA<sub>2</sub>. Dazu muss jedoch angemerkt werden, dass diese Betrachtung auf Schlussfolgerungen beruht und mangels experimentell bestimmter Primärschnittstellen nicht mit Daten hinterlegt werden kann.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Trypsin bevorzugt nach Arginin- oder Lysinresten und Chymotrypsin dagegen nach aromatischen, teilweise nach Leucinresten schneidet. Die katalytische Effizienz gegen Modellpeptide mit den entsprechenden Resten ist bis zu  $10^5$ -fach höher als gegen andere Substrate<sup>182</sup>. Proteinase K zeigt, sofern überhaupt, nur eine Präferenz für kleine unpolare Aminosäuren wie Alanin oder Glycin in der P1'-Position. Die Substratspezifität von Pepsin wird als „breit“ bezeichnet. Die geringe katalytische Effizienz gegen synthetische F-F-Dipeptide wird allerdings durch Hinzufügen weiterer Reste erhöht. Dabei werden große hydrophobe Reste, wie die von Phenylalanin oder Leucin, in P1- und P1'-Position bevorzugt. Darüber hinaus wird angenommen, dass der extrem niedrige isoelektrische Punkt von Pepsin ( $< 1$ ) und die damit verbundene negative Nettoladung der Protease die Bindung der im relevanten pH-Bereich (2-6) häufig protonierten Substratproteine begünstigt<sup>182</sup>.

In der Aminosäuresequenz von PLA<sub>2</sub> befinden sich viele potentielle Angriffsmöglichkeiten. Diese können jedoch anhand des Substratbindungsverhaltens von Proteasen eingegrenzt werden. In Abbildung 4.24 A wurde die Primärstruktur von PLA<sub>2</sub> mit den potentiellen Schnittstellen für Trypsin und Chymotrypsin dargestellt. Diese werden im Folgenden nach der Wahrscheinlichkeit eines Schnittes an dieser Position in

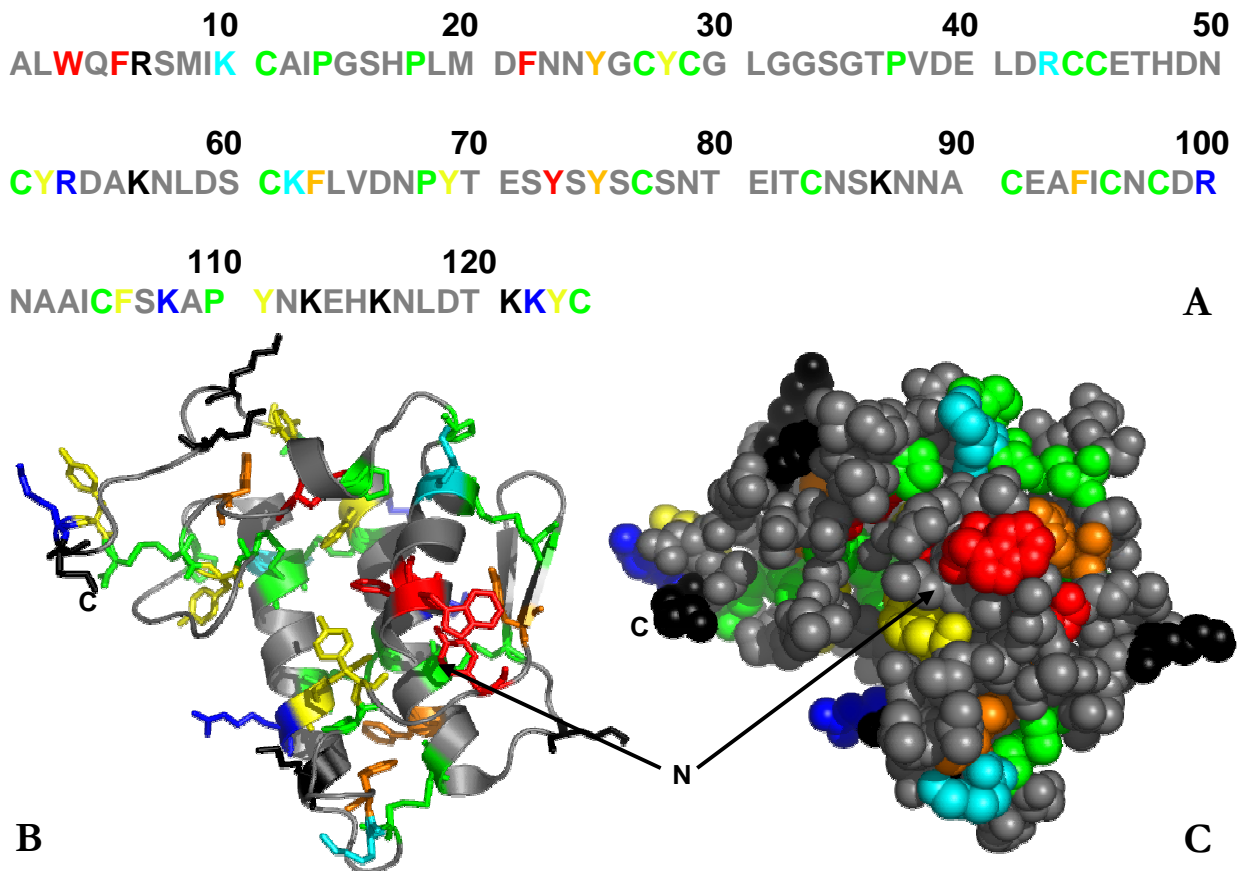


Abbildung 4.24 Potentielle Trypsin- und Chymotrypsinschnittstellen in PLA<sub>2</sub>. A: Aminosäuresequenz von PLA<sub>2</sub>. Potentielle Chymotrypsinschnittstellen der Klasse I sind rot, der Klasse II orange und der Klasse III gelb dargestellt. Potentielle Trypsinschnittstellen der Klasse I wurden schwarz, der Klasse II blau und der Klasse III türkis gefärbt. Grün gefärbte Regionen repräsentieren die Cysteine und Proline des Proteins. Alle anderen Aminosäuren wurden grau gefärbt. Die Definition der Klassen I-III wird im Text gegeben. B und C: Lokalisierung der potentiellen Schnittstellen in der Raumstruktur von PLA<sub>2</sub>. Die Tertiärstruktur wird schematisch (B) und in der Kalottendarstellung (C) gezeigt. Die Farbcodierung entspricht der aus Abbildung 4.23 A. N- und C-Terminus wurden mittels der entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Die Koordinaten wurden aus der pdb-Datei 4P2P<sup>72</sup> der Brookhaven-Datenbank entnommen und mit der Visualisierungssoftware Pymol bearbeitet.

drei Klassen eingeteilt. Potentielle Schnittstellen, die sich in direkter Nachbarschaft eines Prolins oder eines in eine Disulfidbrücke involvierten Cysteins befinden (Klasse III) können aufgrund ihrer Protease-unzugänglichkeit vernachlässigt werden. Solche Reste wurden in Abbildung 4.23 gelb bzw. türkis gefärbt. Klasse II wird von Resten gebildet, die sich nicht in direkter Nachbarschaft aber trotzdem mit einer Aminosäure als Zwischenraum (in der Primärstruktur) in großer Nähe zu Cystein- oder Prolinresten befinden. Der Schnitt an solch einer Stelle ist möglich aber unwahrscheinlicher als bei Resten der Klasse I (siehe unten). In Abbildung 4.24 sind sie blau bzw. orange dargestellt. Potentielle Schnittstellen ohne solche Limitationen bilden Klasse I. Die Wahrscheinlichkeit eines Schnittes ist hier am höchsten. In Abbildung 4.24 sind sie anhand der schwarzen bzw. roten Färbung erkennbar.

Die Primärstruktur von PLA<sub>2</sub> zeigt, dass die Klasse I-Schnittstellen für Trypsin trotz einer gewissen Häufung am C-Terminus über die gesamte Sequenz verteilt sind. Dagegen treten die wenigen Klasse I-

Schnittstellen für Chymotrypsin mit einer Ausnahme nur in der N-terminalen Hälfte auf. Noch deutlicher wird dies, wenn man die Lokalisierung dieser Reste in der Raumstruktur von PLA<sub>2</sub> (Abb. 4.24 B und C) betrachtet. Die teilweise zur *is* gehörenden Trypsinschnittstellen der Klasse I sind über die gesamte Raumstruktur verteilt, während die Klasse I-Schnittstellen für Chymotrypsin auch räumlich betrachtet am N-Terminus konzentriert auftreten. Die besten Beispiele sind W3 und Y73. In unmittelbarer Nähe sowohl in räumlicher Hinsicht, als auch in der Aminosäuresequenz befindet sich F5. Dieses ist nach Röntgenkristall- und NMR-Strukturen zu urteilen im gefalteten Zustand allerdings im Inneren des Proteins abgeschirmt, wie auch F22 (Abb. 4.24 B und C). Aufgrund der Konzentration potentieller Schnittstellen mit höchster Schnittwahrscheinlichkeit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass sich die primäre Spaltstelle für Chymotrypsin in der Tat am N-Terminus von PLA<sub>2</sub> befindet.

Interessanterweise ist das bereits erwähnte Y73 in das den protonierten N-Terminus stabilisierende Wasserstoffbrückennetzwerk (Abb. 2.11 A) involviert. Unter Berücksichtigung der bisher diskutierten Ergebnisse bezüglich der Rolle des N-Terminus im N<sup>E</sup>/N<sup>R</sup>-Gleichgewicht und der aus den Messungen mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz gewonnenen Erkenntnisse lässt sich die Diskrepanz der Entfaltungskonstanten von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 und pH 4,0 mit einem durch Chymotrypsin detektierten lokalen und von der mit Trypsin, Proteinase K und Pepsin verfolgten globalen Entfaltung unabhängigen Entfaltungsereignis des N-Terminus erklären. Konsequenterweise muss dann davon ausgegangen werden, dass der N-Terminus von apoPLA<sub>2</sub> exponiert oder in einer sehr flexiblen Konformation vorliegt. Dies kann anhand der spektroskopisch gefundenen Eigenschaften von N<sup>E</sup> bestätigt werden. Ebenso passend erscheint, dass mit Pepsin bei pH 4,0, also unter Bedingungen, unter denen ausschließlich N<sup>R</sup> akkumuliert wird, eine langsamere Entfaltung gezeigt werden konnte. Der globale Charakter dieses Entfaltungsereignisses wird anhand der im nächsten Kapitel vorgestellten Daten offensichtlich.

#### 4.3.5 Entfaltungsmessungen in Anwesenheit von GuHSCN

Die Entfaltungskonstanten von apo- und holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 in Anwesenheit steigender GuHSCN-Aktivitäten wurden mittels limitierter Proteolyse durch Proteinase K bestimmt. Die Entscheidung fiel für diese Protease, da Trypsin in Gegenwart von GuHSCN nicht aktiv ist (nicht gezeigt) und andererseits die globale Entfaltung von PLA<sub>2</sub> in An- und Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> untersucht werden sollte, weshalb beispielsweise Thermolysin ausschied. Die Untersuchungen bei pH 4,0 erfolgten wieder mit Pepsin.

Die Werte von  $k_p$  zeigten in allen Fällen in Abhängigkeit von der Proteasekonzentration einen hyperbolen Verlauf, wie die Beispiele in Abbildung 4.25 A. Bei pH 8,0 nahmen die daraus gewonnenen Werte von  $k_u$  sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> zunächst ab, bevor sie bei höheren GuHSCN-Aktivitäten wieder anstiegen. In der halblogarithmischen Auftragung scheint dieser Anstieg linear zu verlaufen (Abb. 4.25 B). Da  $k_p$  unter allen Bedingungen ein hyperbole Abhängigkeit von der Protease-

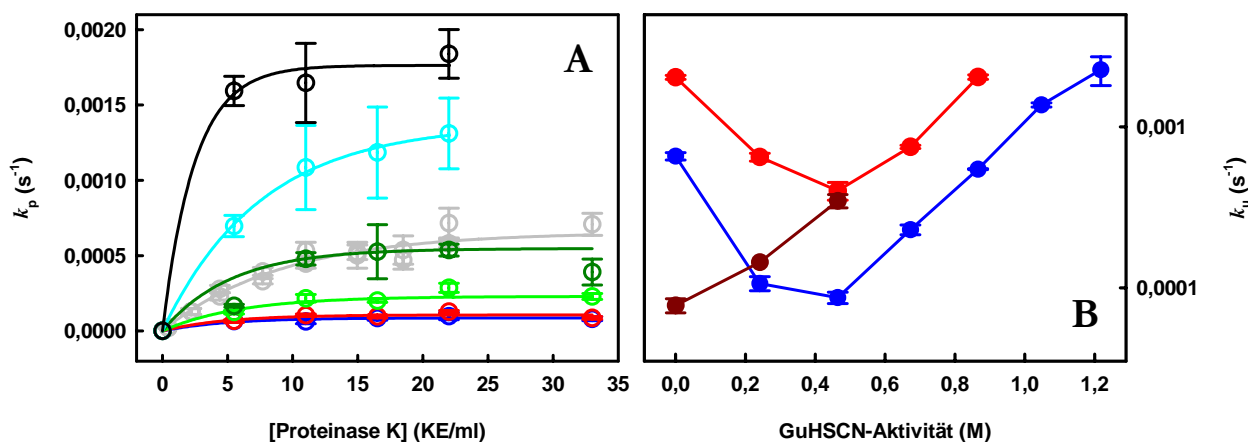


Abbildung 4.25 Abhängigkeit der Entfaltungskonstante von PLA<sub>2</sub> von der GuHSCN-Aktivität. A: Auftragung der Geschwindigkeitskonstante des Abbaus von holoPLA<sub>2</sub> durch Proteinase K in Abhängigkeit von der Proteasekonzentration. Die proteolytische Abbaukonstante wurde in Gegenwart von 0 M (○), 0,25 M (○), 0,5 M (○), 0,75 M (○), 1,0 M (○), 1,25 M (○) und 1,5 M (○) GuHSCN wie unter 3.2.9.3 beschrieben bestimmt. B: Abhängigkeit der Entfaltungskonstanten von PLA<sub>2</sub> von der Denaturansaktivität. Die jeweiligen Werte für  $k_u$  von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (●), bzw. apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 (●) und pH 4,0 (●) wurden aus den Auftragungen von  $k_p$  gegen die eingesetzten Proteasekonzentration gewonnen.

konzentration zeigte, die zur Bestimmung von  $k_u$  diente, und die Halbsättigungskonzentration der Protease auch in Gegenwart von GuHSCN niemals größer als der Wert war, der in Abwesenheit des Denaturans bestimmt wurde (Abb. 4.25 A), können die verringerten  $k_p$ -Werte nicht auf die Proteaseaktivität zurückgeführt werden. Andernfalls hätte sich die Sättigung nicht oder bei höheren Proteasekonzentrationen eingestellt. Dies wird auch durch die Ergebnisse entsprechender Caseintests bestätigt, die in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> aber in Gegenwart von entsprechenden GuHSCN-Aktivitäten durchgeführt wurden. In allen Fällen lagen die Aktivitäten gegen Casein, sowohl von Proteinase K als auch von Pepsin, deutlich über denen gegen PLA<sub>2</sub> (nicht gezeigt). Beiden Befunden zufolge muss die unter den jeweiligen Bedingungen gefundene Entfaltungskonstante einzig die Entfaltung von PLA<sub>2</sub>, nicht aber die Aktivität der Protease anzeigen.

Vor diesem Hintergrund lässt das Absinken von  $k_u$  bei geringen GuHSCN-Aktivitäten auf eine Stabilisierung von PLA<sub>2</sub> durch geringe GuHSCN-Aktivitäten zumindest bei 20 °C schließen. Allerdings stellt sich die Frage, ob es sich dabei um einen ausschließlich  $k_u$  betreffenden Effekt handelt. In diesem Fall wären nach Gleichung 2.1 von der Denaturanzkonzentration nichtlinear abhängige  $\Delta G_{N \rightarrow U}$ -Werte die Folge. Diese würden sich gegen  $[D] \rightarrow 0$  M hin aufwärts krümmen, was zur Folge hätte, dass die durch lineare Extrapolation aus dem Übergangsbereich auf die Abwesenheit von Denaturans bestimmten Werte von  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$  niedriger als die in diesem Falle wahren Parameter wären. Andernfalls muss es einen vergleichbaren Effekt niedriger GuHSCN-Aktivitäten auf  $k_f$  geben. Ohne adäquate Daten zur Rückfaltung des Proteins unter diesen Bedingungen ist allerdings keine diesbezügliche Aussage möglich. Allerdings

spricht die bereits erwähnte Übereinstimmung von  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$ - und  $\Delta G_{N \rightarrow U}$ -Werten aus Fluoreszenzübergangskurven und HD-Austauschmessungen sowie die damit verbundene Anwendbarkeit der linearen Extrapolation zur Bestimmung von  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  eindeutig für letzteres.

Pepsin bevorzugt, wie erwähnt, langkettige Modellsubstrate. Für eine effektive Proteolyse bedeutet dies, dass ein als Substrat agierendes Protein eine vergleichsweise lange Sequenz exponieren muss. Dies wiederum sollte zur Folge haben, dass Pepsin vorzugsweise entfaltete Proteine abbaut, wie im Falle von apoPLA<sub>2</sub> gezeigt. PLA<sub>2</sub> enthält als bevorzugte P1- und P1'-Bindungspartner für Pepsin die schon diskutierten potentiellen Chymotrypsinschnittstellen sowie fünf Leucinreste, die in nativer PLA<sub>2</sub> nur wenig exponiert sind. Die Richtigkeit der zur Proteolyse durch Chymotrypsin getätigten Annahmen vorausgesetzt bedeutet dies, dass es bei pH 4,0 eines Entfaltungsschrittes bedarf, um die N-terminal lokalisierten, bei pH 8,0 für Chymotrypsin bereits im nativen Zustand zugänglichen aromatischen Reste in apoPLA<sub>2</sub> zugänglich zu gestalten. Dies wiederum bestätigt die aus den spektroskopischen Daten gezogenen Schlussfolgerungen zu der Rolle des N-Terminus beim N<sup>R</sup>/N<sup>E</sup>-Gleichgewicht.

Ebenso bedeutsam erscheint, dass die mit Hilfe von Pepsin bestimmten Entfaltungskonstanten von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 nicht nur linear von der GuHSCN-Aktivität abhängig zu sein scheinen, sondern offenbar direkt in den wahrscheinlich linear ansteigenden Arm der Werte von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 münden (Abb. 4.26 B). Die in den Kapiteln 4.1.3 und 4.3.2 getätigte Annahme, dass sich das Gleichgewicht zwischen N<sup>E</sup> und N<sup>R</sup> auch bei basischen pH-Werten durch Erhöhung der Ionenstärke zugunsten von N<sup>R</sup> verschieben lässt, bietet sich auch in diesem Fall an. Wie bereits festgestellt, entfaltet das bei pH 4,0 überwiegend populierte N<sup>R</sup> deutlich langsamer als N<sup>E</sup> (Abb. 4.23, 4.25, Tab. 6.13). Das Verlangsamen der Entfaltung bei pH 8,0, wenn N<sup>E</sup> zu einem höheren Anteil vorliegt, und das Einmünden in einen gemeinsamen Entfaltungsast kann dementsprechend als Anzeichen einer Verschiebung des nativen Konformerengleichgewichtes aufgrund nicht denaturierend wirkender Konzentrationen des Salzes GuHSCN zu N<sup>R</sup> hin interpretiert werden.

#### 4.3.6 Einfluss der Temperatur auf die kinetischen Stabilitätsparameter von PLA<sub>2</sub>

Die Entfaltungskonstanten von PLA<sub>2</sub> wurden unter den verschiedenen, bereits zum Einsatz gekommenen Bedingungen mittels limitierter Proteolyse im Temperaturbereich von 10 °C bis 50 °C, bei pH 4,0 bis 60 °C bestimmt. Dies bietet neben dem Vorteil der im Vergleich zu Denaturanzien höheren Temperaturresistenz speziell des Chymotrypsins die Möglichkeit, die  $\Delta G_u^\ddagger$ -Werte hinsichtlich ihrer enthalpischen und entropischen Beiträge zu analysieren.

Um einen besseren Überblick zu gewährleisten, wurden die Ergebnisse in Abbildung 4.26 A direkt aufgetragen. Die für die Auswertung relevanten Eyring-*plots* sind in Abbildung 4.26 B dargestellt. Aus der

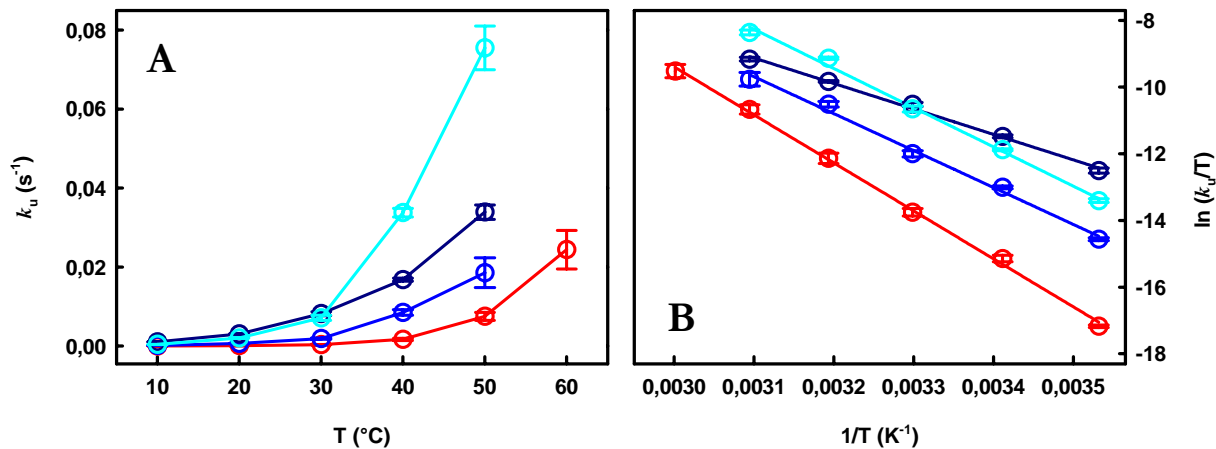


Abbildung 4.26 Temperaturabhängigkeit der Entfaltungskonstanten von PLA<sub>2</sub>. A: Direkte Auftragung der mittels limitierter Proteolyse von apoPLA<sub>2</sub> mit Pepsin bei pH 4,0 (○) und mit Proteinase K bei pH 8,0 (○) bzw. von holoPLA<sub>2</sub> mit Proteinase K (○) und Chymotrypsin (○) bei pH 8,0 bestimmten Werte von  $k_u$  gegen die Temperatur. B: Eyring-Plot der gleichen Daten. Die Farbgebung der Symbole entspricht der in Abbildung 4.25 A. Die angegebenen Fehlerbreiten basieren auf einer mit der der eigentlichen Konstanten identischen Bearbeitung der Fehlerbreiten in Abbildung 4.25 A.

direkten Auftragung (Abb. 4.26 A) ist ein offenbar exponentieller Anstieg der Entfaltungskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur erkennbar. Dies wird durch die Linearisierung der Daten mittels einer halblogarithmischen Auftragung bestätigt (nicht gezeigt). Die erhaltenen Konstanten erstrecken sich über den Bereich von  $9 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 und 10 °C) bis  $0,08 \text{ s}^{-1}$  (apoPLA<sub>2</sub>/Proteinase K bei pH 8,0 und 50 °C). Die geringste Temperaturabhängigkeit wurde für das Paar holoPLA<sub>2</sub>/Chymotrypsin gefunden. Dies wird in der Eyring-Auftragung (Abb. 4.26 B) besonders deutlich. Die Tatsache, dass das mit Chymotrypsin detektierte, wie weiter oben bereits angemerkt, höchstwahrscheinlich lokale Entfaltungsereignis sich im Gegensatz zu der mit Proteinase K verfolgten globalen Entfaltung als verhältnismäßig temperaturunabhängig erweist, deutet auf eine vom übrigen Protein vergleichsweise unabhängige Entfaltung hin. Dementsprechend kann dies als Bestätigung der bisher getätigten Annahmen bezüglich des selektiven Abbaus von PLA<sub>2</sub> durch Chymotrypsin über den N-Terminus und dessen Rolle bei der Entfaltung interpretiert werden. Die Auswertung der Eyring-Auftragung nach Gleichung 2.28 offenbarte weitere interessante Einzelheiten (Tabellen 6.14, 6.15).

Wie sich aus dem annähernd parallelen Verlauf von  $k_u$  in Abhängigkeit von  $T$  bereits andeutet, sind die Werte von  $\Delta H_u^\ddagger$  für die globale Entfaltung von apo- und holoPLA<sub>2</sub> unter Berücksichtigung der Fehlerbreiten mit  $\approx 95 \text{ kJ mol}^{-1}$  gleich. Der mit Chymotrypsin ermittelte Wert des N-terminalen Bereiches von holoPLA<sub>2</sub> ist mit  $\approx 60 \text{ kJ mol}^{-1}$  um etwa ein Drittel geringer und beträgt nur etwa die Hälfte des Wertes von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 ( $\approx 120 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Ähnlich verhält es sich mit den aus den Ordinaten-schnittpunkten ermittelten  $\Delta S_u^\ddagger$ -Werten. Die unter Verwendung der Boltzmann-Konstante bestimmten Werte (Tabelle 6.14) sind unverhältnismäßig gering; für die mit Chymotrypsin verfolgte Entfaltung des N-

Terminus ergibt sich sogar ein Entropieverlust während der Bildung des Übergangszustandes aus dem nativen. Dies würde bedeuten, dass die N-terminale  $\alpha$ -Helix im Übergangszustand geordneter vorläge als im nativ gefalteten. Wird dagegen unter Berücksichtigung der in Kapitel 2.2.4 zitierten Argumentation ein Wert von  $2,2224 \cdot 10^{-28} \text{ J K}^{-1}$  anstelle der Boltzmann-Konstante verwendet, relativieren sich die Werte (Tabelle 6.15). Der Befund, dass sich anstelle des Entropieverlustes nun ein, wenn auch mit  $\approx 25 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  sehr geringer Entropiegewinn ergibt, macht diese Daten glaubwürdiger. Gerade dieser geringe Wert, bzw. der Unterschied zu den für die globale Entfaltung berechneten Werten von rund  $109 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  bis circa  $139 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und die daraus zu entnehmende Erkenntnis, dass die N-terminale Region von holoPLA<sub>2</sub> im Vergleich zum übrigen Protein im nativen Zustand nur wenig geordneter vorliegt als im Übergangszustand, ist ein weiteres Indiz für die schon mehrfach diskutierte Rolle des N-Terminus in Struktur und Entfaltung von N<sup>E</sup>.

Diese Schlussfolgerung beruht zwar auf der Annahme, dass die geringe Entropieänderung durch eine im nativen Zustand bereits hohe absolute Entropie zustande kommt und nicht, wie theoretisch ebenso möglich, auf einer verhältnismäßig geringen absoluten Entropie des N-terminalen Bereiches im Übergangszustand basiert. Angesichts des Befundes, dass die fragliche Region in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> bereits im nativen Zustand für Chymotrypsin zugänglich ist, scheint die erstere Möglichkeit allerdings glaubwürdiger zu sein.

Die Berechnung des Wertes von  $\Delta G_u^\#$  der einzelnen Entfaltungsereignisse bei 20 °C aus den jeweiligen  $\Delta H_u^\#$ - und  $\Delta S_u^\#$ -Werten ergibt unabhängig vom jeweils betrachteten Ereignis nahezu gleiche Parameter von  $\approx 60 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Tabelle 6.15). Aufgrund der Fehlerbreite von  $\approx 5\%$  bis  $\approx 10\%$  der gefundenen Parameter scheint auch der Wert für apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0 mit  $\approx 65 \text{ kJ mol}^{-1}$  nicht signifikant nach oben abzuweichen. Angesichts der deutlichen Unterschiede der thermodynamischen Stabilität von N<sup>E</sup> und N<sup>R</sup> ist dies bemerkenswert, deutet es doch nach Gleichung 2.5 auf signifikante Unterschiede hinsichtlich  $\Delta G_f^\#$  zumindest in Abwesenheit von Denaturanzien hin, was die in Abschnitt 4.2 gezogenen Schlussfolgerungen zum Einfluss von U auf das Faltungs-/Entfaltungsverhalten in Frage stellt.

Allerdings ist dies ohne adäquate Daten zur Rückfaltung nicht zu belegen. Weiterhin ist die Vergleichs- bzw. Übertragbarkeit der Werte von  $\Delta G_u^\#$  zwischen den beiden verwendeten Systemen (An- und Abwesenheit von GuHSCN) fraglich. Beschränkt man sich auf den Vergleich der unter nativen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse (Abwesenheit von GuHSCN bzw. Anwesenheit geringer GuHSCN-Aktivitäten), wird die Betrachtung aufgrund des Gleichgewichtes zwischen N<sup>E</sup> und N<sup>R</sup> erschwert, da der derzeitige Datensatz keine Aussage bezüglich der Lage des Gleichgewichtes unter den zur HD-Austauschmessung verwendeten Bedingungen (150 mM NaCl) bei basischen pD-Werten erlaubt.

Das Zutreffen der in Abschnitt 4.2 gezogenen Schlussfolgerungen vorausgesetzt, bieten die in Kapitel 4.3.3 gezeigten, offensichtlich mehrphasigen Rückfaltungen einen weiteren Ansatz. Die gefundenen

Phasen können als lokale Umlagerungsreaktionen (*rearrangements*) des N-terminalen Bereiches angesehen werden. Dies impliziert, dass auch die den jeweiligen *rearrangements* vorausgehende globale Rückfaltung in mehreren Phasen verläuft. Unabhängig vom Charakter des Intermediates kann somit nicht mehr von einem Zweizustandsmodell ausgegangen werden, weshalb sich wiederum ohne weitere Rückfaltungsdaten Aussagen zur freien Enthalpiebarriere eines einzelnen Rückfaltungsschrittes verbieten.

Festzuhalten bleiben daher folgende Fakten: Die spektroskopisch verfolgten Entfaltungsreaktionen, besonders von apoPLA<sub>2</sub>, verlaufen im Millisekunden- bis Sekundenbereich und weitgehend denaturanzunabhängig. Aus dem Zeitverlauf des Fluoreszenzsignals kann auf die in Kapitel 4.1 diskutierte Heterogenität von N geschlossen werden. Dies wurde anhand limitierter Proteolyse mit Hilfe von Proteasen unterschiedlicher Substratpräferenzen in An- und Abwesenheit von GuHSCN bestätigt. Aus der weitgehenden Temperaturunabhängigkeit des mit Chymotrypsin verfolgten Entfaltungsereignisses geht dessen lokaler Charakter hervor.



## 5 Zusammenfassende Diskussion

Die vorliegende Arbeit widmet sich in erster Linie dem Faltungs- bzw. Entfaltungsvorgang von PLA<sub>2</sub>. Folgerichtig waren hierfür sind vorrangig Faltungs- bzw. Entfaltungsmessungen vorgesehen. Im Zuge der entsprechenden Experimente ergab sich dennoch mehrmals die Notwendigkeit, bestimmte Eigenschaften des Enzyms, wie z.B. seine Affinität zum Substrat NOB oder zum Liganden ANS auch unter strikt nativen Bedingungen zu bestimmen. Weiterhin boten verschiedene spektroskopische Eigenschaften während der Faltungs- und Entfaltungsmessungen hinreichenden Anlass, den Einfluss unterschiedlicher nicht denaturierender Bedingungen auf die native Struktur von PLA<sub>2</sub> zu untersuchen. Die resultierenden, in Abschnitt 4.1 präsentierten Daten bieten, obwohl sie ursprünglich nicht in dieser Absicht zusammengetragen wurden, einen überaus interessanten Einblick in das pH-abhängige Verhalten von PLA<sub>2</sub>.

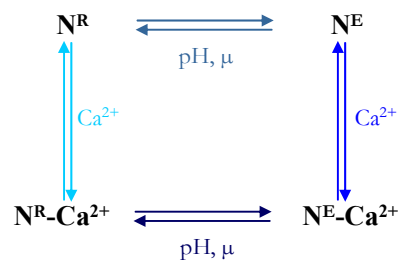
In Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt PLA<sub>2</sub> zwei verschiedene Tendenzen. Einerseits ist das Enzym bei moderat sauren pH-Werten gegen das Substrat NOB nicht aktiv. Andererseits zeigt es bei basischen pH-Werten in Gegenwart höherer Substratkonzentrationen eine Aktivierungsphase, die bei neutralem pH-Wert nicht auftritt. Ersteres wurde auf die Protonierung des für die enzymatische Aktivität essentiellen H48 und der für die Calciumbindung verantwortlichen Gruppen zurückgeführt, nicht aber auf ein Entfaltungsereignis. Letzteres wurde mit einer lokalen Konformationsänderung erklärt, die zu einer erhöhten Mischoligomerisierungscompetenz führt.

Anhand der nahezu unveränderten Affinität des Enzyms zu ANS wurde gezeigt, dass das aktive Zentrum von PLA<sub>2</sub> auch bei moderat sauren Bedingungen nativ gefaltet, zumindest aber bindungskompetent vorliegt. Aus den verschiedenen Quantenausbeuten des ANS-PLA<sub>2</sub>-Komplexes, die mit einer Spezies oder der Dissoziation des Komplexes nicht erklärbar sind, wurde auf das Vorhandensein verschiedener, jeweils pH-abhängig akkumulierter Proteinspezies geschlossen.

Zu ähnlichen Resultaten führten Messungen mittels intrinsischer Fluoreszenz und CD-Spektroskopie. Anhand der Fluoreszenz von W3 konnte bei basischen pH-Werten die Akkumulation einer Spezies mit höherer Solvensexponierung des Fluorophors verglichen mit der bei neutralen und sauren Bedingungen dominanten Form gezeigt werden. Mittels Nah-UV-CD-Spektroskopie konnte dies bestätigt werden. Die Resultate der Messungen mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie waren dagegen nicht eindeutig. Sie können ebenfalls in obigem Sinne interpretiert werden, bieten aber auch Hinweise auf eine verminderte Helizität des Proteins oder eine erhöhte Flexibilität wahrscheinlich der N-terminalen  $\alpha$ -Helix.

Trotz der noch ausstehenden Zuordnungen der NOE-Kreuzsignale lieferte die Messung der NOESY-Spektren von PLA<sub>2</sub> in Gegenwart verschiedener pH-Werte weitere Hinweise auf das Nativgleichgewicht zwischen N<sup>E</sup> und N<sup>R</sup>. So wurde für holoPLA<sub>2</sub> aus der weitgehenden Übereinstimmung der Signale höherer Intensität auf die Aufrechterhaltung der nativen globalen Struktur unter den gewählten

Bedingungen geschlossen. Dagegen konnten anhand einiger unterschiedlicher Signale, vor allem geringerer Intensität, lokale, durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  verursachte Konformationsänderungen bei pH 4,0 gezeigt werden. Interessanterweise sind jedoch die NOESY-Spektren von  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigter  $\text{PLA}_2$  bei pH 8,0 und  $\text{Ca}^{2+}$ -ungesättigter  $\text{PLA}_2$  bei pH 4,0 nahezu identisch. Vermutungen hinsichtlich einer Vergleichbarkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ - und pH-induzierten Konformationsänderungen bieten sich an, können aber derzeit noch nicht belegt werden. Die Resultate mit apo $\text{PLA}_2$  wiesen dagegen auf eine allgemein höhere Mobilität der meisten Reste hin, die ebenfalls mittels des pH-Wertes beeinflussbar zu sein scheint. Aus den gezeigten Resultaten kann das nachstehende, unter Umständen nicht vollständige, die vorliegenden Daten aber in Grundzügen beschreibende Modell erstellt werden.



**Abbildung 5.1** Schematische Darstellung des Gleichgewichtes zwischen  $\text{N}^{\text{R}}$  und  $\text{N}^{\text{E}}$  unter nativen Bedingungen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke  $\mu$ .

Wie bereits erwähnt, sind neben den nachgewiesenen, durch Reaktionspfeile dargestellten Reaktionen noch weitere vorstellbar, wie z.B. eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Umwandlung zwischen  $\text{Ca-N}^{\text{R}}$  und  $\text{N}^{\text{E}} + \text{Ca}^{2+}$ . Diese sind, wie ebenfalls erwähnt, mit den vorliegenden Daten nicht nachweisbar.

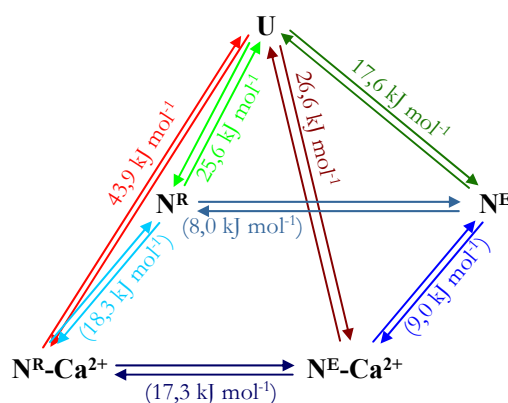
Die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität von  $\text{PLA}_2$  bei pH 8,0 in Gegenwart von  $\text{GuHCl}$  erbrachte wegen der durch die hohen  $[\text{D}]_{0,5}$ -Werte bedingten nicht erreichten für U repräsentativen Basislinien keine Stabilitätsparameter. Dies wurde mithilfe von  $\text{GuHSCN}$  als Denaturanz erreicht. Dabei wurden verhältnismäßig niedrige  $m_{\text{N} \rightarrow \text{U}}$ -Werte gefunden, was trotz der sehr hohen Halbdaturansaktivitäten zu relativ geringen  $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{U}}^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werten führt. Dies wiederum war die Motivation für eine statistische Untersuchung der Stabilitätsparameter von 138 Proteinen bezüglich einer Beziehung zwischen  $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{U}}^{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $m_{\text{N} \rightarrow \text{U}}$  und  $[\text{D}]_{0,5}$ . Als Resultat konnte eine statistisch signifikante Tendenz abnehmender  $m_{\text{N} \rightarrow \text{U}}$  mit steigenden  $[\text{D}]_{0,5}$ -Werten nachgewiesen werden.

Da im Falle der  $\text{PLA}_2$  stabile Faltungintermediate als Erklärung für dieses Verhalten ausschieden und die gefundenen Reststrukturen sich als thermodynamisch relevant erwiesen, musste die Ursache zwangsläufig in den Eigenschaften von N zu finden sein. Hierfür wurde ein hypothetisches Modell eingeführt, nach dem kleine, monomere und nach dem Zweizustandsmodell faltende Proteine in zwei Klassen eingeteilt wurden. Während „nicht resistente“ Proteine einen energetisch und strukturell scharf abgegrenzten nativen Zustand ausbildeten, der durch einen obligatorisch hohen Grad tertiärer Interaktionen stabilisiert

wird, würden „resistente“ Proteine, denen PLA<sub>2</sub> zuzurechnen wäre, einen nativen Zustand bilden, der für seine Aufrechterhaltung weniger tertiäre Interaktionen benötigt und als Konsequenz aus mehr Subkonformationen besteht, energetisch und strukturell also weniger scharf von U abgegrenzt wäre.

Interessanterweise wird dieses hypothetische Verhalten von den beiden diskutierten nativen PLA<sub>2</sub>-Spezies widerspiegelt. So konnte ein spezifischer Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von N gezeigt werden. Es sind unter moderat sauren Bedingungen, wenn ausschließlich N<sup>R</sup> vorliegt, fast alle thermodynamischen Stabilitätsparameter deutlich höher als unter basischen Bedingungen, wenn signifikante Anteile von N<sup>E</sup> populiert werden. Dieses Verhalten wurde sowohl bei der thermischen, als auch bei der GuHSCN-induzierten Entfaltung gefunden. Die Kombination thermisch und durch Denaturans induzierter Entfaltung lieferte darüber hinaus den Nachweis der das Entfaltungsgleichgewicht determinierenden Rolle von N.

Unter Einbeziehung der Resultate aus Faltungs-/Entfaltungsmessungen von PLA<sub>2</sub> im Gleichgewicht kann das in Abbildung 5.1 gezeigte Schema nunmehr zu dem in Abbildung 5.2 dargestellten Reaktionsgleichgewicht erweitert werden. In diesem Schema wurde die Annahme impliziert, dass der Komplex aus Ca<sup>2+</sup> und PLA<sub>2</sub> vollständig dissoziiert vorliegt, wenn letztere entfaltet ist. Weiterhin wurde zur Vereinfachung eine jeweils vollständige Entfaltung zu einem einheitlichen entfalteten Zustand U angenommen.



**Abbildung 5.2** Schematische Darstellung des Gleichgewichtes zwischen N<sup>R</sup>, N<sup>E</sup> und U. Das in Abbildung 5.1 dargestellte Gleichgewicht nativer Spezies wurde um einen gemeinsamen entfalteten Zustand U erweitert. Den einzelnen Teilgleichgewichten wurde der Wert ihrer freien Enthalpien zugeordnet. Hierfür sind die entsprechenden Werte und Reaktionspfeile jeweils in der gleichen Farbe dargestellt. Alle  $\Delta G_{N \rightarrow U}^{\text{H}_2\text{O}}$ -Werte entstammen GuHSCN-induzierten Übergangskurven (Tab. 6.12). Die in Klammern gesetzten Werte wurden unter Annahme einer Nullsumme im jeweiligen thermodynamischen Zyklus berechnet.

Die strikte Trennung der Entfaltungsgleichgewichte von apo- und holoPLA<sub>2</sub> ist dagegen durch den Befund gerechtfertigt, dass Ca<sup>2+</sup> bis zur Entfaltung gebunden vorliegt. Die erhaltenen Resultate von holoPLA<sub>2</sub> konnten durch HD-Austausch, der mittels Protonen-NMR verfolgt wurde, bestätigt werden. Dies betrifft sowohl die Anwendung des Zweizustandsmodells unter Nichtberücksichtigung stabiler Reststrukturen als auch die gefundene pH-Abhängigkeit der thermodynamischen Stabilität.

Manuell gestartete, spektroskopisch verfolgte kinetische Messungen der Ent- und Rückfaltung von PLA<sub>2</sub> führten zu dem Erkenntnis, dass die anhand der Signale von W3 detektierbaren Konformationsänderungen zu schnell stattfinden, um mittels manueller Mischtechniken verfolgt werden zu können. Die daraufhin durchgeführten Messungen mithilfe von *stopped-flow*-Fluoreszenz führten zwar zu keinem verwertbaren Ergebnis hinsichtlich globaler Entfaltungs- und Rückfaltungskonstanten, demonstrierten aber wieder den Einfluss des pH-Wertes auf die Struktur von PLA<sub>2</sub>. Die Progresskurven der Entfaltung von PLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 durchlaufen unabhängig von der Anwesenheit des Cofaktors Ca<sup>2+</sup> ein Maximum, welches bei pH 4,0 nicht nachgewiesen werden konnte. Der grundsätzliche Verlauf der Rückfaltung war dagegen in allen Fällen gleich. Dagegen wurde sowohl für die Ent- als auch für die Rückfaltung von PLA<sub>2</sub> ein starker Einfluss von CaCl<sub>2</sub> auf die Geschwindigkeit einzelner Teilreaktionen gefunden. Auch wenn die zeitabhängigen Fluoreszenzsignale, besonders der Rückfaltung, die Annahme nahe legten, dass ein beträchtlicher Teil der mittels Tryptophanfluoreszenz verfolgbaren Reaktionen bereits außerhalb des mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz erfassbaren Zeitfensters stattfindet, kann aus der verhältnismäßig geringen Abhängigkeit der bestimmten Geschwindigkeitskonstanten auf einen lokalen Charakter der von der jeweiligen Faltungs- bzw. Entfaltungsreaktion betroffenen Strukturregion um W3 geschlossen werden.

Besonders dieser Befund konnte anhand der mittels limitierter Proteolyse verfolgten Entfaltungsstudien bestätigt werden. Mithilfe dieser Technik und dem gezielten Einsatz von Proteasen verschiedener Substratspezifität war es möglich, zwischen globalen und lokalen Entfaltungsreaktionen zu unterscheiden. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der globalen Entfaltungsreaktion bei verschiedenen pH-Werten und in Gegenwart steigender Denaturanskonzentrationen erlaubte die gezogenen Schlussfolgerungen bezüglich des Einflusses von Salzen auf die Stabilität von N<sup>R</sup> und N<sup>E</sup> und auch auf das Gleichgewicht zwischen beiden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte einigen interessanten Fragestellungen nicht nachgegangen werden. So wäre die Aufklärung der Rolle von N<sup>R</sup> und N<sup>E</sup> während des eigentlichen Entfaltungsvorganges von besonderem Interesse. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Frage, ob die zweifelsfrei vorhandenen transienten Intermediate der Entfaltung der einen mit der jeweils anderen nativen Spezies identisch sind. Die Rückfaltung von PLA<sub>2</sub> aus dem GuHSCN-induzierten entfalteten Zustand ist ebenfalls noch mit vielen Fragezeichen behaftet. Eine Möglichkeit, diese noch offenen Fragen zu beantworten, ist möglicherweise in der Herstellung und Untersuchung einer Variante zu sehen, in der das Tryptophan 3 beispielsweise gegen Phenylalanin ausgetauscht würde. Unter der Voraussetzung, dass sich das Verhalten dieser Variante gegenüber dem des Wildtypenzym nicht grundsätzlich ändert, erscheinen besonders Messungen ohne den in der Praxis erwiesenermaßen störenden Einfluss des alle UV/Vis, CD- und Fluoreszenzsignale von PLA<sub>2</sub> dominierenden Tryptophanrestes von W3 vielversprechend. Besonders dieser Rest befindet sich zwar exakt in der Region, die für die besprochenen lokalen Konformationsänderungen von Bedeutung zu sein scheint, beeinträchtigt aber aufgrund der

angesprochenen Dominanz aller optischen Signale Messungen der globalen Faltung/Entfaltung mittels spektroskopischer Techniken erheblich. Entfaltungsstudien der erwähnten Tryptophanvariante mittels limitierter Proteolyse, speziell mit Chymotrypsin, könnten die aus den Experimenten mit dem Wildtypenzym gezogenen Schlussfolgerungen verifizieren. Desweiteren bietet die Messung von NMR-Spektren  $^{15}\text{N}$ -markierter  $\text{PLA}_2$  sowie auch des HD-Austausches mittels schneller Mischtechniken noch viele interessante Möglichkeiten, das Nativgleichgewicht und das Faltungs- bzw. Entfaltungsverhalten von  $\text{PLA}_2$  näher zu charakterisieren.

Ungeachtet dieser noch offenen Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch einige interessante Resultate gefunden. Der Einfluss des pH-Wertes auf lokale Strukturbereiche von  $\text{PLA}_2$  wurde hinsichtlich seiner strukturellen und funktionellen Konsequenzen bestimmt. Die Kombination diverser Techniken zur Messung von Faltung/Entfaltung im Gleichgewicht und in Verbindung mit einer statistischen Analyse erlaubte Aussagen einerseits zur Anwendbarkeit des Zweizustandsmodells auf die Evaluation des Entfaltungsgleichgewichtes von  $\text{PLA}_2$  und hinsichtlich der Auswirkungen der erwähnten lokalen Strukturbereiche auf die globale Stabilität des Enzyms. Mithilfe kinetischer Messungen konnten diese Aussagen trotz der durch das Signal von W3 bedingten Limitationen zum großen Teil bestätigt werden.

## 6. Tabellarischer Anhang

### 6.1. Einfluss des pH-Wertes auf native PLA<sub>2</sub>

**Tabelle 6.1** apparente Aktivitätsparameter von PLA<sub>2</sub> in Gegenwart verschiedener GuHSCN-Konzentrationen. Die angegebenen Fehlerbreiten repräsentieren die aus der hyperbolen Anpassung resultierenden Standardfehler.

[GuHSCN] (M)	$K_{D^*}$ (mM)	$\nu_{\max}$ ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
0,0	$0,61 \pm 0,07$	$228,50 \pm 18,43$
0,1	$0,74 \pm 0,04$	$257,59 \pm 7,30$
0,3	$0,91 \pm 0,07$	$285,33 \pm 12,41$
0,9	$1,18 \pm 0,14$	$128,90 \pm 7,66$
1,4	$0,70 \pm 0,10$	$40,89 \pm 3,28$

**Tabelle 6.2** Apparente Aktivitätsparameter von holoPLA<sub>2</sub> in Gegenwart verschiedener pH-Werte. Die angegebenen Fehlerbreiten geben die aus der nichtlinearen Anpassung nach Gleichung 4.1 resultierenden Standardfehler wieder. Die Ober- und Untergrenzen der jeweils möglichen Maximalgeschwindigkeiten wurden manuell definiert.

pH	$\nu_{\max 1}$ ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_1$ (mM)	$\nu_{\max 2}$ ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_2$ (mM)	n
5	9,6	$0,29 \pm 0,07$	-	-	-
6	113,1	$0,30 \pm 0,03$	-	-	-
7	163,6	$0,24 \pm 0,21$	186,6	$0,53 \pm 0,02$	9
8	160,8	$0,37 \pm 0,16$	216,7	$0,55 \pm 0,01$	9
9	216,7	$0,69 \pm 0,72$	380,7	$0,66 \pm 0,01$	7

**Tabelle 6.3** Apparente Bindungsparameter von apoPLA<sub>2</sub> und ANS bei verschiedenen pH-Werten. Die angegebenen Fehlerbreiten repräsentieren die aus der nichtlinearen Anpassung nach Gleichung 4.1 resultierenden Standardfehler. Die maximale Fluoreszenzemission wurde auf den Wert bei pH 8,0 normiert.

pH	$K_{D^*}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\text{RF}_{\max} / \Delta\text{RF}_{\max}(\text{pH } 8,0)$
10,5	$22,1 \pm 3,8$	$0,61 \pm 0,04$
8,0	$16,8 \pm 2,2$	$1,00 \pm 0,04$
4,5	$16,3 \pm 2,8$	$0,89 \pm 0,05$
2,1	$18,3 \pm 3,4$	$2,33 \pm 0,17$

## 6.2 Thermodynamische Stabilitätsparameter von PLA<sub>2</sub>

**Tabelle 6.4** Stabilitätsparameter der CD-spektroskopisch verfolgten, thermisch induzierten Entfaltung von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,0. Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

[GuHCl] (M)	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
1	353,2 ± 0,7	262,5 ± 21,2	743,2 ± 80,8
2	346,4 ± 0,7	249,0 ± 22,3	718,8 ± 89,6
3	342,2 ± 0,6	215,1 ± 18,0	628,6 ± 83,7
4	335,4 ± 0,6	187,9 ± 15,6	557,5 ± 83,0
5	325,5 ± 0,7	165,8 ± 16,6	509,4 ± 100,1

**Tabelle 6.5** Stabilitätsparameter der UV-spektroskopisch verfolgten, thermisch induzierten Entfaltung von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 6,0. Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

[GuHCl] (M)	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
1	352,2 ± 1,5	208,6 ± 19,3	592,3 ± 92,6
2	346,0 ± 0,6	203,3 ± 11,1	587,6 ± 54,6
3	341,7 ± 0,4	195,0 ± 7,3	570,7 ± 37,5
4	334,7 ± 0,3	171,7 ± 6,2	513,0 ± 36,1
5	323,8 ± 0,4	159,0 ± 8,6	491,0 ± 54,1

**Tabelle 6.6** Stabilitätsparameter der CD-spektroskopisch verfolgten, thermisch induzierten Entfaltung von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0. Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

[GuHCl] (M)	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
1	347,1 ± 1,0	187,3 ± 20,6	539,6 ± 110,0
2	341,9 ± 0,7	168,5 ± 12,0	492,8 ± 71,3
3	336,0 ± 0,7	148,8 ± 12,3	442,9 ± 82,7
4	330,8 ± 0,9	120,4 ± 9,5	364,0 ± 79,0
5	323,7 ± 1,0	105,4 ± 11,3	325,6 ± 107,3

**Tabelle 6.7** Stabilitätsparameter der CD-spektroskopisch verfolgten, thermisch induzierten Entfaltung von apoPLA<sub>2</sub> in Gegenwart von 5 M GuHCl in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

pH	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
5	327,7 ± 0,9	150,8 ± 18,5	460,2 ± 122,7
7	325,0 ± 1,1	104,3 ± 12,0	320,1 ± 115,1
9	320,2 ± 1,7	99,2 ± 13,2	309,8 ± 133,2
10	312,0 ± 3,8	71,4 ± 13,4	228,9 ± 188,1

**Tabelle 6.8** Stabilitätsparameter der UV-spektroskopisch verfolgten, Temperatur-induzierten Entfaltung von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 6,0. Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

[GuHCl] (M)	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
1	352,1 ± 0,4	364,6 ± 21,8	1035,2 ± 59,8
2	347,8 ± 0,7	299,6 ± 27,6	861,4 ± 92,2
3	342,3 ± 0,4	291,0 ± 17,9	850,1 ± 61,5
4	337,5 ± 0,2	232,1 ± 5,2	687,7 ± 22,4
5	330,5 ± 0,3	222,4 ± 9,2	672,9 ± 41,4

**Tabelle 6.9** Stabilitätsparameter der CD-spektroskopisch verfolgten, Temperatur-induzierten Entfaltung von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0. Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

[GuHCl] (M)	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
2,5	343,4 ± 0,4	229,2 ± 16,6	667,4 ± 72,4
3	340,5 ± 0,4	292,0 ± 26,2	857,6 ± 89,7
3,5	337,6 ± 0,3	227,8 ± 14,1	676,0 ± 61,9
4	335,6 ± 0,4	217,8 ± 15,7	649,0 ± 72,1
5	331,7 ± 0,4	180,1 ± 11,3	543,0 ± 62,8



**Tabelle 6.10** Stabilitätsparameter der CD-spektroskopisch verfolgten, Temperatur-induzierten Entfaltung von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 10,0. Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

[GuHCl] (M)	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
1	341,4 ± 0,8	296,5 ± 50,7	868,8 ± 171,0
2	339,0 ± 0,5	262,5 ± 25,5	744,3 ± 97,1
3	335,6 ± 0,5	230,2 ± 22,9	685,9 ± 99,5
4	329,1 ± 0,5	208,1 ± 19,4	632,3 ± 93,2
5	311,4 ± 1,3	179,6 ± 34,5	576,8 ± 192,1

**Tabelle 6.11** Stabilitätsparameter der CD-spektroskopisch verfolgten, thermisch induzierten Entfaltung von holoPLA<sub>2</sub> in Gegenwart von 5 M GuHCl in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

pH	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
7	336,9 ± 0,4	237,1 ± 18,6	703,8 ± 78,5
9	327,9 ± 0,4	163,3 ± 10,0	498,0 ± 61,3

**Tabelle 6.12** Thermodynamische Stabilitätsparameter der GuHSCN-induzierten Entfaltung von PLA<sub>2</sub> bzw. von bvPLA<sub>2</sub> (letzte Zeile). Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

Bedingung	[D] <sub>1/2</sub> (M)	$m_{N \rightarrow U}$ (kJ M <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
10 mM EDTA; pH 8,0	1,8 ± 0,1	9,8 ± 0,6	17,6 ± 0,6
25 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 8,0	2,0 ± 0,1	13,3 ± 1,0	26,6 ± 1,0
2 mM EDTA; pH 4,0	1,8 ± 0,1	14,2 ± 0,8	25,6 ± 0,8
25 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 4,0	1,9 ± 0,1	18,5 ± 1,6	35,2 ± 1,6
500 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 4,0	2,1 ± 0,1	20,9 ± 1,5	43,9 ± 1,5
10 mM EDTA; pH 8,0	1,1 ± 0,1	32,2 ± 3,1	35,2 ± 3,1

### 6.3 Entfaltungskonstanten von PLA<sub>2</sub>

**Tabelle 6.13** Mittels limitierter Proteolyse bestimmte Entfaltungskonstanten von PLA<sub>2</sub>. Die angegebenen Fehlerbreiten geben die aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardfehler wieder. Die nach den verwendeten Proteasen angeführten in Klammern stehenden Zahlen geben den jeweils vorliegenden pH-Wert an.

Protease	$k_u(\text{apoPLA}_2)$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$k_u(\text{holoPLA}_2)$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )
Proteinase K (8,0)	$2,02 \pm 0,06$	$0,66 \pm 0,03$
Trypsin (8,0)	$2,03 \pm 0,14$	$1,26 \pm 0,06$
Chymotrypsin (8,0)	-	$3,14 \pm 0,13$
Pepsin (4,0)	$0,08 \pm 0,01$	-

**Tabelle 6.14** Kinetische Stabilitätsparameter von PLA<sub>2</sub>. Die Reaktionsenthalpie- und -entropieänderungen wurden nach Gleichung 2.28 aus der Temperaturabhängigkeit von  $k_u$  bestimmt. Die freien Enthalpieänderungen wurden nach Gleichung 2.3 berechnet. Die angegebenen Fehlerbreiten repräsentieren die Standardfehler, die mittels Berechnung der Fehlerfortpflanzung aus den durch die lineare Regression erhaltenen Fehlern entstanden.

Paarung	$\Delta H_u^\#$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_u^\#$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G_u^\#$ (20°C) (kJ mol <sup>-1</sup> )
apoPLA <sub>2</sub> /Proteinase K	$97,9 \pm 4,1$	$37,1 \pm 13,6$	$87,0 \pm 5,7$
holoPLA <sub>2</sub> /Proteinase K	$92,2 \pm 4,4$	$7,7 \pm 14,5$	$89,9 \pm 6,1$
holoPLA <sub>2</sub> /Chymotrypsin	$63,6 \pm 2,3$	$-76,4 \pm 7,4$	$86,0 \pm 3,3$
apoPLA <sub>2</sub> /Pepsin	$119,7 \pm 2,5$	$83,6 \pm 8,0$	$95,2 \pm 3,4$

**Tabelle 6.15** Kinetische Stabilitätsparameter von PLA<sub>2</sub>. Die Reaktionsenthalpie- und -entropieänderungen wurden nach Gleichung 2.28 aus der Temperaturabhängigkeit von  $k_u$  bestimmt. Die freien Enthalpieänderungen wurden nach Gleichung 2.3 berechnet. Die angegebenen Fehlerbreiten repräsentieren die Standardfehler, die mittels Berechnung der Fehlerfortpflanzung aus den durch die lineare Regression erhaltenen Fehlern entstanden. Die mit „\*“ gekennzeichneten Werte entstanden unter Verwendung von  $2,2224 \cdot 10^{-28} \text{ J K}^{-1}$  anstelle der Boltzmann-Konstante (siehe Kapitel 2.2.4).

Paarung	$\Delta H_u^\#$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_u^\#$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )*	$\Delta G_u^\#$ (20°C) (kJ mol <sup>-1</sup> )
apoPLA <sub>2</sub> /Proteinase K	$97,9 \pm 4,1$	$138,5 \pm 13,6$	$57,3 \pm 5,7$
holoPLA <sub>2</sub> /Proteinase K	$92,2 \pm 4,4$	$109,1 \pm 14,5$	$60,2 \pm 6,1$
holoPLA <sub>2</sub> /Chymotrypsin	$63,6 \pm 2,3$	$25,0 \pm 7,4$	$56,2 \pm 3,3$
apoPLA <sub>2</sub> /Pepsin	$119,7 \pm 2,5$	$185,0 \pm 8,0$	$65,5 \pm 3,4$

## 6.4 NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub>

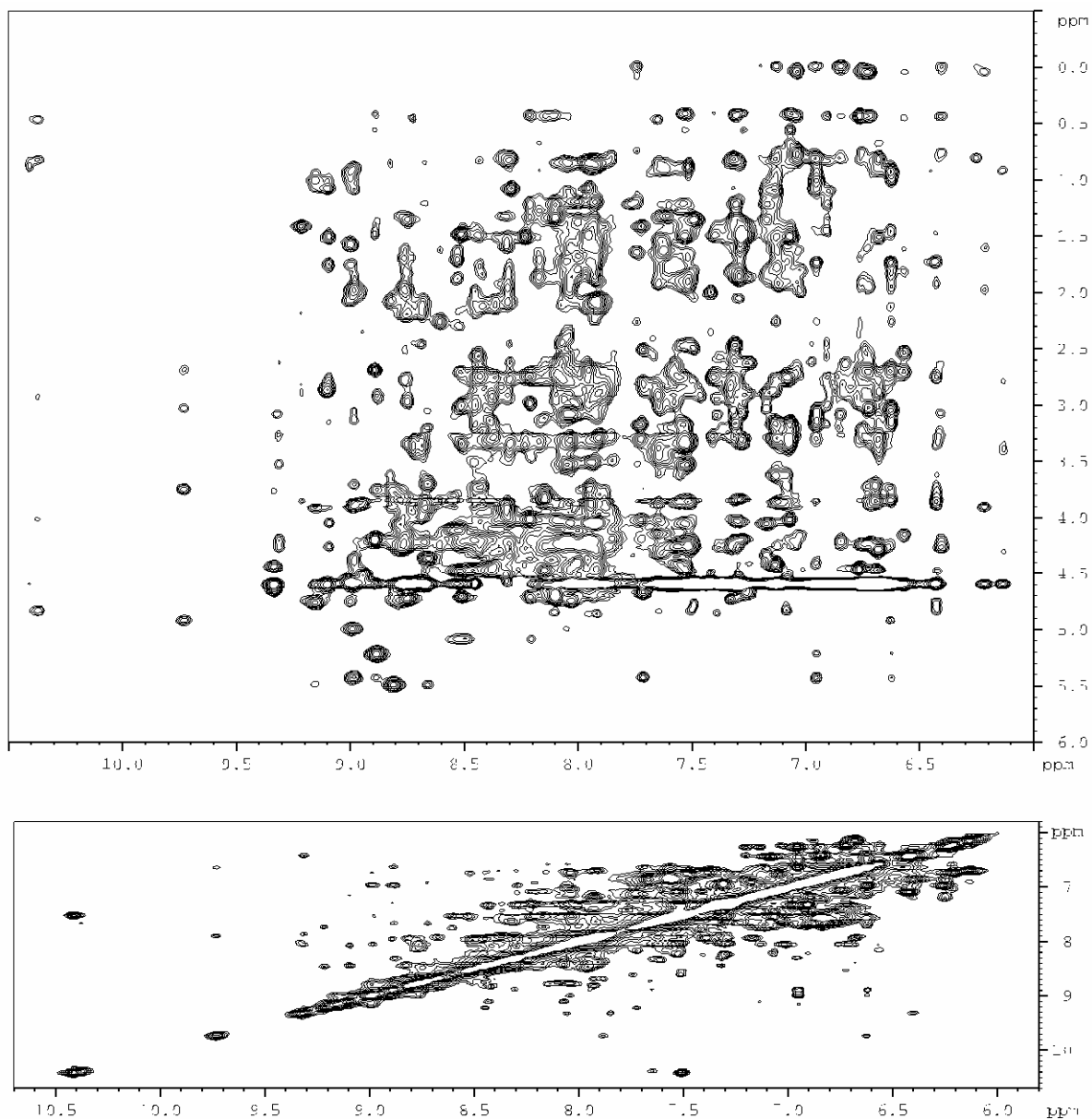
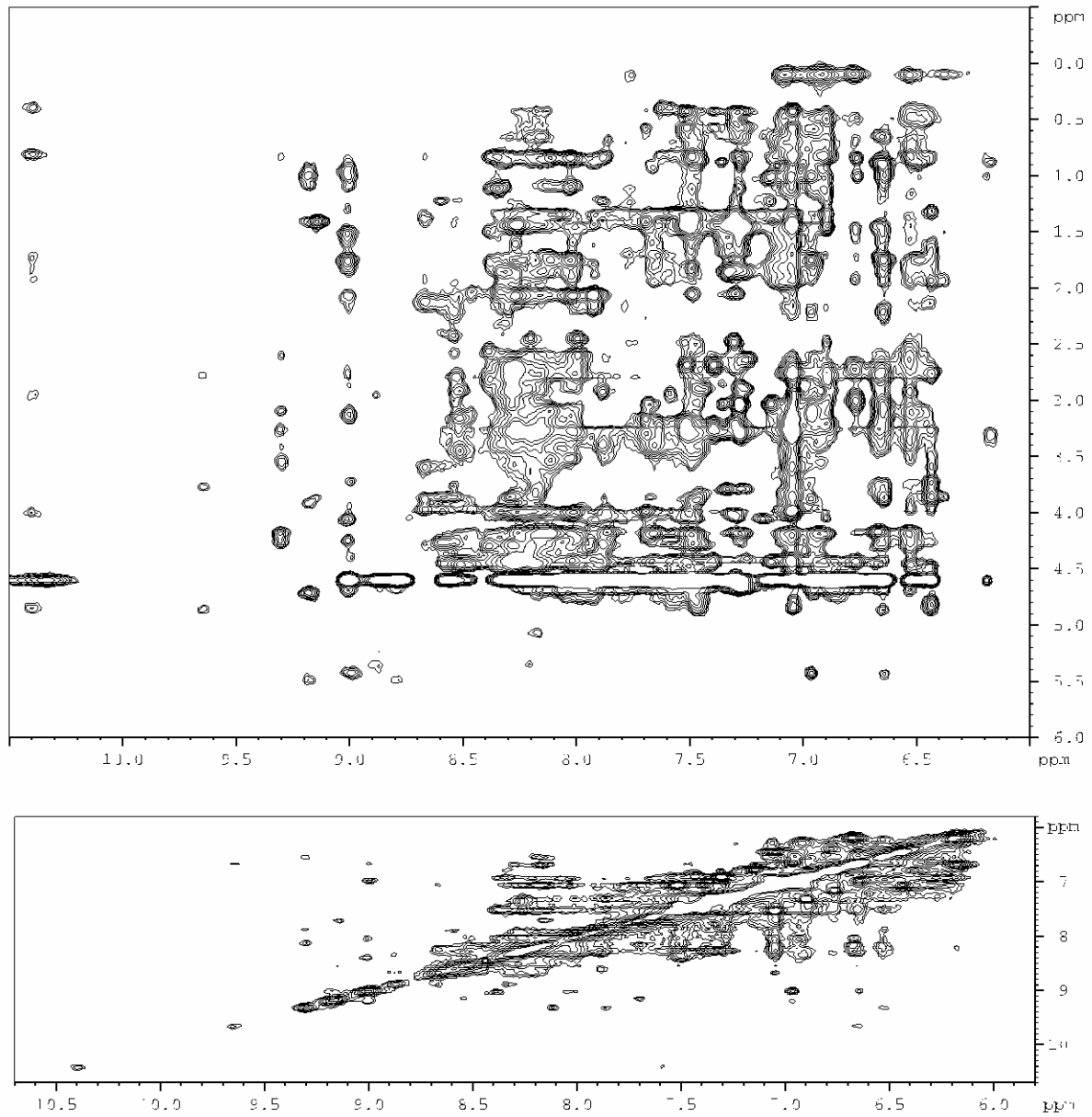


Abbildung 6.1 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,3 in Gegenwart von 2 mM EDTA. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.



**Abbildung 6.2** Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von apoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 in Gegenwart von 2 mM EDTA. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

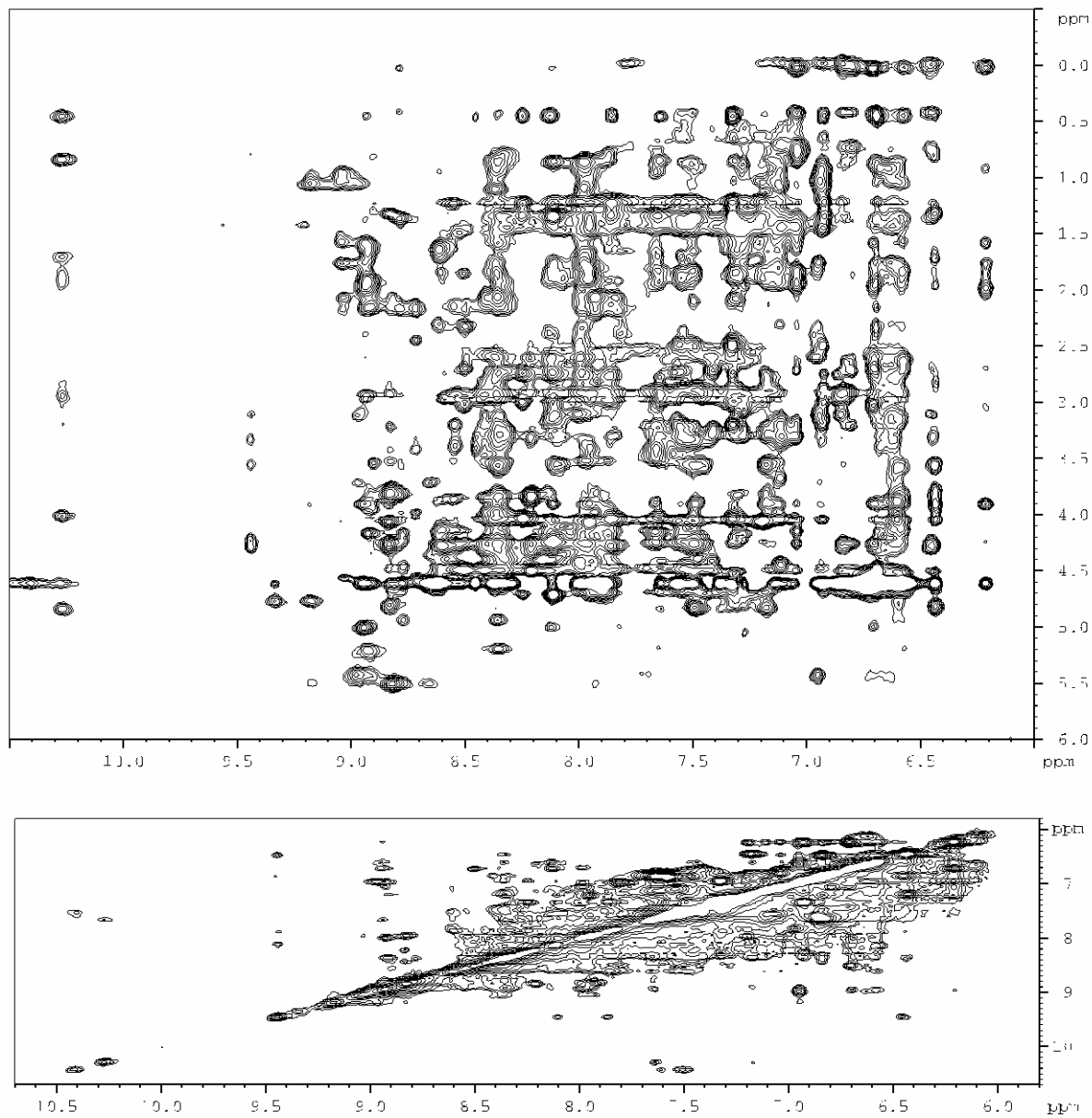


Abbildung 6.3 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von PLA<sub>2</sub> bei pH 4,3 in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

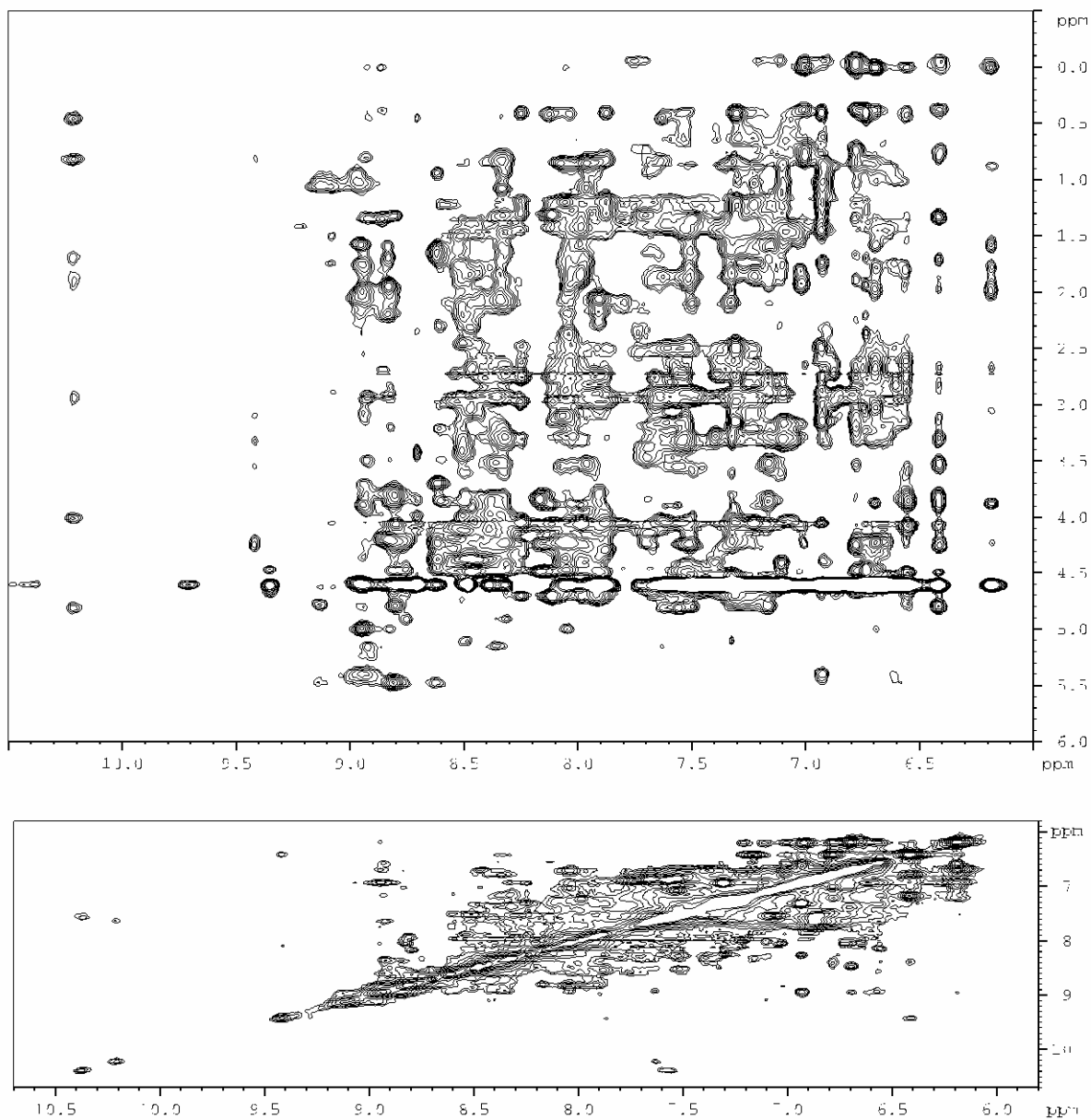


Abbildung 6.4 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 4,3 in Gegenwart von 500 mM CaCl<sub>2</sub>. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

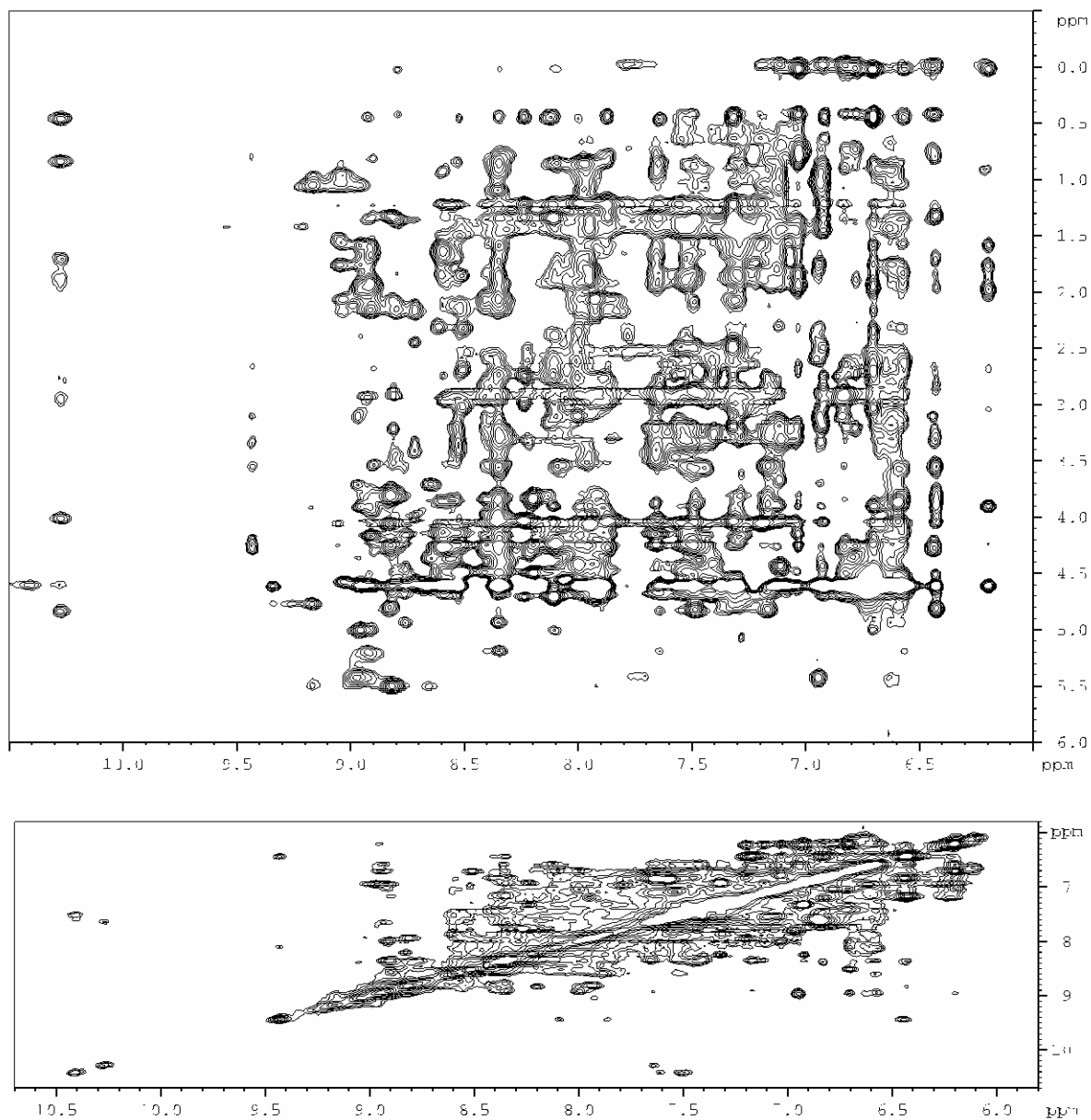


Abbildung 6.5 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von holoPLA<sub>2</sub> bei pH 8,0 in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

## Literaturverzeichnis

1. Markert, Y. (2005). Gewinnung und gentechnische Modifizierung einer rekombinanten Phospholipase A2 zur industriellen Anwendung. *Dissertation vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
2. Janssen, M. J., Verheij, H. M., Slotboom, A. J. & Egmond, M. R. (1999). Engineering the disulphide bond patterns of secretory phospholipases A2 into porcine pancreatic isozyme. The effects on folding, stability and enzymatic properties. *Eur J Biochem* 261, 197-207.
3. Pickersgill, R. W., Sumner, I. G., Collins, M. E., Warwicker, J., Perry, B., Bhat, K. M. & Goodenough, P. W. (1991). Modification of the stability of phospholipase A2 by charge engineering. *FEBS Lett* 281, 219-22.
4. Goodenough, P. W., Bhat, K. M., Collins, M. E., Perry, B. N., Pickersgill, R. W., Sumner, I. G., Warwicker, J., de Haas, G. H. & Verheij, H. M. (1991). Changes in activity of porcine phospholipase A2 brought about by charge engineering of a major structural element to alter stability. *Protein Eng* 4, 929-34.
5. Janssen, M. J., van de Wiel, W. A., Beiboer, S. H., van Kampen, M. D., Verheij, H. M., Slotboom, A. J. & Egmond, M. R. (1999). Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Eng* 12, 497-503.
6. Dupureur, C. M., Yu, B. Z., Jain, M. K., Noel, J. P., Deng, T., Li, Y., Byeon, I. J. & Tsai, M. D. (1992). Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of highly conserved active site residues tyrosine-52 and tyrosine-73. *Biochemistry* 31, 6402-13.
7. Annand, R. R., Kontoyianni, M., Penzotti, J. E., Dudler, T., Lybrand, T. P. & Gelb, M. H. (1996). Active site of bee venom phospholipase A2: the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87. *Biochemistry* 35, 4591-601.
8. Lee, B. I., Yoon, E. T. & Cho, W. (1996). Roles of surface hydrophobic residues in the interfacial catalysis of bovine pancreatic phospholipase A2. *Biochemistry* 35, 4231-40.
9. Kölbel, K. (2002). Studien zur Konformationsstabilität zweier sekretorischer Phospholipasen A2. *Diplomarbeit.*
10. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-30.
11. Jaswal, S. S., Sohl, J. L., Davis, J. H. & Agard, D. A. (2002). Energetic landscape of alpha-lytic protease optimizes longevity through kinetic stability. *Nature* 415, 343-6.
12. Baker, D. & Agard, D. A. (1994). Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry* 33, 7505-9.
13. Fersht, A. (1999). Structure and Mechanism in Protein Science: Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. *W.H. Freeman & Co Ltd, New York.*
14. Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* 131, 266-80.
15. Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* 4, 2138-48.
16. Eftink, M. R. & Ionescu, R. (1997). Thermodynamics of protein unfolding: questions pertinent to testing the validity of the two-state model. *Biophysical Chemistry* 64, 175-197.
17. Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063-8.
18. Pace, C. N. & Shaw, K. L. (2000). Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins Suppl* 4, 1-7.
19. Eftink, M. R. & Shastry, M. C. (1997). Fluorescence methods for studying kinetics of protein-folding reactions. *Methods Enzymol* 278, 258-86.
20. Clarke, J. & Fersht, A. R. (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry* 32, 4322-9.
21. Privalov, P. L. & Potekhin, S. A. (1986). Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol* 131, 4-51.



22. Privalov, P. L. & Makhatadze, G. I. (1992). Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding. *J Mol Biol* 224, 715-23.
23. Makhatadze, G. I. & Privalov, P. L. (1992). Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *J Mol Biol* 226, 491-505.
24. Pace, C. N., Hebert, E. J., Shaw, K. L., Schell, D., Both, V., Krajcikova, D., Sevcik, J., Wilson, K. S., Dauter, Z., Hartley, R. W. & Grimsley, G. R. (1998). Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. *J Mol Biol* 279, 271-86.
25. Pace, C. N. & Laurents, D. V. (1989). A new method for determining the heat capacity change for protein folding. *Biochemistry* 28, 2520-5.
26. Eftink, M. R. & Ramsay, G. D. (1997). Studies of the unfolding of an unstable mutant of staphylococcal nuclease: evidence for low temperature unfolding and compactness of the high temperature unfolded state. *Proteins* 28, 227-40.
27. Lumry, R. & Biltonen, R. (1966). Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4, 917-44.
28. Creighton, T. E. e. (1992). Protein Folding. *W.H. Freeman & Co Ltd, New York*, 197-241.
29. Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *Extrait du Journal de Chimie Physique* 65, 44-45.
30. Levinthal, C. (1969). How to fold graciously. *Mössbaun Spectroscopy in Biological Systems Proceedings University of Illinois Bulletin* 67, 22-24.
31. Dill, K. A. (1999). Polymer principles and protein folding. *Protein Sci* 8, 1166-80.
32. Ozkan, S. B., Dill, K. A. & Bahar, I. (2002). Fast-folding protein kinetics, hidden intermediates, and the sequential stabilization model. *Protein Sci* 11, 1958-70.
33. Wagner, C. & Kiefhaber, T. (1999). Intermediates can accelerate protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6716-21.
34. Wildegger, G. & Kiefhaber, T. (1997). Three-state model for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate. *J Mol Biol* 270, 294-304.
35. Bachmann, A. & Kiefhaber, T. (2001). Apparent two-state tendamistat folding is a sequential process along a defined route. *J Mol Biol* 306, 375-86.
36. Baldwin, R. L. (1996). On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Fold Des* 1, R1-8.
37. Nölting, B. (2005). Protein Folding Kinetics Biophysical Methods. *SPRINGER, BERLIN*.
38. Utiyama, H. & Baldwin, R. L. (1986). Kinetic mechanisms of protein folding. *Methods Enzymol* 131, 51-70.
39. Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990). Folding of ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry* 29, 3053-61.
40. Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990). Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions. *Biochemistry* 29, 3061-70.
41. Schönbrunner, N., Koller, K. P. & Kiefhaber, T. (1997). Folding of the disulfide-bonded beta-sheet protein tendamistat: rapid two-state folding without hydrophobic collapse. *J Mol Biol* 268, 526-38.
42. Bisswanger, H. (1994). Enzymkinetik Theorie und Methoden. *VCH Weinheim*.
43. Buchner, J. K., Thomas. (2004). Protein Folding Handbook. *Wiley-VCH, Weinheim*.
44. Krishna, M. M., Hoang, L., Lin, Y. & Englander, S. W. (2004). Hydrogen exchange methods to study protein folding. *Methods* 34, 51-64.
45. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* 17, 75-86.
46. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. (1994). Protein stability parameters measured by hydrogen exchange. *Proteins* 20, 4-14.
47. Bai, Y., Sosnick, T. R., Mayne, L. & Englander, S. W. (1995). Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange. *Science* 269, 192-7.
48. Hubbard, S. J. (1998). The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim Biophys Acta* 1382, 191-206.
49. Imoto, T., Yamada, H. & Ueda, T. (1986). Unfolding rates of globular proteins determined by kinetics of proteolysis. *J Mol Biol* 190, 647-9.
50. Park, C. & Marqusee, S. (2004). Probing the high energy states in proteins by proteolysis. *J Mol Biol* 343, 1467-76.

51. Six, D. A. & Dennis, E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1488, 1-19.
52. Verheij, H. M. & de Haas, G. H. (1991). Cloning, expression, and purification of porcine pancreatic phospholipase A2 and mutants. *Methods Enzymol* 197, 214-23.
53. Nevalainen, T. J., Haapamaki, M. M. & Gronroos, J. M. (2000). Roles of secretory phospholipases A(2) in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta* 1488, 83-90.
54. Yedgar, S., Lichtenberg, D. & Schnitzer, E. (2000). Inhibition of phospholipase A(2) as a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1488, 182-7.
55. Buckland, A. G. & Wilton, D. C. (2000). The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2). *Biochim Biophys Acta* 1488, 71-82.
56. Beers, S. A., Buckland, A. G., Koduri, R. S., Cho, W., Gelb, M. H. & Wilton, D. C. (2002). The antibacterial properties of secreted phospholipases A2: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. *J Biol Chem* 277, 1788-93.
57. Murakami, M., Nakatani, Y., Kuwata, H. & Kudo, I. (2000). Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A(2)s. *Biochim Biophys Acta* 1488, 159-66.
58. McIntosh, J. M., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Dooley, D. J., Stoehr, S. J., Giordani, A. B., Naisbitt, S. R. & Olivera, B. M. (1995). Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J Biol Chem* 270, 3518-26.
59. Sosa, B. P., Alagon, A. C., Martin, B. M. & Possani, L. D. (1986). Biochemical characterization of the phospholipase A2 purified from the venom of the Mexican beaded lizard (*Heloderma horridum horridum* Wiegmann). *Biochemistry* 25, 2927-33.
60. Gomez, F., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Herzog, R., Rathe, J., Stievenart, M., Winand, J. & Christophe, J. (1989). Purification and characterization of five variants of phospholipase A2 and complete primary structure of the main phospholipase A2 variant in *Heloderma suspectum* (Gila monster) venom. *Eur J Biochem* 186, 23-33.
61. Shipolini, R. A., Callewaert, G. L., Cottrell, R. C. & Vernon, C. A. (1974). The amino-acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A2 from bee venom. *Eur J Biochem* 48, 465-76.
62. Nicolas, J. P., Lin, Y., Lambeau, G., Ghomashchi, F., Lazdunski, M. & Gelb, M. H. (1997). Localization of structural elements of bee venom phospholipase A2 involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J Biol Chem* 272, 7173-81.
63. Verheij, H. M., Slotboom, A. J. & de Haas, G. H. (1981). Structure and function of phospholipase A2. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 91, 91-203.
64. Sugiyama, M., Ohtani, K., Izuhara, M., Koike, T., Suzuki, K., Imamura, S. & Misaki, H. (2002). A novel prokaryotic phospholipase A2. Characterization, gene cloning, and solution structure. *J Biol Chem* 277, 20051-8.
65. Wang, B., Lu, D., Gao, R., Yang, Z., Cao, S. & Feng, Y. (2004). A novel phospholipase A2/esterase from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Protein Expr Purif* 35, 199-205.
66. Snijder, H. J. & Dijkstra, B. W. (2000). Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochim Biophys Acta* 1488, 91-101.
67. Matoba, Y., Katsube, Y. & Sugiyama, M. (2002). The crystal structure of prokaryotic phospholipase A2. *J Biol Chem* 277, 20059-69.
68. Ambrosio, A. L., Nonato, M. C., de Araujo, H. S., Arni, R., Ward, R. J., Ownby, C. L., de Souza, D. H. & Garratt, R. C. (2005). A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change. *J Biol Chem* 280, 7326-35.
69. Cintra, A. C., Marangoni, S., Oliveira, B. & Giglio, J. R. (1993). Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J Protein Chem* 12, 57-64.
70. da Silva Giotto, M. T., Garratt, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., Giglio, J. R., Cintra, A. C., de Azevedo, W. F., Jr., Arni, R. K. & Ward, R. J. (1998). Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. *Proteins* 30, 442-54.
71. Valentin, E. & Lambeau, G. (2000). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1488, 59-70.

72. Finzel, B. C., Ohlendorf, D. H., Weber, P. C. & Salemme, F. R. (1991). An independent crystallographic refinement of porcine phospholipase A2 at 2.4 Å resolution. *Acta Crystallogr B* 47 (Pt 4), 558-9.
73. Pieterse, W. A., Volwerk, J. J. & de Haas, G. H. (1974). Interaction of phospholipase A2 and its zymogen with divalent metal ions. *Biochemistry* 13, 1439-45.
74. Pieterse, W. A., Vidal, J. C., Volwerk, J. J. & de Haas, G. H. (1974). Zymogen-catalyzed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces in phospholipase A2. *Biochemistry* 13, 1455-60.
75. Dijkstra, B. W., Renetseder, R., Kalk, K. H., Hol, W. G. & Drenth, J. (1983). Structure of porcine pancreatic phospholipase A2 at 2.6 Å resolution and comparison with bovine phospholipase A2. *J Mol Biol* 168, 163-79.
76. Bhat, M. K., Pickersgill, R. W., Perry, B. N., Brown, R. A., Jones, S. T., Mueller-Harvey, I., Sumner, I. G. & Goodenough, P. W. (1993). Modification of the head-group selectivity of porcine pancreatic phospholipase A2 by protein engineering. *Biochemistry* 32, 12203-8.
77. Ghomashchi, F., Lin, Y., Hixon, M. S., Yu, B. Z., Annand, R., Jain, M. K. & Gelb, M. H. (1998). Interfacial recognition by bee venom phospholipase A2: insights into nonelectrostatic molecular determinants by charge reversal mutagenesis. *Biochemistry* 37, 6697-710.
78. Yu, B. Z., Poi, M. J., Ramagopal, U. A., Jain, R., Ramakumar, S., Berg, O. G., Tsai, M. D., Sekar, K. & Jain, M. K. (2000). Structural basis of the anionic interface preference and kcat\* activation of pancreatic phospholipase A2. *Biochemistry* 39, 12312-23.
79. Yu, B. Z., Rogers, J., Tsai, M. D., Pidgeon, C. & Jain, M. K. (1999). Contributions of residues of pancreatic phospholipase A2 to interfacial binding, catalysis, and activation. *Biochemistry* 38, 4875-84.
80. Scott, D. L. & Sigler, P. B. (1994). Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. *Adv Protein Chem* 45, 53-88.
81. Pan, Y. H., Epstein, T. M., Jain, M. K. & Bahnsen, B. J. (2001). Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A2: relationship to interface binding. *Biochemistry* 40, 609-17.
82. Vincent, M., Devere, A. M., De Haas, G. H., Verheij, H. M. & Gallay, J. (1993). Stereospecificity of the interaction of porcine pancreatic phospholipase A2 with micellar and monomeric inhibitors. A time-resolved fluorescence study of the tryptophan residue. *Eur J Biochem* 215, 531-9.
83. Ludescher, R. D., Volwerk, J. J., de Haas, G. H. & Hudson, B. S. (1985). Complex photophysics of the single tryptophan of porcine pancreatic phospholipase A2, its zymogen, and an enzyme/micelle complex. *Biochemistry* 24, 7240-9.
84. Ludescher, R. D., Johnson, I. D., Volwerk, J. J., de Haas, G. H., Jost, P. C. & Hudson, B. S. (1988). Rotational dynamics of the single tryptophan of porcine pancreatic phospholipase A2, its zymogen, and an enzyme/micelle complex. A steady-state and time-resolved anisotropy study. *Biochemistry* 27, 6618-28.
85. Berg, O. G. J., Mahendra Kumar. (2001). *Interfacial Enzyme Kinetics*. Wiley & Sons, New York.
86. Berg, O. G., Gelb, M. H., Tsai, M. D. & Jain, M. K. (2001). Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chem Rev* 101, 2613-54.
87. Hille, J. D., Egmond, M. R., Dijkman, R., van Oort, M. G., Jirgensons, B. & de Haas, G. H. (1983). Aggregation of porcine pancreatic phospholipase A2 and Its zymogen induced by submicellar concentrations of negatively charged detergents. *Biochemistry* 22, 5347-53.
88. Yu, B. Z., Aritz-Castro, R., Tsai, M. D. & Jain, M. K. (2003). Interaction of monodisperse anionic amphiphiles with the i-face of secreted phospholipase A2. *Biochemistry* 42, 6293-301.
89. Berg, O. G., Yu, B. Z., Chang, C., Koehler, K. A. & Jain, M. K. (2004). Cooperative binding of monodisperse anionic amphiphiles to the i-face: phospholipase A2-paradigm for interfacial binding. *Biochemistry* 43, 7999-8013.
90. Hille, J. D., Egmond, M. R., Dijkman, R., van Oort, M. G., Sauve, P. & de Haas, G. H. (1983). Unusual kinetic behavior of porcine pancreatic (pro)phospholipase A2 on negatively charged substrates at submicellar concentrations. *Biochemistry* 22, 5353-8.
91. Yuan, W., Quinn, D. M., Sigler, P. B. & Gelb, M. H. (1990). Kinetic and inhibition studies of phospholipase A2 with short-chain substrates and inhibitors. *Biochemistry* 29, 6082-94.
92. Yu, B. Z., Berg, O. G. & Jain, M. K. (1999). Hydrolysis of monodisperse phosphatidylcholines by phospholipase A2 occurs on vessel walls and air bubbles. *Biochemistry* 38, 10449-56.

93. Dijkstra, B. W., Kalk, K. H., Hol, W. G. & Drenth, J. (1981). Structure of bovine pancreatic phospholipase A2 at 1.7Å resolution. *J Mol Biol* 147, 97-123.
94. Epstein, T. M., Yu, B. Z., Pan, Y. H., Tutton, S. P., Maliwal, B. P., Jain, M. K. & Bahnson, B. J. (2001). The basis for k(cat) impairment in pro-phospholipase A(2) from the anion-assisted dimer structure. *Biochemistry* 40, 11411-22.
95. Thunnissen, M. M., Franken, P. A., de Haas, G. H., Drenth, J., Kalk, K. H., Verheij, H. M. & Dijkstra, B. W. (1992). Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of two phospholipase A2 mutants: Y52F and Y73F. *Protein Eng* 5, 597-603.
96. Poi, M. J., Tomaszewski, J. W., Yuan, C., Dunlap, C. A., Andersen, N. H., Gelb, M. H. & Tsai, M. D. (2003). A low-barrier hydrogen bond between histidine of secreted phospholipase A2 and a transition state analog inhibitor. *J Mol Biol* 329, 997-1009.
97. Kinkaid, A. R. & Wilton, D. C. (1993). A continuous fluorescence displacement assay for phospholipase A2 using albumin and medium chain phospholipid substrates. *Anal Biochem* 212, 65-70.
98. Richieri, G. V. & Kleinfeld, A. M. (1995). Continuous measurement of phospholipase A2 activity using the fluorescent probe ADIFAB. *Anal Biochem* 229, 256-63.
99. Bayburt, T., Yu, B. Z., Street, I., Ghomashchi, F., Laliberte, F., Perrier, H., Wang, Z., Homan, R., Jain, M. K. & Gelb, M. H. (1995). Continuous, vesicle-based fluorimetric assays of 14- and 85-kDa phospholipases A2. *Anal Biochem* 232, 7-23.
100. Fernández, M. S. & Juárez, J. A. (1994). Activity of phospholipase A2 on a fluorescent substrate incorporated into non-hydrolyzable phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1192, 132-42.
101. Tsai, T. C., Hart, J., Jiang, R. T., Bruzik, K. & Tsai, M. D. (1985). Phospholipids chiral at phosphorus. Use of chiral thiophosphatidylcholine to study the metal-binding properties of bee venom phospholipase A2. *Biochemistry* 24, 3180-8.
102. Bhat, M. K., Mueller-Harvey, I., Sumner, I. G. & Goodenough, P. W. (1993). Simplified methods for the synthesis of 2-hexadecanoylthio-1-ethylphosphorylcholine and for the determination of phospholipase A2 activity. *Biochim Biophys Acta* 1166, 244-50.
103. Yu, L. & Dennis, E. A. (1991). Thio-based phospholipase assay. *Methods Enzymol* 197, 65-75.
104. Cho, W. M., Michael A. Kézdy, Ferenc J. (1988). A New Class of Phospholipase A2 Substrates: Kinetics of the Phospholipase A2 Catalyzed Hydrolysis of 3-(Acyloxy)-4-nitrobenzoic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5166-5171.
105. Petrovic, N., Grove, C., Langton, P. E., Misso, N. L. & Thompson, P. J. (2001). A simple assay for a human serum phospholipase A2 that is associated with high-density lipoproteins. *J Lipid Res* 42, 1706-13.
106. Cho, W. & Kézdy, F. J. (1991). Chromogenic substrates and assay of phospholipases A2. *Methods Enzymol* 197, 75-9.
107. Holzer, M. & Mackessy, S. P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon* 34, 1149-55.
108. Tomasselli, A. G., Hui, J., Fisher, J., Zurcher-Neely, H., Reardon, I. M., Oriaku, E., Kézdy, F. J. & Henrikson, R. L. (1989). Dimerization and activation of porcine pancreatic phospholipase A2 via substrate level acylation of lysine 56. *J Biol Chem* 264, 10041-7.
109. Matulis, D. & Lovrien, R. (1998). 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophys J* 74, 422-9.
110. Daniel, E. & Weber, G. (1966). Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Fluorimetric titrations. *Biochemistry* 5, 1893-900.
111. Ory, J. J. & Banaszak, L. J. (1999). Studies of the ligand binding reaction of adipocyte lipid binding protein using the fluorescent probe 1, 8-anilinonaphthalene-8-sulfonate. *Biophys J* 77, 1107-16.
112. Schoeffler, A. J., Ruiz, C. R., Joubert, A. M., Yang, X. & LiCata, V. J. (2003). Salt modulates the stability and lipid binding affinity of the adipocyte lipid-binding proteins. *J Biol Chem* 278, 33268-75.
113. Collini, M., D'Alfonso, L., Molinari, H., Ragona, L., Catalano, M. & Baldini, G. (2003). Competitive binding of fatty acids and the fluorescent probe 1-8-anilinonaphthalene sulfonate to bovine beta-lactoglobulin. *Protein Sci* 12, 1596-603.

114. Johnson, J. D., El-Bayoumi, M. A., Weber, L. D. & Tulinsky, A. (1979). Interaction of alpha-chymotrypsin with the fluorescent probe 1-anilidonaphthalene-8-sulfonate in solution. *Biochemistry* 18, 1292-6.
115. Collini, M., D'Alfonso, L. & Baldini, G. (2000). New insight on beta-lactoglobulin binding sites by 1-anilidonaphthalene-8-sulfonate fluorescence decay. *Protein Sci* 9, 1968-74.
116. Bismuto, E., Sirangelo, I., Irace, G. & Gratton, E. (1996). Pressure-induced perturbation of apomyoglobin structure: fluorescence studies on native and acidic compact forms. *Biochemistry* 35, 1173-8.
117. Sirangelo, I., Tavassi, S., Martelli, P. L., Casadio, R. & Irace, G. (2000). The effect of tryptophanyl substitution on folding and structure of myoglobin. *Eur J Biochem* 267, 3937-45.
118. Sirangelo, I., Bismuto, E. & Irace, G. (1994). Solvent and thermal denaturation of the acidic compact state of apomyoglobin. *FEBS Lett* 338, 11-5.
119. Ptitsyn, O. B., Pain, R. H., Semisotnov, G. V., Zerovnik, E. & Razgulyaev, O. I. (1990). Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett* 262, 20-4.
120. Ptitsyn, O. B. (1995). Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem* 47, 83-229.
121. Bhattacharjee, C. & Das, K. P. (2000). Thermal unfolding and refolding of beta-lactoglobulin. An intrinsic and extrinsic fluorescence study. *Eur J Biochem* 267, 3957-64.
122. Golbik, R., Zahn, R., Harding, S. E. & Fersht, A. R. (1998). Thermodynamic stability and folding of GroEL minichaperones. *J Mol Biol* 276, 505-15.
123. Engelhard, M. & Evans, P. A. (1995). Kinetics of interaction of partially folded proteins with a hydrophobic dye: evidence that molten globule character is maximal in early folding intermediates. *Protein Sci* 4, 1553-62.
124. Matulis, D., Baumann, C. G., Bloomfield, V. A. & Lovrien, R. E. (1999). 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers* 49, 451-8.
125. Uversky, V. N., Winter, S. & Lober, G. (1998). Self-association of 8-anilino-1-naphthalene-sulfonate molecules: spectroscopic characterization and application to the investigation of protein folding. *Biochim Biophys Acta* 1388, 133-42.
126. van Eijk, J. H., Verheij, H. M. & de Haas, G. H. (1984). Interaction of native and modified Naja melanoleuca phospholipases A2 with the fluorescent probe 8-anilidonaphthalene-1-sulfonate. *Eur J Biochem* 140, 407-13.
127. Chang, L. S., Wen, E. Y., Hung, J. J. & Chang, C. C. (1994). Energy transfer from tryptophan residues of proteins to 8-anilidonaphthalene-1-sulfonate. *J Protein Chem* 13, 635-40.
128. Chang, L. S., Wen, E. Y. & Chang, C. C. (1996). The structural elements of phospholipase A2 affecting the enhancement of 8-anilidonaphthalene-1-sulfonate fluorescence. *Biochem Mol Biol Int* 38, 617-23.
129. Chang, L. S., Chou, L., Lin, S. R. & Chang, C. C. (1996). The interaction of 8-anilidonaphthalene-1-sulfonate with His-47 of Taiwan cobra phospholipase A2 perturbing by the binding of calcium ion. *Biochem Mol Biol Int* 39, 335-42.
130. Chang, L. S., Wen, E. Y. & Chang, C. C. (1996). The essentiality of His-47 and the N-terminal region for the binding of 8-anilidonaphthalene-1-sulfonate with Taiwan cobra phospholipase A2. *J Protein Chem* 15, 255-60.
131. Abita, J. P., Lazdunski, M., Bensen, P. P., Pieterse, W. A. & de Haas, G. H. (1972). Zymogen-enzyme transformations. On the mechanism of activation of pro-phospholipase A. *Eur J Biochem* 30, 37-47.
132. Dupureur, C. M. L., Yishan, Tsai, Ming-Daw. (1992). Phospholipase A<sub>2</sub> Engineering. 6. Single Amino Acid Substitutions of Active Site Residues Convert the Rigid Enzyme to Highly Flexible Conformational States. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2748-2749.
133. Singh, R. R. & Chang, J. Y. (2004). Investigating conformational stability of bovine pancreatic phospholipase A2: a novel concept in evaluating the contribution of the 'native-framework' of disulphides to the global conformational stability of proteins. *Biochem J* 377, 685-92.
134. Zhu, H., Dupureur, C. M., Zhang, X. & Tsai, M. D. (1995). Phospholipase A2 engineering. The roles of disulfide bonds in structure, conformational stability, and catalytic function. *Biochemistry* 34, 15307-14.
135. Nieuwenhuizen, W., Kunze, H. & de Haas, G. H. (1974). Phospholipase A2 (phosphatide acylhydrolase, EC 3.1.1.4) from porcine pancreas. *Methods Enzymol* 32, 147-54.

136. Nozaki, Y. (1972). The preparation of guanidine hydrochloride. *Methods Enzymol* 26 PtC, 43-50.
137. Motono, C., Yamagishi, A. & Oshima, T. (1999). Urea-induced unfolding and conformational stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the Thermophile thermus thermophilus and its mesophilic counterpart from Escherichia coli. *Biochemistry* 38, 1332-7.
138. Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R. (1999). Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal Biochem* 271, 197-9.
139. Marion, D. & Wuthrich, K. (1983). Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 967-74.
140. Bax, A. D., Donald G. (1985). MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* 65, 355-360.
141. Aue, W. P. B., Ernst, R. R. (1976). Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *The Journal of Chemical Physics* 64, 2229-2246.
142. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 2, 661-5.
143. Chang, L. S., Lin, S. R. & Chang, C. C. (1996). The essentiality of calcium ion in the enzymatic activity of Taiwan cobra phospholipase A2. *J Protein Chem* 15, 701-7.
144. Blouin, C., Guillemette, J. G. & Wallace, C. J. (2001). Resolving the individual components of a pH-induced conformational change. *Biophys J* 81, 2331-8.
145. van Scharrenburg, G. J., Jansen, E. H., Egmond, M. R., de Haas, G. H. & Slotboom, A. J. (1984). Structural importance of the amino-terminal residue of pancreatic phospholipase A2. *Biochemistry* 23, 6285-94.
146. Woody, R. W. (1994). Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur Biophys J* 23, 253-62.
147. Fasman, G. D. e. (1996). Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. *New York, Plenum Press*.
148. van den Berg, B., Tessari, M., de Haas, G. H., Verheij, H. M., Boelens, R. & Kaptein, R. (1995). Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A2. *Embo J* 14, 4123-31.
149. van den Berg, B., Tessari, M., Boelens, R., Dijkman, R., Kaptein, R., de Haas, G. H. & Verheij, H. M. (1995). Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A2 complexed with micelles and a competitive inhibitor. *J Biomol NMR* 5, 110-21.
150. Qin, S., Pande, A. H., Nemeč, K. N. & Tatulian, S. A. (2004). The N-terminal alpha-helix of pancreatic phospholipase A2 determines productive-mode orientation of the enzyme at the membrane surface. *J Mol Biol* 344, 71-89.
151. Qin, S., Pande, A. H., Nemeč, K. N., He, X. & Tatulian, S. A. (2005). Evidence for the regulatory role of the N-terminal helix of secretory phospholipase A(2) from studies on native and chimeric proteins. *J Biol Chem* 280, 36773-83.
152. Holtzer, M. E. & Holtzer, A. (1992). Alpha-helix to random coil transitions: determination of peptide concentration from the CD at the isodichroic point. *Biopolymers* 32, 1675-7.
153. Mo, J. M., Holtzer, M. E. & Holtzer, A. (1990). The thermal denaturation of nonpolymerizable alpha alpha-tropomyosin and its segments as a function of ionic strength. *Biopolymers* 30, 921-7.
154. Wallimann, P., Kennedy, R. J., Miller, J. S., Shalongo, W. & Kemp, D. S. (2003). Dual wavelength parametric test of two-state models for circular dichroism spectra of helical polypeptides: anomalous dichroic properties of alanine-rich peptides. *J Am Chem Soc* 125, 1203-20.
155. Schendel, S. L. & Cramer, W. A. (1994). On the nature of the unfolded intermediate in the in vitro transition of the colicin E1 channel domain from the aqueous to the membrane phase. *Protein Sci* 3, 2272-9.
156. van Dam-Mieras, M. C., Slotboom, A. J., Pieterse, W. A. & de Haas, G. H. (1975). The interaction of phospholipase A2 with micellar interfaces. The role of the N-terminal region. *Biochemistry* 14, 5387-94.
157. Aguiar, A., De Haas, G. H., Jansen, E. H., Slotboom, A. J. & Williams, R. J. (1979). Proton-nuclear-magnetic-resonance/pH-titration studies of the histidines of pancreatic phospholipase A2. *Eur J Biochem* 100, 511-8.

158. Fisher, J., Primrose, W. U., Roberts, G. C., Dekker, N., Boelens, R., Kaptein, R. & Slotboom, A. J. (1989). <sup>1</sup>H NMR studies of bovine and porcine phospholipase A2: assignment of aromatic resonances and evidence for a conformational equilibrium in solution. *Biochemistry* 28, 5939-46.
159. Dekker, N., Peters, A. R., Slotboom, A. J., Boelens, R., Kaptein, R. & de Haas, G. (1991). Porcine pancreatic phospholipase A2: sequence-specific <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N NMR assignments and secondary structure. *Biochemistry* 30, 3135-46.
160. Liu, X., Zhu, H., Huang, B., Rogers, J., Yu, B. Z., Kumar, A., Jain, M. K., Sundaralingam, M. & Tsai, M. D. (1995). Phospholipase A2 engineering. Probing the structural and functional roles of N-terminal residues with site-directed mutagenesis, X-ray, and NMR. *Biochemistry* 34, 7322-34.
161. van Oort, M. G., Dijkman, R., Hille, J. D. & de Haas, G. H. (1985). Kinetic behavior of porcine pancreatic phospholipase A2 on zwitterionic and negatively charged double-chain substrates. *Biochemistry* 24, 7993-9.
162. de Haas, G. H., van Scharrenburg, G. J. & Slotboom, A. J. (1987). Interaction of pancreatic phospholipases A2 and semisynthetic mutants with anionic substrates and substrate analogues. *Biochemistry* 26, 3402-8.
163. Donne-Op den Kelder, G. M., Hille, J. D., Dijkman, R., de Haas, G. H. & Egmond, M. R. (1981). Binding of porcine pancreatic phospholipase A2 to various micellar substrate analogues. Involvement of histidine-48 and aspartic acid-49 in the binding process. *Biochemistry* 20, 4074-8.
164. Durrschmidt, P., Mansfeld, J. & Ulbrich-Hofmann, R. (2001). Differentiation between conformational and autoproteolytic stability of the neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* containing an engineered disulfide bond. *Eur J Biochem* 268, 3612-8.
165. Yang, H. J. & Tsou, C. L. (1995). Inactivation during denaturation of ribonuclease A by guanidinium chloride is accompanied by unfolding at the active site. *Biochem J* 305 ( Pt 2), 379-84.
166. Köditz, J., Ulbrich-Hofmann, R. & Arnold, U. (2004). Probing the unfolding region of ribonuclease A by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem* 271, 4147-56.
167. Bärlocher, F. (1998). Biostatistik Praktische Einführung in Konzepte und Methoden. *Thieme, Stuttgart*.
168. Pfeil, W. (1998). Protein Stability and Folding. *Springer, Berlin*.
169. Spudich, G. & Marqusee, S. (2000). A change in the apparent m value reveals a populated intermediate under equilibrium conditions in *Escherichia coli* ribonuclease HI. *Biochemistry* 39, 11677-83.
170. Soulages, J. L. (1998). Chemical denaturation: potential impact of undetected intermediates in the free energy of unfolding and m-values obtained from a two-state assumption. *Biophys J* 75, 484-92.
171. Shortle, D. (1995). Staphylococcal nuclease: a showcase of m-value effects. *Adv Protein Chem* 46, 217-47.
172. Staniforth, R. A., Burston, S. G., Smith, C. J., Jackson, G. S., Badcoe, I. G., Atkinson, T., Holbrook, J. J. & Clarke, A. R. (1993). The energetics and cooperativity of protein folding: a simple experimental analysis based upon the solvation of internal residues. *Biochemistry* 32, 3842-51.
173. Parker, M. J., Spencer, J. & Clarke, A. R. (1995). An integrated kinetic analysis of intermediates and transition states in protein folding reactions. *J Mol Biol* 253, 771-86.
174. Cota, E. & Clarke, J. (2000). Folding of beta-sandwich proteins: three-state transition of a fibronectin type III module. *Protein Sci* 9, 112-20.
175. Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R. (1997). Kinetic and thermodynamic thermal stabilities of ribonuclease A and ribonuclease B. *Biochemistry* 36, 2166-72.
176. Arnold, U., Schierhorn, A. & Ulbrich-Hofmann, R. (1998). Influence of the carbohydrate moiety on the proteolytic cleavage sites in ribonuclease B. *J Protein Chem* 17, 397-405.
177. Arnold, U., Schulenburg, C., Schmidt, D. & Ulbrich-Hofmann, R. (2006). Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics. *Biochemistry* 45, 3580-7.
178. Schellenberger, A. & Ulbrich, R. (1989). Protein stabilization by blocking the native unfolding nucleus. *Biomed Biochim Acta* 48, 63-7.
179. Mansfeld, J., Vriend, G., Van den Burg, B., Eijssink, V. G. & Ulbrich-Hofmann, R. (1999). Probing the unfolding region in a thermolysin-like protease by site-specific immobilization. *Biochemistry* 38, 8240-5.

180. Golbik, R., Fischer, G. & Fersht, A. R. (1999). Folding of barstar C40A/C82A/P27A and catalysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerization by human cytosolic cyclophilin (Cyp18). *Protein Sci* 8, 1505-14.
181. Finke, J. M. & Jennings, P. A. (2002). Interleukin-1 beta folding between pH 5 and 7: experimental evidence for three-state folding behavior and robust transition state positions late in folding. *Biochemistry* 41, 15056-67.
182. Barnett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. & (ed.). (2004). Handbook of Proteolytic Enzymes. *Elsevier Academic Press München*.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte all jenen Personen herzlich danken, die zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Ulbrich-Hofmann danke ich für die Möglichkeit, dieses sehr spannende Thema in ihrer Gruppe zu bearbeiten.

Herrn PD Dr. Ralph Golbik möchte ich für die Einführung in die *stopped-flow*-Fluoreszenzmessung und viele hilfreiche Ratschläge und Diskussionen herzlich danken.

Mein besonderer Dank für die Messung der NMR-Spektren und des HD-Austausches gilt Frau Dr. Carmen Mrestani-Klaus.

Bei Herrn Dr. Ulrich Arnold, Herrn Dr. Jens Köditz, Herrn Diplom-Biochemiker Hagen Hofmann und Frau Diplom-Biochemikerin Franziska Leich möchte ich mich viele fruchtbare Diskussionen und hilfreiche Ratschläge bedanken sowie bei der gesamten Arbeitsgruppe „Technische Enzymologie“ für eine unvergessliche und angenehme Zeit.

Der Lipoid GmbH in Ludwigshafen danke ich für die Bereitstellung großer Mengen der PLA<sub>2</sub>.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle beim Land Sachsen-Anhalt und dem Graduierten-Kolleg 1026 ebenfalls bedanken.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und den Rückhalt während der vergangenen Jahre.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Wörtlich oder inhaltlich aus Publikationen übernommene Zitate wurden als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt oder veröffentlicht.

Halle, den 09.07.2006

**Lebenslauf**

Knut Kölbl  
 Dessauer Straße 10  
 06118 Halle

Geburtsdatum, -ort 14.08.1977 Karl-Marx-Stadt, heute Chemnitz

Nationalität deutsch

Familienstand ledig

**Schulbildung:**

1984-1986 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Karl Liebknecht“

1986-1992 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule mit erweitertem Fremdsprachen-Unterricht „W. I. Lenin“

1992-1996 Gymnasium „Johann Wolfgang von Goethe“, Abitur 06.1996

07. 1996 - 06. 1997 Allgemeiner Grundwehrdienst im ABC-Abwehrebataillon 409, Bad Dübren

**Studium:**

10. 1997 - 07. 2002 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

09. 2001-07. 2002 Diplomarbeit bei Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann

**Berufliche Daten:**

09. 2002 - 02. 2006 Arbeit an der Promotion bei Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann

10.2002 - 09.2005 Stipendiat nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt

10.2005- 12.2005 Stipendiat des Graduiertenkollegs 1026

Seit 03.2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Abteilung allgemeine Biochemie

**Publikationen:**

Kölbl, K., Mrestani-Klaus, C., Ulbrich-Hofmann, R. Structural Changes of Porcine Pancreatic Phospholipase A<sub>2</sub> induced by Calcium Bindung (*Poster für die Faltertage in Wittenberg 2005*)

Heinig, L., Kölbl, K., Müller, D.A., Hunsmann, G., Holznagel, E., Stuke, A.W. Infection of PrP knock-out cells conditionaly expressing mammalian prion proteins (*Postervorschlag für PRION 2006 Turin*)

Halle, den 09.07.2006