

**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	Natriumdesoxycholat
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