

# 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.