

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Verwendete Materialien

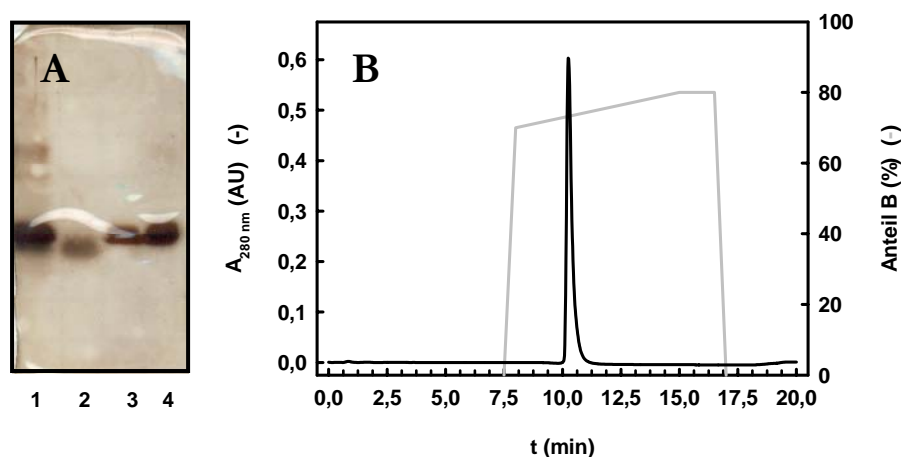
ANS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Serva, Heidelberg
CaCl <sub>2</sub>	AppliChem, Darmstadt
Caprylsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Casein	Merck, Darmstadt
Chymotrypsin	Serva, Heidelberg
DCl	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
D <sub>2</sub> O	Euriso-Top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
GuHCl	Sigma-Aldrich, 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.

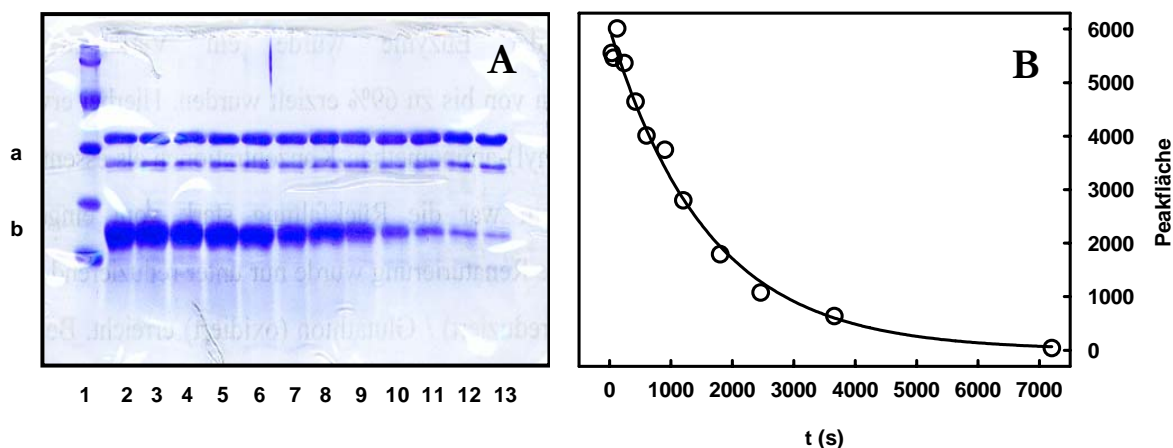
### **3.2.9 Limitierte Proteolyse**

#### **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.