

5 Zusammenfassende Diskussion

Die vorliegende Arbeit widmet sich in erster Linie dem Faltungs- bzw. Entfaltungsvorgang von PLA₂. 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 PLA₂ 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 PLA₂.

In Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt PLA₂ 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 PLA₂ auch bei moderat sauren Bedingungen nativ gefaltet, zumindest aber bindungskompetent vorliegt. Aus den verschiedenen Quantenausbeuten des ANS-PLA₂-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 α -Helix.

Trotz der noch ausstehenden Zuordnungen der NOE-Kreuzsignale lieferte die Messung der NOESY-Spektren von PLA₂ in Gegenwart verschiedener pH-Werte weitere Hinweise auf das Nativgleichgewicht zwischen N^E und N^R. So wurde für holoPLA₂ 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 Ca^{2+} verursachte Konformationsänderungen bei pH 4,0 gezeigt werden. Interessanterweise sind jedoch die NOESY-Spektren von Ca^{2+} -gesättigter PLA_2 bei pH 8,0 und Ca^{2+} -ungesättigter PLA_2 bei pH 4,0 nahezu identisch. Vermutungen hinsichtlich einer Vergleichbarkeit von Ca^{2+} - und pH-induzierten Konformationsänderungen bieten sich an, können aber derzeit noch nicht belegt werden. Die Resultate mit apo 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.

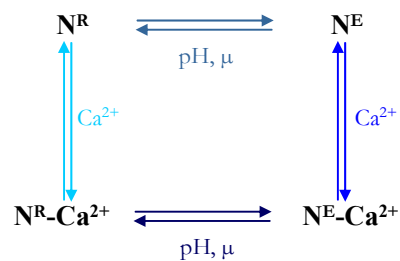


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung des Gleichgewichtes zwischen N^{R} und N^{E} unter nativen Bedingungen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke μ .

Wie bereits erwähnt, sind neben den nachgewiesenen, durch Reaktionspfeile dargestellten Reaktionen noch weitere vorstellbar, wie z.B. eine Ca^{2+} -vermittelte Umwandlung zwischen Ca-N^{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 PLA_2 bei pH 8,0 in Gegenwart von 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 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 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 PLA₂ 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 PLA₂-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^R vorliegt, fast alle thermodynamischen Stabilitätsparameter deutlich höher als unter basischen Bedingungen, wenn signifikante Anteile von N^E 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 PLA₂ 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 Ca²⁺ und PLA₂ vollständig dissoziiert vorliegt, wenn letztere entfaltet ist. Weiterhin wurde zur Vereinfachung eine jeweils vollständige Entfaltung zu einem einheitlichen entfalteten Zustand U angenommen.

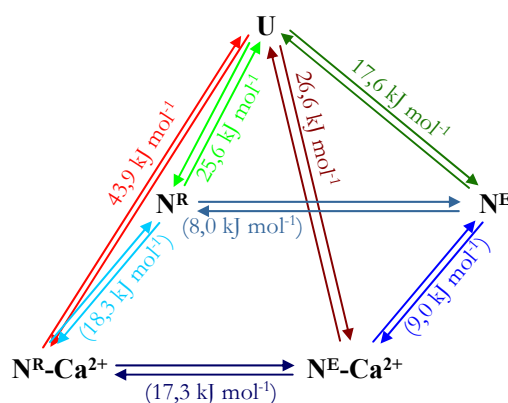


Abbildung 5.2 Schematische Darstellung des Gleichgewichtes zwischen N^R, N^E und U. Das in Abbildung 5.1 dargestellte Gleichgewicht nativer Spezies wurde um einen gemeinsamen entfalteten Zustand U erweitert. Den einzelnen Teilgleichgewichten wurde der Wert ihrer freien Enthalpien zugeordnet. Hierfür sind die entsprechenden Werte und Reaktionspfeile jeweils in der gleichen Farbe dargestellt. Alle $\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$ -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 holoPLA₂ ist dagegen durch den Befund gerechtfertigt, dass Ca²⁺ bis zur Entfaltung gebunden vorliegt. Die erhaltenen Resultate von holoPLA₂ 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 PLA₂ 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 PLA₂. Die Progresskurven der Entfaltung von PLA₂ bei pH 8,0 durchlaufen unabhängig von der Anwesenheit des Cofaktors Ca²⁺ 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 PLA₂ ein starker Einfluss von CaCl₂ 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^R und N^E 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^R und N^E 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 PLA₂ 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 PLA₂ 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}N -markierter PLA_2 sowie auch des HD-Austausches mittels schneller Mischtechniken noch viele interessante Möglichkeiten, das Nativgleichgewicht und das Faltungs- bzw. Entfaltungsverhalten von 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 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 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.