

6. Tabellarischer Anhang

6.1. Einfluss des pH-Wertes auf native PLA₂

Tabelle 6.1 apparente Aktivitätsparameter von PLA₂ in Gegenwart verschiedener GuHSCN-Konzentrationen. Die angegebenen Fehlerbreiten repräsentieren die aus der hyperbolen Anpassung resultierenden Standardfehler.

[GuHSCN] (M)	K_{D^*} (mM)	ν_{\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 holoPLA₂ 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 apoPLA₂ 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^*} (μM)	$\Delta\text{RF}_{\max} / \Delta\text{RF}_{\max}(\text{pH } 8,0)$
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 PLA₂

Tabelle 6.4 Stabilitätsparameter der CD-spektroskopisch verfolgten, thermisch induzierten Entfaltung von apoPLA₂ 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)	ΔH_m (kJ mol ⁻¹)	ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
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 apoPLA₂ 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)	ΔH_m (kJ mol ⁻¹)	ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
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 apoPLA₂ 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)	ΔH_m (kJ mol ⁻¹)	ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
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 apoPLA₂ 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)	ΔH_m (kJ mol ⁻¹)	ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
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 holoPLA₂ 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)	ΔH_m (kJ mol ⁻¹)	ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
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 holoPLA₂ 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)	ΔH_m (kJ mol ⁻¹)	ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
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 holoPLA₂ 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)	ΔH_m (kJ mol ⁻¹)	ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
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 holoPLA₂ 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)	ΔH_m (kJ mol ⁻¹)	ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
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 PLA₂ bzw. von bvPLA₂ (letzte Zeile). Die angegebenen Fehlerbreiten entsprechen den aus der nichtlinearen Anpassung resultierenden Standardabweichungen bzw. wurden nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

Bedingung	[D] _{1/2} (M)	$m_{N \rightarrow U}$ (kJ M ⁻¹ mol ⁻¹)	$\Delta G_{N \rightarrow U}^{H_2O}$ (kJ mol ⁻¹)
10 mM EDTA; pH 8,0	1,8 ± 0,1	9,8 ± 0,6	17,6 ± 0,6
25 mM CaCl ₂ ; 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 ₂ ; pH 4,0	1,9 ± 0,1	18,5 ± 1,6	35,2 ± 1,6
500 mM CaCl ₂ ; 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 PLA₂

Tabelle 6.13 Mittels limitierter Proteolyse bestimmte Entfaltungskonstanten von PLA₂. 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} s^{-1})	$k_u(\text{holoPLA}_2)$ (10^{-3} 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 PLA₂. 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 ⁻¹)	$\Delta S_u^\#$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G_u^\#$ (20°C) (kJ mol ⁻¹)
apoPLA ₂ /Proteinase K	$97,9 \pm 4,1$	$37,1 \pm 13,6$	$87,0 \pm 5,7$
holoPLA ₂ /Proteinase K	$92,2 \pm 4,4$	$7,7 \pm 14,5$	$89,9 \pm 6,1$
holoPLA ₂ /Chymotrypsin	$63,6 \pm 2,3$	$-76,4 \pm 7,4$	$86,0 \pm 3,3$
apoPLA ₂ /Pepsin	$119,7 \pm 2,5$	$83,6 \pm 8,0$	$95,2 \pm 3,4$

Tabelle 6.15 Kinetische Stabilitätsparameter von PLA₂. 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 ⁻¹)	$\Delta S_u^\#$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)*	$\Delta G_u^\#$ (20°C) (kJ mol ⁻¹)
apoPLA ₂ /Proteinase K	$97,9 \pm 4,1$	$138,5 \pm 13,6$	$57,3 \pm 5,7$
holoPLA ₂ /Proteinase K	$92,2 \pm 4,4$	$109,1 \pm 14,5$	$60,2 \pm 6,1$
holoPLA ₂ /Chymotrypsin	$63,6 \pm 2,3$	$25,0 \pm 7,4$	$56,2 \pm 3,3$
apoPLA ₂ /Pepsin	$119,7 \pm 2,5$	$185,0 \pm 8,0$	$65,5 \pm 3,4$

6.4 NMR-Spektren von PLA₂

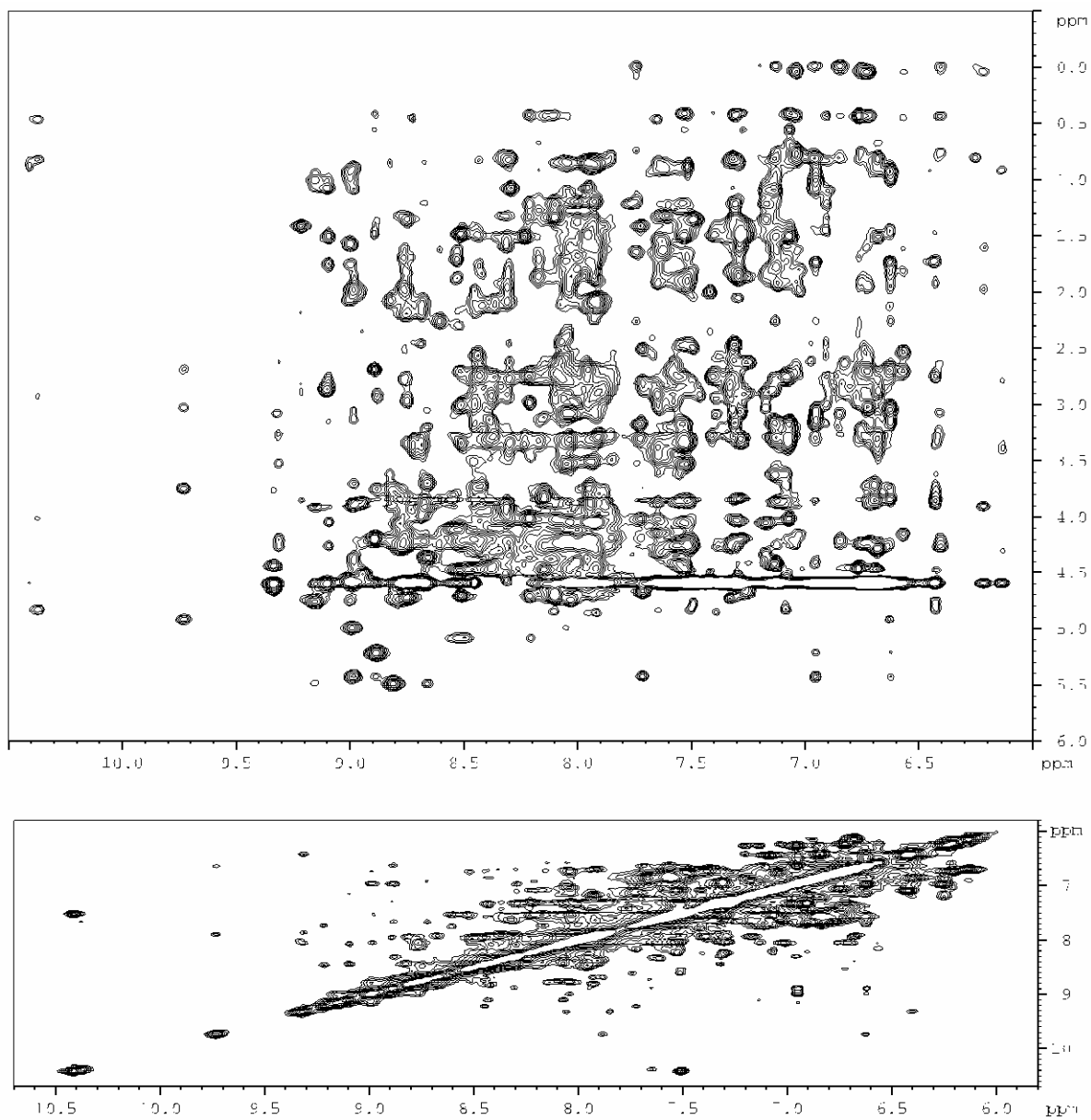


Abbildung 6.1 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von apoPLA₂ bei pH 4,3 in Gegenwart von 2 mM EDTA. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

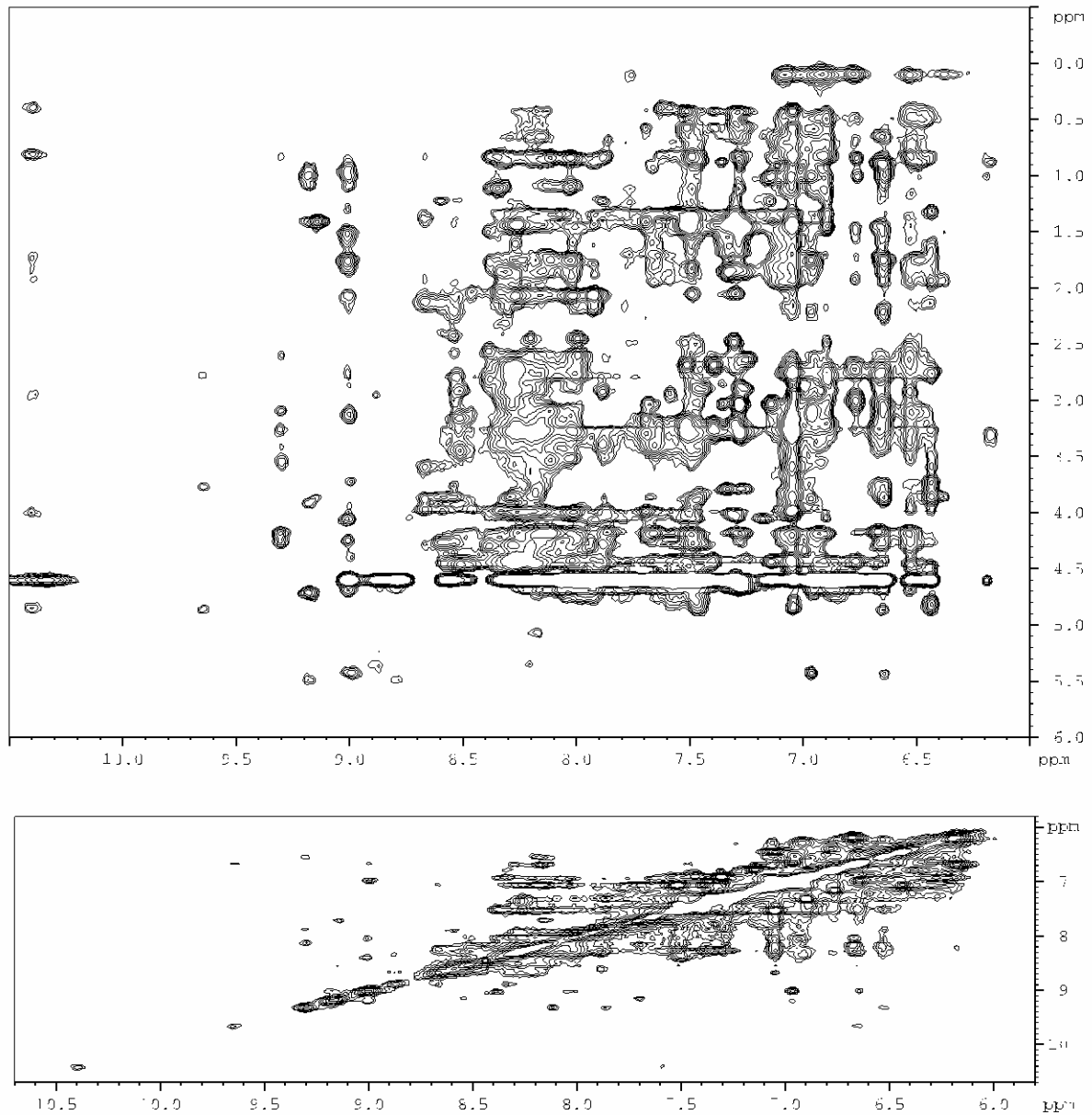


Abbildung 6.2 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von apoPLA₂ bei pH 8,0 in Gegenwart von 2 mM EDTA. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

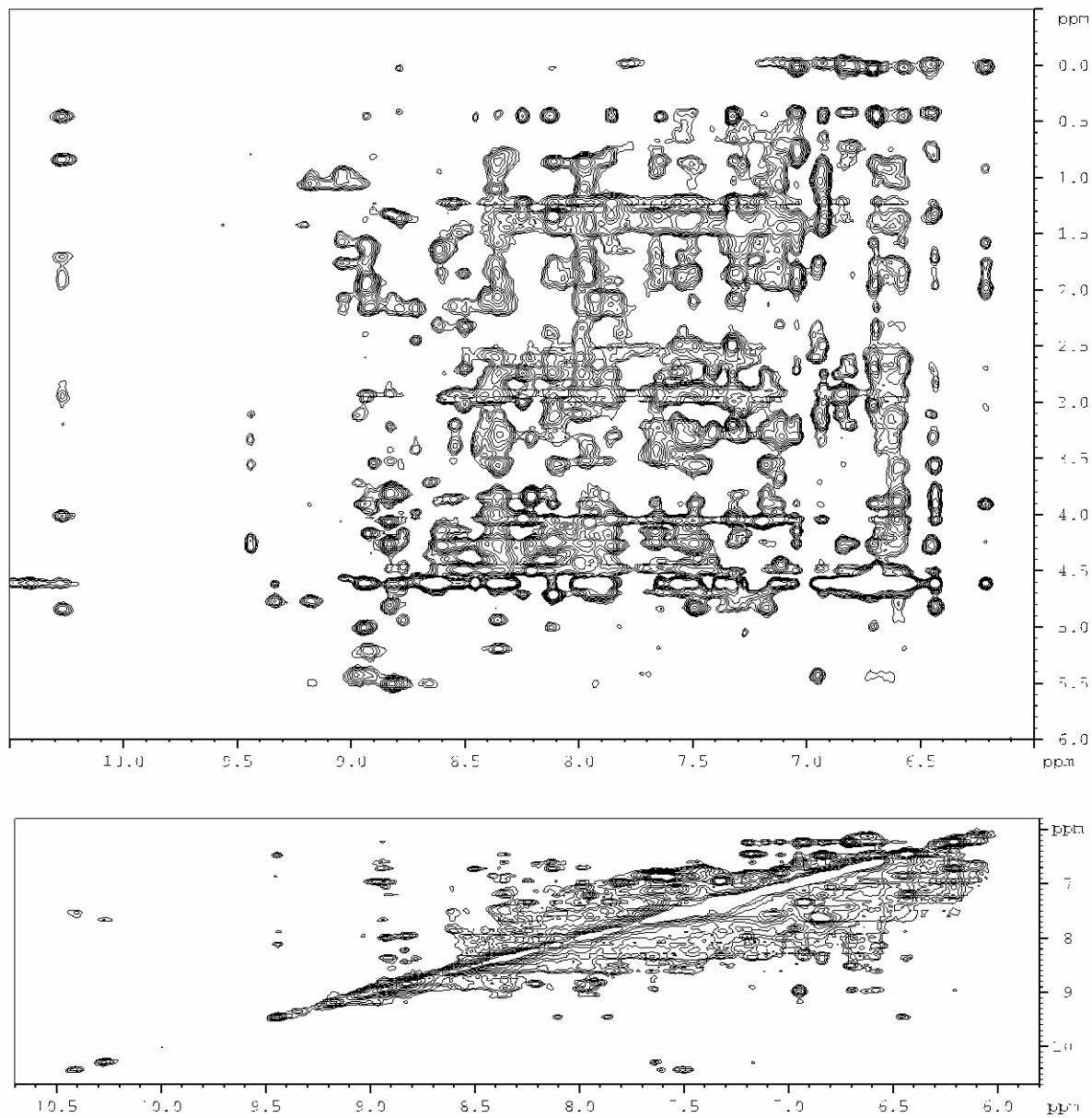


Abbildung 6.3 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von PLA₂ bei pH 4,3 in Gegenwart von 50 mM CaCl₂. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

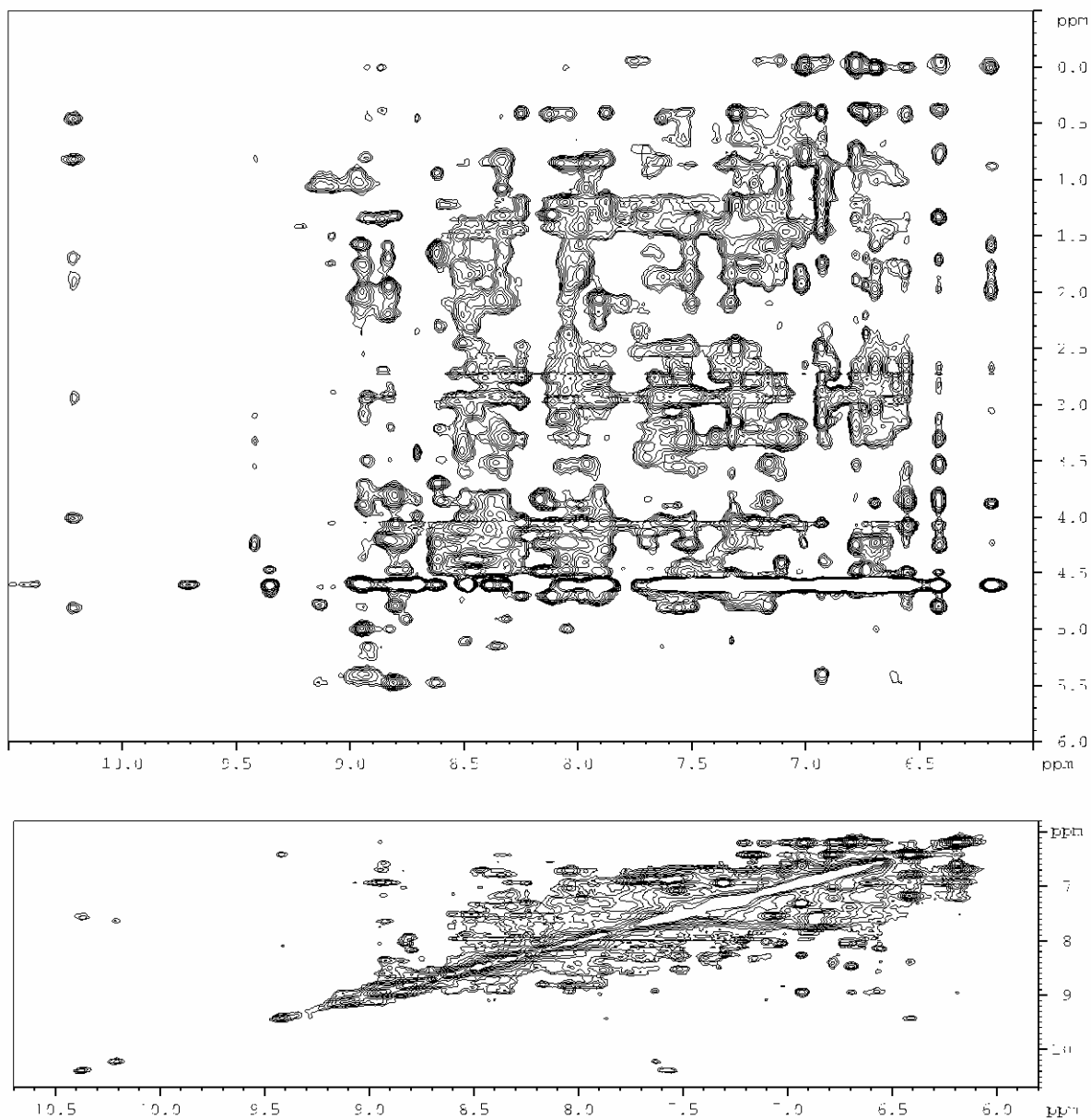


Abbildung 6.4 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von holoPLA₂ bei pH 4,3 in Gegenwart von 500 mM CaCl₂. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.

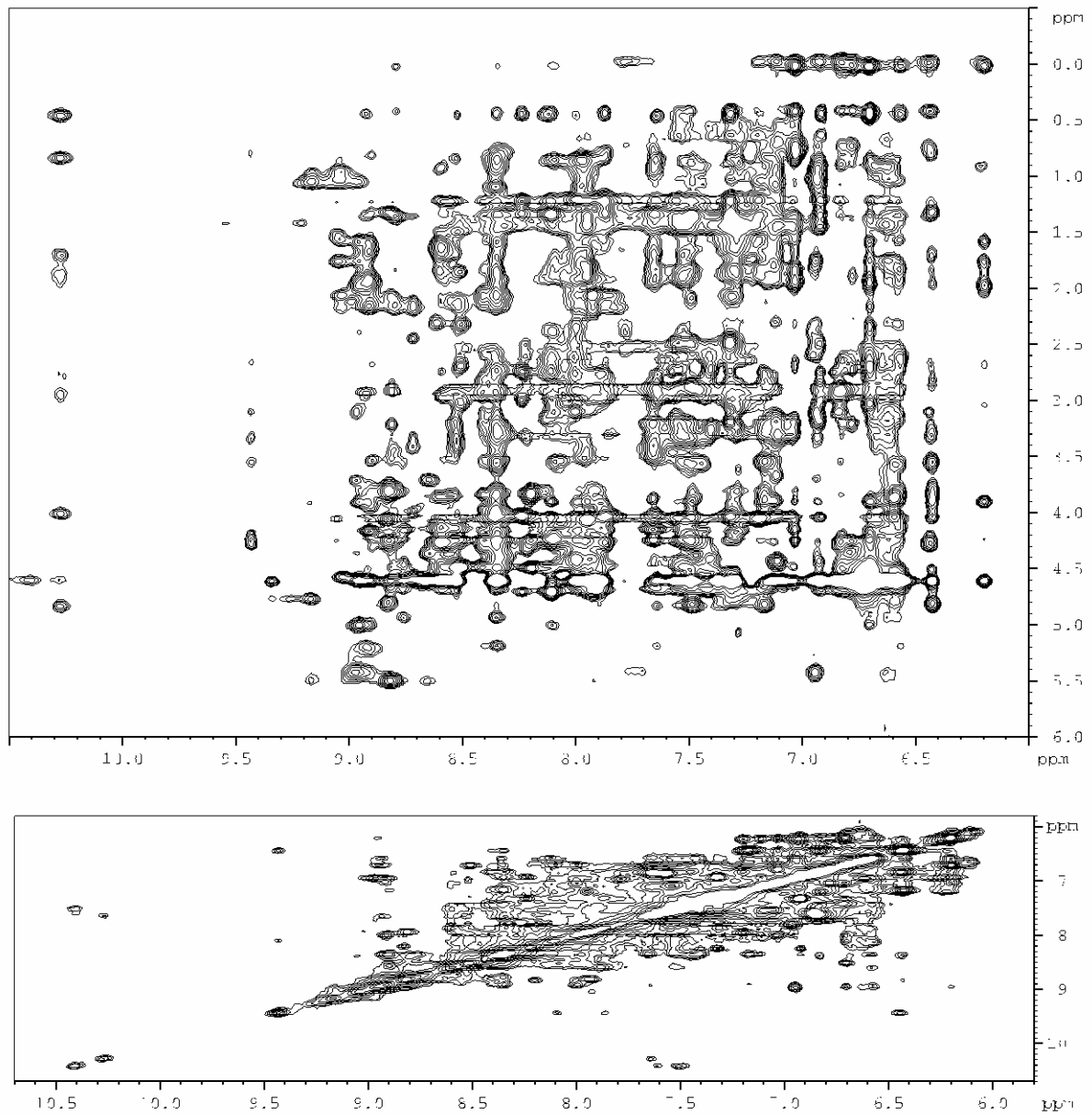


Abbildung 6.5 Ausgewählte Regionen des 2D-NOESY-NMR-Spektren von holoPLA₂ bei pH 8,0 in Gegenwart von 50 mM CaCl₂. Oberer Teil: Amid- und Aliphatenprotonenbereich des NOESY-Spektrums. Unterer Teil: Amid- und Aromatenprotonenbereich der NOESY-Spektrums. Das NMR-Spektrum wurde wie unter 3.2.10.1 beschrieben gemessen.