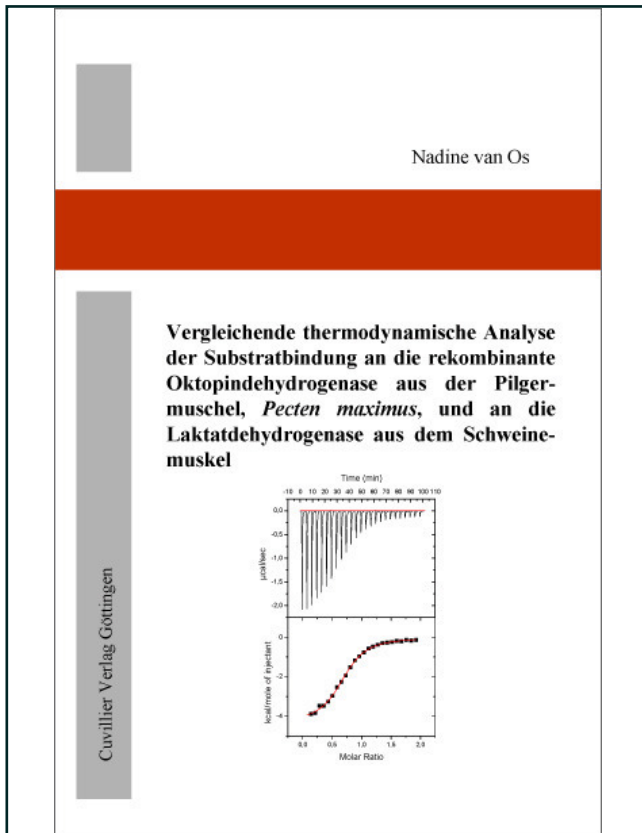




Nadine Van Os (Autor)

Vergleichende thermodynamische Analyse der Substratbindung an die rekombinante Oktopindehydrogenase aus der Pilgermuschel, *Pecten maximus*, und an die Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel.



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1835>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGEN	3
EIN- UND DREIBUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN	4
1 EINLEITUNG	5
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 CHEMIKALIEN	14
2.2 ÜBERPRODUKTION UND REINIGUNG DER ODH.....	14
2.2.1 <i>Sterilisation der erforderlichen GefäÙe, Lösungen und Medien</i>	14
2.2.2 <i>Herstellung elektrokompetenter ER2566-Zellen</i>	14
2.2.3 <i>Transformation der E. coli-Zellen durch Elektroporation</i>	15
2.2.4 <i>Anzuchtbedingungen des E. coli-Stammes für die Überproduktion der heterolog exprimierten ODH</i>	15
2.2.5 <i>Präparation der ODH</i>	16
2.2.6 <i>Reinigung durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie</i>	16
2.2.6.1 <i>Regenerierung des Ni-NTA-Superflowmaterials</i>	17
2.2.7 <i>Reinigung durch Größenausschlusschromatographie</i>	17
2.2.8 <i>Aktivitätsbestimmung</i>	18
2.2.9 <i>Proteinbestimmung</i>	18
2.2.10 <i>SDS-Gelelektrophorese</i>	18
2.2.11 <i>Nachweis der Proteine im Gel</i>	19
2.2.11.1 <i>Coomassie-Färbung</i>	19
2.2.11.2 <i>Silberfärbung</i>	19
2.3 OKTOPINSYNTHESE	20
2.3.1 <i>Durchführung</i>	20
2.3.2 <i>Dünnschichtchromatographie</i>	21
2.3.3 <i>Bestimmung der Reinheit</i>	22
2.3.4 <i>Ausbeute</i>	22
2.4 MIKROKALORIMETRISCHE MESSUNGEN.....	22
2.4.1 <i>Messprinzip</i>	22
2.4.2 <i>Theoretische Grundlagen der isothermalen Titrationskalorimetrie</i>	24
2.4.3 <i>Datenanalyse</i>	27
2.4.4 <i>Durchführung eines ITC-Experimentes</i>	29
2.4.4.1 <i>Probenvorbereitung</i>	29
2.4.4.2 <i>Durchführung der Messung</i>	30
2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG	31
3 ERGEBNISSE	32
3.1 REINIGUNG DER REKOMBINANTEN OKTOPINDEHYDROGENASE.....	32

3.2	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE REKOMBINANTE OKTOPINDEHYDROGENASE AUS <i>PECTEN MAXIMUS</i>	34
3.2.1	<i>Coenzym-Bindung</i>	35
3.2.2	<i>L-Arginin-Bindung</i>	36
3.2.3	<i>Pyruvat-Bindung</i>	39
3.2.4	<i>Bindungsverhalten bei gleichzeitiger L-Arginin- und Pyruvatinjektion</i>	41
3.2.4.1	Vergleich der thermodynamischen Parameter bei gleichzeitiger und unabhängiger L-Arginin- und Pyruvattitration	42
3.2.5	<i>D-Oktopin-Bindung</i>	43
3.2.5.1	D-Oktopin-Bindung vs. L-Arginin- und Pyruvat-Bindung	44
3.3	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE LAKTATDEHYDROGENASE AUS DEM SCHWEINEMUSKEL	46
3.3.1	<i>Coenzym-Bindung</i>	46
3.3.2	<i>Pyruvat-Bindung</i>	48
3.3.3	<i>L-Laktat-Bindung</i>	50
3.4	VERGLEICH DER SUBSTRATBINDUNG AN ODH UND LDH	53
4	DISKUSSION	56
4.1	REINIGUNG DER REKOMBINANTEN OKTOPINDEHYDROGENASE.....	57
4.2	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE REKOMBINANTE OKTOPINDEHYDROGENASE	57
4.2.1	<i>Coenzym-Bindung</i>	58
4.2.2	<i>L-Arginin- und Pyruvat-Bindung</i>	59
4.2.3	<i>D-Oktopin-Bindung</i>	63
4.3	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE LAKTATDEHYDROGENASE AUS DEM SCHWEINEMUSKEL	64
4.3.1	<i>Coenzym-Bindung</i>	65
4.3.2	<i>Pyruvat- und L-Laktat-Bindung</i>	66
4.4	VERGLEICH DER SUBSTRATBINDUNG AN ODH UND LDH	69
4.5	KINETISCHER MECHANISMUS DER ODH-REAKTION	72
4.6	WELCHEN VORTEIL HAT ES, EINE OKTOPINDEHYDROGENASE ZU BESITZEN?.....	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	LITERATUR	79