

Akim Dirksen

Untersuchungen zur Denaturierung und Rückfaltung von Lysozym und β -Lactoglobulin

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 2010 Diplomica Verlag GmbH
ISBN: 9783842828346

Akim Dirksen

**Untersuchungen zur Denaturierung und Rückfaltung
von Lysozym und β -Lactoglobulin**

Akim Dirksen

Untersuchungen zur Denaturierung und Rückfaltung von Lysozym und β -Lactoglobulin

Akim Dirksen

Untersuchungen zur Denaturierung und Rückfaltung von Lysozym und β -Lactoglobulin

ISBN: 978-3-8428-2834-6

Herstellung: Diplomica® Verlag GmbH, Hamburg, 2012

Zugl. Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Hamburg, Deutschland,
Diplomarbeit, 2010

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden und der Verlag, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

© Diplomica Verlag GmbH

<http://www.diplomica.de>, Hamburg 2012

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Birger Anspach für die engagierte wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken. Er hat es mir ermöglicht diese Arbeit im Labor der Molekularbiologie an der HAW Hamburg, Bergedorf durchzuführen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich, der sich freundlicherweise als zweiter Gutachter zur Verfügung gestellt hat. Auch Frau Elisabeth Schäfer danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei analytischen Angelegenheiten.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Vor allem danke ich meiner Mutter, die mich nicht nur finanziell, sondern auch moralisch unterstützt hat. Auch meiner Schwester Julia möchte ich für die immer zur Verfügung stehende Hilfe ebenfalls danken.

Insbesondere danke ich meiner Freundin Xeniya, die mir immer helfend zur Seite stand und mich während meiner Diplomarbeit immer wieder motiviert hat.

Nicht zuletzt möchte ich ganz herzlich bei allen meinen Freunden für ihre stetige Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	2
2.1 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	2
2.1.1 Bakterielle Einschlusskörper (Inclusion Bodies)	2
2.2 Proteindenaturierung	5
2.3 Proteinrückfaltung	7
2.4 Rückfaltungsmethoden	10
2.4.1 Rückfaltung durch Verdünnung	12
2.4.2 Rückfaltung mittels Gelfiltrationschromatographie (SEC)	13
2.5 Methoden zur Analyse der Proteinrückfaltung.....	14
2.6 Fluoreszenzspektroskopie	16
2.6.1 Prinzip der Fluoreszenz	16
2.6.2 Intrinsische Fluoreszenz von Proteinen.....	17
2.6.3 Fluoreszenzlöschung (Quenching)	18
2.6.4 Streulichteffekte in der Fluoreszenzspektroskopie.....	19
2.7 Modellproteine	21
2.7.1 Lysozym	21
2.7.2 β -Lactoglobulin	21
3. Ziel der Arbeit	23
4. Material und Methoden	24
4.1 Material.....	24
4.1.1 Verwendete Chemikalien	24
4.1.2 Modellproteine	24
4.2 Methoden.....	25
4.2.1 Fluoreszenzspektroskopie.....	25
4.2.2 Denaturierung von Proteinen.....	25
4.2.3 Aufnahme von Entfaltungskurven.....	26
4.2.4 Vorversuche zur Rückfaltung.....	26

4.2.5 Rückfaltungsmethoden	27
4.2.5.1 Rückfaltung durch Verdünnung	27
4.2.5.2 Rückfaltung mittels Gelfiltrationschromatographie (SEC)	28
4.2.6 Entsalzung von Proteinproben (HiTrap™ Desalting-Säule)	29
4.2.7 Lysozym Assay	30
4.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration	31
4.2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch photometrische Messung.....	32
4.2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Fluoreszenzmessung.....	33
4.2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Enzymaktivität.....	33
4.2.9 Berechnung der Massenausbeuten.....	34
4.2.10 SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen	34
4.2.11 Coomassie-Blue-Färbung der Polyacrylamidgele	35
5. Ergebnisse und Diskussion.....	36
5.1 Untersuchungen zur Denaturierung von Lysozym und β -Lactoglobulin	36
5.2 Aufnahme von Entfaltungskurven mittels Fluoreszenzspektroskopie	41
5.3 Vorversuche zur Rückfaltung von Modellproteinen	44
5.4 Rückfaltung durch Verdünnung	48
5.4.1 Rückfaltung von Lysozym durch Verdünnung	48
5.4.2 Rückfaltung von β -Lactoglobulin durch Verdünnung	51
5.5 Rückfaltung mittels Gelfiltrationschromatographie (SEC)	54
5.5.1 Rückfaltung von Lysozym mittels Gelfiltrationschromatographie	54
5.5.2 Rückfaltung von β -Lactoglobulin mittels Gelfiltrationschromatographie	61
6. Fazit	66
7. Zusammenfassung.....	68
8. Literaturverzeichnis.....	69
9. Anhang.....	73