

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Biologische Grundlagen	3
2.1	Mikrobiologische Grundlagen	3
2.1.1	Aufbau von Bakterien	3
2.1.2	<i>Escherichia Coli</i>	4
2.1.3	Rolle von Plasmiden	4
2.2	Proteinbiosynthese/Expression	5
2.2.1	Grundlagen	5
2.2.2	Transkription	6
2.2.3	Translation	7
2.3	Präparation von rekombinantem Protein	9
2.3.1	Klonierung eines Gens und Transformation in ein Bakterium	9
2.3.2	Proteinexpression in <i>Escherichia Coli</i> -Zellen	19
2.3.3	Isolation des gewünschten Proteins	24
2.3.4	Proteinkonzentration und Reinheit	28
2.4	Hämthiolat Proteine	31
2.4.1	Funktion von Hämproteinen	31
2.4.2	Spektrale Eigenschaften von Hämenzymen	32
2.4.3	Chloroperoxidase	33
2.4.4	Die Cytochrom P450-Familie	36
2.4.5	Cytochrom P450cam	40
2.4.6	Cytochrom P450bmp	43
2.4.7	<i>Cimex</i> -Nitrophorin	44
3	Physikalische Grundlagen	47
3.1	UV-Vis-Stopped-Flow-Spektroskopie	47
3.1.1	Physikalische Grundlagen optischer Spektroskopie	47
3.1.2	Aufbau einer Stopped-Flow-Anlage	49
3.1.3	Zur Auswertung der Daten verwendete Techniken	50
3.2	Grundlagen Reaktionskinetik	53
3.2.1	Reaktionsgeschwindigkeit	53
3.2.2	Reaktion erster Ordnung	53
3.2.3	Reaktion zweiter Ordnung	54
3.2.4	Reaktion pseudoerster Ordnung	54

3.2.5	Folgereaktionen.....	54
3.2.6	Temperaturabhängigkeit chemischer Reaktionen.....	55
3.3	EPR-Spektroskopie.....	55
3.3.1	Physikalische Grundlagen der EPR-Spektroskopie.....	55
3.3.2	g-Wert.....	56
3.3.3	Spin-Hamilton-Operator.....	57
3.3.4	Aufbau und Funktionsweise einer EPR-Anlage.....	58
3.4	Mössbauer-Spektroskopie.....	59
3.4.1	Der Mössbauer-Effekt.....	59
3.4.2	Analyse von Mössbauerspektren.....	60
3.4.3	Spin-Hamilton-Formalismus.....	61
3.4.4	Aufbau eines Mössbauer-Spektrometers.....	62
4	Material und Methoden.....	65
4.1	Geräte.....	65
4.2	Verwendete Substanzen.....	67
4.2.1	Verwendete Bakterienstämme.....	67
4.2.2	Umklonierung.....	67
4.2.3	Proteinexpression.....	70
4.2.4	Proteinaufreinigung.....	73
4.2.5	Reaktionspartner für die „Shunt“-Reaktion.....	74
4.2.6	Proteincharakterisierung.....	76
4.3	Methoden zur Umklonierung.....	77
4.3.1	Plasmidpräparation.....	77
4.3.2	Herstellen der Primer.....	80
4.3.3	PCR.....	80
4.3.4	Restriktion der DNA-Stücke und Ligation zum neuen Plasmid.....	82
4.3.5	Colony-PCR.....	84
4.3.6	Kontrollverdau.....	86
4.3.7	Gensequenzierung.....	86
4.4	Proteinexpression.....	86
4.4.1	Expression von Cytochrom P450cam in <i>E. Coli KRX</i> -Zellen.....	86
4.4.2	Expression von Cytochrom P450cam in <i>E. Coli C43 DE3</i> -Zellen nach etabliertem Protokoll.....	88

4.4.3	Verbesserte Expression von Cytochrom P450cam in <i>E. Coli</i> C43 DE3-Zellen	89
4.4.4	Expression von Cytochrom P450bmp in <i>E. Coli</i> DH5a-Zellen	90
4.5	Stammhaltung	91
4.5.1	Anlegen von Kryokulturen	91
4.6	Proteinaufreinigung	91
4.6.1	Isolation des Enzyms mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	91
4.6.2	Dialyse des Enzyms und Aufkonzentrierung	92
4.7	Proteincharakterisierung	93
4.7.1	CO-Differenz-Test	93
4.7.2	Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test)	93
4.7.3	SDS-Gelelektrophorese	95
4.7.4	Stopped-Flow-UV-Vis-Spektroskopie	97
4.7.5	EPR-Spektroskopie	98
4.7.6	Mössbauer-Spektroskopie	98
5	Ergebnisse und Diskussion	101
5.1	Die Reaktion von Chloroperoxidase mit Wasserstoffperoxid	101
5.1.1	Präparation	101
5.1.2	Kinetik der Reaktion von CPO mit H ₂ O ₂	101
5.2	Die Reaktion von Cytochrom P450cam mit Peroxysäuren	105
5.2.1	Umklonierung von Cytochrom P450cam zur Aufreinigung durch His-Tag	105
5.2.2	Optimierung der Enzympräparation	111
5.2.3	Bindung des Substrats Campher an Cytochrom P450cam	119
5.2.4	Kinetik der Reaktion von P450cam mit Persäuren	122
5.2.5	Bindet Imidazol an P450cam?	142
5.2.6	EPR-Spektren von Cytochrom P450cam	143
5.2.7	Problematik des Nachweises von Cpd I in P450cam	146
5.3	Die Reaktion von Cytochrom P450bmp mit Wasserstoffperoxid und Peroxysäuren	149
5.3.1	Präparation	149
5.3.2	Kinetik der Reaktion von P450bmp mit Wasserstoffperoxid und Persäuren	149
5.3.3	EPR-Spektren von Cytochrom P450bmp	169
5.4	Mössbauerspektroskopische Untersuchungen zur NO-Bindung am <i>Cimex</i> -Nitrophorin (cNP)	172

6	Zusammenfassung und Ausblick.....	181
7	Literaturverzeichnis	183
8	Anhang	189
8.1	Veröffentlichungen.....	189
8.2	Verwendete Plasmide.....	190
8.2.1	Konzentrationen und Reinheiten der verwendeten Plasmide.....	190
8.2.2	Konzentrationen der verwendeten DNA-Stücke	190
8.2.3	Primersequenzen	190
8.2.4	Basensequenz für pET20b+-CamC-Thrombin-His	191
8.2.5	Basensequenz für pET20b+-CamC-TEV-His	195
8.2.6	Basensequenz für pET20b+-CamC-Y75F/Y96F-Thrombin-His	197
8.2.7	Basensequenz für pET20b+-CamC-Y75F/Y96F-TEV-His	201
8.3	Spektroskopische Charakterisierung von Cytochrom P450cam	204
8.3.1	Einfluss von Campher auf die Expression von Cytochrom P450cam Y75F/Y96F	204
8.3.2	Test der Performance von <i>Pro-Kineticist</i>	206
8.3.3	Kinetik der Reaktion von P450cam Y75F/Y96F mit Persäuren	206
8.4	Charakterisierung von <i>Cimex</i> -Nitrophorin mittels Mössbauer-Spektroskopie.....	215
	Index.....	217
	Danksagung	221
	Lebenslauf	223