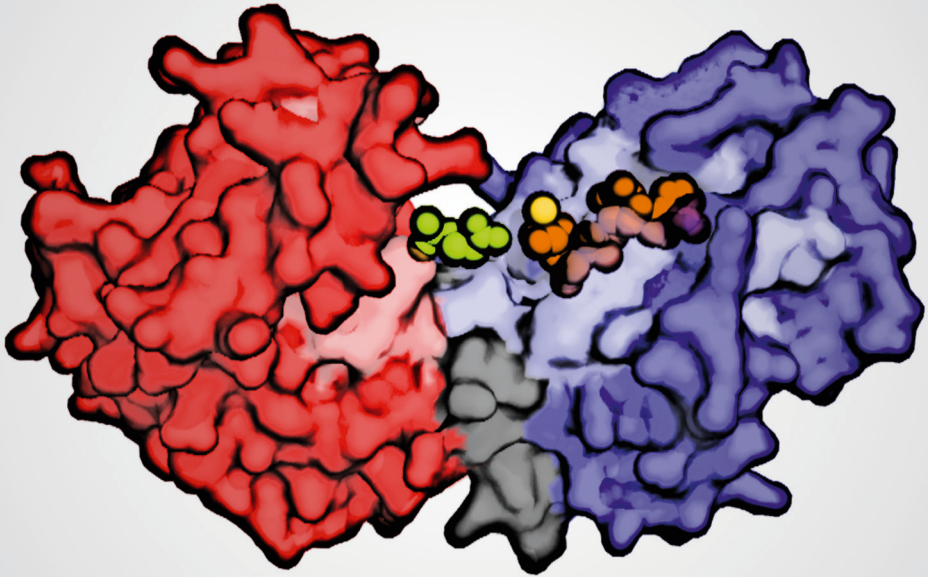


Etablierung eines Systems aus Cysteinmutanten der Phosphoglycerat-Kinase für Entfaltungsstudien mit Einzelmolekül-FRET

Antonie Schöne



Schlüsseltechnologien /
Key Technologies
Band/ Volume 143
ISBN 978-3-95806-237-5

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Complex Systems
Molekulare Biophysik (ICS-5)

Etablierung eines Systems aus Cysteinmutanten der Phosphoglycerat-Kinase für Entfaltungsstudien mit Einzelmolekül-FRET

Antonie Schöne

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies

Band / Volume 143

ISSN 1866-1807

ISBN 978-3-95806-237-5

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Material.....	9
3	Methoden	26
3.1	Methoden der Klonierung	26
3.1.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	26
3.1.2	Primerabhängige Mutagenese	28
3.1.3	Endonukleolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	30
3.1.4	Dephosphorylierung von DNA.....	31
3.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
3.1.6	Auftrennung von Nukleinsäuren mit Agarose-Gelelektrophorese	33
3.1.7	Herstellung transformationskompetenter Zellen (<i>E.coli</i>)	33
3.1.8	Transformation von <i>E.coli</i>	34
3.1.9	Kultivierung von <i>E.coli</i>	35
3.1.10	Plasmidpräparation	35
3.1.11	Sequenzierung	35
3.2	Biochemische Methoden	36
3.2.1	Expression der yPGK in <i>E.coli</i>	36
3.2.2	Proteinreinigung	36
3.2.3	Natriumdodecylsulfat–Polyacralamid-Gelelektrophorese.....	40
3.2.4	Blue-Native-PAGE (BN-PAGE).....	41
3.2.5	Westernblot.....	42
3.2.6	yPGK-Aktivitätstest	43
3.3	Methoden der Spektroskopie.....	46
3.3.1	Zirkulardichroismus-Spektroskopie	46
3.3.2	Dynamische Lichtstreuung (<i>dynamic light scattering</i> , DLS).....	49
3.3.3	Fluoreszenzspektroskopie.....	50

4	Ergebnisse.....	71
4.1	Design der Cystein-Mutanten der yPGK.....	71
4.2	Proteinexpression und Reinigung.....	75
4.3	Dynamische Lichtstreuung.....	80
4.4	Integrität der Sekundärstruktur.....	82
4.5	Enzymatische Aktivität der Cysteinvarianten der yPGK	84
4.6	Fluoreszenzmarkierung der yPGK für Einzelmolekül-FRET-Studien	88
4.7	Diffusionseigenschaften der fluoreszenzmarkierten yPGK-Varianten	91
4.8	Farbstoffabstände unter nativen Bedingungen.....	93
4.9	Equilibrium-Entfaltungsstudien an der yPGK	97
4.9.1	CD-Studien zur Entfaltung der yPGK-Varianten.....	97
4.10	Einzelmolekül-FRET-Studien zur Entfaltung der yPGK.....	99
4.10.1	Entfaltung der Interdomänenmutante PGK Q135C S290C.....	99
4.10.2	Entfaltung der N-Domänenmutante PGK S1C Q135C	103
4.10.3	Entfaltung der C-Domänenmutante PGK T202C D256C	106
5	Diskussion und Ausblick	111
5.1	Mutagenese und Fluoreszenzmarkierung der yPGK.....	111
5.2	Reinigung der yPGK	114
5.3	Präparation der yPGK für Einzelmolekül-FRET	116
5.4	Charakterisierung der yPGK	117
5.5	Wirkung von Guanidiniumhydrochlorid	118
5.6	Entfaltung der yPGK.....	120
5.7	Ausblick.....	123
6	Zusammenfassung	125
7	Summary.....	127
8	Literaturverzeichnis	129

Schlüsseltechnologien /
Key Technologies
Band / Volume 143
ISBN 978-3-95806-237-5

