

Die Octopindehydrogenase der
Pilgermuschel *Pecten maximus*:
Neue Einblicke in die Struktur und den
Reaktionsmechanismus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt

von

Andre Müller
aus Oberhausen

Düsseldorf, 2006

Aus dem Institut für Zoophysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Manfred K. Grieshaber
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.2006

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
ABKÜRZUNGEN	5
EIN- UND DREIBUCHSTABEN-AMINOSÄURE-CODE	7
1 EINLEITUNG	9
<i>Funktionsbedingte Anaerobiose</i>	<i>9</i>
<i>Anaerobe Glykolyse.....</i>	<i>11</i>
<i>Terminale Pyruvatoxidoreduktasen.....</i>	<i>12</i>
<i>Biotopbedingte Anaerobiose.....</i>	<i>14</i>
<i>Dualismus der Opimbildung.....</i>	<i>15</i>
<i>Verbreitung von Opindehydrogenasen.....</i>	<i>16</i>
<i>Biochemische Charakterisierung der Opindehydrogenasen</i>	<i>17</i>
2 MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1 TIERBESCHAFFUNG.....	20
2.2 CHEMIKALIEN.....	20
2.3 STERILISATION VON GEFÄßEN, LÖSUNGEN UND MEDIEN	20
2.4 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME	20
2.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	21
2.5.1 DNA-Isolierung.....	21
2.5.2 RNA-Isolierung nach Chomzynski et al. (1987).....	21
2.5.2.1 Isolierung von Poly(A) ⁺ RNA	22
2.5.3 cDNA-Synthese.....	22
2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
2.5.4.1 Amplifikation des ODH-Gens	22
2.5.4.2 Molekularbiologische Artbestimmung	22
2.5.5 Gelelektrophoretische Trennung der DNA.....	23
2.5.6 Präparative Isolierung von PCR-Fragmenten	23
2.5.7 Klonierung von PCR-Produkten	23
2.5.7.1 Adenylierung von PCR-Amplifikaten	23
2.5.8 Transformation von Bakterien.....	24
2.5.8.1 Herstellung chemischkompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	24
2.5.8.2 Transformation durch Hitzeschock.....	24
2.5.8.3 Herstellung elektrokompenter Zellen	24
2.5.8.4 Elektroporation.....	25
2.5.8.5 Blau-Weiß-Selektion	25
2.5.8.6 Kolonie-PCR.....	25
2.5.9 Plasmidpräparation	26
2.5.10 DNA-Sequenzierung.....	26

2.5.11	<i>Auswertung der Sequenzdaten</i>	26
2.6	ÜBEREXPRESSION DER ODH-5HIS.....	26
2.6.1	<i>Konstruktion der Überexpressionsvektoren</i>	27
2.6.1.1	ODH-5His in pTYBI.....	27
2.6.1.2	ODH-LE6His in pET-24d(+).....	27
2.6.1.3	ODH ohne Fusion mit einem Affinitätstag (CtermPst in pTYBI).....	28
2.6.2	<i>Anzuchtbedingungen für rekombinante ODH</i>	29
2.6.3	<i>Isolierung der überexprimierten ODH</i>	29
2.6.4	<i>Aufschluss der E. coli-Zellen</i>	30
2.7	GERICHTETE MUTAGENESE (SITE-DIRECTED MUTAGENESIS).....	30
2.7.1	<i>Konstruktion der Mutageneseprimer</i>	30
2.7.2	<i>Mutagenesereaktion</i>	30
2.7.3	<i>Kontrolle durch Restriktionsverdau</i>	31
2.7.4	<i>Umklonierung in den Expressionsvektor pTYBI</i>	32
2.8	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	32
2.8.1	<i>Herstellung von Rohextrakten aus Adduktormuskeln von Pecten maximus</i>	32
2.8.2	<i>Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung</i>	32
2.8.3	<i>Chromatographische Methoden</i>	33
2.8.3.1	Reinigung der Rohextrakte über Ni-NTA Superflow.....	33
2.8.3.2	Anionenaustauschchromatographie.....	34
2.8.3.3	Analytische Gelfiltrationschromatographie.....	34
2.8.3.4	Präparative Gelfiltrationschromatographie.....	35
2.8.3.5	Hydroxylapatit-Chromatographie.....	35
2.8.3.6	Affinitätschromatographie an Arginin-Sepharose.....	35
2.8.4	<i>Aktivitätsbestimmung</i>	36
2.8.5	<i>Bestimmung kinetischer Parameter</i>	36
2.8.6	<i>Quantitativer Nachweis von SH-Gruppen und Inhibition der ODH durch thiol-spezifische Reagenzien</i>	37
2.8.7	<i>Proteinbestimmung</i>	37
2.8.8	<i>Elektrophoretische Methoden</i>	38
2.8.8.1	Horizontale Disk-Elektrophorese.....	38
2.8.8.2	Proteinnachweis in Polyacrylamidgelen.....	39
2.8.8.3	Aktivitätsanfärbung.....	39
2.8.8.4	Coomassie-Färbung.....	39
2.8.8.5	Silberfärbung.....	39
2.8.8.6	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot).....	40
2.8.8.7	Isoelektrische Fokussierung.....	41
2.9	VERSUCHE ZUR KRISTALLISATION DER ODH.....	41
2.9.1	<i>Probenvorbereitung</i>	43
2.9.2	<i>Sitting- und Hanging-Drop Ansätze</i>	43
2.9.3	<i>Additiv-Screen</i>	44
2.9.4	<i>Mikroseeding</i>	45

2.9.5	<i>Kontrollexperimente</i>	45
2.9.6	<i>Röntgenographische Untersuchung von ODH-Kristallen</i>	45
2.10	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR).....	46
2.10.1	<i>Expression isotoopenmarkierter ODH</i>	47
2.10.1.1	¹⁵ N-markierte ODH.....	47
2.10.1.2	Expression ² H- ¹⁵ N- ¹³ C markierter ODH.....	47
2.10.2	<i>NMR-Experimente</i>	48
2.10.3	<i>Titrationsexperimente mit Liganden</i>	48
2.10.3.1	Normierung der chemischen Verschiebungen bei der Ligandenbindung.....	49
2.10.3.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K _D	49
2.10.4	<i>Versuche zur Renaturierung der ODH</i>	50
2.10.4.1	Schnelle-Verdünnung (Rapid-Dilution).....	50
2.10.4.2	Dialyse.....	50
2.10.4.3	Renaturierung mit chromatographischen Methoden (Middelberg, 2002).....	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	ARTBESTIMMUNG.....	51
3.2	ISOENZYME DER ODH.....	51
3.2.1	<i>Einzeltier-Präparationen von Pecten maximus</i>	51
3.2.2	<i>Klonierung und Sequenzierung der ODH</i>	53
3.2.3	<i>Expression der ODH-Isoenzyme</i>	54
3.3	KINETISCHE PARAMETER DER ODH.....	55
3.3.1	<i>Substratspektrum der ODH-5His</i>	58
3.4	REINIGUNG REKOMBINANTER OCTOPINDEHYDROGENASEN.....	60
3.4.1	<i>Reinigung der ODH-5His aus einer 1 L-Kultur</i>	60
3.4.2	<i>Reinigung der ODH-5His aus 8 L-E. coli</i>	63
3.4.3	<i>ODH-LE6His</i>	67
3.4.3.1	Reinigung der ODH-LE6His.....	68
3.4.4	<i>Reinigung der ODH ohne Histidin-Tag (ODH-CtermPst)</i>	71
3.4.5	<i>Reinigung der ODH ohne Histidin-Tag II</i>	76
3.5	KRISTALLISATION DER ODH.....	79
3.5.1	<i>Erste Kristallisationsversuche</i>	79
3.5.2	<i>Evaluierung geeigneter Kristallisationsbedingungen mittels „Sparse matrix screen“</i>	80
3.5.2.1	ODH-5His kristallisiert in PEG-4000 und PEG-6000 bei 12 °C.....	81
3.5.2.2	ODH-5His kristallisiert in Na-Citrat bei 12 °C.....	82
3.5.2.3	Kristallisationsversuche mit ODH ohne His-Tag und mit ODH-LE6His.....	84
3.5.2.4	Kontrollexperimente.....	84
3.5.3	<i>Röntgenographische Untersuchung der ODH-Kristalle</i>	85
3.5.4	<i>Homogenität der ODH-Präparation</i>	86
3.6	NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER ODH.....	87
3.6.1	<i>Reinigung ¹⁵N-markierter ODH-5His</i>	87
3.6.2	<i>1D-¹H-Spektrum der ODH</i>	88

3.6.3	2D-Spektren von ¹⁵ N-markierter ODH.....	89
3.6.4	Reinigung dreifach-isotopen-markierter ODH	91
3.6.5	Versuche zur Denaturierung/Renaturierung der ODH.....	93
3.6.6	Titrationsexperimente.....	95
3.7	GERICHTETE MUTAGENESE UND CHARAKTERISIERUNG DER ODH-MUTANTEN.....	99
3.7.1	Herstellung der Mutanten	100
3.7.2	Expression und Reinigung der Mutanten	100
3.7.3	Auswahl der Aminosäurereste für die Mutagenese	104
3.7.4	Bedeutung der Aminosäuren Histidin 212, Arginin 324 und Aspartat 329.....	105
3.7.4.1	Kinetische Charakterisierung der ODH-Mutanten R324A, D329A und H212A.....	106
3.7.5	Bedeutung von Cystein-Resten.....	109
3.7.5.1	Bestimmung des Cysteingehaltes der ODH.....	109
3.7.5.2	Inhibition der ODH durch thiolmodifizierende Reagenzien.....	110
3.7.6	Mögliche Aminosäurebindestelle	113
3.7.7	Weitere Aminosäuren, die für die Mutagenese ausgewählt wurden.....	115
4	DISKUSSION	119
4.1	ISOENZYME DER ODH	120
4.2	REINIGUNG DER ODH.....	122
4.3	KRISTALLISATION DER ODH	126
4.4	NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	131
4.5	DER REAKTIONSMCHANISMUS DER ODH.....	135
4.5.1	Kinetische Eigenschaften wildtypischer ODH-5His.....	138
4.5.2	Gerichtete Mutagenese von Cystein-Resten.....	139
4.5.3	Gerichtete Mutagenese weiterer Aminosäurereste.....	141
4.5.4	Die katalytische Triade	143
4.5.5	Aminosäurebindestelle	146
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	150
	SUMMARY	152
6	LITERATUR	153
7	ANHANG	170
7.1	PRIMERSEQUENZEN	170
7.2	SEQUENZVERGLEICH ZUR ARTBESTIMMUNG	173
7.3	EINZELTIER-PRÄPARATIONEN VON <i>PECTEN MAXIMUS</i>	174
7.4	SEQUENZVERGLEICHE DER <i>PECTEN MAXIMUS</i> ODH-ISOENZYME	175
7.5	PROTEINALIGNMENT VERSCHIEDENER OPINDEHYDROGENASEN.....	178
7.6	CRYSTAL SCREEN I (HAMPTON RESEARCH ,USA)	181
7.7	CRYSTAL SCREEN II (HAMPTON RESEARCH, USA)	182

Abkürzungen

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
A	Adenin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat Dinatriumsalz
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	copy DNA
CENDH	N-(1-D-carboxyethyl)-L-Norvalin Dehydrogenase
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
D ₂ O	Deuteriumoxid
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2)-nitro-Benzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GTC	Guanidinium-Isothiocyanat
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HSQC	Hetero single quantum coherence (Heteronukleare Einquanten-Kohärenz)
IAA	Iodacetamid

IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMAC	Immobilisierte Metall-Ionen Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kcat	Wechselzahl
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K_i	Inhibitionskonstante
K_m	Michaelis-Konstante
LB	Luria Broth
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MWCO	molecular weight cut-off (Molekulargewichtsausschlussgrenze)
$NAD^+ / NADH$	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert/ reduziert)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickelnitrilotriessigsäure
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernmagnetische Resonanz)
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 Nanometern
ODH	Octopindehydrogenase
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCMB	p-Chlormercuribenzoat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEG MME	Polyethylenglykol Monomethylether
pI	isoelektrischer Punkt
PMS	Phenazinmethosulfat
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RE	Rohextrakt

RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TDH	Tauropindehydrogenase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRA	Triethanolaminhydrochlorid
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy (Optimierte transverse Relaxationsspektroskopie)
U	Unit, $\mu\text{mol min}^{-1}$
ÜNK	Übernachtkultur
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid

Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Code

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Sauerstoff spielt für die Energieversorgung der überwiegenden Mehrzahl der rezenten tierischen Organismen eine entscheidende Rolle. Substrate für eine aerobe Energiegewinnung sind vor allem Glukose oder ihre Speicherform, das Glykogen. Während Glukose zuerst durch die Hexokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert werden muss, kann Glykogen direkt in den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) eintreten. In der Glykolyse können ausgehend von einer Glykosyleinheit zwei bzw. drei Moleküle ATP gewonnen werden. Endprodukte der Glykolyse sind Pyruvat, NADH und Wasser. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat im Krebs-Zyklus innerhalb der Mitochondrien weiter oxidiert. Die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen werden zuerst auf Reduktionsäquivalente (NADH, FADH₂) und schließlich auf Sauerstoff übertragen. Sauerstoff sorgt für einen kontinuierlichen Elektronenfluss über die Komplexe der Atmungskette und somit für den Aufbau eines Protonengradienten, der für die Energiekonservierung mit Hilfe der ATPsynthase genutzt werden kann. Bei der vollständigen Oxidation der Glukose können 29.5 Moleküle ATP aus einer Glykosyleinheit gewonnen werden. Werden die Elektronen des cytosolischen NADH über den Malat-Aspartat-Shuttle in die Mitochondrien transportiert, so können pro Mol Glukose sogar 31 Mol ATP gewonnen werden (Hinkle *et al.*, 1991).

Funktionsbedingte Anaerobiose

Obwohl der Sauerstoffanteil an der Zusammensetzung der heutigen Atmosphäre ca. 21 % beträgt, können Organismen kurz- oder längerfristigen Sauerstoffmangelsituationen ausgesetzt sein. Nach Zebe *et al.* (1980) kann man zwei Arten des Sauerstoffmangels unterscheiden: Während starker körperlicher Anstrengungen, z.B. bei der Flucht vor Fressfeinden (Flight and Fight-Reaktion) oder beim Eingraben ins Sediment kann es in bestimmten Geweben zu einer funktionsbedingten Anaerobiose kommen (Gäde *et al.*, 1978; Zebe *et al.*, 1980). Beispiele für eine solche funktionsbedingte Anaerobiose sind die Fluchtreaktionen der Pilgermuschel *Pecten maximus* oder der Wellhornschnecke *Buccinum undatum*. Beide versuchen Fressfeinden, wie z.B. dem Seestern *Astropecten aurantiacus*, zu entkommen. Kontraktionen des Adduktormuskels der Pilgermuschel führen zu einem schnellen Öffnen und Schließen der Schale, was zu heftigen Spring- und Schwimmbewegungen führt (Thomas und Gruffydd, 1971). Die Wellhornschnecke versucht, sich durch Rotationen der Schale um den Eingeweidessack, die durch den Columellarmuskel angetrieben werden, dem Fressfeind zu entwinden

(Feder, 1963). Der Spritzwurm *Sipunculus nudus* oder der Wattwurm *Arenicola marina* können durch starken Wellengang ausgespült werden und müssen sich wieder ins Sediment eingraben um vor Fressfeinden geschützt zu sein (Pörtner *et al.*, 1984; Siegmund *et al.*, 1985).

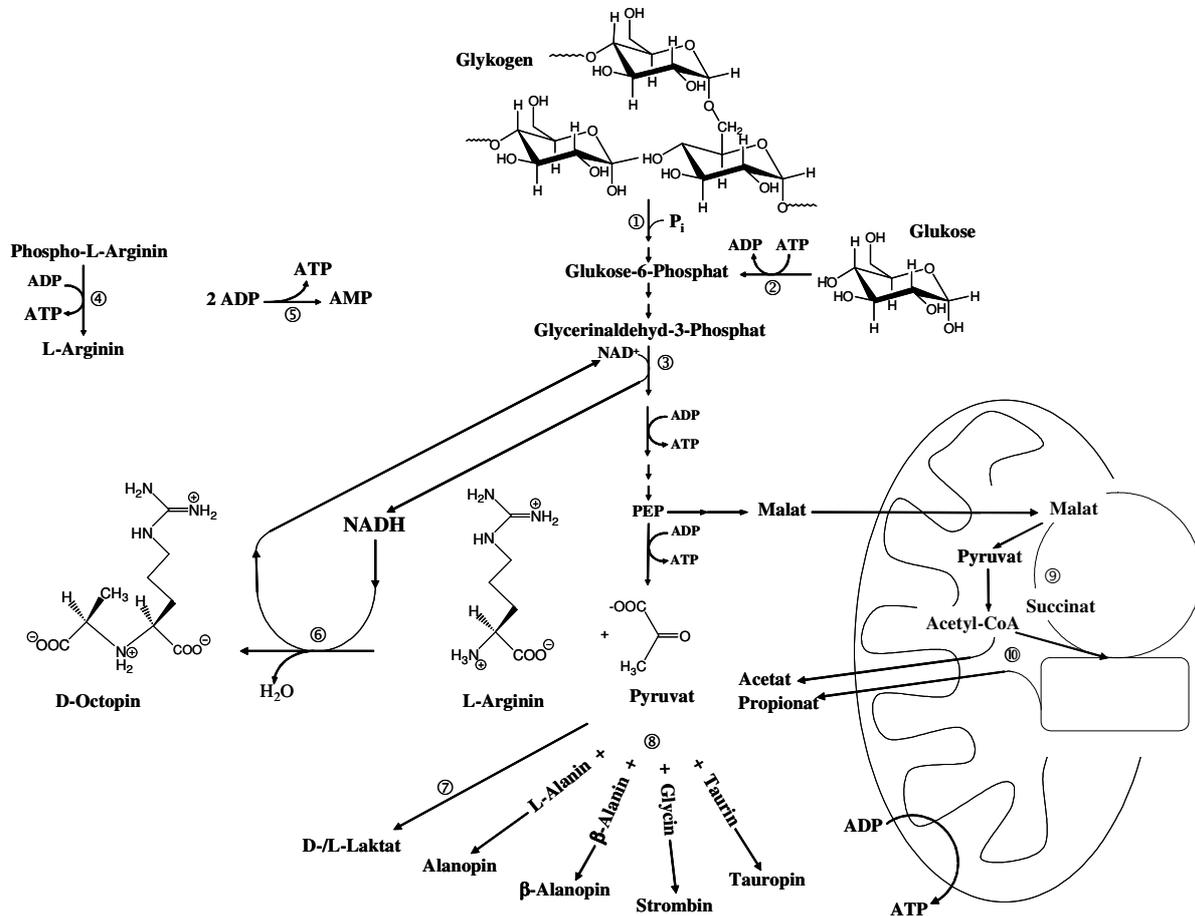


Abb. 1 Überblick über die verschiedenen anaeroben Stoffwechselforgänge in marinen Invertebraten.
 ① Phosphorylase ② Hexokinase ③ Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) ④ Argininkinase
 ⑤ Myokinase ⑥ Octopindehydrogenase (ODH) ⑦ Laktatdehydrogenase (LDH) ⑧ verschiedene Opindehydrogenasen (Pyruvatoxidoreduktasen; s. Erläuterung im Text) ⑨ Fumaratreduktase-Komplex (Succinatgärung)
 ⑩ Acetat- /Propionatgärung (verändert nach Grieshaber *et al.*, 1994).

Bis zu 20 % der für die „Flight and Fight“-Reaktionen benötigten Energie kann aus dem ATP-Vorrat der Zelle geschöpft werden. Die restlichen 70-80 % werden durch Transphosphorylierung von Phosphagenen bereitgestellt. Phosphagene sind phosphorylierte Guanidiniumverbindungen. Ihre energiereiche Phosphorylgruppe kann katalysiert durch Phosphagenkinasen auf ADP übertragen werden. Kreatinphosphat ist das einzige Phosphagen der Vertebraten. Bei Invertebraten wurden sieben weitere Phosphagene und die zugehörigen Phosphotransferasen gefunden (Roche *et al.*, 1960; Ellington, 1989; Ellington, 2001). In vielen Spezies können gleichzeitig mehrere Phosphagene, wenn auch oft in unterschiedlichen Kon-

zentrationen, detektiert werden. L-Argininphosphat, das Phosphagen der Mollusken und Arthropoden, ist bei den Invertebraten am weitesten verbreitet (Meyerhof, 1928; Meyerhof und Lohmann, 1928; Grieshaber, 1978; Gäde *et al.*, 1978). Im Adduktormuskel der ruhenden Pilgermuschel wurde mit 52 μmol pro Gramm Muskel eine hohe L-Argininphosphat-Konzentration gemessen (Beis und Newsholme, 1975). Während einer heftigen Fluchtreaktion nimmt die Konzentration fast vollständig ab (Grieshaber und Gäde, 1977; Gäde *et al.*, 1978). Vergleiche der Phosphagenkonzentrationen im Gewebe verschiedener Spezies haben gezeigt, dass der Phosphagengehalt mobiler Tiere größer ist als in sessilen Spezies. Entsprechend der Phosphagenkonzentration im Gewebe können unterschiedlich lange Perioden erhöhter Aktivität bewältigt werden. Jedes Phosphagen benötigt für die Übertragung der Phosphorylgruppe auf ADP eine eigene Phosphagenkinase. Die L-Argininkinase stellt wahrscheinlich den ursprünglichsten Vertreter dieser Enzymfamilie dar, aus dem sich die Vielzahl der Phosphagenkinasen entwickelt haben soll (van Thoai und Roche, 1964; Suzuki und Furukohri, 1994; Suzuki *et al.*, 1998). Bei den Mollusken arbeitet die L-Argininkinase (Abb.1, ④) *in vivo* nahe ihres Gleichgewichts und sorgt, z.B. bei der Fluchtreaktion, für eine schnelle Bereitstellung von ATP (van Thoai und Roche, 1964; Beis und Newsholme, 1975; Graham *et al.*, 1986). Eine weitere Möglichkeit der ATP-Synthese wird von der Myokinase (Abb.1, ⑤) katalysiert, die zwei ADP in ATP und AMP umwandelt.

Anaerobe Glykolyse

Wird mehr ATP benötigt als durch Phosphagene bereitgestellt werden kann, so wird dieses durch die anaerobe Glykolyse gewonnen. Glykogen ist die hauptsächliche Energiequelle unter funktionsbedingter Anaerobiose und daher auch in hohen Konzentrationen im Muskelgewebe enthalten. Bei der Miesmuschel *Mytilus edulis* macht Glykogen zwischen 10 und 30 % des Trockengewichts aus (de Zwaan und Zandee, 1972; de Zwaan und Wijsman, 1976). Hohe Aktivitäten der Phosphorylase (Abb.1, ①) und im Vergleich geringe Aktivitäten der Hexokinase (Abb.1, ②) wurden z.B. in der Adduktormuskulatur von *Pecten maximus* und in der Mantelmuskulatur des schnell schwimmenden Kalmars *Loligo vulgaris* gefunden (Zammit und Newsholme, 1976).

Allerdings lässt sich durch anaerobe Glykolyse, verglichen mit einer vollständigen Oxidation der Glukose, nur wenig Energie gewinnen. Die Ausbeute liegt lediglich bei 10 %. Zum Ausgleich kann die glykolytische Fluxrate erhöht werden (Pasteur-Effekt) (de Zwaan *et al.*, 1980; Thompson *et al.*, 1980; Pörtner *et al.*, 1984; Stanley und Connet, 1991). Allosteri-

sche Kontrolle von Schlüsselenzymen, kovalente Protein-Modifikationen z.B. der Glykogenphosphorylase (Ebberink und Salismans, 1982) und Phosphofruktokinase (Ebberink, 1982; Storey, 1984) sowie die Kompartimentierung von Enzymgruppen spielen bei der Regulation der anaeroben Glykolyse eine wichtige Rolle (Clarke und Masters, 1974a und b; Plaxton und Storey, 1986; Masters *et al.*, 1987; Srivastava, 1991). Durch eine erhöhte Glykolyserate häufen sich jedoch Reduktionsäquivalente an, die nicht alle in der Atmungskette oxidiert werden können, da zum einen die Transportkapazität für die Reduktionsäquivalente ins Mitochondrium erschöpft ist und zum anderen die Fluxrate des Krebszyklus einen limitierenden Faktor darstellt (Crabtree und Newsholme, 1972; Zammit und Newsholme, 1976; Grieshaber *et al.*, 1994). Obwohl in der stark arbeitenden Muskulatur Energie überwiegend durch die anaerobe Glykolyse gewonnen wird, müssen die Mitochondrien nicht zwingend einem Sauerstoffmangel ausgesetzt sein. Die O₂-Konzentration in den Mitochondrien kann ausreichend sein, um ATP zu produzieren, allerdings ist die Rate zu gering, um den erhöhten Energiebedarf im kontrahierenden Muskel sicherzustellen (Connet *et al.*, 1983, 1984 und 1985; Katz und Sahlin, 1988). Damit die anaerobe Glykolyse nicht zum Erliegen kommt, müssen die bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Abb.1, ③) gebildeten Reduktionsäquivalente reoxidiert werden.

Terminale Pyruvatoxidoreduktasen

Verschiedene terminale Pyruvatoxidoreduktasen katalysieren die Oxidation von NADH. Der bekannteste Vertreter dieser Enzymklasse ist die Laktat-Dehydrogenase (Abb.1, ⑦; L-Laktat: NAD⁺ Oxidoreduktase, EC 1.1.1.27; LDH). Dieses Enzym katalysiert die Übertragung eines Hydridions vom NADH auf Pyruvat. Endprodukte dieser Reaktion sind Laktat und NAD⁺ (Meyerhof, 1924; Straub, 1940; Crabtree und Newsholme, 1972). Die LDH hält somit vorwiegend bei Vertebraten aber auch bei Crustaceen, Spinnen und Insekten den Redoxzustand der Zellen bei funktionsbedingter Anaerobiose aufrecht (Livingstone *et al.*, 1983). Laktat als Endprodukt einer anaeroben Glykolyse lässt sich leicht in ihren Geweben nachweisen (Fletcher und Hopkins, 1907; Meyerhof, 1924; Bennett, 1978).

In der Muskulatur der Coelenteraten, Nemertinen, Cnidariern und Mollusken konnte allerdings auch nach extensiver Muskelarbeit kein oder nur wenig Laktat gefunden werden (Glaister und Kerly, 1936; Zebe, 1975). Weiterhin war eine LDH gar nicht oder nur in sehr geringer Aktivität nachweisbar. Lange Zeit war unklar, ob auch diese Organismen überhaupt Energie über eine anaerobe Glykolyse gewinnen können (Dales, 1958; Surholt, 1980).

Heute weiß man, dass anstelle der LDH so genannte Opindehydrogenasen (Abb.1, ⑥ und ⑧) in diesen Tieren die anaerobe Glykolyse terminieren (Zammit und Newsholme, 1976; Baldwin und Opie, 1978; Gäde, 1980; Livingstone *et al.*, 1983; Pörtner *et al.*, 1984; Siegmund *et al.*, 1985; Gäde und Grieshaber, 1986; Livingstone *et al.*, 1990; Hammen und Bullock, 1991; Hammen und Fielding, 1993). Die Opindehydrogenasen katalysieren die reversible, reduktive Kondensation von Pyruvat oder einer anderen α -Ketosäure mit einer Aminosäure in Gegenwart von NADH. Endprodukte dieser Reaktion sind N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren, die als Opine bezeichnet werden (Tempé, 1983) und NAD^+ . Bereits 1928 isolierte Morizawa aus der Mantelmuskulatur des Cephalopoden *Octopus octopodia* eine „ungewöhnliche“ Aminosäure, die später als Octopin bezeichnet wurde (Morizawa, 1928; Moore und Willson, 1937a und b). Ausgehend von Pyruvat, L-Arginin und Muskelextrakten aus verschiedenen marinen Invertebraten wurde Octopin 1959 von van Thoai und Robin *in vitro* synthetisiert (van Thoai und Robin, 1959a und b). Die Kondensation von Pyruvat mit der Aminosäure L-Arginin wird von einem Enzym katalysiert, das den Namen Octopindehydrogenase (Abb.1, ⑥; ODH, EC 1.5.1.11, N^2 -(1-carboxyethyl)-L-Arginin: NAD^+ Oxidoreduktase) erhielt (van Thoai *et al.* 1961). Isoliert wurde dieses Enzym zum ersten Mal 1969 aus dem Adduktormuskel der Pilgermuschel *Pecten maximus* (van Thoai *et al.*, 1969). Später wurde ODH in einer Vielzahl anderer mariner bzw. limnischer Invertebraten nachgewiesen und aus ihnen gereinigt, z.B. aus dem Anneliden *Sipunculus nudus* (Haas *et al.*, 1973), aus der Teichmuschel *Anodonta cygnea* (Gäde und Grieshaber, 1975), aus *Pecten jacobaeus* (Grieshaber und Gäde, 1977) sowie aus dem Kalmar *Loligo vulgaris* (Grieshaber *et al.*, 1978) und dem Nemertinen *Cerebratulus lacteus* (Gäde und Carlsson, 1984).

Im Adduktormuskel einer flüchtenden Pilgermuschel steigt der Gehalt an L-Arginin durch die Transphosphorylierung von Argininphosphat (Abb.1, ④) stark an. Freigewordenes L-Arginin wird während der nachfolgenden Erholungsphase ODH-katalysiert mit Pyruvat zu D-Octopin umgesetzt (Grieshaber und Gäde, 1977; Gäde *et al.*, 1978). Bei dieser Reaktion werden ebenfalls die bei der Reaktion der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Abb.1, ③) anfallenden Reduktionsäquivalente reoxidiert, so dass die ODH bei den marinen Invertebraten den Redoxzustand des sauerstoffverarmten Muskelgewebes konstant hält (Fields *et al.*, 1976b und c; Fields und Quinn, 1981; Fields, 1983). Bei anderen Vertretern mariner Invertebraten übernehmen andere Opindehydrogenasen diese Reaktion.

Bis heute sind vier weitere Opindehydrogenasen in marinen Invertebraten entdeckt und teilweise auch gereinigt worden (Gäde und Grieshaber, 1986; Grieshaber und Kreutzer, 1986; Kreutzer *et al.*, 1986; Grieshaber *et al.*, 1994). Die Strombin-/ Alanopindehydrogenase (Glycin bzw. Alanin als Aminosäuresubstrat; EC 1.5.1.22, EC 1.5.1.17) wurde von Fields (1976a) im Adduktormuskel der Auster *Crassostrea gigas* nachgewiesen. Die Tauropindehydrogenase, die Taurin neben Pyruvat als Substrat verwendet, ist 1986 von Sato entdeckt worden (Sato und Gäde, 1986), der auch die β -Alanopindehydrogenase (Aminosäuresubstrat β -Alanin) aus der Trogmuschel *Scapharca broughtonii* isolierte (Sato *et al.*, 1987). Oft findet man jedoch in einem Organismus bzw. Gewebe mehr als eine Opindehydrogenaseaktivität. Teilweise ließen sich die verschiedenen Aktivitäten unterschiedlichen Enzymen zuordnen (Kreutzer *et al.*, 1989). Es lassen sich jedoch auch Opindehydrogenasen finden, die ein breites Substratspektrum bezüglich der Aminosäure aufweisen (Ellington, 1980; Storey und Dando, 1982; Gäde und Grieshaber, 1986). Weiterhin wird in der Literatur auch von Enzym polymorphismen und gewebespezifischen Isoenzymen berichtet (Storey, 1977; Storey und Storey, 1979a und b; Dando *et al.*, 1981; Kanno *et al.*, 1996; Manchenko *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2000).

Biotopbedingte Anaerobiose

Neben einer funktionsbedingten Anaerobiose können tierische Organismen auch einer biotopbedingten Anaerobiose ausgesetzt sein, die sich durch die Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) in ihrem Habitat unter einen kritischen Wert (p_c) auszeichnet (Zebe *et al.*, 1980). Dieser hypoxische Zustand kann zeitlich begrenzt sein oder aber fortwährend bestehen. Bewohner des intertidalen Sediments zum Beispiel sind durch den periodischen Wechsel von Ebbe und Flut zeitweilig hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, da sie ihren Bau bei Niedrigwasser nicht mehr mit O_2 -reichem Wasser irrigieren können. In limnischen und marinen Habitaten kommt es durch starke Besiedlung mit Tieren und Pflanzen zu diurnalen Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks. Parasiten, die im Verdauungstrakt von Vertebraten leben, sind hingegen vollständig von atmosphärischem Sauerstoff abgeschlossen. Zur Energieversorgung sind Lebewesen in diesen Habitaten mitunter auf eine anaerobe Energiegewinnung angewiesen.

Zu Beginn einer biotopbedingten Anaerobiose wird Energie ebenfalls überwiegend durch die Transphosphorylierung von Phosphagenen gewonnen. Im Gegensatz zum Phosphokreatin der Vertebraten sind die Phosphagene der Invertebraten thermodynamisch stabiler und damit hervorragend geeignet, Energie auch über einen längeren Zeitraum bei einem sehr nie-

drigen [ATP]/[ADP]-Verhältnis im Gewebe bereitzustellen (Schöttler *et al.*, 1984a und b; Graham und Ellington, 1985; Graham *et al.*, 1985; Ellington, 1989; Ellington, 2001). Weiterhin lässt sich durch Substratkettenphosphorylierung während der anaeroben Glykolyse und durch die Reduktion von Fumarat zu Succinat (Abb.1, ⑨) Energie gewinnen (Kmetec und Bueding, 1961; Schroff und Schöttler, 1977; Holwerda und de Zwaan, 1979 und 1980). Zusätzlich wird der Metabolismus drastisch reduziert und die Glykolyserate bis auf 5 bis 10 % der normoxischen Rate herabgesetzt (Meinardus-Hager *et al.*, 1989; Hardewig *et al.*, 1991a und b). Die Reoxidation von glykolytischem NADH allerdings wird auch bei biotopbedingter Anaerobiose durch die Laktat- bzw. durch die Opindehydrogenasen ermöglicht.

Bei länger andauernder Anaerobiose wird auch das mitochondriale Kompartiment in die Energiegewinnung mit einbezogen. Die Ausnutzung des Fumaratreduktase-Komplexes (Abb.1, ⑨) und des Acetat-Propionat-Weges (Abb.1, ⑩; Schroff und Zebe, 1980; Schöttler, 1983; Hardewig *et al.*, 1994) erhöhen die ATP-Ausbeute von 3 Mol auf 7 Mol ATP pro Glykosyleinheit (Grieshaber *et al.*, 1994).

Dualismus der Opinbildung

Opindehydrogenasen sind also sowohl bei funktionsbedingter, als auch bei biotopbedingter Anaerobiose entscheidend an der Energieversorgung der Invertebraten beteiligt. Allerdings werden oft unterschiedliche Endprodukte nach funktions- bzw. biotopbedingter Anaerobiose akkumuliert (Kreutzer *et al.*, 1989). Im Hautmuskelschlauch des Wattwurms *Arenicola marina* z.B. findet man nach starker Grabaktivität überwiegend Alanopin, wohingegen bei einer stickstoffinduzierten Anaerobiose vorwiegend Strombin akkumuliert (Siegmond *et al.*, 1985). In der Herzmuschel *Cardium tuberculatum* und der amerikanischen Schwertmuschel *Ensis directus* konnte nach starker Muskelaktivität vornehmlich Octopin, nach einer Hypoxie überwiegend D-Laktat nachgewiesen werden (Meinardus-Hager und Gäde, 1986a und b; Schiedek und Zebe, 1987). Der Spritzwurm *Sipunculus nudus* akkumuliert ebenfalls Octopin bei funktionsbedingter Anaerobiose, allerdings wird in seinem Hautmuskelschlauch bei biotopbedingter Hypoxie Strombin gebildet (Pörtner *et al.*, 1984). Dieser Dualismus der Opinbildung ließ sich durch vergleichende Untersuchungen zum Aminosäure- und Opingehalt in mehr als 20 Spezies, die sowohl funktionsbedingter-, als auch biotopbedingter Anaerobiose unterworfen wurden, physiologisch erklären. Biotopbedingte Anaerobiose ist durch einen niedrigen glykolytischen Flux gekennzeichnet. Hierbei arbeiten alle Opindehydrogenasen eines Gewebes nahe ihres Gleichgewichts und die am höchsten konzentrierte Aminosäure bestimmt

das bevorzugt gebildete Endprodukt. Bei einem hohen glykolytischem Flux, wie er für die funktionsbedingte Anaerobiose charakteristisch ist, arbeiten nur diejenigen Opindehydrogenasen nahe ihres Gleichgewichts, die in ausreichend hoher Aktivität im entsprechenden Gewebe vorhanden sind. Die Kapazität dieser Enzyme bestimmt, welche Endprodukte vornehmlich gebildet werden (Pörtner *et al.*, 1984; Kreutzer *et al.*, 1989).

Verbreitung von Opindehydrogenasen

In Arbeiten von Livingstone (1983 und 1990), Hammen und Bullock (1991), Hammen und Fielding (1993) sowie von Sato (1993a) wird die Verbreitung von Opin- und Laktatdehydrogenasen in mehr als 160 Spezies aus 17 Tierstämmen eingehend behandelt. Opindehydrogenasen wurden jedoch nicht nur bei Invertebraten gefunden. Sato und Mitarbeiter reinigten 1993 eine Tauropindehydrogenase aus der marinen Rotalge *Rhodoglossum japonicum* (Sato *et al.*, 1993b). Weiterhin wurden auch in Wurzelhalsgallen dikotyler Pflanzen Opindehydrogenasen nachgewiesen (Smith und Townsend, 1907; Chilton *et al.*, 1977; Moore *et al.*, 1979; Schell *et al.*, 1979). Wurzelhalsgallen entstehen durch Infektion der Pflanzen mit pathogenen Agrobakterien, z.B. mit *Agrobacterium tumefaciens*. Die Agrobakterien enthalten so genannte Ti-Plasmide (tumor inducing plasmids), welche neben den Oncogenen auch Gene für die Synthese und den Abbau von Opinen enthalten (van Larebeke *et al.*, 1973 und 1974; Watson *et al.*, 1975; van Montagu *et al.*, 1980; Messens *et al.*, 1985). Der Einbau eines Abschnitts dieses Plasmids in das Pflanzengenom (Chilton *et al.*, 1977; Willmitzer *et al.*, 1980; Deblaere *et al.*, 1985) führt zu einer tumorösen Veränderung des Pflanzengewebes und veranlasst die Pflanze, Opine zu produzieren, die wiederum den Bakterien als Kohlen- und Stickstoffquelle dienen. Die benötigten Opinpermeasen und Opinoxidasen sind ebenfalls Ti-Plasmid kodiert. Allerdings unterscheiden sich die Opinoxidasen sowohl katalytisch als auch strukturell von den Opinsynthesen (Nester, 1981; Tempé und Petit, 1983; Chang *et al.*, 1983; Chilton *et al.*, 1984; Firmin *et al.*, 1985; Thompson und Donkersloot, 1992). Weiterhin wurden Opindehydrogenasen auch bei Pseudomonaden (Beaulieu *et al.*, 1983; Rossignol und Dion, 1985; Boivin *et al.*, 1987), Rhizobiaceen (Beauchamp *et al.*, 1991) und Coryneformen, z.B. bei *Arthrobacter sp.*, nachgewiesen (Tremblay *et al.*, 1987a und b; Asano *et al.*, 1989). Zusätzlich konnte auch in Pilzen der Gattungen *Cylindrocarpon* und *Fusarium* ein Opinkatabolismus nachgewiesen werden (Beauchamp *et al.*, 1990).

Biochemische Charakterisierung der Opindehydrogenasen

Neben ihren physiologischen Eigenschaften sind einzelne Opindehydrogenasen auch biochemisch bereits gut charakterisiert worden. Besonders die als erstes isolierte Octopindehydrogenase der Pilgermuschel *Pecten maximus* war in der Vergangenheit ein beliebtes Versuchsobjekt, da sie sich verhältnismäßig leicht aus dem Adduktormuskel reinigen ließ. Als monomeres Enzym mit einem Molekulargewicht von 43.3 kDa hält man sie für eine der kleinsten NADH-abhängigen Dehydrogenasen (Olomucki *et al.*, 1972; Gäde und Grieshaber, 1986; Janßen, 2000).

Die Ligandenbindung an ODH wurde mit kinetischen Techniken eingehend von Monneuse-Doulet und Olomucki (1975 a & b, Monneuse-Doulet *et al.*, 1978) sowie von Schrimsher und Taylor (1984) untersucht, wobei jedoch beide Gruppen zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Monneuse-Doulet und Olomucki (1975 a & b) postulieren für die Ligandenbindung an ODH eine geordnete Reihenfolge. Zuerst bindet das Coenzym NADH, dann Pyruvat und schließlich L-Arginin. Pyruvat reagiert mit L-Arginin unter Dehydratisierung zu einer Schiffbase. Auf diesen Übergangszustand erfolgt schließlich der Hydridtransfer vom NADH, wodurch D-Octopin entsteht. Anscheinend besitzt die ODH zwei unterschiedliche Bindestellen für die Substrate Pyruvat und L-Arginin. Die bis dahin vorherrschende Meinung, dass die Schiffbase an das Enzym gebunden wird (van Thoai *et al.*, 1969), wurde von diesen Autoren widerlegt. Auch Schrimsher und Taylor (1984) gehen davon aus, dass zuerst das Coenzym an das Enzym bindet. Die nachfolgende Bindung der Substrate soll jedoch ungeordnet erfolgen, selbst die Bindung einer Schiffbase wird von ihnen nicht ausgeschlossen. Pho (1970), sowie Oriol und Olomucki (1972) konnten durch spektrophotometrische und spektropolarometrische Untersuchungen feststellen, dass sich bei der Bindung des Coenzym die Proteinstruktur ändern muss. Weiterhin wurde die ODH auch benutzt, um die Faltung einfacher, monomerer Proteine zu untersuchen (Zettlmeissel *et al.*, 1984; Teschner *et al.*, 1987).

Durch die Aufklärung der Primärstruktur der Octopindehydrogenasen aus *Pecten maximus*, *Loligo vulgaris*, *Loligo opalescens* und *Sepia officinalis* von Janßen (2000) sowie durch die Arbeiten einer japanischer Gruppe (Kimura *et al.*, 2004; Kan-No *et al.* 2005) sind heute Sequenzen verschiedener Octopin- und Tauropindehydrogenasen mariner Invertebraten in Datenbanken verfügbar und ermöglichen Sequenzvergleiche z.B. mit anderen NADH-abhängigen Dehydrogenasen. Die coenzymbindenden Domänen dieser Dehydrogenasen sind topologisch sehr ähnlich aufgebaut und bestehen aus einem konservierten β - α - β - α - β -Motiv

(Brändén *et al.*, 1970; Rossmann *et al.*, 1974). Die β - α - β -Sekundärstruktur der so genannten Rossmann-Falte konnte auch für die Invertebraten Opindehydrogenasen nachgewiesen werden (Janßen, 2000). Weiterhin lässt sich innerhalb der Rossmannfalte die Glycin-reiche Konsensussequenz GXGXXG (Brändén, 1980; Wierenga *et al.*, 1985, 1986; Brändén und Tooze, 1991) finden, die für die Bindung des Dinukleotidanteils des Coenzym verantwortlich ist (Brändén, 1980; Wierenga *et al.*, 1985; Baker *et al.*, 1992). Auch dieses Motiv wurde z.B. in der *Pecten*-Sequenz nachgewiesen (Janßen, 2000).

Über die an der Bindung der Substrate beteiligten Aminosäuren und den genauen Reaktionsmechanismus der Opinbildung konnte allerdings bisher nur wenig in Erfahrung gebracht werden. Für die Laktat-Dehydrogenase ist bekannt, dass sich im aktiven Zentrum ein DXXR-Motiv befindet. Gemeinsam mit einem Histidin wird eine Histidin-Aspartat-Arginin-Triade gebildet, welche die Übertragung eines Hydridions vom NADH auf Pyruvat ermöglicht (Monneuse und Rouzé, 1987; Clarke *et al.*, 1988; Clarke *et al.*, 1989a und b). Auch in der Malatdehydrogenase ist eine solche Triade nachgewiesen (Birktoft und Banaszak, 1982; Goward und Nicholls, 1994). Durch Sequenzvergleiche konnte jedoch ein DXXR-Motiv in den tierischen Opindehydrogenasen nicht gefunden werden (Janßen, 2000). Allerdings zeigten Thomé-Beau und Olomucki, dass sowohl ein Histidyl-, als auch ein Carboxylrest wichtig für die Aktivität der ODH sein müssen (Thomé-Beau *et al.*, 1971; Thomé-Beau und Olomucki 1973; Olomucki *et al.*, 1975). Da sich innerhalb der Opindehydrogenase-Sequenzen ein konserviertes Histidin, ein Arginin und ein Aspartat finden lassen, wurde vermutet, dass auch bei ihnen eine ähnliche Triade an der Katalyse beteiligt sein könnte (Janßen, 2000; Kan-No *et al.* 2005). Auch ein Cystidyl-Rest scheint am katalytischen Mechanismus beteiligt zu sein, wie durch Inaktivierungsexperimente mit thiol-spezifischen Reagenzien gezeigt werden konnte (Olomucki *et al.*, 1972; Olomucki *et al.*, 1975; Sheikh und Katiyar, 1993a und b sowie 1994).

Bis zur heterologen Expression der ODH (Janßen, 2000) waren die zu reinigenden Proteinmengen vor allem für strukturelle Untersuchungen limitierend. Van Thoai *et al.* (1969) isolierten aus 2,8 kg Adduktormuskeln lediglich 50 mg ODH. Bei einem durchschnittlichen Adduktormuskel-Gewicht von 8 g entspricht dies ca. 350 Muscheln, die für einen solchen Ansatz präpariert wurden. Das bakterielle Expressionssystem stellt dagegen ausreichende Enzymmengen zur Verfügung, um mit Kristallisationsversuchen beginnen zu können (Janßen, 2000; Müller, 2001), und es ist hiermit auch die Möglichkeit gegeben, gezielt Aminosäuren im Enzym auszutauschen, von denen eine Beteiligung am Reaktionsmechanismus vermutet wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Einblicke in die Struktur und den Reaktionsmechanismus der Octopindehydrogenase aus der Pilgermuschel *Pecten maximus* zu gewinnen. Hierzu sollte zunächst die Reinigungsmethode der rekombinanten ODH so weit verbessert werden, um höchstmöglich homogene ODH zu gewinnen, die dann in Kristallisationsversuchen eingesetzt werden kann. Ziel war es, einen ODH-Kristall zu erhalten, der für die Strukturaufklärung geeignet ist. Zusätzlich zu den Kristallisationsversuchen sollen NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigen, ob sich die 43.3 kDa große ODH hier als Versuchsobjekt eignet. Möglicherweise können mit Hilfe der NMR diejenigen Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung der Substrate beteiligt sind. Durch gerichtete Mutagenese sollten schließlich detailliertere Einblicke in den Reaktionsmechanismus und womöglich in die Substratspezifität der Octopindehydrogenase aus der Pilgermuschel *Pecten maximus* gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierbeschaffung

Als Versuchstier wurde in dieser Arbeit die Pilgermuschel *Pecten maximus* verwendet. Die Pilgermuscheln stammten aus dem Ärmelkanal und wurden lebend bei Händlern in Roscoff (Frankreich) gekauft. Die Adduktormuskeln der Pilgermuscheln wurde präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (USA), Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Eppendorf (Hamburg), euriso-top (Frankreich), Fisher Scientific (England), Fluka (Neu-Ulm), Hampton Research (USA), Invitrogen (Niederlande), J.T. Baker (Niederlande), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt), Novagen (Merck Biosciences, Darmstadt), peqLab (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Riedel-deHaën (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Stratagene (Niederlande) und USB (USA) in höchstmöglicher Reinheit bezogen. D-Octopin wurde nach der Methode von Tempé (1983) synthetisiert.

2.3 Sterilisation von Gefäßen, Lösungen und Medien

Glasgefäße und Medien, die der Anzucht und Kultur von Bakterien dienten, wurden vor ihrer Verwendung 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Ampicillin, Kanamycin und IPTG wurden mit Hilfe von 0,22 µm Einwegfiltern sterilfiltriert. Mit D₂O angesetzte Lösungen wurden ebenfalls sterilfiltriert.

2.4 Verwendete Bakterienstämme

Typischerweise wurde der Bakterienstamm *Epicurian coli* XL1-Blue (Stratagene) für Klonierungen verwendet. Zur Stammhaltung wurden die jeweiligen Plasmide in den Bakterienstamm JM109 transformiert. Für die Überexpression der ODH wurde der *E. coli*-Stamm ER2566 (NEB) verwendet. Die Genotypen der verwendeten Bakterienstämme finden sich in Tabelle 1.

Tab. 1 Genotypen der verwendeten Bakterienstämme.

	Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac ^q ZΔM15 Tn10(Tet ^r)]
<i>E. coli</i>	JM109	e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK-,mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lac ^q ZΔM15]
<i>E. coli</i>	ER2566	F ⁺ λ fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 D(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [Dcm]

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA-Isolierung

DNA wurde mit dem E.Z.N.A. Invertebrate DNA Kit (peqlab) isoliert. Es wurden ca. 30 mg Adduktormuskel eingesetzt. Das Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend nach Herstellerangaben weiter verarbeitet. Die isolierte DNA wurde in 30 µL ddH₂O aufgenommen.

2.5.2 RNA-Isolierung nach Chomzynski et al. (1987)

Gesamt-RNA wurde mit einer Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (modifiziert nach Chomzynski *et al.*, 1987) aus den Adduktormuskeln der Pilgermuscheln isoliert. Zwei Gramm Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und in 10 mL GTC-Puffer (4 mol L⁻¹ Guanidinthiocyanat pH 7,0, 25 mmol L⁻¹ Na-Citrat, 0,5 % (w/v) N-Laurylsarcosin) aufgenommen und mit einem Ultraturrax (IKA Labortechnik, Staufen) unter Eiskühlung homogenisiert. Die Lösung wurde anschließend 60 Minuten bei 88.000 g (Sorvall RC M120EX, Rotor RP80AT) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,1 Volumen 2 mol L⁻¹ Na-Acetat pH 5.2 versetzt und gemischt. Anschließend wurde ein Volumen Aqua-Roti-Phenol pH 5.2 (Roth) und 0,2 Volumen Chloroform hinzugegeben und die Lösung 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde für 20 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit einem Volumen Aqua-Roti-Phenol pH 5.2 sowie einem 0,2 Volumen Chloroform versetzt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und erneut 20 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit einem Volumen 100 % Isopropanol versetzt und bei -20 °C eine Stunde inkubiert. Die RNA wurde durch 20 minütige Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend 15 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Alkohol entfernt worden war, wurde die RNA bei 60 °C getrocknet und anschließend in ca. 250 µL erwärmtes ddH₂O aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.2.1 Isolierung von Poly(A)⁺ RNA

Poly(A)⁺ RNA (mRNA) wurde mit Oligotex-Suspension (Qiagen, Hilden) aus der Gesamt-RNA isoliert. Es wurde hierbei nach Herstellerangaben verfahren. Eingesetzt wurden zwischen 0,5 und 1 mg nach Chomzynski (2.5.2) isolierte RNA. Die Poly(A)⁺ RNA wurde in 50 μ L ddH₂O aufgenommen und bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese einzelsträngiger cDNA wurden ca. 0,1 mg Poly(A)⁺ RNA mit 40 U RNaseOUT™ (Rekombinanter Ribonuklease Inhibitor, Invitrogen) und 0,5 μ g Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) versetzt und 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurde die Probe auf Eis abgekühlt und mit 1 X Erststrangpuffer (20 mmol L⁻¹ Tris/HCl pH 8.4, 50 mmol L⁻¹ KCl, Invitrogen), 0,5 mmol L⁻¹ dNTP und 5 mmol L⁻¹ DTT gemischt. Nach zweiminütiger Inkubation bei 42 °C wurden 50 U SuperSCRIPT II RT (Invitrogen) hinzugegeben und die Probe 45 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach erfolgter Erststrangsynthese wurde die Reverse Transkriptase durch 15 minütiges Erhitzen auf 70 °C denaturiert und die Probe anschließend auf Eis abgekühlt. Das RNA-Template wurde durch Verdau mit 2 U RNaseH bei 37 °C für 20 Minuten vom cDNA-RNA-Hybrid-Molekül entfernt.

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.5.4.1 Amplifikation des ODH-Gens

Für die Amplifikation des ODH-Gens aus verschiedenen Individuen der Pilgermuschel *Pecten maximus* wurde ca. 50 ng cDNA eingesetzt. Der PCR-Ansatz enthielt weiterhin 1 X Cloned *Pfu* DNA Polymerase Reaktions-Puffer (Stratagene), 0,2 mmol L⁻¹ je dNTP, jeweils 0,5 μ mol L⁻¹ der Primer ODH-5Prime und ODH-3Prime (s. 7.1, Tab. 19) sowie 2,5 U *Pfu*Turbo® DNA Polymerase (Stratagene). Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95 °C für 2 Minuten folgten 30 PCR-Zyklen von Denaturierung (30 Sekunden, 95 °C), Primer-Anlagerung (30 Sekunden, 58 °C) und Synthese neuer DNA-Stränge (90 Sekunden, 72 °C). Abgeschlossen wurde die PCR mit einer finalen Elongation bei 72 °C für 5 Minuten.

2.5.4.2 Molekularbiologische Artbestimmung

Ein PCR-Ansatz zur Artbestimmung enthielt 10 mmol L⁻¹ Tris/HCl pH 8.3, 50 mmol L⁻¹ KCl, 1,5 mmol L⁻¹ Magnesiumacetat (Eppendorf), 0,2 mmol L⁻¹ je dNTP, jeweils 1 μ mol L⁻¹ der Primer Lsu3 und LSU2eco (s. 7.1, Tab. 19) sowie 1 U Taq DNA-Polymerase (Eppendorf). Es wurde ca. 10 ng DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für

5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um Primer und DNA zu denaturieren. Es folgten 30 Zyklen, bestehend aus 30 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung), 30 Sekunden bei 55 °C (Annealing) und 60 Sekunden bei 72 °C (Elongation). Eine finale Elongation fand bei 72 °C für 5 Minuten statt.

2.5.5 Gelelektrophoretische Trennung der DNA

DNA wurde in einem 1-2 %igen TAE-Agarosegel (40 mmol L⁻¹ Tris pH 8.3, 20 µmol L⁻¹ Acetat, 2 mmol L⁻¹ EDTA, 0,1 µg mL⁻¹ Ethidiumbromid) elektrophoretisch mit 150 V getrennt. Als Laufpuffer wurde 1 X TAE verwendet. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 0,2-Volumen 5 X TAE-Probenpuffer (0,2 mmol L⁻¹ Tris pH 8.3, 0,1 mmol L⁻¹ Acetat, 10 mmol L⁻¹ EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 15 % (w/v) Ficoll 400) versetzt. Als Standards wurden entweder ein 100 bp DNA-Marker (Invitrogen), eine 1 kb DNA-Leiter (New England Biolabs) oder der GeneRuler™ 1 kb DNA-Marker (MBI Fermentas) verwendet.

2.5.6 Präparative Isolierung von PCR-Fragmenten

Nach elektrophoretischer Trennung im Agarosegel wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Elution der DNA aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die DNA wurde anschließend in 30 µL ddH₂O aufgenommen.

2.5.7 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die durch Amplifikation mit Taq DNA-Polymerase erhalten wurden wiesen einen Desoxyadenosin-Überhang auf, der eine Klonierung in einen Vektor mit einem Desoxythymidin-Überhang ermöglichte. Standardmäßig wurde hierfür der Vektor pGEM-T Easy (Promega) benutzt. Die Ligation erfolgte in 1 X Rapid Ligation Puffer (Promega) mit 3 U T4 DNA Ligase. Die Vektor-DNA wurde entsprechend einem molaren Vektor zu Insert-Verhältnis von 1:3 mit dem gereinigten PCR-Produkt versetzt und die Reaktion anschließend für mindestens 20 Stunden bei 4°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert.

2.5.7.1 Adenylierung von PCR-Amplifikaten

Polymerasen mit Fehlerkorrekturfähigkeit, wie zum Beispiel die *PfuTurbo*[®], erzeugen PCR-Fragmente mit glatten Enden. Um diese Fragmente ebenfalls in den Vektor pGEM-T Easy zu klonieren, wurden sie mit Desoxyadenosin-Überhängen versehen (A-Tailing). Hierzu

wurden aus Agarosegelen isolierte PCR-Produkte verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 1 X Taq DNA Reaktionspuffer (Eppendorf), 0,2 mmol L⁻¹ dATP und 5 U Taq DNA Polymerase (Eppendorf). Der Ansatz wurde bei 70 °C für 30 Minuten inkubiert. 2 µL wurden anschließend für die Ligation eingesetzt.

2.5.8 Transformation von Bakterien

Bei -80°C aufbewahrte Zellen der verwendeten Bakterienstämme wurden mit einer Inokulationsöse auf LB-Agarplatten (0,5 % (w/v) Servabacter[®] Hefeextrakt (Serva), 1 % (w/v) Caseinhydrolysat (Peptone, Serva)) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen. Für Übernachtskulturen wurden 3 mL LB-Medium (0,5 % (w/v) Servabacter[®] Hefeextrakt (Serva), 1 % (w/v) Caseinhydrolysat (Peptone, Serva), 1 % (w/v) NaCl, pH 7.0) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Die Bakterien wurden anschließend bei 37 °C unter Schütteln für ca. 15 h angezogen.

2.5.8.1 Herstellung chemischkompetenter *E. coli*-Zellen

Mit 2 mL einer Übernachtskultur wurden 500 mL LB-Medium angeimpft und ca. 4 Stunden bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,6 angezogen. Die Bakterien wurden 30 Minuten auf Eis abgekühlt, durch 20 minütige Zentrifugation bei 4 °C pelletiert und dann in 0,3 Volumen FB-Puffer (100 mmol L⁻¹ KCl, 50 mmol L⁻¹ CaCl₂, 10 % (v/v) Glycerin, 10 mmol L⁻¹ Kaliumacetat, pH 6.4) resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für weitere 30 Minuten wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert und danach in 10 mL FB-Puffer aufgenommen. 100 µL-Aliquots wurden bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.5.8.2 Transformation durch Hitzeschock

Zur Transformation wurde ein Aliquot Bakterienzellen aufgetaut, mit dem Vektor versetzt und mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch einen 45 sekündigen Hitzeschock bei 42 °C. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 1 mL LB-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln angezogen.

2.5.8.3 Herstellung elektrokompenter Zellen

500 mL LB-Medium wurden mit 2 mL einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C ca. 4 Stunden bis zu einer optischen Dichte von 0,6 unter Schütteln angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4.000 g pelletiert, in ca. 50 mL

eiskaltem ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde noch mindestens dreimal wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in 500 µL 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 30 µL-Einheiten bei -80 °C eingefroren.

2.5.8.4 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die Zellen einem kurzzeitigen elektrischem Feld ausgesetzt, das die Zellwand destabilisiert und die Aufnahme von Fremd-DNA ermöglicht. Ein 30 µL Aliquot elektrokompenter Zellen wurde 20 Minuten auf Eis aufgetaut, mit dem Vektor versetzt und 1 Minute inkubiert. Die Transformation erfolgte mit einem Spannungspuls von 2500 V für ca. 5,8 Millisekunden (Eppendorf Elektroporator 2510). Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL LB-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37 °C mit Schütteln inkubiert.

2.5.8.5 Blau-Weiß-Selektion

Zum Nachweis einer erfolgreichen Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pGEM-T Easy wurde auf die Blau-Weiß-Selektion zurückgegriffen (α -Komplementationstest nach Sambrook, 2001). Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die frisch transformierten Zellen für 5 Minuten bei 4.000 g abzentrifugiert und in 200 µL LB-Medium mit 100 mmol L⁻¹ IPTG und 80 µg mL⁻¹ X-Gal (in Dimethylformamid) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten (0,5 % (w/v) Servabacter[®] Hefeextrakt (Serva), 1 % (w/v) Caseinhydrolysat (Peptone, Serva), 1 % (w/v) NaCl, 2 % (w/v) Agar Agar (Serva), 100 µg mL⁻¹ Ampicillin, alternativ 30 µg mL⁻¹ Kanamycin, pH 7.0) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur deutlicheren Ausprägung der Blau-Färbung wurden die Platten im Kühlschrank bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Weiße Kolonien wurden durch Kolonie-PCR (2.5.8.6) auf den erfolgreichen Einbau eines Inserts überprüft.

2.5.8.6 Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurden ausgewählte Klone zuerst mit einer Impföse auf eine neue LB-Agarplatte repliziert und danach in einen PCR-Ansatz überführt. Der 12,5 µL große PCR-Ansatz enthielt 10 mmol L⁻¹ Tris/HCl pH 8.3, 50 mmol L⁻¹ KCl, 1,5 mmol L⁻¹ Magnesiumacetat (Eppendorf), 0,2 mmol L⁻¹ je dNTP, jeweils 1 µmol L⁻¹ Primer sowie 1 U Taq DNA-Polymerase (Eppendorf). Als Primerpaar wurden je nach Vektor M13/M13reverse, T7/Intein reverse oder T7/T7-Terminator in der PCR-Reaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um Primer und DNA zu denaturieren. Es folgten

30 Zyklen, bestehend aus 30 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung), 30 Sekunden bei 56 °C (Anlagerung) und 60 Sekunden bei 72 °C (Elongation). Eine finale Elongation fand bei 72 °C für 5 Minuten statt. Um diejenigen Klone zu identifizieren, bei denen das Insert erfolgreich eingebaut worden ist, wurden Aliquots der PCR-Reaktion anschließend gelelektrophoretisch untersucht. Positive Klone wurden zum Animpfen von 3 mL Übernachtskulturen benutzt, aus denen nach Inkubation bei 37 °C über Nacht die entsprechenden Plasmide isoliert wurden.

2.5.9 Plasmidpräparation

Plasmide wurden mit dem E.Z.N.A. Plasmid Minipräp Kit I (peqlab) nach Angaben des Herstellers isoliert und in 50 µL ddH₂O aufgenommen.

2.5.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden kommerziell von der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Zu sequenzierende Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert (2.5.8.2) und über Nacht auf Antibiotikahaltigen LB-Agarplatten angezogen. Für die Sequenzierungen wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Plasmid die Primer T7, InteinReverse, T7Terminator, M13, M13reverse oder N6 verwendet. Die Sequenzen der Primer finden sich im Anhang (7.1 Tab. 19).

2.5.11 Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mittels der frei erhältlichen Demoversion von ChromasPro (Version 1.33, <http://www.techne.lysium.com.au/ChromasPro.html>) und dem Programm pDRAW (Version 1.1.92, <http://www.acaclone.com>). Nukleotid- bzw. Proteinalignments wurden mit Hilfe von ClustalW (Higgins *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1994; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Für die Datenbankrecherche wurden die Programme BLASTn, BLASTx und BLASTp des BLAST-(basic local alignment tool)Pakets verwendet (Altschul *et al.*, 1990). Theoretische Werte für die isoelektrischen Punkte wurden mit dem Programm Compute pI/Mw des Expasy-Programmpaketes berechnet (Bjellqvist *et al.*, 1993 und 1994; <http://www.expasy.ch>).

2.6 Überexpression der ODH-5His

Zu Beginn dieser Arbeit konnte auf einen von Janßen erzeugten Expressionsklon für die ODH zurückgegriffen werden (Janßen, 2000). Das für die ODH codierende Gen war in den Vektor pTYBI inseriert worden und ermöglichte die heterologe Expression der ODH mit einem um fünf Histidine verlängerten C-Terminus (ODH-5His). In dieser Arbeit wurde, aus-

gehend von Addukturen, in denen jeweils nur eine ODH-Isoform nachgewiesen wurde, versucht, das zugehörige ODH-Gen zu sequenzieren und zu exprimieren. Weiterhin wurde ein neues Expressionssystem getestet, um die Ausbeute an rekombinantem Enzym möglicherweise weiter zu erhöhen. Schließlich sollte auch rekombinante ODH ohne Fusion mit einem His-Tag exprimiert werden, um sie ebenfalls für Kristallisationsversuche einsetzen zu können.

2.6.1 Konstruktion der Überexpressionsvektoren

2.6.1.1 ODH-5His in pTYBI

Für die Klonierung des ODH-Gens in den Vektor pTYBI (NEB) wurde ausgehend von cDNA das ODH-Gen mit den Primern Nterm_neu-Cterm5_neu vervielfältigt (Janßen, 2000). Der Primer Cterm5_neu ist so konstruiert, dass er am 3'-Ende der ODH-Sequenz fünf Histidin codierende Triplets und ein Stoppcodon inseriert. Für die Amplifikation des ODH-Gens wurde das Triplemaster[®] PCR System (Eppendorf) verwendet. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt 1 X HighFidelity Puffer mit Mg^{2+} , $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ je dNTP, jeweils $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ der Primer Nterm_neu und Cterm5_neu (s. 7.1 Tab. 20) sowie 2,5 U TripleMaster Polymerase Mix (Eppendorf). Nach einer anfänglichen Denaturierung bei $94 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 Minuten folgten 30 PCR-Zyklen mit 30 Sekunden bei $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 Sekunden bei $56 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1 Minute bei $72 \text{ }^\circ\text{C}$. Abgeschlossen wurde die PCR mit einer finalen Elongation bei $72 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 Minuten. Nach elektrophoretischer Trennung wurde das PCR-Produkt aus einem Agarosegel extrahiert (2.5.6). $0,5 \mu\text{g}$ des Produktes wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI (1 U) und SapI (0,5 U)(NEB) über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gespalten. $2 \mu\text{g}$ des Vektors pTYBI wurden ebenfalls über Nacht mit NdeI und SapI gespalten, danach elektrophoretisch aufgetrennt (2.5.5) und aus dem Agarosegel eluiert (2.5.6). Für die Ligation wurden Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit T4 DNA Ligase (Promega) über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Expressionsvektor wurde anschließend in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert (2.5.8.4). Durch Kolonie-PCR (2.5.8.6) und Sequenzierung (2.5.10) wurde der korrekte Einbau des ODH-Gens kontrolliert.

2.6.1.2 ODH-LE6His in pET-24d(+)

Zusätzlich wurde für die Expression der ODH der Vektor pET-24d(+) (Novagen) verwendet. Für die Klonierung wurde das ODH-Gen ausgehend von cDNA mit den Primern NtermPec-CtermPec vervielfältigt. Der Primer NtermPec ist so konstruiert, dass anstelle von NcoI das Restriktionsenzym BsmBI für den Verdau verwendet werden kann und das Startcodon im richtigen Leseraster in den Vektor inseriert wird. Der Primer CtermPec fügt am

3'-Ende des ODH-Gens die beiden zusätzlichen Aminosäuren Leucin und Glutamat ein. Die Codons dieser zwei Aminosäuren bilden die Restriktionsschnittstelle für das Enzym XhoI, welches zum Einbau in den Vektor benutzt werden soll. Für die Amplifikation wurde PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) verwendet. Der PCR-Ansatz enthielt 1 X PfuUltra™ HF Reaktions-Puffer (Stratagene), 0,2 mmol L⁻¹ je dNTP, jeweils 0,5 μmol L⁻¹ der Primer NtermPec und CtermPec (s. 7.1 Tab. 20) sowie 1,25 U PfuUltra™ (Stratagene). Das PCR-Programm bestand aus einer anfänglichen Denaturierung bei 95 °C für 2 Minuten. Es folgten 30 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, der Primeranlagerung bei 56 °C (30 Sekunden) und der Vervielfältigung bei 72 °C für 1 Minute. Abgeschlossen wurde die PCR mit einer finalen Elongation bei 72 °C für 10 Minuten. Nach elektrophoretischer Trennung wurde das PCR-Produkt aus dem Gel extrahiert (2.5.6) und mit dem Restriktionsenzym BsmBI (10 U, NEB, 1 X NEB-Puffer 3) 12 Stunden bei 55 °C gespalten. BsmBI wurde durch 20 minütiges Erhitzen des Reaktionsansätzen auf 85 °C inaktiviert. Es folgte eine weitere Restriktion mit 10 U XhoI (NEB, 1 X NEB-Puffer 2) für ca. 12 Stunden bei 37 °C. Der Restriktionsansatz wurde anschließend mit QIAquick-Zentrifugeneinheiten (Qiagen) gereinigt. 3 μg Vektor-DNA wurden mit 10 U NcoI und 10 U XhoI (beide NEB, 1 X NEB-Puffer 2) für ca. 12 Stunden bei 37 °C gespalten. Nach Restriktion wurde der Vektor mit QIAquick-Zentrifugeneinheiten (Qiagen) gereinigt und anschließend dephosphoryliert. Hierzu wurde das Eluat mit 0,2 U CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase, Promega) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die CIAP wurde durch Erhitzen für 15 Minuten auf 85 °C inaktiviert. Das Fragment wurde mit T4 DNA Ligase (Promega) für 16 Stunden bei 4 °C in den Vektor ligiert. Der Expressionsvektor wurde in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert (2.5.8.4). Durch Kolonie-PCR (2.5.8.6) und Sequenzierung (2.5.10) wurde der korrekte Einbau des ODH-Gens überprüft.

2.6.1.3 ODH ohne Fusion mit einem Affinitätstag (CtermPst in pTYBI)

Zusätzlich zu den mit einem His-Tag verlängerten Enzymen wurde das ODH-Gen ohne eine solche Affinitätsmarkierung in den Vektor pTYBI (NEB) kloniert. Ausgehend von cDNA wurde das ODH-Gen hierzu mit den Primern Nterm und CtermPst vervielfältigt. Hierzu wurde PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) verwendet. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt 1 X PfuUltra™ HF Reaktions-Puffer (Stratagene), 0,2 mmol L⁻¹ je dNTP, jeweils 0,5 μmol L⁻¹ der Primer Nterm und CtermPst (7.1 Tab. 20) sowie 1,25 U PfuUltra™ (Stratagene). Das PCR-Programm bestand aus einer anfänglichen Denaturierung bei 95 °C für 2 Minuten. Es folgten 30 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekun-

den, der Primeranlagerung bei 56 °C (30 Sekunden) und der Vervielfältigung bei 72 °C für 1 Minute. Abgeschlossen wurde die PCR mit einer finalen Elongation bei 72 °C für 10 Minuten. Nach elektrophoretischer Trennung wurde das PCR-Produkt aus dem Gel extrahiert (2.5.6) und mit den Restriktionsenzymen NdeI (2 U) und PstI (2 U) (NEB) über Nacht bei 37 °C gespalten. 2 µg des Vektors pTYBI wurden ebenfalls über Nacht mit NdeI und PstI gespalten, danach elektrophoretisch aufgetrennt (2.5.5) und aus dem Agarosegel eluiert (2.5.6). Für die Ligation wurden Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit T4 DNA Ligase (Promega) über Nacht bei 4 °C. Der Expressionsvektor wurde anschließend in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert (2.5.8.4). Der korrekte Einbau des ODH-Gens wurde durch Kolonie-PCR und Sequenzierung kontrolliert.

2.6.2 Anzuchtbedingungen für rekombinante ODH

Die bei –80 °C aufbewahrten Bakterien wurden zur Anzucht auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten mittels einer sterilen Öse ausplattiert und dann über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Alternativ wurden ER2566-Zellen mit dem entsprechenden Vektor transformiert (2.5.8.2) und auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert.

Zur Herstellung von Übernachtskulturen (ÜNK) wurden 20 mL LB-Medium (0,5 % (w/v) Servabacter[®] Hefeextrakt (Serva), 1 % (w/v) Caseinhydrolysat (Peptone, Serva), 1 % (w/v) NaCl, pH 7.0) mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin bzw. 30 µg mL⁻¹ Kanamycin versetzt. Von der LB-Agarplatte wurde mit einer sterilen Öse eine einzelne Kolonie in das Medium überführt. Die Bakterien wurden anschließend bei 37 °C unter Schütteln für ca. 15 h angezogen. 1 L LB-Medium (mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin bzw. 30 µg mL⁻¹ Kanamycin) wurde jeweils mit 1 mL der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,6 erreicht war. Nach Induktion der Expression mit 0,35 mmol L⁻¹ IPTG wurde die Anzuchttemperatur auf 18 °C gesenkt und die Inkubation 20 h fortgesetzt.

2.6.3 Isolierung der überexprimierten ODH

Alle Reinigungs-Schritte erfolgten bei 4 °C oder auf Eis. Nach Abbruch der Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4.000 g pelletiert (Zentrifuge Kontron Hermle ZK 400, Rotor Hermle A 6.9) und mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA Labortechnik, Staufen) in Lysepuffer (50 mmol L⁻¹ Na-Phosphatpuffer mit 300 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ Imidazol, pH 8.0) bzw. in Homogenisationsmedium (25 mmol L⁻¹ TRA, pH 7.5, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT) resuspendiert.

2.6.4 Aufschluss der *E. coli*-Zellen

Der Aufschluss der Bakterien erfolgte mit Hilfe von Ultraschall in 8 Intervallen von je 15 Sekunden mit jeweils mindestens 15 Sekunden Pause (Sonoplus HD2200 mit Titanteller TT13 bzw. Mikrospitze MS72, Bandelin, Berlin). Die Intensität betrug entweder 10 % (MS72) oder 25 % (TT13). Die Zelltrümmer bzw. nicht aufgeschlossene Zellen wurden mit einer sich anschließenden Zentrifugation bei 88.000 g (Zentrifuge Sorvall Ultra Pro 80, Rotor Sorvall T-865) abgetrennt. Der ODH-haltige Überstand wurde abgenommen und bis zu seiner weiteren Verwendung bei 4 °C auf Eis gelagert. Das Pellet wurde erneut in Lysepuffer resuspendiert und noch mal mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation (1 h, 88.000 g) wurden die Überstände zum Rohextrakt vereinigt. Zur Solubilisierung von Einschlusskörperchen (Inclusion bodies) wurde das Pellet in Lysepuffer mit 8 mol L⁻¹ Harnstoff resuspendiert, 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde für gelelektrophoretische Untersuchungen der Protein-Expression aufbewahrt.

2.7 Gerichtete Mutagenese (Site-directed mutagenesis)

Um gezielt Aminosäuren der ODH zu verändern wurde in dieser Arbeit eine nach Wang und Malcolm (1999 und 2002) modifizierte Quickchange™-Methode verwendet.

2.7.1 Konstruktion der Mutageneseprimer

Für jeden Aminosäureaustausch wurden zwei exakt komplementäre Primer benötigt. Die Primer wurden mit Hilfe des online verfügbaren Programms „The Primer Generator“ (Turchin *et al.*, 1998; <http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi>) erstellt. Neben den notwendigen Basenaustauschen zur Änderung der gewünschten Aminosäure wurden auch stille Mutationen in die Primer eingebaut, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme erzeugten oder eliminierten ohne die Aminosäuresequenz zu verändern. Das ermöglichte es, positive Klone durch Restriktionsverdau zu identifizieren (s. 2.7.3). Eine vollständige Liste der verwendeten Primer und Restriktionsenzyme findet sich im Anhang (7.1 Tab. 21a und b).

2.7.2 Mutagenesereaktion

Die von der Firma Stratagene kommerziell vertriebene Quickchange™-Methode beruht auf einer linearen PCR-ähnlichen Amplifikation des gesamten Plasmids. Das parentale Plasmid kann im Anschluss an die Reaktion mit DpnI verdaut werden, da es im Gegensatz zu der durch PCR erzeugten Kopie methyliert ist. Das neu synthetisierte Plasmid liegt ringförmig

vor, enthält allerdings Strangbrüche, die nach Transformation in *E. coli* von bakteriellen Enzymen repariert werden.

Der Expressionsvektor pTYB1 erwies sich in ersten Versuchen, wahrscheinlich aufgrund seiner Größe von über 8 kB, als ungeeignet für die gewählte Mutagenesemethode. Es wurde daraufhin ein das ODH-Gen überspannendes Stück mit den Enzymen HindIII und XbaI aus dem Expressionsplasmid ausgeschnitten und in das Plasmid pUC-19 (Amersham Pharmacia Biotech) inseriert, das mit den gleichen Enzymen geschnitten worden war. Das resultierende Konstrukt ODH-5His/pUC-19 wurde anschließend als Template für die Mutagenesereaktionen verwendet. Um die Ausbeuten an positiven Klonen zu erhöhen, wurden jeweils zwei Mutationsreaktionen mit je einem komplementärem Primer angesetzt (Wang und Malcolm 1999 und 2002). Jeder Ansatz hatte ein Volumen von 25 μL und enthielt 1 X Cloned *Pfu* DNA Polymerase Reaktions-Puffer (Stratagene), 0,2 mmol L^{-1} je dNTP, jeweils 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ des Vorwärts bzw. Rückwärts-Primers (s. 7.1 Tab. 21a und b) sowie 1,2 U *Pfu*Turbo[®] DNA Polymerase (Stratagene). Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten folgten 5 PCR-Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 Sekunden, 95 °C), Primer-Anlagerung (1 Minute, 55 °C) und Synthese neuer DNA-Stränge (8 Minuten, 68 °C). Anschließend wurden die beiden Ansätze vereinigt und die Reaktion für 16 Zyklen fortgesetzt. Den Abschluss der Reaktion bildete eine 16 minütige finale Elongation bei 68 °C. Anschließend wurden 25 μL des Ansatzes mit 10 U DpnI versetzt und für ca. 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktion wurde durch 20 minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt. Zwischen 1 und 5 μL wurden durch Elektroporation in den Bakterienstamm XL1-Blue transformiert. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C auf Ampicillin-haltigen LB-Platten angezogen.

2.7.3 Kontrolle durch Restriktionsverdau

Zur schnellen Identifizierung positiver Klone wurden zunächst ca. 10-15 Klone auf eine neue LB-Platte repliziert und anschließend als Template für eine Kolonie-PCR mit den Primern M13 und M13reverse verwendet (s. 2.5.8.6). Nach der PCR wurde ein Aliquot der Reaktion mit einem geeigneten Restriktionsenzym (s. Tab. 21 im Anhang) versetzt und mindestens 1 h bei notwendiger Temperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde ein PCR-Produkt in der Restriktion eingesetzt, bei dem das unmutierte Plasmid ODH-5His/pUC-19 als Template in der Kolonie-PCR eingesetzt worden war. Nach Restriktion wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und positive Klone durch Vergleich des Restriktionsmusters mit der Kontrolle identifiziert. Positive Klone auf der Replikaplatte wurden anschließend dazu benutzt, je-

weils 3 mL LB-Medium anzuimpfen. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht im Schüttelwasserbad wurden die Plasmide wie unter 2.5.9 beschrieben isoliert.

2.7.4 Umklonierung in den Expressionsvektor pTYB1

Ein Aliquot des mutierten Plasmids wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI geschnitten. Ein typischer Restriktionsansatz enthielt neben dem Puffer Y⁺-Tango (MBI Fermentas) ca. 5 µg Plasmid und 2,5 U HindIII, sowie 2,5 U XbaI. Der Verdau fand für ca. 4 h bei 37 °C statt. Anschließend wurde die Probe gelelektrophoretisch getrennt und die DNA aus dem Agarosegel eluiert (2.5.6). Das DNA-Stück wurde anschließend in den Vektor pTYB1 inseriert, der ebenfalls mit den Enzymen HindIII und XbaI geschnitten worden war. Der korrekte Einbau des Inserts und der Mutation wurde durch Sequenzierung des Plasmids pTYB1 überprüft, die von der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt wurde.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Herstellung von Rohextrakten aus Adduktormuskeln von *Pecten maximus*

Die bei -80 °C gelagerten *Pecten maximus*-Adduktormuskeln wurden zunächst unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Zwischen 2 und 4 Gramm Adduktormuskel wurden dann in 25 mL eiskaltem Homogenisationsmedium (25 mmol L⁻¹ Na-Phosphat, pH 7.0, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT) resuspendiert und mit einem Ultraturrax (IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Nach einer Zentrifugation für 30 Minuten bei 17.000 g (Zentrifuge Sorvall RC5+, Rotor SS34) wurde der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen (s. 2.8.2). Nach erneuter Zentrifugation (30 Minuten, 17.000 g) wurde das Proteinpellet in Homogenisationsmedium resuspendiert. 2,5 mL der Proteinsuspension wurden anschließend durch Gelfiltration entsalzt. Hierfür wurde eine mit Sephadex G-25 gefüllte PD-10 Fertigsäule (Pharmacia) verwendet. Nachdem die Säule mit 25 mL Homogenisationsmedium äquilibriert worden war, wurden 2,5 mL ODH-Suspension aufgetragen und mit 3,5 mL des gleichen Puffers eluiert. Proben der entsalzten Suspension wurden durch native Gelelektrophorese (2.8.7.1) und anschließender Aktivitätsfärbung (2.8.7.3) auf das Vorkommen verschiedener ODH-Isoenzyme untersucht.

2.8.2 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Im ersten Schritt der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurde die Proteinprobe langsam und unter Eiskühlung mit Ammoniumsulfat versetzt, bis eine Sättigung von 50 % erreicht war. Anschließend wurde die Suspension für 1 h bei 27.000 g zentrifugiert (Sorvall

RC5+, Rotor F16/250). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 85 % versetzt. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie zuvor wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet in entsprechendem Puffer aufgenommen. Zum Entsalzen wurde die Probe über Nacht gegen den gewählten Puffer dialysiert. Die verwendeten Dialyseschläuche hatten eine Porengröße von 12-14 kDa (Medicell, Liverpool, England).

2.8.3 *Chromatographische Methoden*

Alle bei den Chromatographien eingesetzten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung mit 0,45 µm Cellulose-Acetat-Filter (Sartorius, Göttingen) filtriert und entgast.

2.8.3.1 **Reinigung der Rohextrakte über Ni-NTA Superflow**

ODH-5His und ODH-LE6His wurden im ersten Schritt durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt. Die hierfür verwendeten Säulen waren mit 12 mL (Ø 1,25 cm, Höhe 10 cm) bzw. 49 mL (Ø 2,8 cm, Höhe 8 cm) Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden) gefüllt. Die Reinigung erfolgte an einem ÄKTA-Explorer 100 (Pharmacia, Freiburg). Der ÄKTA-Explorer war ausgestattet mit der Pumpe P-900, dem UV-Detektor UV-900 und dem Fraktionssammler Frac-900. Die Chromatogramme wurden mit der Software Unicorn 3.0 aufgezeichnet.

Beide Säulen wurden vor dem Probenauftrag mit mindestens zwei Säulenvolumen (CV) Lysepuffer äquilibriert. Auf die 12 mL-Säule wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL min⁻¹ verschiedene Probenmengen (genaue Angaben sind dem Ergebnisteil zu entnehmen) aufgetragen. Die beladene Säule wurde mit 70 mL Lysepuffer gewaschen, wobei die Flussgeschwindigkeit auf 1 mL min⁻¹ erhöht wurde. Anschließend wurde die Säule mit 100 mL Waschpuffer (50 mmol L⁻¹ Na-Phosphatpuffer pH 8,0, 300 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ Imidazol) gespült. Die Elution der ODH erfolgte während eines linearen Imidazol-Gradienten von 20-250 mmol L⁻¹ (Länge 100 mL, Flussgeschwindigkeit ebenfalls 1 mL min⁻¹). Während des Laufs wurden 5 mL-Fractionen gesammelt und deren ODH-Aktivität (s. 2.8.4) in jeweils einfacher Messung bestimmt.

Der Probenauftrag auf die 55 mL-Säule erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 mL min⁻¹. Die aufgetragenen Rohextrakte waren zuvor durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen Lysepuffer vorbereitet worden. Die applizierten Probenmengen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Nach dem Probenauftrag wurde die Laufgeschwindigkeit auf 1 mL min⁻¹ erhöht und die Säule mit Lysepuffer gespült. Nach 500 mL wurde auf Waschpuf-

fer umgestellt und die Flussgeschwindigkeit auf 2 mL min^{-1} gesteigert. Nach 500 mL Waschen erfolgte die Elution der ODH mit einem linearen, 500 mL-langen Imidazol-Gradienten von 20 auf 250 mmol L^{-1} . Die Fraktionsgröße betrug 10 mL.

Die Fraktionen mit der höchsten ODH-Aktivität wurden jeweils vereinigt und in Abhängigkeit vom Volumen entweder mit Vivaspin-20 Zentrifugeneinsätzen (Sartorius, Göttingen; MWCO 10.000 Da) oder durch Druckfiltration in einer Amicon-Rührzelle (Model 52, Amicon, USA) mit YM-10-Filtrationsmembran (Millipore, Eschborn) auf ein Endvolumen zwischen 2 und 10 mL eingeengt.

2.8.3.2 Anionenaustauschchromatographie

Für die Reinigung der ODH ohne Fusion mit einem His-Tag (ODH-CtermPst) wurde als erster chromatographischer Schritt eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Es wurde hierzu eine Säule (\varnothing 2,8 cm, Höhe 13 cm) verwendet, die mit 80 mL Fractogel[®] EMD DEAE (M) (Merck) gefüllt war. Die Säule war mit einem Säulenvolumen 25 mmol L^{-1} TRA pH 7.5, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT äquilibriert worden. Der Probenauftrag erfolgte mit $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Nach Probenapplikation wurde die Säule mit 160 mL Puffer gespült. Die Flussgeschwindigkeit wurde hierzu auf 1 mL min^{-1} erhöht. In den nächsten 200 mL der Elution wurde die NaCl-Konzentration im Eluenten auf 50 mmol L^{-1} erhöht. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten ($50\text{-}300 \text{ mmol L}^{-1}$) mit einer Länge von 640 mL (8 CV). Eluiert wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 mL min^{-1} . Es wurden 8 mL Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten ODH-Aktivität wurden vereinigt, durch Druckfiltration eingeengt und in Gelfiltrationspuffer (50 mmol L^{-1} K-Phosphatpuffer, pH 7.5, 2 mmol L^{-1} EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0.1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) überführt.

2.8.3.3 Analytische Gelfiltrationschromatographie

Für analytische Zwecke und als zweiter Reinigungsschritt bei kleinen Probenmengen wurde eine Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-100 (Pharmacia) durchgeführt. Die verwendete Säule (\varnothing 2,8 cm, Höhe 86,5 cm) hatte ein Volumen von 530 mL. Das aufgetragene Probenvolumen betrug höchstens 2 mL. Vor Benutzung wurde die Säule mit mindestens einem Säulenvolumen 50 mmol L^{-1} K-Phosphatpuffer, pH 7.5 mit 2 mmol L^{-1} EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol äquilibriert. Die Flussrate betrug $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Es wurden 3 mL Fraktionen gesammelt. Zur Molekulargewichtsbestimmung

wurde die Säule mit Dextranblau und verschiedenen Proteinen bekannten Molekulargewichts kalibriert (Gel Filtration Calibration Kit, Amersham Pharmacia Biosciences).

2.8.3.4 Präparative Gelfiltrationschromatographie

Bei größeren Probenmenge erfolgte die weitere Reinigung der ODH mit einer Sephadex G-100 Gelfiltrationssäule (\varnothing 8 cm, Länge 120 cm, Volumen ca. 6.000 mL). Für die Reinigung wurde eine FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg), bestehend aus einer Pumpe des Typs P-500, einem UV-Detektor (Single Path Control Unit UV-1, 280 nm), einem Fraktionssammler (Foxy Fraktionssammler, Colora Messtechnik GmbH, Ratingen) und Schreiber (Kipp & Zonen) benutzt. Das aufgetragene Probenvolumen betrug höchstens 10 mL. Vor der Benutzung wurde die Säule mit 1 CV Laufpuffer (50 mmol L⁻¹ K-Phosphatpuffer, pH 7.5 mit 2 mmol L⁻¹ EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) äquilibriert. Die Flussrate betrug 60 mL h⁻¹. Es wurden 20 mL-Fraktionen gesammelt. Nach Aktivitätsbestimmung (2.8.4) wurden die Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt und in einer mit YM-10-Filtrationsmembranen (Millipore, Eschborn) ausgestatteten Druckfiltrationszelle (Modell 402, Amicon, USA) auf ein Volumen kleiner 20 mL eingengt.

2.8.3.5 Hydroxylapatit-Chromatographie

Ohne His-Tag exprimierte ODH wurde in einem dritten Schritt durch Chromatographie mit keramischem Hydroxylapatit weiter gereinigt. Die verwendete Säule (\varnothing 2,8 cm, Höhe 8 cm) war mit 50 mL Hydroxylapatit gefüllt (Bio-Gel[®] HTP, BioRad). Vor Applikation wurde die ODH-Probe nach Gelfiltration gegen 10 mmol L⁻¹ K-Phosphatpuffer pH 7.0 dialysiert und die Säule mit gleichem Puffer äquilibriert. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 mL min⁻¹. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 60 mL Puffer gespült und die Flussgeschwindigkeit auf 1 mL min⁻¹ erhöht. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen Gradienten von 10 auf 130 mmol L⁻¹ Kaliumphosphat mit einer Länge von 200 mL. Es wurden 5 mL Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen höchster ODH-Aktivität wurden vereinigt und konzentriert.

2.8.3.6 Affinitätschromatographie an Arginin-Sepharose

Alternativ zur Hydroxylapatitchromatographie wurde die ODH ohne Fusionstag in einem dritten Schritt durch Affinitätschromatographie an Arginin-Sepharose weiter gereinigt. Hierzu wurde eine Säule verwendet (\varnothing 1 cm, Höhe 10 cm), die mit 8 mL Arginin-Sepharose CL-4B (Pharmacia) gefüllt war. Vor Benutzung wurde die Säule mit 25 mmol L⁻¹ K-Phos-

phatpuffer pH 6.2 mit 0,15 mmol L⁻¹ NADH gespült. Der Probenauftrag erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL min⁻¹. Anschließend wurde die Säule mit 25 mL Puffer gespült. Die Elution der ODH erfolgte durch 25 mmol L⁻¹ K-Phosphatpuffer pH 6.2 ohne NADH. Es wurden 4 mL Fraktionen gesammelt. Nach Aktivitätsbestimmung (2.8.4) wurden die Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt und konzentriert.

2.8.4 Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der ODH-Aktivitäten erfolgte an einem Photometer Uvikon 810 (BioTek, Neufahrn) bei 25 °C. Anhand der zeitlichen Abnahme der Extinktion bei 339 nm wurde der NADH-Umsatz verfolgt. Im Reaktionsansatz befanden sich 50 mmol L⁻¹ TRA, pH 7.0, 3 mmol L⁻¹ Pyruvat, 5,5 mmol L⁻¹ L-Arginin, 0,16 mmol L⁻¹ NADH sowie definierte Volumina der Probe unbekannter Aktivität (modifiziert nach van Thoai *et al.*, 1969 und Grieshaber *et al.*, 1978). Die Reaktion wurde durch Zugabe des L-Arginins gestartet.

2.8.5 Bestimmung kinetischer Parameter

Sowohl wildtypische ODH-5His als auch erzeugte ODH-Muteine wurden einer kinetischen Untersuchung unterzogen. Bei der ODH-5His wurden die apparenten K_m-Werte für Pyruvat, L-Arginin, NADH und D-Octopin bestimmt. Bei den Muteinen wurde auf die Bestimmung des K_m-Wertes für Octopin verzichtet. Die katalytische Aktivität der Enzyme wurde entsprechend dem unter 2.8.4 beschriebenen Prinzip bestimmt. Die Testansätze für die Vorwärtsreaktion (Octopinbildung) enthielten 50 mmol L⁻¹ TRA pH 7.0. Für die Rückreaktion wurde ein Glycin/NaOH-Puffer pH 9.6 verwendet. Während einer Messreihe wurde jeweils nur die Konzentration eines Substrats variiert. Die verwendeten Substrat- und Enzymkonzentrationen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch nicht-lineare Regression mit dem Enzymkinetik-Modul 1.2 und der Software Sigma-Plot 9 (Systat Software GmbH, Erkrath). Hierbei wurde entweder die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2.1) oder eine um unkompetitive Substratinhibition erweiterte Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2.2) verwendet.

$$(2.1) \quad v = \frac{V \max \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$(2.2) \quad v = \frac{V \max \cdot [S]}{K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)}$$

Die Übergangszustandsstabilisierungsenergie (ΔG) berechnet sich nach Wilkinson (1983) aus

$$(2.3) \quad \Delta G = R \cdot T \cdot \ln \frac{k_{cat}}{K_m}$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante [$\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$] und T die absolute Temperatur in [K] darstellt. Der Verlust an Übergangszustandsstabilisierungsenergie, der durch den Einbau einer Mutation verursacht wird, wurde mit Gleichung 2.4 berechnet.

$$(2.4) \quad \Delta\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_{\text{Mutante}}}{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_{\text{Wildtyp}}}$$

2.8.6 *Quantitativer Nachweis von SH-Gruppen und Inhibition der ODH durch thiolepezifische Reagenzien*

Freie Sulfhydrylgruppen in Proteinen können durch 5,5'-Dithiobis-(2)-nitro-Benzoesäure (DTNB, Ellman-Reagenz) quantitativ erfasst werden. Thiole reagieren mit DTNB zu einem gemischten Disulfid wobei eine äquivalente Menge an 5-Thio-2-nitrobenzoat freigesetzt wird, die photometrisch bestimmt werden kann. Zur Bestimmung der für DTNB zugänglichen Sulfhydrylgruppen wurde native ODH in 50 mmol L^{-1} Na-Phosphatpuffer pH 7.0 mit 4 mmol L^{-1} DTNB versetzt und die Extinktionsänderung bei 412 in den folgenden 20 Minuten aufgezeichnet. Zur Bestimmung aller in der ODH enthaltenen SH-Gruppen wurde das Enzym in 50 mmol L^{-1} Na-Phosphatpuffer pH 7.0 mit 8 mol L^{-1} Harnstoff denaturiert und dann mit 4 mmol L^{-1} DTNB versetzt. Anschließend wurde die resultierende Extinktionsänderung bei 412 aufgezeichnet. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für DTNB ($14,2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde die Anzahl an Sulfhydrylgruppen in nativer und denaturierter ODH bestimmt.

Weiterhin wurde ODH mit 4 mmol L^{-1} DTNB versetzt und die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmt. Zusätzlich wurde ODH auch mit $0,16 \text{ mmol L}^{-1}$ p-Chlormercuribenzoat (PCMB) oder 5 und 10 mmol L^{-1} Iodacetamid (IAA) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Hier wurde ebenfalls die Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgezeichnet.

2.8.7 *Proteinbestimmung*

Proteinbestimmungen wurden nach Bradford (1976) durchgeführt. Ausgehend von BSA-Standards wurde zunächst eine Kalibrierungsgerade erstellt. Anschließend wurden je $800 \text{ } \mu\text{L}$ Probe unbekannter Proteinkonzentration mit $200 \text{ } \mu\text{L}$ BioRad Reagenz (BioRad, Mün-

chen) versetzt, gemischt und nach exakt 20 min die Extinktion bei 595 nm an einem Uvikon Spektralphotometer 941 der Firma Kontron (Eching) gemessen. Alle Proben wurden so mit Wasser verdünnt, dass ihre Proteinkonzentration im Bereich der Kalibrierungsgeraden lag.

2.8.8 Elektrophoretische Methoden

Während der einzelnen Reinigungsschritte entnommene ODH-Proben wurden zur Kontrolle der Reinheit auf Polyacrylamidgelen getrennt. Verwendung fand eine Kombination aus Isotachophorese und Zonenelektrophorese, die so genannte Disk-Elektrophorese (Davis, 1964; Ornstein, 1964). Die Proteine werden hierbei zuerst in einem Sammelgel nach dem Prinzip der Isotachophorese konzentriert und danach in einem Trenngel nach dem Prinzip der Zonenelektrophorese getrennt.

2.8.8.1 Horizontale Disk-Elektrophorese

Für die horizontalen Elektrophoresen wurde das Elektrophoresesystem Multiphor II (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Mit dem zugehörigen Kühlaggregat wurde bei nativen Elektrophoresen die Kühlplatte auf 10 °C, bei SDS-Gelen auf 15 °C gekühlt. Trenn- und Sammelgele wurden mittels gebrauchsfertiger Acrylamid- und Bisacrylamidlösungen (Roth, Karlsruhe) hergestellt. Die Gele wurden auf einen Trägerfilm „Gelbond PAG-Film“ (Pharmacia, Freiburg) gegossen. Bei der nativen Page benutzte Sammelgele (4 %ig; Quervernetzung 3 %) enthielten 0,125 mol L⁻¹ Tris/HCl, pH 6.8 mit 17,4 % (v/v) Glycerin. Die 12 % igen Trenngele (Quervernetzung ebenfalls 3 %) enthielten 0,375 mol L⁻¹ Tris/HCl, pH 8.8 und 3,5 % (v/v) Glycerin. Als Laufpuffer diente 25 mmol L⁻¹ Tris/HCl, 192 mmol L⁻¹ Glycin, pH 8.3. Die aufzutragenden Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer (62,5 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 6.8, 10 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) versetzt. Es wurden jeweils 10 µL Probe auf das Gel aufgetragen.

Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophoresen erfolgten analog zur nativen PAGE. Jedoch enthielten Probenpuffer und Laufmittel im Unterschied zu den nativen Elektrophoresen 2 % (w/v) bzw. 0,1 % (w/v) SDS (Laemmli, 1970). Weiterhin wurden die Proteine, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden, für 3 min bei 85 °C denaturiert. Bei den SDS-Gelen wurde ein molekularer Größen-Marker der Firma MBI Fermentas mit auf das Gel aufgetragen der β -Galactosidase (116 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), LDH (35 kDa), Restriktions-Endonuklease Bsp981 (25 kDa), β -Laktoglobulin (18,4 kDa) sowie Lysozym (14,4 kDa) enthielt.

Bei den nativen Gelen wurden die Proben für ca. 45 Minuten im Sammelgel konzentriert. Die Spannung wurde dabei auf 600 V, die Stromstärke auf 20 mA und die Leistung auf 30 W begrenzt, wobei die Stromstärke limitierend wirkte. Nach Übergang ins Trenngel wurde die maximale Stromstärke auf 50 mA angehoben wodurch die Spannung zum limitierenden Faktor wurde. Die weitere Trennung dauerte 2 bis 2,5 h. Bei den horizontalen SDS-Gelen wurde während der gesamten Trenndauer von 2 bis 2,5 h eine maximale Stromstärke von 50 mA zugelassen, so dass hier schon im Sammelgel die Spannung limitierend wirkte.

2.8.8.2 Proteinnachweis in Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine mittels verschiedener Methoden sichtbar gemacht.

2.8.8.3 Aktivitätsanfärbung

In den nativen Gelen wurde ODH spezifisch durch eine Aktivitätsanfärbung nachgewiesen. Die von Latner und Skillen (1968) beschriebene Methode nutzt die enzymatische Aktivität einer Dehydrogenase aus, um das gelbe, lösliche NBT zu reduzieren, wobei das blaue, unlösliche Formazan entsteht. Hierfür wurden die Gele mit 200 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 8.0 gespült, anschließend mit der Färbelösung (100 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 8.0, 1,5 mmol L⁻¹ NAD⁺, 0,8 mmol L⁻¹ Octopin, 0,2 mmol L⁻¹ PMS, 2 mmol L⁻¹ NBT) überschichtet und im Dunkeln inkubiert. Nachdem ODH-Aktivitätsbanden ausgebildet waren, wurden die Gele zunächst mit entionisiertem Wasser gespült, um die Reaktion zu stoppen und dann in 10 % Essigsäure fixiert.

2.8.8.4 Coomassie-Färbung

Sowohl in nativen als auch in SDS-Gelen wurden die Proteine durch Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau sichtbar gemacht. Dazu wurden die Proteine zunächst mit 20 % TCA in den Gelen ausgefällt und anschließend mit ca. 60 °C warmer Coomassie-Lösung (0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blue R350, 10 % (v/v) Essigsäure) 60 Minuten angefärbt. Nachfolgend wurde die Hintergrundfärbung mit 10 % Essigsäure ausgewaschen.

2.8.8.5 Silberfärbung

Zusätzlich zur Coomassie-Färbung wurden einige Gele einer Silberfärbung mit dem SilverXpress[®] Kit der Firma Novex (Invitrogen, Groningen, Niederlande) unterzogen. Hierbei wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.8.8.6 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)

Zur Kontrolle der Expression wurden Proben des Rohextraktes und der unlöslichen Fraktion durch eine SDS-PAGE getrennt und die ODH-5His nach Transfer auf eine Membran durch Immunodetektion des His-Tags sichtbar gemacht. Gereinigte ODH und ODH-Muteine wurden in SDS-Gelen und in nativen Gelen getrennt und durch Immunodetektion des His-Tags nach Transfer auf eine Membran nachgewiesen. Die gelelektrophoretischen Trennungen wurden wie unter 2.8.7.1 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proteine durch Elektroblothing (Mini-Trans-Blot, BioRad) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Da die PVDF-Membran hydrophob ist, wurde sie vor Verwendung für wenige Sekunden mit Methanol inkubiert und danach mit Wasser gewaschen. Als Puffer diente bei nativen Gelen ein nativer Blotpuffer (25 mmol L⁻¹ Tris pH 8.3, 192 mmol L⁻¹ Glycin). Bei denaturierenden SDS-Gelen enthielt der Blotpuffer weiterhin 20 % (v/v) Methanol. Bei einer Spannung von 100 V wurden die Proteine in 60 Minuten auf die Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran zweimal für 10 min mit TBS (10 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 7.5, 150 mmol L⁻¹ NaCl) gewaschen. Danach wurde die Membran für 1 h mit Blockierungslösung (10 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 7.5, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 3 % (w/v) BSA) inkubiert und anschließend zweimal für 10 Minuten mit TBS-Tween/Triton (20 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 7.5, 500 mmol L⁻¹ NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.2% (v/v) Triton X-100) gewaschen. Nach einem Waschschrift für 10 Minuten mit TBS wurde die Membran über Nacht mit Hybridisierungslösung (10 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 7.5, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 3 % (w/v) BSA, 1 µg Penta-His™ Antikörper (Qiagen)) bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 min mit TBS-Tween/Triton wurde die Membran 10 Minuten mit TBS gespült und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Zweitantikörperlösung (10 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 7.5, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 3 % (w/v) BSA, 0.01 % (v/v) Anti-Maus IgG gekoppelt mit Alkalischer-Phosphatase (Sigma)) inkubiert. Schließlich wurde die Membran viermal für 10 Minuten mit TBS-Tween/Triton und einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion des His-Tags erfolgte durch Inkubation mit Färbelösung (100 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 9.5, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 5 mmol L⁻¹ MgCl₂, 2 mg mL⁻¹ NBT, 1 mg mL⁻¹ BCIP) im Dunkeln. Bei den SDS-Gelen wurde ein molekularer Größenmarker der Firma Qiagen (Hilden) mit auf das Gel aufgetragen, der verschiedene rekombinante Proteine enthält, die jeweils über einen 6fachen Histidin-Tag verfügen.

2.8.8.7 Isoelektrische Fokussierung

Für die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden CleanGel-IEF Gele (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet, die vor der Verwendung rehydratisiert werden mussten. Die Rehydratisierungslösung enthielt 10 % Sorbitol (w/v), 1.9 % (v/v) Ampholine™ pH 3.5-9.5 (Amersham Pharmacia Biotech), 5,5 % (v/v) Pharmalyte™ pH 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech) sowie 1 mmol L⁻¹ DTT. Rehydratisiert wurde für ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur. Für die isoelektrische Fokussierung wurde ebenfalls die Multiphor II Elektrophoresekammer (Pharmacia) verwendet. Mit dem zugehörigen Kühlaggregat wurde die Kühlplatte auf 10 °C temperiert. Eine Vorfokussierung wurde mit 700 V, 9 mA und 5 W für 20 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 10 µL Probe an verschiedenen Stellen auf dem Gel mit Hilfe von Filterpapieren appliziert. Der verwendete Marker (Amersham Pharmacia Biotech, Broad range pH 3-10) enthielt Amyloglukosidase (pI 3,5), Trypsin Inhibitor aus Sojabohnen (pI 4,55), β-Laktoglobulin A (pI 5,2), Carboanhydrase aus dem Rind (pI 5,85), menschliche Carboanhydrase B (pI 6,55), Pferde-Myoglobin, saure Bande (pI 6,85), Pferde-Myoglobin, basische Bande (7,35), Linsenlektin, saure Bande (pI 8,15), mittlere Bande (pI 8,45), basische Bande (pI 8,65) und Trypsinogen (pI 9,30). Der Probeneintritt ins Gel erfolgte für 20 Minuten mit 500 V, 9 mA und 5 W. Anschließend wurden die Applikationspapiere vom Gel abgenommen und die Fokussierung gestartet. Fokussiert wurde mit 2.000 V, 9 mA und 9 W für 90 Minuten. Um die Banden zu schärfen schlossen sich 10 Minuten mit 2500 V, 9 mA und 12 W an. Nach der Fokussierung wurde das Gel 20 Minuten in 20 % (w/v) TCA fixiert und anschließend 10 Minuten mit warmer Coomassie-Lösung gefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde schließlich mit Entfärbelösung (25 % (v/v) Ethanol, 8 % (v/v) Essigsäure) über Nacht ausgewaschen.

2.9 Versuche zur Kristallisation der ODH

Um die dreidimensionale Struktur von Makromolekülen mit einem Molekulargewicht von über 40 kDa auf atomarer Ebene aufzuklären, muss auf die Röntgenstrukturanalyse zurückgegriffen werden. Für die Röntgenstrukturanalyse benötigt man allerdings Proteinkristalle ausreichender Größe und Qualität. Proteinkristalle werden aus übersättigten Lösungen gezüchtet. Eine übersättigte Proteinlösung erhält man in der Regel durch Zugabe eines Präzipitanten, die generell in zwei große Gruppen eingeteilt werden: Salze und organische Moleküle. Salze wie Ammoniumsulfat oder Ammoniumphosphat konkurrieren mit den Proteinen um die Hydrathülle. Sie minimieren so die Interaktion zwischen Protein und Lösungsmittel und maximieren so Protein-Protein-Wechselwirkungen. Organische Lösungsmittel, wie Ethanol oder

Isopropanol, verändern dagegen die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und reduzieren die elektrostatische Abschirmung geladener und polarer Gruppen der Proteine (McPherson, 1985a; McPherson, 1990). Polyethylenglykole (PEG) variabler Kettenlänge nehmen eine Zwischenstellung ein. Sie konkurrieren zum einen mit den Proteinen um ihre Hydrathülle, verändern andererseits aber auch die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels (McPherson, 1985b).

Die wichtigsten Methoden, die bei der Kristallisation von Proteinen verwendet werden, sind die Methode des Hängenden- bzw. die Methode des Sitzenden Tropfens (Hanging oder Sitting Drop; McPherson, 1985a; McPherson, 1990; Ducroix und Giegé, 1999). Hierbei wird Gasphasendiffusion mit der Benutzung von Präzipitanten kombiniert. Der Kristallisationsvorgang lässt sich anhand eines in Abbildung 2 dargestellten Phasendiagramms veranschaulichen. Die Proteinlösung, die einen Präzipitanten in einer bestimmten Konzentration enthält, steht mit einer Präzipitanten-Lösung doppelt so hoher Konzentration in einem abgeschlossenen Gefäß nur über die Gasphase in Verbindung. Die Proteinmoleküle befinden sich zu Beginn der Kristallisation im ungesättigten Bereich (Abb. 2, ①). Die Konzentration des Präzipitanten in der Proteinlösung erhöht sich langsam, weil zum Konzentrationsausgleich zwischen beiden Lösungen Wasser aus der Proteinlösung diffundiert. Weiterhin nimmt dadurch auch die Proteinkonzentration der Lösung zu. Wenn die Konzentration des Proteins über seine Löslichkeitsgrenze (Abb. 2, ②) gebracht wird, beginnt die Lösung übersättigt zu werden. Liegen die Konzentrationen von Protein und Präzipitant im Bereich der Nukleationszone (Abb. 2, ③), so fangen die Proteinmoleküle an zu aggregieren.

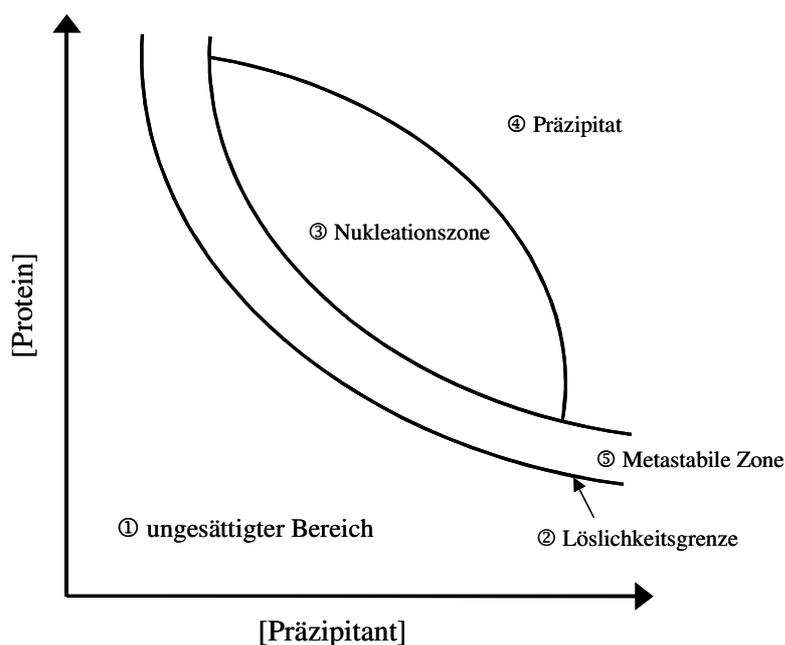


Abb. 2 Phasendiagramm der Löslichkeit eines Proteins. Die Löslichkeitsgrenze unterteilt ungesättigte von gesättigten Bereichen. Auf ihr befinden sich die Proteine im Gleichgewicht zwischen Lösung und Kristall (Weitere Erläuterungen im Text).

Aggregation lässt sich in zwei Stadien einteilen: Nukleation und Wachstum. Während der Nukleationsphase beginnen Proteinmoleküle, sich zu einem stabilen Komplex zusammenzulagern. Dieser Komplex wird als Kristallisationskeim bezeichnet. Weitere Proteinmoleküle diffundieren zum Nukleationskomplex und lagern sich in der Wachstumsphase an dessen Oberfläche an. Im metastabilen Bereich (Abb. 2, ⑤) findet keine Nukleation statt. Dieser Bereich fördert jedoch Kristallwachstum an vorhandenen Kristallisationskeimen.

Dadurch, dass Proteinmoleküle in die feste Phase übergehen, erniedrigt sich ihre Konzentration in der Lösung. Das System geht wieder in einen ungesättigten Zustand über. Befinden sich die beiden Lösungen noch nicht im Gleichgewicht, diffundiert weiterhin Wasser aus der Proteinlösung und erhöht so wiederum die Protein- und Präzipitantenkonzentration. Folglich tritt das System wieder in die Nukleationsphase ein. Zusätzlich zu diesen durch Diffusion hervorgerufenen Veränderungen wirkt auch der Präzipitant auf das Protein ein. Durch Entzug von Hydratwasser werden Protein-Protein-Wechselwirkungen gefördert. Bei zu hohen Konzentrationen von Protein und Präzipitant oder wenn das Protein zu schnell in den übersättigten Bereich übertritt, wird es als amorphes Präzipitat ausgefällt (Abb. 2, ④). Bei Kristallisationsexperimenten wird daher versucht, die Proteinlösung so langsam wie möglich in einen Bereich zu bringen, der nur leicht oberhalb der Löslichkeitsgrenze liegt.

2.9.1 *Probenvorbereitung*

Für die Kristallisationsversuche wurde einerseits über Ni-NTA Superflow und Sephadex G-100 gereinigte ODH-5His bzw. ODH-LE6His eingesetzt. Diese wurden vor dem Einsatz im Kristallisationsexperiment über Nacht gegen 10 mmol L^{-1} HEPES pH 7.0, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT dialysiert. Andererseits wurde gereinigte ODH-CtermPst ohne His-Tag verwendet. Diese wurde ebenfalls über Nacht gegen 10 mmol L^{-1} HEPES pH 7.0, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT dialysiert. Nach Dialyse wurden die Proben für 30 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5417R9) bei 14.000 rpm zentrifugiert.

2.9.2 *Sitting- und Hanging-Drop Ansätze*

Für Kristallisationsversuche mittels der Gasphasen-Diffusionsmethode wurde sowohl die Technik des Sitting-, als auch des Hanging-Drop verwendet (McPherson, 1990; Ducruix und Giegé, 1999). Um geeignete Kristallisationsbedingungen für die ODH zu finden, wurden zuerst Reihenversuche mit Ammoniumsulfat, Malonat, NaCl, Methylpentandiol (MPD), PEG 3350 und PEG 6000 als Präzipitanten durchgeführt. Es wurden hierfür jeweils verschiedene Konzentrationen der Substanzen eingesetzt. Weiterhin wurde vier verschiedene Puffer

(0,1 mol L⁻¹ MES pH 6.0, 0,1 mol L⁻¹ Hepes pH 7.0, 0,1 mol L⁻¹ Tris pH 8.0, 0,1 mol L⁻¹ Bicine pH 9.0) getestet und die Proteinkonzentration (5, 10 und 20 mg mL⁻¹) variiert. Zusätzlich wurden die Kristallisationskits „Crystal Screen I & II“ der Firma Hampton Research (USA) für die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen benutzt. Beim Crystal Screen I handelt sich um einen so genannten „Sparse matrix screen“ wie er von Jancarik *et al.* (1990) vorgeschlagen wurde. Er erlaubt den einfachen Screen 50 verschiedener Puffer-, Salz- und Präzipitanten-Kombinationen (genaue Angaben über die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen sind den Tabellen 23 und 24 im Anhang zu entnehmen). Alle Lösungen repräsentieren verschiedenste, bereits erfolgreiche Kristallisationsbedingungen. Crystal Screen II dient als Ergänzung. Er enthält weitere 48 verschiedene Lösungen mit anderen Präzipitanten (Cudney *et al.*, 1994).

Jeweils 1 mL der verschiedenen Lösungen wurde in die Kammern einer Zellkulturplatte (Linbro plate™, Hampton Research, USA) gegeben. Auf den eingesetzten Mikrobrücken (Micro-Bridges®, Hampton Research, USA) wurden zwischen 5 und 10 µL gereinigte ODH und 5 bzw. 10 µL der jeweiligen Präzipitanten-Lösung platziert. Der Proteingehalt wurde zwischen 5 und 30 mg mL⁻¹ variiert. Die Kammern wurden anschließend gasdicht mit gefetteten (High Vakuum Grease, Hampton Research, USA) Deckgläschen verschlossen. Für die Hanging-Drop-Ansätze wurden Deckgläschen verwendet, die zuvor mit AquaSil™ (Hampton Research) silanisiert worden waren. Hier wurden zwischen 3 und 5 µL Proteinsuspension unterschiedlicher Konzentration mit der Präzipitanten-Lösung gemischt und anschließend gasdicht über der jeweiligen Kammer einer Zellkulturplatte platziert.

Die fertig bestückten Platten wurden zuerst bei Raumtemperatur an einem ruhigen, vibrationsfreien Ort aufbewahrt. In späteren Versuchen wurde auch eine Inkubationstemperatur von 12 °C verwendet. Direkt nach dem Ansatz, danach in regelmäßigen Abständen, wurden die Lösungen im Binokular betrachtet und die Wirkung jeder Lösung protokolliert. Viel versprechende Bedingungen wurden näher untersucht, indem sowohl die Konzentration des jeweiligen Präzipitanten, die Proteinkonzentration, sowie der verwendete Puffer und pH-Wert variiert wurden.

2.9.3 Additiv-Screen

Zur Verbesserung der anfänglichen Kristallisationsbedingungen wurde weiterhin ein Additiv-Screen durchgeführt (Crystal Screen as an additive screen; Hampton Research Crystallization Tips). Hierzu wurden 950 µL derjenigen Reservoirolösung, bei der es zu Nadel- bzw. Kristallbildung kam, jeweils mit 50 µL der Crystal Screen I und II-Lösungen versetzt

und der Einfluss auf das Kristallisationsverhalten protokolliert. Hierdurch sollten Substanzen ermittelt werden, die einen positiven Einfluss auf das Kristallisationsverhalten nehmen könnten.

2.9.4 Mikroseeding

Weiterhin wurde versucht, durch Mikroseeding (Bergfors, 2003) das Kristallisationsverhalten zu verbessern. Hierzu wurden einem Ansatz Proteinkristalle bzw. Nadeln entnommen. Diese wurden mehrfach mit der entsprechenden Reservoirlösung gewaschen und durch Zentrifugation gesammelt. Im Anschluss wurden die Kristalle in 500 μL Reservoirlösung aufgenommen und mit einem Ultraschall behandelt (Sonoplus HD2200 mit Mikrospritze MS72, Bandelin, Berlin; 4 mal 15 Sekunden). Die resultierende Kristallsuspension wurde anschließend hundert-, tausend- und zehntausendfach mit Reservoirlösung verdünnt. Jeweils 1 μL dieser Kristallisationskeimlösung wurde zu Ansätzen gegeben, bei denen die Konzentration des jeweiligen Präzipitanten knapp unterhalb derjenigen Konzentration lag, bei der sich kristalline Strukturen ausbildeten.

2.9.5 Kontrollexperimente

Um erhaltene Kristalle eindeutig als Proteinkristalle zu identifizieren, wurden diese mit IZIT Crystal DyeTM (Hampton Research) angefärbt. Hierbei handelt es sich um einen Coomassie-ähnlichen Farbstoff, der leicht in die großen Lösungsmittelkanäle von Proteinkristallen diffundiert und diese blau anfärbt. Um nachzuweisen, dass es sich um ODH-Kristalle handelt, wurden einige gefärbte Kristalle aus dem Ansatz entfernt, mehrfach mit Reservoirlösung gewaschen und jeweils durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurden die Kristalle in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 30 Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurden die Kristall-Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Aliquot des letzten Waschschritts mit auf das Gel aufgebracht.

2.9.6 Röntgenographische Untersuchung von ODH-Kristallen

Die röntgenographische Untersuchung der ODH-Kristalle erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. O. H. Weiergräber vom Institut für Neurowissenschaften und Biophysik, Abteilung Molekulare Biophysik, des Forschungszentrums Jülich. Die Aufnahmen der ODH-Kristalle wurden an der ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) in Grenoble, Frankreich, gemacht. Es wurde hierzu Synchrotronstrahlung mit einer Wellenlänge von 0,934 Å verwendet. Die Aufnahmen erfolgten bei einer Temperatur von 100 K. Pro Bild wurde der Kristall um

1 Grad gedreht. Zur Kryoprotektion wurden die Kristalle in 1,1 mol L⁻¹ Na-Citrat, 0,85 mol L⁻¹ Hepes, 15 % (v/v) Glycerin überführt.

2.10 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

In den letzten Jahren hat sich neben der Röntgenbeugung die Kernresonanzspektroskopie als Alternative zur Strukturbestimmung etabliert. Gegenüber der Kristallographie unterliegt die NMR-Spektroskopie jedoch einer Größenbeschränkung der zu untersuchenden Proteine. Allerdings bietet die NMR-Spektroskopie den Vorteil, dass auch Proben in wässriger Lösung, unter annähernd physiologischen Bedingungen, untersucht werden können. Strukturbestimmung mit der NMR-Spektroskopie war bis vor wenigen Jahren auf Proteine bis zu einer Größe von 10 bis 15 kDa beschränkt. Die Einführung zweidimensionaler Experimente (Aue *et al.*, 1976) ermöglichte es, die Signalüberlagerungen in 1D-Spektren durch Korrelation einzelner Kernspins aufzulösen, was 1982 zur ersten sequenzspezifischen Zuordnung eines Proteins durch Wagner und Wüthrich führte. Durch die Isotopenmarkierung heterolog exprimierter Proteine (Fesik und Zuiderweg, 1988; Marion *et al.*, 1989; McIntosh und Dahlquist, 1990) sowie durch Einführung von 3D- (Vuister *et al.*, 1988; Oschkinat *et al.*, 1988; Montelione und Wagner, 1990) und 4D-Tripleresonanz-(¹H-¹⁵N-¹³C) Experimenten (Kay *et al.*, 1990) wurde es möglich, die dreidimensionale Struktur von Proteinen zu bestimmen, die größer als 25 kDa sind.

Mit zunehmender Proteingröße nimmt allerdings die Linienverbreiterung und die transversale Relaxation zu, was bei größeren Proteinen eine partielle oder vollständige Probendeuterierung bzw. eine selektive Isotopenmarkierung erforderlich macht (LeMaster, 1994; Gardner und Kay, 1998; Coughlin *et al.*, 1999; Goto und Kay, 2000; Tugarinov und Kay, 2003). Die Einführung der TROSY-Technik (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy; Pervushin *et al.*, 1997; Salzmann *et al.*, 1998) verbesserte die Auflösung der Spektren noch weiter. Fiaux *et al.* erzielten 2002 aufgelöste Spektren des 900 kDa großen bakteriellen Chaperon-Komplexes GroEL-GroES. Tugarinov *et al.* beschrieben 2005 die Lösungsstruktur der 82 kDa großen Malat-Synthase G aus *E. coli*. Weiterhin kann die NMR-Spektroskopie auch dazu eingesetzt werden Proteinfaltung (Dyson und Wright, 1998; Zeeb und Balbach, 2004), Ligandeninteraktion und -Bindung (Shuker *et al.*, 1996; Meyer und Peters, 2003; Fielding, 2003; Dehner und Kessler, 2005) zu untersuchen.

2.10.1 Expression isotopenmarkierter ODH

2.10.1.1 ^{15}N -markierte ODH

Für die Expression ^{15}N -markierter ODH wurde M9 Minimalmedium (0,6 % (w/v) Na_2HPO_4 , 0,3 % (w/v) KH_2PO_4 , 0,05 % (w/v) NaCl , 0,4 % (w/v) Glucose, 1 mmol L^{-1} MgSO_4 , 0,3 mmol L^{-1} CaCl_2 , 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Biotin, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Thiamin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EDTA, 8,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FeCl_3 , 0,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ZnCl_2 , 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CuCl_2 , 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CoCl_2 , 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ H_3BO_3 , 16 ng mL^{-1} MnCl_2 , pH 7.0; Sambrook *et al.*, 2001) verwendet, dem als einzige Stickstoffquelle 0,1 % (w/v) ^{15}N -Ammoniumchlorid zugefügt wurde. 5 Einliterkolben mit Minimalmedium wurden mit je 1 mL einer Übernachtskultur angeimpft und für 12 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Expression wurde mit 0,35 mmol L^{-1} IPTG induziert und die Temperatur anschließend auf 18 °C reduziert. Die Bakterien wurden für weitere 36 h angezogen, durch Zentrifugation pelletiert und aufgeschlossen (2.6.4). Die Reinigung erfolgte mit Ni-NTA (2.8.3.1) und Gelfiltration (2.8.3.4). Im Anschluss wurde die Probe in 50 mmol L^{-1} Na-Phosphatpuffer, pH 6.8, 1 mmol L^{-1} DTT, 1 mmol L^{-1} EDTA überführt.

2.10.1.2 Expression ^2H - ^{15}N - ^{13}C markierter ODH

Für die Herstellung dreifach isotopenmarkierter ODH wurde M9 Minimalmedium verwendet, das neben 0,1 % (w/v) ^{15}N -Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle, 0,4 % (w/v) ^{13}C -Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt und mit deuteriertem H_2O (eurisotop) hergestellt wurde. Alle Substanzen wurden im geringstmöglichen Volumen D_2O gelöst, anschließend gefriergetrocknet (Lyovac GT2, Finn-Aqua, Hürth) und danach im endgültigen Volumen D_2O aufgenommen. Ampicillin und IPTG wurden ebenfalls mit D_2O angesetzt. Alle Lösungen wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert. 10 mL M9-Minimalmedium mit 50 % (v/v) D_2O wurde mit einer einzelnen Kolonie ER2566/ODH-5His angeimpft und für 30 h bei 37 °C inkubiert. 5 mL M9-Minimalmedium mit 100 % D_2O wurden mit 1 mL der ersten Kultur angeimpft und für weitere 30 h bei 37 °C inkubiert. 2 mL dieser Vorkultur wurden zum Animpfen von 1 L Medium benutzt. Nach 30 stündigem Wachstum bei 37 °C wurde die Inkubationstemperatur auf 18 °C erniedrigt und die Expression der ODH durch 0,35 mmol L^{-1} IPTG induziert. Die Bakterien wurden anschließend für 48 h bei 18 °C inkubiert und aufgearbeitet wie zuvor beschrieben (2.6.3 und folgende). Die Reinigung der dreifachmarkierten ODH erfolgte durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA (2.8.3.1). Aufgrund einer sehr geringen Expression wurde auf einen mit Proteinverlusten verbundenen zweiten Reinigungs-

schritt verzichtet. Die Probe wurde konzentriert und in 50 mmol L⁻¹ Na-Phosphatpuffer, pH 6.8, 1 mmol L⁻¹ DTT, 1 mmol L⁻¹ EDTA aufgenommen, der 6 % (v/v) D₂O enthielt.

2.10.2 NMR-Experimente

NMR-spektroskopische Experimente mit der ODH fanden in Zusammenarbeit mit Juniorprof. Dr. M. Stoldt vom Institut für Neurowissenschaften und Biophysik - Molekulare Biophysik II - des Forschungszentrums Jülich statt.

Sämtliche NMR-Experimente wurde an einem Varian^{UNITY} INOVA-Spektrometer mit einer Protonenfrequenz von 800 MHz durchgeführt. Es wurde ein cryogen gekühlter 5 mm Z-PFG-¹H{¹³C, ¹⁵N}-Probenkopf verwendet. Alle Versuche wurden bei 25 °C durchgeführt. Als NMR-Probenröhrchen wurden 5 mm Suszeptibilitäts-angeglichene Micro-NMR-Röhrchen (BMS-005V; Shigemi, Japan) benutzt. Die Prozessierung der Spektren erfolgte von M. Stoldt mit der Software VNMRJ Version 1.1D (Varian, Inc., Palo Alto, USA). Für die Visualisierung und Auswertung der NMR-Experimente wurde das Programm CARA (Version 1.5.5; Keller, 2004) verwendet.

Bei ¹H-1D-Spektren betrug die spektrale Weite 20.000 Hz und die Aufnahmezeit (t1) 80 ms. Je nach Proteinkonzentration wurden 16-120 scans durchgeführt. Bei den 2D-TROSY-HSQC-Spektren betrug die spektrale Weite in der Protonendimension 14.000 Hz und 2.900Hz in der ¹⁵N-Stickstoff-Dimension. Die Aufnahmezeit (t2) der Protonen betrug 73 ms, die der ¹⁵N-Stickstoffe 69 ms. Je nach Probenkonzentration wurden 16-64 scans aufgenommen.

2.10.3 Titrationsexperimente mit Liganden

Durch die Bindung eines Liganden an ein Protein oder Enzym ändert sich die chemische Umgebung derjenigen Aminosäurereste die an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Weiterhin kann es zu strukturellen Umlagerungen im Molekül kommen, wodurch ebenfalls die chemische Umgebung verschiedenster Aminosäurereste verändert wird. Die veränderte Umgebung führt zu einer veränderten chemischen Verschiebung der Resonanzen dieser Atome in NMR-Spektren. Sind die Resonanzen bestimmten Aminosäuren zugeordnet, so ist es möglich die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste oder Domänen zu bestimmen. Allerdings kann auch ohne vollständige Zuordnung die chemische Verschiebung, die aus der Bindung von Liganden resultiert, dazu benutzt werden die Dissoziationskonstante K_D zu bestimmen (s. 2.10.3.2). Für Titrationsexperimente wurde ¹⁵N-markierte ODH mit einer Konzentration von 0,3 mmol L⁻¹ verwendet (2.10.1.1). Es wurden jeweils 2D (¹H-¹⁵N)-TROSY-HSQC-Spektren mit freiem Enzym und danach mit steigenden Ligandenkonzentrationen aufgenom-

men. Genaue Angaben über die eingesetzten Konzentrationen der unterschiedlichen Liganden und die untersuchten Liganden-Kombinationen sind dem Ergebnisteil (3.6.6) zu entnehmen.

2.10.3.1 Normierung der chemischen Verschiebungen bei der Ligandenbindung

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D (2.10.3.2) wurden die Differenzen der chemischen Verschiebungen verschiedener, ausgewählter Amidprotonen und Amidstickstoffresonanzen von freiem Enzym sowie nach Zugabe unterschiedlicher Ligandenkonzentrationen bestimmt. Die chemische Verschiebung wurde intern auf die maximale Verschiebung normiert (Gleichungen 2.5 und 2.6) und nach Gleichung 2.7 zusammengefasst.

$$(2.5) \quad \Delta\delta_n(H^N) = \frac{\Delta\delta(H^N)}{\Delta\delta_{\max}(H^N)}$$

$$(2.6) \quad \Delta\delta_n(N) = \frac{\Delta\delta(N)}{\Delta\delta_{\max}(N)}$$

$$(2.7) \quad \Delta\delta_{total} = \sqrt{(\Delta\delta(HN))^2 + (0,1 \cdot \Delta\delta(N))^2}$$

$\Delta\delta_n(H^N)$ = normierte Differenz der chemischen Verschiebungen für H^N . $\Delta\delta(H^N)$ = chemische Verschiebung für H^N [ppm]. $\Delta\delta_{\max}(H^N)$ = maximale chemische Verschiebung für H^N . $\Delta\delta_n(N)$ = normierte Differenz der chemischen Verschiebungen für N. $\Delta\delta(N)$ = chemische Verschiebung für N [ppm]. $\Delta\delta_{\max}(N)$ = maximale chemische Verschiebung für N.

2.10.3.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D

Die Dissoziationskonstante eines Protein und eines Liganden ist definiert als Quotient der Konzentration des Proteins [M] multipliziert mit der Konzentration des Liganden [L] und Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes [ML] bzw. als Quotient der Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsrate (k_{off}) (Gleichung 2.8).

$$(2.8) \quad K_D = \frac{[M] \cdot [L]}{[ML]} = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

Zur Bestimmung des K_D -Wertes der Bindung von NADH, NAD^+ bzw. L-Arginin an ODH wurde die normierte chemische Verschiebung ausgewählter Resonanzen gegen die Liganden-Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe nicht-linearer Regression wurde die Dissoziationskonstante bestimmt. Es wurde hierfür das einfachste Bindungsmodell verwendet (One-site saturation, Gleichung 2.9)

$$(2.9) \quad \Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{\max} \cdot [L]}{K_D \cdot [L]}$$

2.10.4 Versuche zur Renaturierung der ODH

Um einen vollständigen Austausch von Amiddeuteronen gegen ^1H zu erreichen, musste die ODH denaturiert und anschließend wieder renaturiert werden. Die ODH wurde zunächst mit $7,5 \text{ mol L}^{-1}$ Guanidinhydrochlorid oder mit 8 mol L^{-1} Harnstoff denaturiert. Für die Renaturierung wurden verschiedene Methoden getestet.

2.10.4.1 Schnelle-Verdünnung (Rapid-Dilution)

Ein Aliquot denaturierter ODH wurde schrittweise in das achtzigfache Volumen 50 mmol L^{-1} K-Phosphatpuffer pH 7.0, 1 mmol L^{-1} EDTA, 5 mmol L^{-1} DTT eingebracht und die Aktivität der resultierenden Suspension sofort bzw. nach 24 stündiger Inkubation bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt (Zettelmeisl *et al.*, 1984).

2.10.4.2 Dialyse

Denaturierte ODH wurde nacheinander jeweils über Nacht gegen 50 mmol L^{-1} K-Phosphatpuffer pH 7.0, 1 mmol L^{-1} EDTA, 5 mmol L^{-1} DTT dialysiert, dessen Guanidinhydrochlorid- bzw. Harnstoffkonzentration schrittweise bis auf $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ reduziert wurde. Ausgefallenes Protein wurde in 50 mmol L^{-1} K-Phosphatpuffer pH 7.0, 1 mmol L^{-1} EDTA, 5 mmol L^{-1} DTT resuspendiert und die ODH-Aktivität bestimmt.

2.10.4.3 Renaturierung mit chromatographischen Methoden (Middelberg, 2002)

Denaturierte ODH wurde mit ihrem His-Tag an eine Ni-NTA-Matrix gebunden (modifiziert nach Oganessian *et al.*, 2005). Die Säule war hierzu mit Lysepuffer äquilibriert worden, der 8 mol L^{-1} Harnstoff enthielt. Anschließend wurde die Harnstoffkonzentration im Eluenten innerhalb von 100 mL kontinuierlich von 8 mol L^{-1} auf 0 mol L^{-1} reduziert. Die gebundene ODH konnte durch Elutionspuffer, der 250 mmol L^{-1} Imidazol enthielt, von der Säule eluiert werden. Zusätzlich wurde versucht, ODH durch Gelfiltration zu renaturieren (Werner *et al.*, 1994). Denaturierte ODH wurde hierzu auf eine mit Superdex-75 gefüllte Gelfiltrationssäule (Hiload Superdex™ 75 HR16/60, Pharmacia) aufgetragen. Die Säule war zuvor mit 50 mmol L^{-1} Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 mit 2 mmol L^{-1} EDTA, 5 mmol L^{-1} DTT und 10% (v/v) Glycerin äquilibriert worden. Die Trennung erfolgte im gleichen Puffer mit einer Flussgeschwindigkeit von $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. ODH-Aktivität im Eluat wurde wie beschrieben detektiert (2. 8.4).

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Einblicke in die Struktur und den Reaktionsmechanismus der Octopindehydrogenase aus der Pilgermuschel *Pecten maximus* zu gewinnen. Zuerst musste die Reinigungsmethode der rekombinanten ODH verbessert werden, um ODH höchstmöglicher Reinheit zu gewinnen. Weiterhin sollten Kristallisationsversuche durchgeführt werden, um einen ODH-Kristall zu erhalten, der für die Strukturaufklärung geeignet ist. Hierzu wurde sowohl eine C-terminal mit einem His-Tag fusionierte ODH, als auch ein Enzym ohne diesen Affinitäts-Tag hergestellt und gereinigt. Zusätzlich zu den Kristallisationsversuchen sollten NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigen, ob sich die ODH hier als Versuchsobjekt eignet. Durch gerichtete Mutagenese sollten schließlich Einblicke in den Reaktionsmechanismus erhalten werden.

3.1 Artbestimmung

Bei der Untersuchung von Isoenzymen ist es wichtig, die benutzte Tierart genau zu bestimmen, damit die erhaltenen Nukleotid-Sequenzen nicht durch nah verwandte Arten verfälscht werden. Daher wurden die in dieser Arbeit benutzten Pilgermuscheln der Art *Pecten maximus* sowohl morphologisch, als auch molekularbiologisch charakterisiert. Hierzu wurde ein Bereich der kleinen ribosomalen Untereinheit mit Hilfe universeller Primer (Berschick, 1997) vervielfältigt und sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend mit Datenbankeinträgen verglichen. Sowohl das morphologische Erscheinungsbild, als auch die molekulare Untersuchung der kleinen ribosomalen Untereinheit bestätigten, dass es sich bei der verwendeten Muschel um die Pilgermuschel *Pecten maximus* handelte. Es stimmten 549 (99 %) von 551 Basenpaaren mit dem Datenbankeintrag für die ribosomale 16S-Untereinheit von *Pecten maximus* (PMA571619) überein (Barucca *et al.*, 2004). Der Vergleich der Sequenzen findet sich im Anhang (7.2).

3.2 Isoenzyme der ODH

3.2.1 Einzeltier-Präparationen von *Pecten maximus*

Zur Untersuchung der Verteilung von ODH-Isoenzymen innerhalb verschiedener Individuen der Pilgermuschel, wurden die Adduktoren einzelner Tiere präpariert und in Homogenisationsmedium aufgeschlossen. Es wurde hier jeweils nur eine Hälfte des Adduktormuskels verwendet und die andere Hälfte für eine DNA- oder RNA-Präparation aufbewahrt. Um die Konzentration der ODH zu erhöhen, wurden die Rohextrakte einer fraktionierten Ammoni-

umsulfatfällung unterzogen. Die Proteinsuspension wurde anschließend durch Gelfiltration über Sephadex G-25 entsalzt und gelelektrophoretisch auf einer nativen Page untersucht. Im Anhang (7.3, Tab. 22) findet sich die Tabelle, in der jeweils die ODH-Aktivitäten im Rohextrakt der verschiedenen Individuen, die Aktivitäten nach der Ammoniumsulfatfällung und nach Entsatzung sowie die zugehörigen Proteinkonzentrationen dargestellt sind.

Es wurden zwischen 3,1 g und 4,7 g Adduktormuskel für die Gewinnung des Rohextraktes verwendet. Nach Homogenisation und Zentrifugation konnten zwischen 81 U und 125 U ODH im Überstand gefunden werden. Durchschnittlich wurden 25,8 U ODH aus einem Gramm Adduktormuskel gewonnen. Bei Proteinkonzentrationen zwischen 15,7 und 67 mg ergaben sich im Rohextrakt spezifische Aktivitäten von 1,7 bis 5,2 U mg⁻¹. Durchschnittlich lag die spezifische ODH-Aktivität bei 2,6 U mg⁻¹. Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung war sowohl mit einem Aktivitäts- als auch mit einem Proteinverlust verbunden. Durchschnittlich 65,2 U ODH und 16,5 mg Protein waren nach der Ammoniumsulfatfällung noch vorhanden. Die spezifische Aktivität betrug durchschnittlich 4,5 U mg⁻¹. Um die Extrakte gelelektrophoretisch zu untersuchen, wurden jeweils 2,5 mL durch Gelfiltration mit Sephadex G-25 entsalzt. Die Extrakte enthielten anschließend durchschnittlich 32 U ODH. Bei einem Proteingehalt zwischen 4,4 und 16,7 mg betrug die spezifische Aktivität im Durchschnitt 4,5 U mL⁻¹.

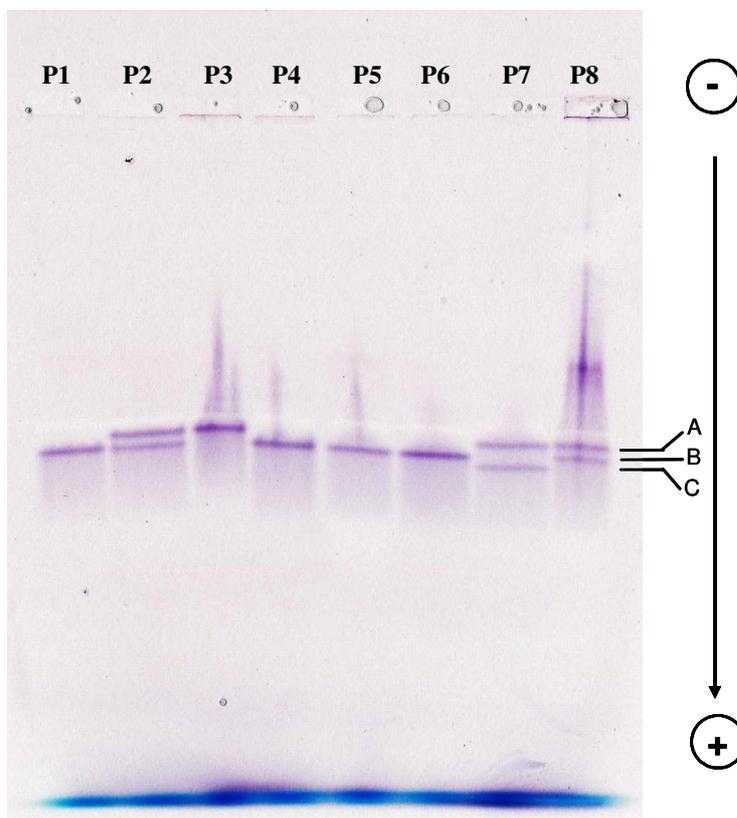


Abb. 3 Native Gelelektrophorese mit Extrakten aus Einzeltierpräparationen. Die ODH wurde durch eine Aktivitätsfärbung nachgewiesen. Aufgetragen wurde jeweils der ODH-Extrakt nach Entsatzung mit Sephadex G-25. Die Nummerierung der Individuen entspricht der in Tab. 22 verwendeten. Es wurden jeweils ca. 6 µg Protein auf das Gel aufgetragen.

Anschließend wurden die Einzeltierextrakte gelelektrophoretisch auf das Vorkommen verschiedener ODH-Isoformen untersucht. Abbildung 3 zeigt die zugehörige native PAGE. Die ODH wurde spezifisch durch eine Aktivitätsanfärbung nach Latner und Skillen (1968) sichtbar gemacht. In den Spuren, in denen Extrakte der Muscheln P1, P4, P5 und P6 aufgetragen wurden, ist jeweils nur eine ODH-Bande mit einem rf-Wert von 0,49 zu erkennen. Nach Monneuse-Doulet (1980) kann diese Bande der B-Form der ODH zugeordnet werden. Der in Spur P3 aufgebrauchte Extrakt von Individuum Nr. 3 zeigt nach nativer Elektrophorese eine ODH-Bande mit einem rf-Wert von 0,46 (A-Form). Die Spuren, in denen Extrakte von Pecten 2, Pecten 7 und Pecten 8 aufgetragen wurden, lassen jeweils zwei Banden mit ODH-Aktivität erkennen. In den Spuren der Proben P2 und P8 betragen die rf-Werte für die ODH-Banden 0,48 und 0,51 (sowohl A als auch B-Form). Für die beiden ODH-Banden des in Spur P7 aufgetragenen Extraktes wurden rf-Werte von 0,48 und 0,52 bestimmt. Hierbei handelte es sich um die A- und die C-Form der ODH.

3.2.2 Klonierung und Sequenzierung der ODH

Zur Bestimmung von Unterschieden in der Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen ODH-Isoformen, wurden die ODH-Gene aus den Individuen 2, 3, 5, 6 und 7 vervielfältigt und kloniert. Hierzu wurde ausgehend von RNA aus den Adduktoren der verschiedenen Individuen mRNA präpariert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und das ODH-Gen mit zwei Primern amplifiziert, deren Bindestellen im untranslatierten Bereich vor bzw. hinter der ODH-codierenden Sequenz lagen. Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige PCRs mit einer Proofreading-Polymerase durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden kloniert und anschließend von der Firma Qiagen (Hilden) sequenziert. Die Sequenzen wurden dann mit der bekannten Sequenz der ODH verglichen. Der detaillierte Vergleich der Sequenzen findet sich im Anhang. In Tabelle 2 ist der Sequenzvergleich zusammengefasst.

In allen fünf untersuchten Adduktormuskeln ließ sich eine ODH-kodierende Sequenz mit einem Leseraster finden, das für 399 Aminosäuren kodierte. Verglichen mit der Pilgermuschel-Sequenz aus der Datenbank (Janßen, 2000) unterscheiden sich die Sequenzen in 24, 27, 28 oder 34 Nukleotiden. Die veränderten Nukleotide führen allerdings lediglich zu zwei bzw. drei Aminosäureaustauschen. Die aus Pecten 3 (A-Form) gewonnene Sequenz z.B. unterscheidet sich in 27 Nukleotiden von der *Pecten*-Sequenz aus der Datenbank. Diese 27 Nukleotidaustausche machen sich in drei Aminosäureaustauschen bemerkbar. Methionin an Position 186 ist gegen Lysin ausgetauscht, Valin an Position 336 gegen Alanin und Serin 350 gegen Asparagin. Der berechnete pI für diese Isoform beträgt 5,44. In allen sequenzierten

ODHs war Serin an Position 350 gegen Asparagin ausgetauscht worden. In der Aminosäuresequenz von Pecten 7 ist zusätzlich Glycin an Position 26 gegen ein Aspartat ausgetauscht, der berechnete isoelektrische Punkt beträgt 5,27.

Tab. 2 Vergleich verschiedener ODH-Isoenzyme. Dargestellt sind jeweils die Anzahl der sequenzierten Nukleotide, die Anzahl der Aminosäuren im Leseraster (ORF), die Anzahl der ausgetauschten Nukleotide, die Aminosäureaustausche und die aus der Aminosäuresequenz berechneten isoelektrischen Punkte (pI). Pecten Wt bezeichnet die in der Datenbank enthaltene Sequenz der ODH aus *Pecten maximus* (AJ237916, Janßen, 2000). Bei den anderen Proben wurde die in Abb. 3 gewählte Nummerierung verwendet.

Name	Nukleotide	ORF (AS)	Nukleotid-austausche	Aminosäure-austausche	pI
Pecten Wt	1793	399	-	-	5,35
Pecten 2	1275	399	27	M186K S350N	5,44
Pecten 3	1254	399	27	M186K V336A S350N	5,44
Pecten 5	1275	399	24	S109A G221S S350N	5,35
Pecten 6	1275	399	28	A241G S350N	5,35
Pecten 7	1275	399	34	G26D S350N	5,27

3.2.3 Expression der ODH-Isoenzyme

Zu Beginn dieser Arbeit konnte auf einen von Janßen (2000) erzeugten Expressionsklon für die ODH zurückgegriffen werden. Das für die ODH codierende Gen war in den Vektor pTYBI inseriert worden und ermöglichte die heterologe Expression der ODH mit einem um fünf Histidine verlängerten C-Terminus (ODH-5His). Allerdings war nicht bekannt, welche Isoform der ODH kloniert worden war. Es wurde daher in dieser Arbeit versucht, ausgehend von Addukturen, in denen jeweils nur eine ODH-Isoform nachgewiesen wurde, das zugehörige ODH-Gen zu sequenzieren (3.2.2) und zu exprimieren.

Für die heterologe Expression wurden die Individuen *Pecten 3*, *Pecten 5* und *Pecten 6* (Abb. 3) ausgewählt. Ausgehend von cDNA wurde das ODH-Gen mit den Primern Nterm_neu-Cterm5_neu amplifiziert und in den Vektor pTYBI (NEB) inseriert. Der Primer Cterm5_neu verlängerte den C-Terminus der rekombinanten ODH um fünf zusätzliche Histidine. Abbildung 4 zeigt eine native PAGE mit gereinigten heterolog exprimierten Octopindehydrogenasen. Die im Gel getrennte ODH wurde durch eine Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht. In Spur 5 wurde ODH-5His aufgetragen (Janßen, 2000). Für die Bande mit ODH-Ak-

tivität ergab sich ein rf-Wert von 0,5. In Spur 2 wurde gereinigte Pecten_6-5His-ODH aufgetragen. Der rf-Wert der ODH-Bande betrug hier ebenfalls 0,5. Spur 3 zeigt ODH ohne Histi-din-Tag. Für diese Probe ergab sich ein rf-Wert von 0,53. In Spur 4 wurde gereinigte Pec-ten_3-5His aufgetragen, der rf-Wert betrug 0,48.

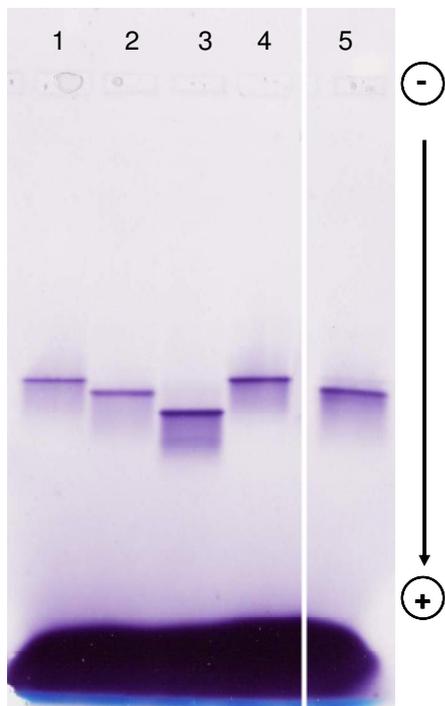


Abb. 4 Native Gelelektrophorese mit rekombinanter ODH. Die ODH wurde durch eine Aktivitätsfärbung nachgewiesen. Aufgetragen wurde jeweils der ODH-Rohextrakt (1) D369N-5His, (2) Pecten_6-5His, (3) ODH kloniert ohne His-Tag (CtermPst), (4) Pecten_3-5His, (5) ODH-5His (Janßen, 2000).

Bei der in der ersten Spur aufgetragenen Probe handelt es sich um eine ODH-Mutante, deren Aspartat (D) an der Position 369 gegen ein Asparagin (N) ausgetauscht wurde. Für die ODH-Bande wurde ein rf-Wert von 0,48 bestimmt.

3.3 Kinetische Parameter der ODH

Die kinetischen Parameter der ODH-Reaktion wurden schon von Doublet und Mitarbeitern (1975 a und b) sowie von Schrimsher und Taylor (1984) bestimmt. Für diese Untersuchungen wurde ODH verwendet, die aus *Pecten maximus*-Adduktoren gereinigt worden war. In der vorliegenden Arbeit wurden daher zuerst die kinetischen Eigenschaften der heterolog exprimierten ODH-5His aufgenommen und diese dann mit den Eigenschaften von ODH-Mutanten verglichen. Mit Hilfe eines optisch-enzymatischen Tests wurde die spezifische ODH-Aktivität bei variierenden Konzentrationen eines Substrats (Pyruvat, L-Arginin, NADH, bzw. D-Octopin) ermittelt. Für die Analyse der Daten wurde zunächst die spezifische Aktivität gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Michaelis-Menten-Diagramm, Abbildung 5).

Trägt man die spezifische Aktivität gegen die NADH-Konzentration auf, so zeigt der resultierende Graph einen hyperbolischen Verlauf (Abb. 5 C). Mit zunehmender NADH-Konzentration stieg die spezifische Aktivität bis auf ca. 890 U mg^{-1} an. Im Gegensatz dazu zeigen die Graphen in Abhängigkeit von der Pyruvat (A), der L-Arginin (B) und der Octopin-Konzentration (D) keinen hyperbolischen Verlauf. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt bis zu einem Maximalwert an, um bei weiter zunehmender Substratkonzentration wieder abzufallen.

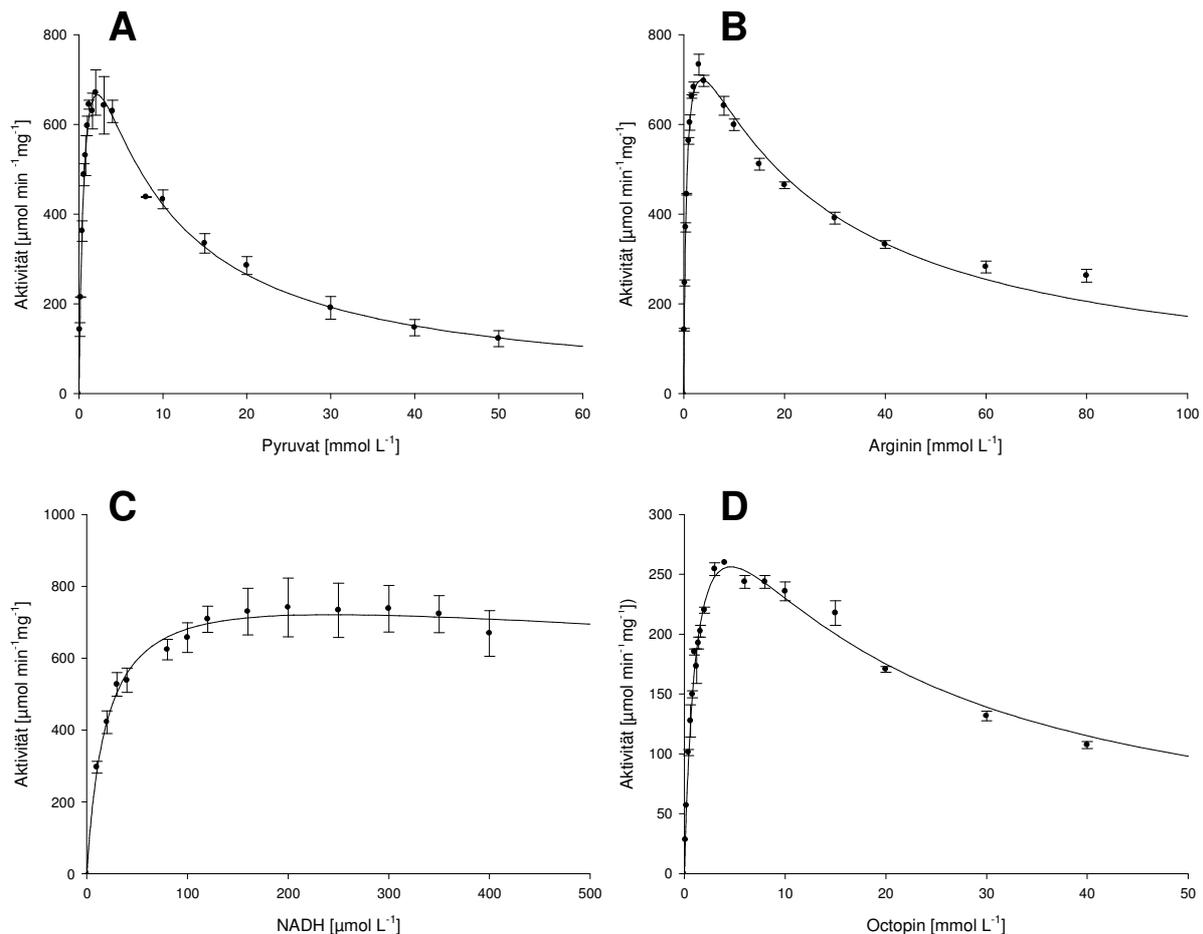


Abb. 5 Michaelis-Menten-Diagramme der ODH-5His-katalysierten Reaktion. Aufgetragen wurde jeweils die spezifische ODH-Aktivität in Abhängigkeit von der (A) Pyruvat-, (B) L-Arginin-, (C) NADH- bzw. (D) D-Octopin-Konzentration. Die Messungen für Pyruvat, L-Arginin und NADH wurden in 50 mmol L^{-1} TRA pH 7.0 durchgeführt. Für die Rückreaktion mit Octopin wurde ein 50 mmol L^{-1} Glycin/NaOH-Puffer pH 9.5 verwendet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. (A) In der zugehörigen Messreihe wurde die Pyruvat-Konzentration zwischen 0,1 und 50 mmol L^{-1} variiert. Es befanden sich 0,16 mmol L^{-1} NADH im Testansatz. Die Reaktion wurde mit 5,5 mmol L^{-1} L-Arginin gestartet. (B) Die L-Arginin-Konzentration wurde zwischen 0,1 und 80 mmol L^{-1} variiert. Die NADH-Konzentration betrug 0,16 mmol L^{-1} . Für den Start der Reaktion wurden 3 mmol L^{-1} Pyruvat verwendet. (C) Der Testansatz enthielt NADH-Konzentrationen zwischen 5 und 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 3 mmol L^{-1} Pyruvat und 5,5 mmol L^{-1} L-Arginin. (D) Die D-Octopin-Konzentration wurde zwischen 0,1 und 40 mmol L^{-1} variiert, der Ansatz enthielt 0,18 mmol L^{-1} NAD^+ .

Bei der Variation von Pyruvat (Abb.5 A) stieg die spezifische Aktivität bis auf 634 U mg^{-1} an (1,2 mmol L^{-1} Pyruvat). Steigende Pyruvat-Konzentrationen führten zu einer

Abnahme der spezifischen Aktivität. Bei 10 mmol L⁻¹ Pyruvat betrug die spezifische Aktivität noch 412 U mg⁻¹. Sie sank weiter ab bis auf 105 U mg⁻¹ bei 50 mmol L⁻¹ Pyruvat. Einen ähnlichen Verlauf zeigten die spezifischen Aktivitäten bei variierenden L-Arginin-Konzentrationen (Abb. 5B). Hier stieg die Aktivität bis auf 698 U mg⁻¹ bei 3 mmol L⁻¹ L-Arginin an, um danach wieder bis auf 240 U mg⁻¹ bei 80 mmol L⁻¹ L-Arginin abzufallen. In den Messreihen mit steigenden Octopinkonzentrationen (Abb. 5D) nahm die spezifische Aktivität zuerst bis auf 260 U mg⁻¹ (4 mmol L⁻¹ Octopin) zu. Mit weiter erhöhter Octopin-Konzentration sank die Aktivität bis auf 104 U mg⁻¹ bei 40 mmol L⁻¹ Octopin im Ansatz ab.

Tab. 3 Kinetische Parameter der ODH-5His-katalysierten Reaktion. Die Tabelle enthält die durch nicht-lineare Regression berechneten Werte für V_{max} und den K_m-Wert, sowie die errechnete Wechselzahl (kcat), die katalytische Effizienz und die Übergangszustandsstabilisierungsenergie ΔG. Untersucht wurden die beiden ODH-Isoenzyme (ODH A und B), ODH ohne Affinitätstag sowie die ODH-Mutante D369N.

		V _{max} [μmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	K _m [mmol L ⁻¹]	K _i [mmol L ⁻¹]	kcat [s ⁻¹]	kcat/K _m [Lmol ⁻¹ S ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]
Pyruvat	ODH B	1074	0,77	6,1	775	1,0·10 ⁶	34,1
	ODH A	1142	0,78	6,1	824	1,05·10 ⁶	34,2
	ohne Tag	766	0,50	7,4	553	1,11·10 ⁶	34,4
	D369N	729	0,78	18,5	526	6,7·10 ⁵	33,1
Arginin	ODH B	886	0,50	22,5	640	1,28·10 ⁶	34,7
	ODH A	918	0,56	23,1	663	1,18·10 ⁶	34,5
	ohne Tag	715	0,34	28,3	516	1,51·10 ⁶	35,1
	D369N	863	0,71	21,6	623	8,79·10 ⁵	33,8
Octopin	ODH B	401	1,3	16,3	290	2,22·10 ⁵	30,4
	ODH A	397	1,3	17,0	287	2,20·10 ⁵	30,4
	ohne Tag	361	1,0	17,3	260	2,54·10 ⁵	30,7
	D369N	686	3,4	7,3	495	1,44·10 ⁵	29,3
		V _{max} [μmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	K _m [μmol L ⁻¹]	K _i [μmol L ⁻¹]	kcat [s ⁻¹]	kcat/K _m [Lmol ⁻¹ S ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]
NADH	ODH B	903	19,8	-	652	3,3·10 ⁷	42,8
	ODH A	836	19,4	-	603	3,11·10 ⁷	42,6
	ohne Tag	677	12,6	-	488	3,89·10 ⁷	43,2
	D369N	570	18,5	-	411	2,22·10 ⁷	41,8

Die Michaelis-Konstante (K_m) und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden aus den gemessenen Werten durch nicht-lineare Regression ermittelt. Hierzu wurde entweder die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet oder die Gleichung für die unkompetitive Substratinhibition. Wenn das Substratinhibitions-Modell verwendet wurde, ist zusätzlich noch der K_i-Wert angegeben. Tabelle 3 fasst die ermittelten Werte zusammen. Als weitere kinetische Parameter zur Charakterisierung des Enzyms wurden auch die Wechselzahl kcat und die katalytische Effizienz kcat/K_m berechnet. Mit Hilfe der Gibbs-Gleichung und der Gleichge-

wichtskonstanten k_{cat}/K_m konnte zusätzlich die Stabilisierungsenergie des Übergangszustandes der Reaktion berechnet werden.

Beide Isoenzyme der ODH (ODH A und B) lassen sich in ihren kinetischen Eigenschaften nicht unterscheiden. Die K_m -Werte für Pyruvat betragen $0,77 \text{ mmol L}^{-1}$ bzw. $0,78 \text{ mmol L}^{-1}$. Auch die K_m -Werte für L-Arginin ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ und $0,56 \text{ mmol L}^{-1}$), NADH ($19,4$ bzw. $19,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) und Octopin (beide $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$) stimmten überein. Für Pyruvat wurde eine Wechselzahl von 775 s^{-1} (824 s^{-1} bei ODH A) bestimmt. Die katalytische Effizienz für die Verwendung von Pyruvat betrug $1 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Für die Übergangszustandsstabilisierungsenergie wurden 34 kJ mol^{-1} berechnet. Für Pyruvat konnte eine Inhibitionskonstante (K_i) von $6,1 \text{ mmol L}^{-1}$ bestimmt werden. Der K_m -Wert von Pyruvat der ODH ohne His-Tag war etwas niedriger und betrug $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Die Mutante D369N hat den gleichen K_m -Wert für Pyruvat wie der Wildtyp, jedoch ist der K_i zu höheren Pyruvat-Konzentrationen verschoben ($18,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Die katalytische Effizienz ist auf $6,7 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ reduziert.

Der K_m -Wert für L-Arginin ist bei der ODH ohne His-Tag auf $0,34 \text{ mmol L}^{-1}$ reduziert ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ beim Wildtyp). Die D369N-Mutante besitzt einen geringfügig ($0,78 \text{ mmol L}^{-1}$) erhöhten K_m -Wert für L-Arginin. Die Wechselzahl liegt bei allen vier Enzymen zwischen 526 und 663 s^{-1} . Es wurden weiterhin ähnliche katalytische Effizienzen errechnet. Diese lagen zwischen $8,8 \cdot 10^5$ und $1,51 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Inhibitionskonstante K_i lag zwischen $21,6$ und 28 mmol L^{-1} L-Arginin. Die Energie zur Stabilisierung des Übergangszustands bezogen auf L-Arginin betrug ca. 34 kJ mol^{-1} .

Für Octopin konnte ein K_m -Wert von ca. $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$ bestimmt werden. Lediglich bei der Mutante D369N war die Michaelis-Konstanten auf $3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ erhöht. Bei ihr betrug die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $686 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Wildtyp: $400 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Allerdings war hier der K_i -Wert für Octopin von 17 mmol L^{-1} (Wildtyp) auf $7,3 \text{ mmol L}^{-1}$ erniedrigt. Bei der Verwendung von NADH ist der K_m der unverlängerten ODH niedriger ($12,6 \text{ mmol L}^{-1}$) als der des Wildtyps. Die Mutante D369N erreichte mit $18,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ einen ähnlichen K_m -Wert für NADH wie der Wildtyp. Es wurden katalytische Effizienzen von $2,22 \cdot 10^7$ (D369N) bis $3,9 \cdot 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ODH ohne His-Tag) bestimmt. Die Stabilisierungsenergie des Übergangszustandes für die Umsetzung von NADH betrug durchschnittlich 42 kJ mol^{-1} .

3.3.1 Substratspektrum der ODH-5His

Neben dem physiologischen Substrat Pyruvat wurde die ODH-katalysierte Umsetzung der strukturverwandten Substanzen α -Ketobutyrat und α -Ketovalerat untersucht. Als Ersatz

für die an der ODH-Reaktion natürlicherweise beteiligte Aminosäure L-Arginin wurde L-Norvalin verwendet. Zur Bestimmung der Kinetik in Abhängigkeit von der Ketobutyrat bzw. Ketovalerat-Konzentration wurde die Reaktion jeweils in Gegenwart von 5,5 mmol L⁻¹ L-Arginin und 0,16 mmol L⁻¹ NADH durchgeführt und anschließend durch nicht-lineare Regression ausgewertet. Der K_m-Wert für Ketobutyrat betrug 5,9 mmol L⁻¹ (7,6-fach erhöht im Vergleich zum Wildtyp), der K_m-Wert für Ketovalerat war auf 49,8 mmol L⁻¹ erhöht (64-fach erhöht). Bei beiden Substraten konnte keine Substratinhibition festgestellt werden. Die Wechselzahl wurde von 775 s⁻¹ (Pyruvat) über 526 s⁻¹ (Ketobutyrat) auf 272 s⁻¹ (Ketovalerat) reduziert. Die Übergangszustandsstabilisierungsenergie reduzierte sich mit zunehmender C-Kettenlänge des Substrats von 34,1 kJ mol⁻¹ (Pyruvat) bis auf 21,3 kJ mol⁻¹ bei Verwendung von Ketovalerat.

Tab. 4 Kinetische Parameter der ODH-5His bei Umsatz verschiedener Substrate. Die Tabelle enthält die durch nicht-lineare Regression berechneten Werte für V_{max} und den K_m-Wert, sowie die errechnete Wechselzahl (k_{cat}), die katalytische Effizienz und die Stabilisierungsenergie (ΔG) des Übergangszustandes für die ODH-5His katalysierte Umsetzung von α-Ketobutyrat, α-Ketovalerat und L-Norvalin.

	v _{max} [μmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	K _m [mmol L ⁻¹]	K _i [mmol L ⁻¹]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [Lmol ⁻¹ S ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]	ΔΔG [kJ mol ⁻¹]
Pyruvat	1074	0,77	6,1	775	1,0·10 ⁶	34,1	-
Ketobutyrat	728	5,9	-	526	8,95·10 ⁴	28,2	-6,0
Ketovalerat	377	49,8	-	272	5,47·10 ³	21,3	-12,9
Norvalin	1	33,6	-	0,9	2,61·10 ¹	8,1	-26,1

Zur Bestimmung der kinetischen Eigenschaften der ODH bei Umsetzung von L-Norvalin, wurde die spezifische Aktivität bei variablen Norvalin-Konzentrationen mit 3 mmol L⁻¹ Pyruvat und 0,16 mmol L⁻¹ NADH ermittelt. Für die Umsetzung von L-Norvalin wurden eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 1 μmol min⁻¹mg⁻¹ und eine Michaelis-Konstante von 33,6 mmol L⁻¹ bestimmt. Die Energie zur Stabilisierung des Übergangszustandes betrug 8,1 kJ mol⁻¹ und war um 26,1 kJ mol⁻¹ gegenüber der wildtypischen Umsetzung von L-Arginin erniedrigt.

Wildtypische ODH-5His (B-Form) war außerdem in der Lage, jede ihr angebotene proteinogene Aminosäure umzusetzen. Allerdings waren die Umsatzraten mindestens um den Faktor 1000 geringer als für L-Arginin. Es lag daher die Vermutung nahe, dass es sich um nicht-enzymatische Umsetzungen handelt, aber mit Verdopplung der Enzymkonzentration konnte auch die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt werden. D-Arginin wurde von wildtypischer ODH-5His nicht umgesetzt, ebenso wenig wie Taurin oder Agmatin. L-Canavanin und L-Ornithin wurden von der ODH hingegen als Substrate akzeptiert. Mit L-Canavanin

wurde eine Aktivität erreicht, die gegenüber der Verwendung von L-Arginin um 75 % reduziert war. Bei Umsetzung von L-Ornithin betrug die Aktivität lediglich noch 0,25 % im Vergleich zum Umsatz von L-Arginin. Zusätzlich kann die ODH auch NADPH als Coenzym verwenden. Aufgrund einer zu hohen Extinktion (339 bzw. 366 nm) bei NADPH-Konzentrationen über $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ war jedoch eine genaue kinetische Analyse durch photometrische Messungen nicht möglich. Der K_m -Wert für NADPH ist größer als $800 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.4 Reinigung rekombinanter Octopindehydrogenasen

Um für Kristallisationsversuche ausreichende Mengen homogener ODH zu erhalten, musste das Reinigungsprotokoll für das rekombinante Enzym verbessert werden. Neben der mit einem His-Tag verlängerten ODH wurde zusätzlich ein Vektor erzeugt, der es erlaubt, das ODH-Gen ohne zusätzliche Affinitätsverlängerung zu exprimieren. Hierdurch sollte ein möglicher Einfluss des His-Tags auf die Kristallisation der ODH untersucht werden. Für die ohne His-Tag exprimierte ODH musste ein neues Reinigungsprotokoll entwickelt werden, da nicht auf eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Superflow zurückgegriffen werden konnte.

3.4.1 *Reinigung der ODH-5His aus einer 1 L-Kultur*

Nach 16 stündiger Inkubation bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Bakterien einer 1L-Kultur durch Zentrifugation pelletiert. Es wurden 6.5 g Bakterien aus der 1L-LB-Kultur erhalten. Die Bakterien wurden anschließend in Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Als erster Schritt zur Isolation der ODH-5His wurde eine Metallchelate Affinitätschromatographie (IMAC) benutzt, wozu eine mit 12 mL Ni-NTA Superflow gefüllte Chromatographiesäule verwendet wurde. Abbildung 6 zeigt beispielhaft das Elutionsprofil eines Laufs. Der Rohextrakt wurde nach einstündiger Zentrifugation bei 88.000 g auf die mit Lysepuffer voräquilibrierte Säule aufgebracht. Nach 100 mL wurde die Imidazol-Konzentration im Laufmittel auf 20 mmol L^{-1} erhöht. Die ODH-Elution erfolgte mittels eines 100 mL langen linearen Imidazol-Gradienten von 20 bis 250 mmol L^{-1} . Es wurden 32,5 mL Rohextrakt mit einer ODH-Gesamtaktivität von 19.000 U auf die Säule aufgetragen. Bei einem Proteingehalt von 303 mg wies die Probe eine spezifische Aktivität von 63 U mg^{-1} auf. Die ODH-Elution erfolgte bei einer Imidazol-Konzentration von ca. 40 mmol L^{-1} .

Die fünf Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt. Sie enthielten ODH mit einer Gesamtaktivität von 16.350 U und hatten einen Proteingehalt von 39,5 mg (Tab. 5). Die spezifische Aktivität der vereinigten Fraktionen betrug 414 U mg^{-1} und war somit um den

Faktor 6,6 höher, als die des Rohextraktes. Die vereinten Fraktionen enthielten noch 86 % der auf die Säule aufgetragenen Ausgangsaktivität und 13 % des anfänglichen Proteingehaltes.

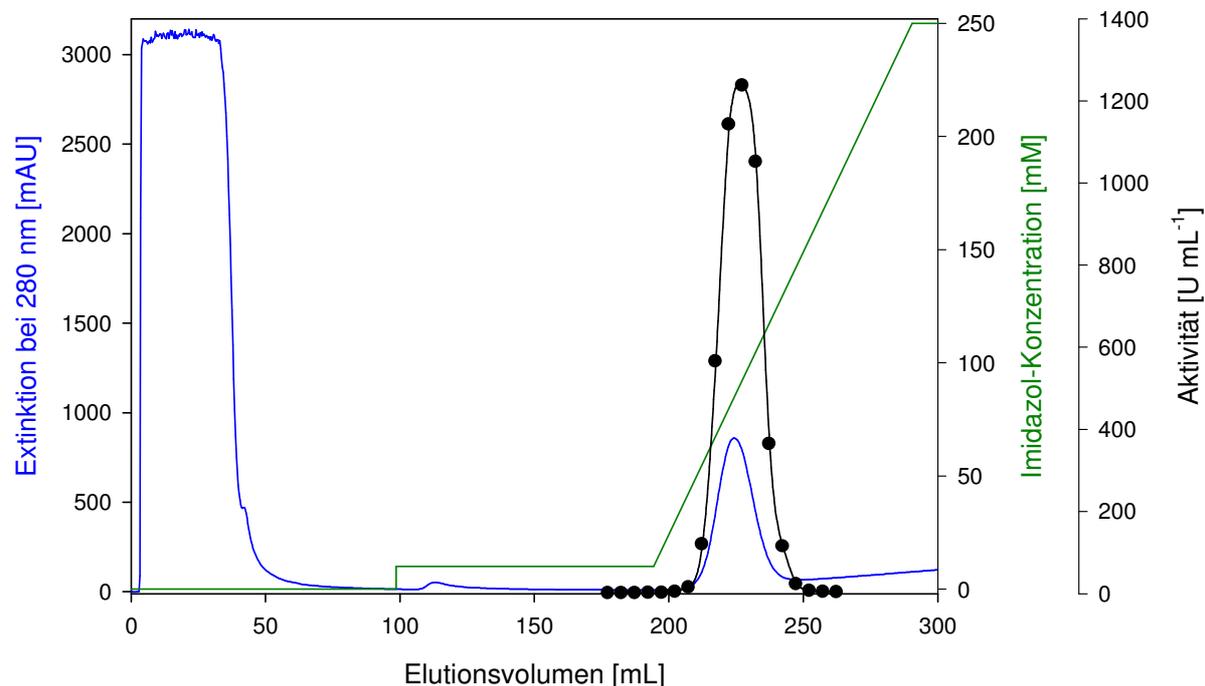


Abb. 6 Elutionsprofil einer Metallchelataffinitätschromatographie mit Ni-NTA. Dargestellt sind Extinktion bei 280 nm, der Verlauf des Imidazol-Gradienten und die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen. Auf die Säule wurden 32,5 mL Probe mit einer ODH-Aktivität von 19.013 U und einem Proteingehalt von 303 mg aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 70 mL Lysepuffer gespült. In den nächsten 100 mL der Elution wurde die Imidazol-Konzentration im Eluenten auf 20 mmol L⁻¹ erhöht. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen Imidazol-Gradienten (20-250 mmol L⁻¹) mit einer Länge von 100 mL. Es wurden 5 mL Fraktionen gesammelt.

Anschließend wurde die Probe auf 4 mL konzentriert, was einen Aktivitäts- und Proteinverlust zur Folge hatte. Die Probe enthielt noch 12.500 U ODH. Bei einem Proteingehalt von 29,9 mg errechnete sich eine spezifische Aktivität von 418 U mg⁻¹. Die weitere Reinigung erfolgte durch Gelfiltration, wozu eine mit Sephadex G-100 gefüllte Säule mit einem Volumen von 530 mL verwendet wurde. Abbildung 7 zeigt das Elutionsprofil dieses chromatographischen Laufs. Nach ca. 120 mL eluierte Protein von der Säule, das allerdings keine ODH-Aktivität aufwies; nach 180 mL begann die ODH von der Säule zu eluieren. Die Aktivität in den folgenden Fraktionen nahm bis auf 420 U mL⁻¹ bei einem Elutionsvolumen von 220 mL zu, um anschließend wieder abzufallen. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, fällt der Aktivitätspeak mit dem bei 280 nm aufgezeichneten Proteinpeak zusammen. Die fünf Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt und durch Druckfiltration auf 2,5 mL eingengt.

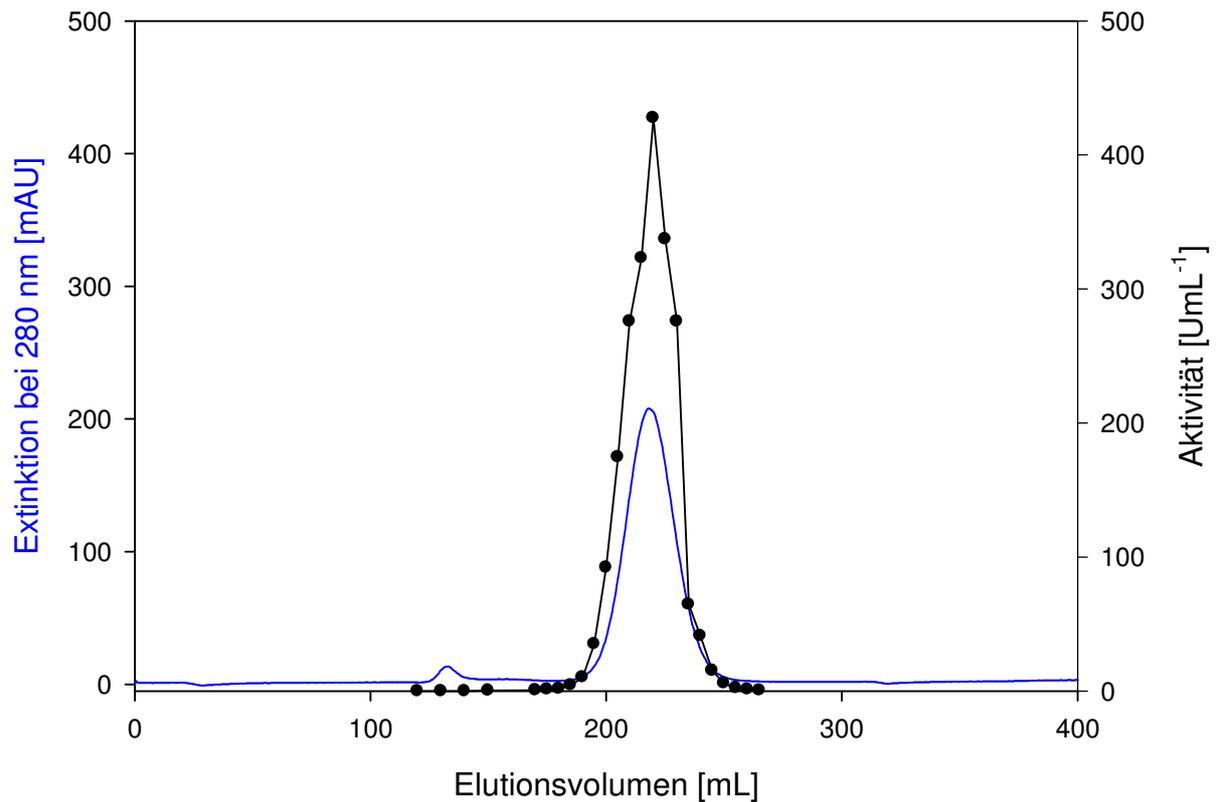


Abb. 7 Elutionsprofil einer Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-100. Dargestellt sind Extinktion bei 280 nm und die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen. Die Trennung der ODH erfolgte mit einem 50 mmol L^{-1} Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 2 mmol L^{-1} EDTA, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin. Es wurden 5 mL Fraktionen gesammelt. Es wurden 4 mL ODH-Suspension nach Ni-NTA mit 12.500 U Aktivität und einem Proteingehalt von 29,9 mg auf die Säule aufgetragen.

Das Endprodukt enthielt 8.303 U ODH, was 44 % der Ausgangsaktivität entsprach. Der Proteingehalt betrug 17,9 mg und war somit auf 6 % des Ausgangsgehaltes gesunken. Die spezifische Aktivität im Endprodukt betrug 464 U mg^{-1} . Bezogen auf den Anfangswert betrug der Reinigungsfaktor 7,4.

Tab. 5 Reinigungsprotokoll einer ODH-5His-Reinigung aus einer 1L-Kultur. Verlauf einer ODH-5His-Reinigung mit Metallchelataffinitätschromatographie und Gelfiltration aus einer 1L-Kultur des *E. coli*-Stammes ER2566.

	Volumen [mL]	Aktivität [U mL^{-1}]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mg mL^{-1}]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U mg^{-1}]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	32,5	585	19013	100	9,33	303,2	100	63	1
NiNTA	25	654	16350	86	1,58	39,5	13	414	6,6
NiNTA konzentriert	4	3125	12500	66	7,47	29,9	10	418	6,7
Gelfiltration mit Sephadex G-100	25	348	8700	46	0,73	18,3	6	477	7,6
konz. Endprodukt	2,5	3321	8303	44	7,15	17,9	6	464	7,4

Der Erfolg der Reinigung mit Ni-NTA und Gelfiltration wurde auf einem 12 % igen SDS-Polyacrylamid-Gel kontrolliert, das in Abbildung 8 gezeigt ist. In der Coomassie-Färbung ist in den Spuren, in denen die vereinigten Fraktionen der Ni-NTA-Chromatographie aufgetragen wurden (2C, 2S) eine Bande mit einem rf-Wert von 0,49 zu erkennen, die der zu erwartenden ODH-Bande zugeordnet werden konnte. Für diese Bande wurde ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa ermittelt. Weiterhin ist hier auch eine schwache Bande mit einem rf-Wert von 0,35 zu erkennen. Das Endprodukt war nach Auftrennung im Gel und Silberfärbung nur als eine Bande mit einem rf-Wert von 0,49 zu erkennen.

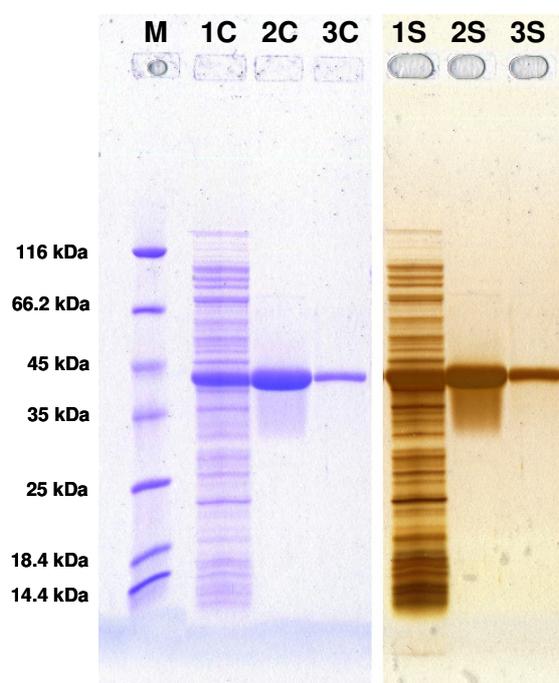


Abb. 8 SDS-Page zur Kontrolle des Reinigungserfolgs der ODH-Isolation mit Ni-NTA und Gelfiltration. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassie (C)- und Silberfärbung (S) sichtbar gemacht. (M) molekularer Größenmarker. (1) Rohextrakt (6 µg). (2) Ni-NTA konzentriert (7 µg). (3) Endprodukt nach Gelfiltration (4,5 µg).

3.4.2 Reinigung der ODH-5His aus *S. L-E. coli*

Zur Reinigung der für Kristallisationsversuche erforderlichen ODH-Mengen war es notwendig das Reinigungsprotokoll an größere Probenmengen anzupassen. Um eine höchstmögliche Reinheit zu erreichen, wurde der Rohextrakt zuerst einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und anschließend einer Metallchelataffinitätschromatographie unterzogen, wozu eine mit 45 mL Ni-NTA Superflow gefüllte Säule benutzt wurde. Abbildung 9 zeigt beispielhaft eine Reinigung, die mit dieser Säule durchgeführt wurde. Im Anschluss wurde weiterhin eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Tabelle 6 gibt einen Überblick über den Reinigungsverlauf.

Aus acht 1L-Kulturen wurden zusammen 48 g Bakterien gewonnen. Nach Aufschluss und Zentrifugation befanden sich 88.218 Units ODH im Überstand. Der Proteingehalt betrug

1.369 mg. Das Bakterien-Pellet wurde erneut in Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Es befanden sich nach erneuter Zentrifugation 89.668 U ODH und 809 mg Protein im Überstand. Der vereinigte Rohextrakt enthielt 184.106 U ODH und 2.000 mg Protein. Die spezifische Aktivität betrug 92 U mg^{-1} . Es wurden 3.836 Units ODH pro Gramm Bakterien gewonnen. Der Extrakt wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen und die resultierende Proteinsuspension anschließend gegen Lysepuffer dialysiert. Bei diesem Schritt verringerte sich die ODH-Aktivität um 16 % auf 154.035 U. Der Proteingehalt wurde um 53 % auf 941 mg reduziert. Die spezifische Aktivität betrug somit 164 U mg^{-1} . Auf die mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule wurden 45 mL ODH-Suspension aufgetragen.

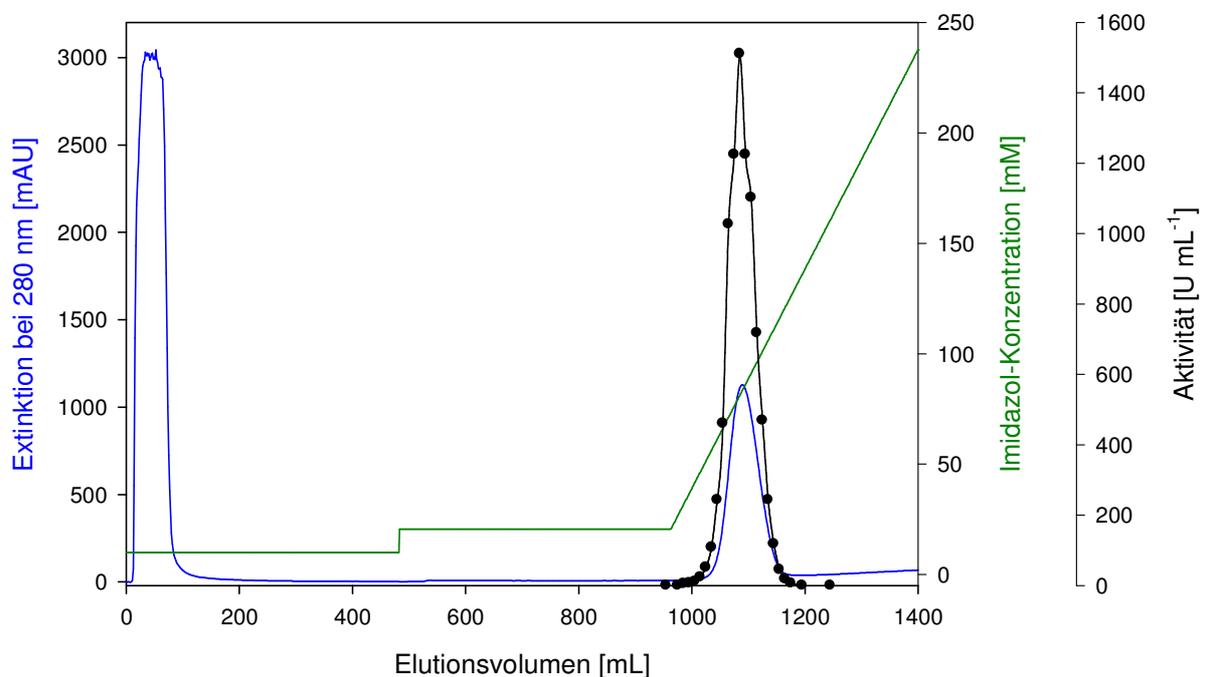


Abb. 9 Elutionsprofil einer Metallchelataffinitätschromatographie mit Ni-NTA. Dargestellt sind Extinktion bei 280 nm, der Verlauf des Imidazol-Gradienten und die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen. Auf die Säule wurden 45 mL Probe mit einer ODH-Aktivität von 154.035 U und einem Proteingehalt von 851 mg aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 500 mL Lysepuffer gespült. In den nächsten 500 mL der Elution wurde die Imidazol-Konzentration im Eluenten auf 20 mmol L^{-1} erhöht. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen Imidazol-Gradienten ($20\text{-}250 \text{ mmol L}^{-1}$) mit einer Länge von 500 mL. Es wurden 10 mL Fraktionen gesammelt.

Nach 500 mL wurde die Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer auf 20 mmol L^{-1} erhöht. Nach weiteren 500 mL wurde die Elution der ODH während eines linearen Imidazol-Gradienten ($20\text{-}250 \text{ mmol L}^{-1}$, Länge 500 mL) bei einer Imidazol-Konzentration von ca. 40 mmol L^{-1} erreicht. Die ODH-Aktivität stieg hier innerhalb von acht Fraktionen bis auf 1.500 U mL^{-1} an und sank danach wieder ab. Die sieben Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt und enthielten ODH mit einer Aktivität von 90.300 U bei einem Proteinge-

halt von 208 mg. Verglichen mit dem Rohextrakt war die Aktivität um 51 % und der Proteingehalt um 90 % reduziert. Die spezifische Aktivität betrug 434 U mg^{-1} . Nach Druckfiltration mit einer Amiconzelle wurden 6 mL ODH-Suspension erhalten, die durch Gelfiltration weiter gereinigt wurden.

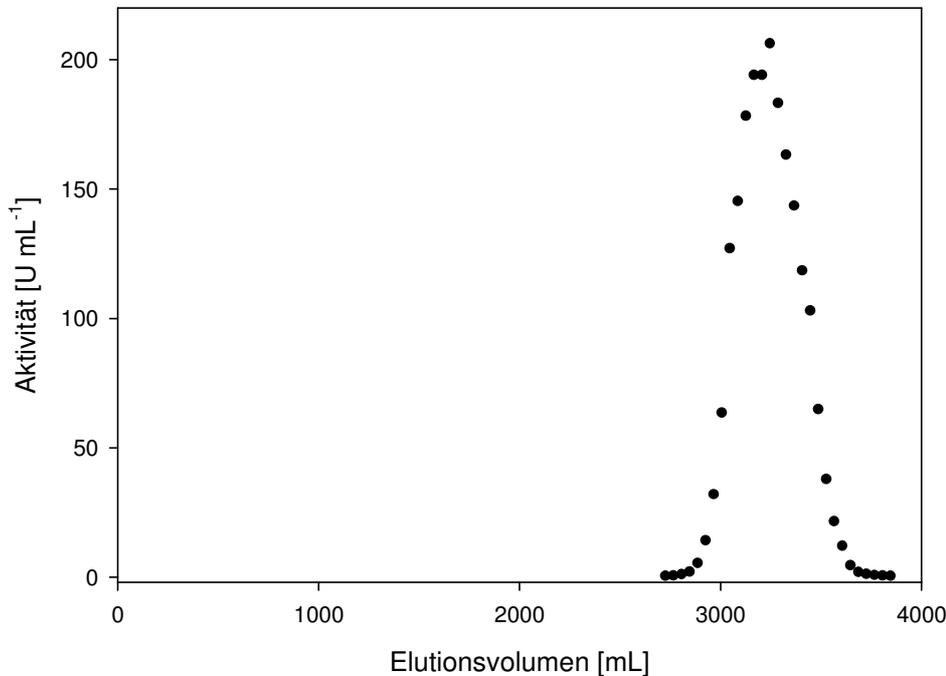


Abb. 10 Elutionsprofil einer Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-100. Die Trennung der ODH-5His erfolgte mit einem 50 mmol L^{-1} Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5 mit 2 mmol L^{-1} EDTA, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin. Es wurden 20 mL Fraktionen gesammelt. Dargestellt ist die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen. Aufgetragen wurden 6 mL ODH-Suspension nach Ni-NTA mit 65.718 U Aktivität und einem Proteingehalt von 178 mg.

Die verwendete Säule war mit 6.000 mL Sephadex G-100 gefüllt. Abbildung 10 zeigt das Elutionsprofil dieses chromatographischen Laufs. Es wurden 65.718 U ODH auf die Säule aufgetragen. Der Proteingehalt betrug 178 mg. Nach 2.700 mL begann die ODH, von der Säule zu eluieren. Die ODH-Aktivität nahm von Fraktion zu Fraktion zu und erreichte nach 3.250 mL mit 205 U mL^{-1} ein Maximum. In den folgenden Fraktionen fiel die Aktivität wieder ab. Nach der Gelfiltration wurden die 26 Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt. Sie enthielten 69.680 U ODH. Bei einem Proteingehalt von 177 mg errechnete sich eine spezifische Aktivität von 394 U mg^{-1} . Die Suspension wurde anschließend durch Druckfiltration auf 8,9 mL konzentriert. Im Endprodukt waren 65.718 U ODH und 130 mg Protein enthalten. Verglichen mit dem Rohextrakt entsprach dies 36 % der Ausgangsaktivität und 6 % des anfänglichen Proteingehalts. Die spezifische Aktivität im Endprodukt betrug 506 U mg^{-1} . Bezogen auf den Ausgangswert betrug der Reinigungsfaktor 5,5.

Tab. 6 Reinigungsprotokoll einer ODH-5His-Reinigung aus dem *E. coli*-Stamm ER2566. Verlauf einer ODH-5His-Reinigung mit Ammoniumsulfatfällung, Metallchelataffinitätschromatographie und Gelfiltration.

	Volumen [mL]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt I	117	754	88218		11,7	1369		64	
Rohextrakt II	29	3092	89668		27,9	809		111	
Rohextrakt vereinigt	146	1261	184106	100	13,7	2000	100	92	1
Ammoniumsulfat I	177	816	144595	79	4,8	851	43	170	1,8
Ammoniumsulfat II dialysiert und zentrifugiert	45	3423	154035	84	20,9	941	47	164	1,8
Ni-NTA	70	1290	90300	49	3,0	208	10	434	4,7
NiNTA konzentriert	6	10953	65718	36	29,6	178	9	370	4,0
Gelfiltration mit Sephadex G-100	520	134,0	69680	38	0,34	177	9	394	4,3
konz. Endprodukt	8,9	7384	65718	36	14,6	130	6	506	5,5

Der Erfolg der Reinigung mit Ammoniumsulfatfällung, Ni-NTA und Gelfiltration wurde auf einem 12 % igen SDS-Polyacrylamid-Gel kontrolliert (Abb. 11). In der Coomassie-Färbung ist in der Spur, in welcher der Rohextrakt aufgetragen wurde, eine stark ausgeprägte Bande bei ca. 43 kDa zu erkennen, die der zu erwartenden ODH-Bande entspricht. In der Spur, in der die vereinigten Fraktionen nach Ni-NTA-Chromatographie aufgetragen wurden (2C) ist eine starke Bande mit einem rf-Wert von 0,5 zu erkennen. Weiterhin sind weitere Banden mit rf-Werten von 0,38, 0,64 und 0,68 zu erkennen.

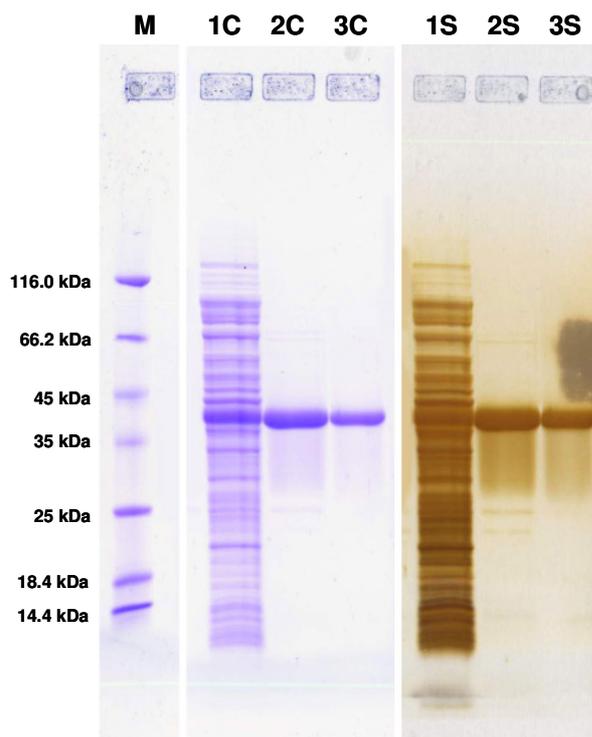


Abb. 11 SDS-Page zur Kontrolle des Reinigungserfolgs der ODH-Isolation mit Ni-NTA und Gelfiltration. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassie (C)- und Silberfärbung (S) sichtbar gemacht. (M) molekularer Größenmarker. (1) Rohextrakt (6,8 µg). (2) Ni-NTA konzentriert (7,5 µg). (3) Endprodukt nach Gelfiltration (6,8 µg).

Nach Silberfärbung des Gels tauchen keine zusätzlichen Protein-Banden auf (2S). Das Endprodukt ließ nach Auftrennung im Gel sowohl nach Coomassie- (3C), als auch nach Silberfärbung nur eine Bande (rf-Wert 0,5) erkennen.

3.4.3 ODH-LE6His

Um die Ausbeuten an rekombinanter ODH möglicherweise noch weiter zu erhöhen, wurde das ODH-Gen in einen anderen Expressions-Vektor kloniert. Es wurde der Vektor pET-24d(+) (Novagen) ausgewählt. Die ODH wurde als Fusionsprotein mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag exprimiert. Zusätzlich wurden die Aminosäuren Leucin und Glutamat vor dem Histidin-Tag eingefügt (ODH-LE6His). Abbildung 12 zeigt eine SDS-PAGE und einen Western-Blot, die zur Expressionsanalyse erstellt wurden. Neben ODH-LE6His wurden ODH-5His und *Loligo*-ODH-5His für die Expressionsanalyse verwendet. Das Gen für die ODH aus *Loligo vulgaris* wurde in den Vektor pTYBI inseriert. Das heterologe Protein war C-terminal mit einem Histidin-Tag fusioniert. Die jeweiligen Expressionskonstrukte wurden in den *E. coli*-Stamm ER2566 transformiert. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte unter identischen Bedingungen und wie unter 2.6.2 beschrieben. Es wurden jeweils 1L-Kulturen für die Expressionsanalyse verwendet.

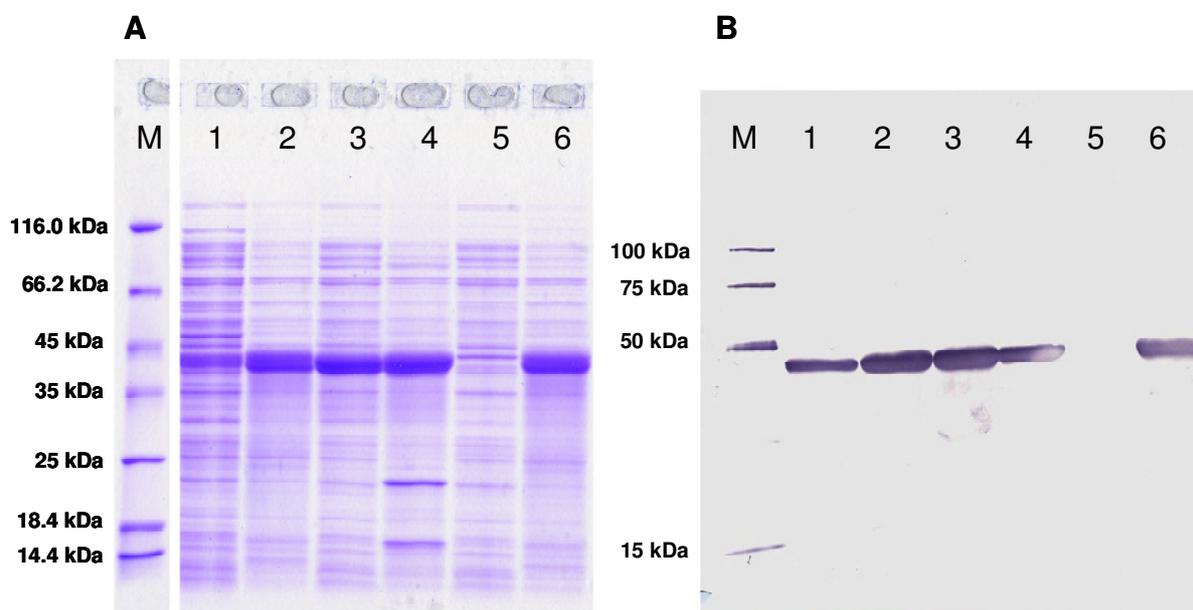


Abb. 12 A SDS-Page zur Kontrolle der ODH-Expression. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Es wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen (M) molekularer Größenmarker. (1) Rohextrakt ODH-LE6His. (2) unlösliche Fraktion ODH-LE6His. (3) Rohextrakt ODH-5His. (4) unlösliche Fraktion ODH-5His. (5) Rohextrakt *Loligo*-ODH-5His. (6) unlösliche Fraktion *Loligo*-ODH-5His.

B Western-Blot Analyse mit Immunodetektion des Histidin-Tag. Es wurden jeweils 10 µg aufgetragen (M) molekularer Größenmarker. (1) Rohextrakt ODH-LE6His. (2) unlösliche Fraktion ODH-LE6His. (3) Rohextrakt ODH-5His. (4) unlösliche Fraktion ODH-5His. (5) Rohextrakt *Loligo*-ODH-5His. (6) unlösliche Fraktion *Loligo*-ODH-5His.

Zusätzlich zur löslichen Fraktion wurde das Bakterienpellet nach der Zentrifugation in Lysepuffer mit 8 mol L^{-1} Harnstoff resuspendiert, um mögliche Inclusion-Bodies zu solubilisieren. Es wurden jeweils $10 \text{ }\mu\text{g}$ Protein aus der löslichen und der unlöslichen Fraktion der verschiedenen Extrakte auf einem SDS-Gel analysiert.

In der Spur A3 wurde Rohextrakt von ODH-5His aufgetragen. Hier zeigt sich eine ausgeprägte Bande mit einem rf-Wert von 0,5, deren Größe der erwarteten ODH-Bande entspricht. Die Western-Blotanalyse mit einem gegen den Histidin-Tag gerichteten Antikörper bestätigte diese Vermutung (B3). Auch in der Spur, in der die unlösliche Fraktion von ODH-5His aufgetrennt wurde (4A, 4B), ist sowohl in der Coomassie-Färbung als auch im Western-Blot eine Bande mit einem rf-Wert von 0,5 zu erkennen. In Spur 2 wurde die unlösliche Fraktion der ODH-LE6His aufgetrennt. Bei dieser Probe ist auch in der Coomassie-Färbung eine stark ausgeprägte Bande zu erkennen, die durch den Western-Blot als ODH-Bande identifiziert werden konnte. Spur 1 (Rohextrakt von ODH-LE6His) zeigt im Vergleich zu den vorher genannten Proben keine ausgeprägte Bande unterhalb von 45 kDa . Die Western-Blotanalyse zeigte jedoch, dass ODH exprimiert worden war. In den Spuren 5 und 6 wurden der Rohextrakt von *Loligo*-ODH-5His bzw. die zugehörige unlösliche Fraktion aufgetragen. Im Rohextrakt (A5) war keine ODH-Expression erkennbar, was durch den Western-Blot bestätigt werden konnte (B5). Lediglich in der unlöslichen Fraktion konnte exprimierte *Loligo*-ODH nachgewiesen werden (A6 und B6).

3.4.3.1 Reinigung der ODH-LE6His

Aus acht 1L-Kulturen wurden zusammen 46 g Bakterien gewonnen. Der Verlauf der Reinigung ist in Tabelle 7 protokolliert. Nach Aufschluss und Zentrifugation befanden sich 55.320 Units ODH im Überstand. Der Proteingehalt betrug 1.365 mg . Das Bakterien-Pellet wurde erneut in Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Nach erneuter Zentrifugation befanden sich 39.767 U ODH und 759 mg Protein im Überstand. Der vereinigte Rohextrakt enthielt 98.720 U ODH und 2.036 mg Protein . Die spezifische Aktivität betrug 48 U mg^{-1} . Pro Gramm Bakterien konnten 2.146 Units ODH gewonnen werden. Der Rohextrakt wurde zuerst einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen und die resultierende Proteinsuspension anschließend gegen Lysepuffer dialysiert. Durch diesen Schritt verringerte sich die ODH-Aktivität auf 154.035 U (86%). Der Proteingehalt sank auf 408 mg (20%). Die errechnete spezifische Aktivität betrug 209 U mg^{-1} .

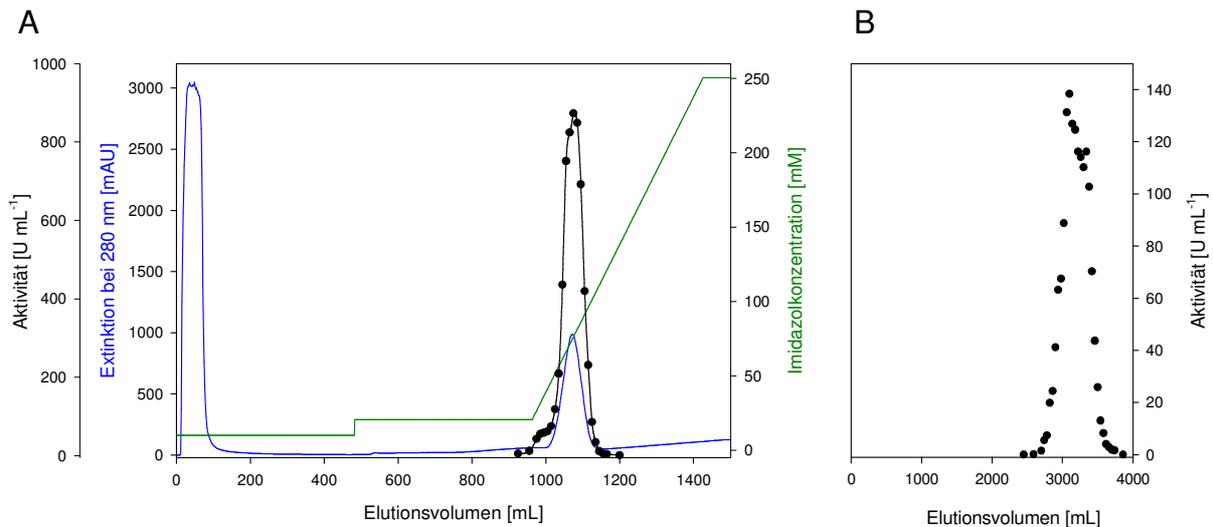


Abb. 13 A Chromatogramm einer Metallchelataffinitätschromatographie mit Ni-NTA. Dargestellt sind die kontinuierlich aufgezeichnete Extinktion bei 280 nm, der Verlauf des Imidazol-Gradienten und die ODH-Aktivität in ausgewählten Fraktionen. Auf die Säule wurden 40 mL Probe mit einer ODH-Aktivität von 85.360 U und einem Proteingehalt von 408 mg aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 500 mL Lysepuffer gespült. In den nächsten 500 mL der Elution wurde die Imidazol-Konzentration im Eluenten auf 20 mmol L⁻¹ erhöht. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen Imidazol-Gradienten (20-250 mmol L⁻¹) mit einer Länge von 500 mL. Es wurden 10 mL Fraktionen gesammelt.

B Elutionsprofil einer Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-100. Die Trennung der ODH-LE6His erfolgte mit einem 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5, 2 mmol L⁻¹ EDTA, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin. Es wurden 20 mL Fraktionen gesammelt. Dargestellt ist die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen. Aufgetragen wurden 5,7 mL ODH-Suspension nach Ni-NTA mit 47.116 U Aktivität. Der Proteingehalt betrug 110 mg.

Auf die mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule wurden 40 mL ODH-Suspension aufgetragen. Abbildung 13A zeigt das Elutionsprofil dieses chromatographischen Laufs. Nach 500 mL wurde die Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer auf 20 mmol L⁻¹ erhöht. Nach weiteren 500 mL eluierte die ODH während eines linearen Imidazol-Gradienten (20-250 mmol L⁻¹, Länge 500 mL) bei einer Imidazol-Konzentration von ca. 40 mmol L⁻¹ von der Säule. Die ODH-Aktivität stieg hier innerhalb von acht Fraktionen bis auf 900 U mL⁻¹ an und sank danach wieder ab. Vereinigt wurden die sechs Fraktionen mit der höchsten Aktivität. Sie enthielten ODH mit einer Aktivität von 49.920 U. Bei einem Proteingehalt von 128 mg betrug die spezifische Aktivität 389 U mg⁻¹. Verglichen mit dem Rohextrakt war die Aktivität um 49 % und der Proteingehalt um 94 % reduziert. Nach Druckfiltration mit einer Amiconzelle wurden 5,7 mL ODH-Suspension erhalten, die durch Gelfiltration mit Sephadex G-100 weiter gereinigt wurden. Abbildung 13B zeigt das Elutionsprofil dieses chromatographischen Laufs. Es wurden 47.116 U ODH auf die Säule aufgetragen. Der Proteingehalt betrug 110 mg. Nach 2.600 mL begann die ODH von der Säule zu eluieren. Die ODH-Aktivität nahm von Fraktion zu Fraktion zu und erreichte nach 3.120 mL mit 138 U mL⁻¹ ein Maximum. In den folgenden Fraktionen fiel die Aktivität wieder ab. Nach der Gelfiltration wurden die 24 Fraktionen mit

der höchsten Aktivität vereinigt und durch Druckfiltration eingengt. Im Endprodukt waren schließlich 33.350 U ODH und 59 mg Protein enthalten.

Tab. 7 Reinigungsprotokoll einer ODH-LE6His-Reinigung aus dem *E. coli*-Stamm ER2566. Verlauf einer ODH-LE6His-Reinigung mit Ammoniumsulfatfällung, Metallchelataffinitätschromatographie und Gelfiltration.

	Volumen [mL]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt I	100,4	551	55320		13,6	1365		41	
Rohextrakt II	23	1729	39767		33	759		52	
Rohextrakt vereinigt	123,4	800	98720	100	16,5	2036	100	48	1
Ammoniumsulfat I	144	674	97056	98	4,6	657	32	148	3,0
Ammoniumsulfat II	36	2514	90504	92	12,1	436	21	208	4,3
dialysiert	40	2134	85360	86	10,2	408	20	209	1,4
Ni-NTA	60	832	49920	51	2,1	128	6	389	8,0
NiNTA konzentriert	5,7	8266	47116	48	19,3	110	5	428	8,8
Gelfiltration mit Sephadex G-100	480	74,8	35904	36	0,15	72	4	499	10,3
konz. Endprodukt	10	3335	33350	34	5,9	59	3	565	11,7

Verglichen mit dem Rohextrakt entsprach dies 34 % der Ausgangsaktivität und 3 % des anfänglichen Proteingehalts. Die spezifische Aktivität im Endprodukt betrug 565 U mg⁻¹. Bezogen auf den Ausgangswert betrug der Reinigungsfaktor 11,7.

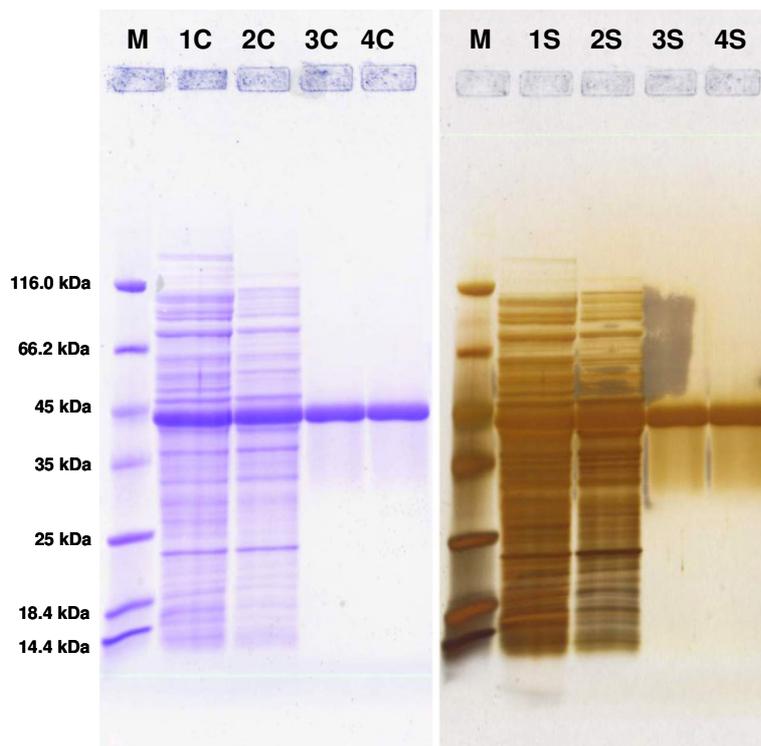


Abb. 14 SDS-Page zur Kontrolle des Reinigungserfolgs der ODH-Isolation mit Ni-NTA und Gelfiltration. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassie (C)- und Silberfärbung (S) sichtbar gemacht. (M) molekularer Größenmarker. (1) Rohextrakt (8,3 µg). (2) Ammoniumsulfatfällung II dialysiert (7,1 µg). (3) Ni-NTA (7,6 µg). (4) Endprodukt (7,4 µg).

Die Kontrolle der Reinheit erfolgte mit einem SDS-Gel, das in Abbildung 14 gezeigt ist. Die ODH nach Ni-NTA zeigte im Gel nach Anfärben mit Coomassie (3C) nur eine starke Bande mit einem rf-Wert von 0,5, die im erwarteten Größenbereich lag. Auch durch Silberfärbung waren hier keine weiteren Proteinbanden detektierbar. Das ODH-Endprodukt ließ nach SDS-PAGE sowohl in der Coomassie- als auch in der Silberfärbung nur eine Bande erkennen, deren rf-Wert ebenfalls 0,5 betrug.

3.4.4 Reinigung der ODH ohne Histidin-Tag (ODH-CtermPst)

Damit auch Kristallisationsversuche mit rekombinanter ODH durchgeführt werden können, deren C-Terminus unverlängert ist, wurde das ODH-Gen in den Vektor pTYBI (NEB) kloniert und ohne His-Tag im *E. coli*-Stamm ER2566 exprimiert. Um eine höchstmögliche Reinheit zu erreichen, wurde der Rohextrakt zuerst einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Da die ODH-CtermPst keinen Histidin-Tag besitzt, war es erforderlich, das Reinigungsprotokoll abzuändern.

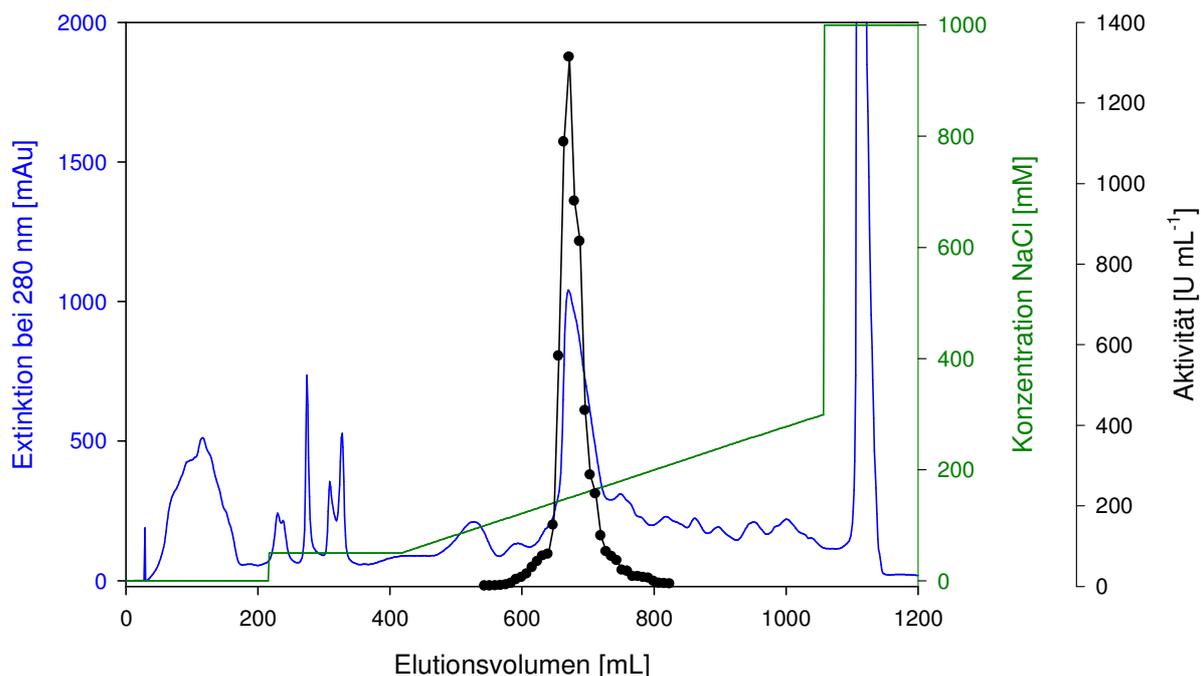


Abb. 15 Chromatogramm einer Anionenaustauschchromatographie über Fractogel-DEAE. Dargestellt sind die kontinuierlich aufgezeichnete Extinktion bei 280 nm, der Verlauf des NaCl-Gradienten und die ODH-Aktivität in ausgewählten Fraktionen. Auf die Säule wurden 58 mL Probe mit einer ODH-Aktivität von 50.170 U und einem Proteingehalt von 498,8 mg aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 160 mL 25 mmol L⁻¹ TRA pH 7,5, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT gespült. In den nächsten 200 mL der Elution wurde die NaCl-Konzentration im Eluenten auf 50 mmol L⁻¹ erhöht. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten (50-300 mmol L⁻¹) mit einer Länge von 640 mL (8 CV). Es wurden 8 mL Fraktionen gesammelt.

Als erster chromatographischer Reinigungsschritt wurde nun eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt bei der eine mit 80 mL Fractogel[®]-EMD DEAE gefüllte Säule verwendet wurde. Abbildung 15 zeigt beispielhaft eine Reinigung, die mit dieser Säule durchgeführt wurde. Im Anschluss wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, wozu eine mit 6.000 mL Sephadex G-100 gefüllte Säule verwendet wurde. Abbildung 16 zeigt das Elutionsprofil eines Laufs. Den letzten Reinigungsschritt stellte eine Hydroxylapatitchromatographie mit Bio-Gel[®] HTP dar. Tabelle 8 gibt einen Überblick über den Reinigungsverlauf. Für die Reinigung der ODH-CtermPst wurden fünf 1L-Kulturen verwendet. Es wurden 30 g Bakterien nach Zentrifugation erhalten.

Tab. 8 Reinigungsprotokoll einer ODH-Reinigung aus dem *E. coli*-Stamm ER2566. Verlauf einer ODH-Reinigung mit Ammoniumsulfatfällung, Anionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und Hydroxylapatitchromatographie.

	Volumen [mL]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt I	124,3	218,3	27135		2,9	360,5		75	
Rohextrakt II	28	889	24892		13,7	383,6		65	
Rohextrakt vereinigt	152,3	373	56808	100	5	761,5	100	75	1
Ammoniumsulfat I	170	318	54060	95	4,1	697,0	92	78	1,0
Ammoniumsulfat II dialysiert und zentrifugiert	58	865	50170	88	8,6	498,8	66	101	1,3
Fractogel DEAE	56	776	43456	76	2,1	117,6	15	370	5,0
Fractogel DEAE konzentriert	8	5319	42552	75	13,3	106,4	14	400	5,4
Gelfiltration mit Sephadex G-100	540	62,3	33642	59	0,1	54,0	7	623	8,4
konzentriert	13,4	2100	28140	50	3,4	45,6	6	618	8,3
Hydroxylapatit I-IV vereinigt	85	215	18275	34	0,41	34,9	5	524	6,8
Endprodukt	10	1643	16430	33	2,9	29,0	6	567	5,6

Nach Aufschluss und Zentrifugation befanden sich 27.135 Units ODH im Überstand. Der Proteingehalt betrug 360 mg. Das Bakterien-Pellet wurde erneut in TRA-Puffer resuspendiert, mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Anschließend wurden die beiden Extrakte vereinigt. Der resultierende Rohextrakt enthielt 56.808 U ODH und 762 mg Protein. Die spezifische Aktivität betrug 75 U mg⁻¹. Es wurden somit 1.894 Units ODH pro Gramm Bakterien gewonnen. Der Rohextrakt wurde zuerst einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen und die resultierende Proteinsuspension anschließend gegen 25 mmol L⁻¹ TRA pH 7,5, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT dialysiert. Es befanden sich schließlich 50.170 U ODH

im Dialysat. Bei einem Proteingehalt von 499 mg ergab sich eine spezifische Aktivität von 101 U mg^{-1} . Nach der Dialyse waren somit noch 88 % der anfänglichen Aktivität und 66 % der anfänglichen Proteinmenge vorhanden. Auf die mit 25 mmol L^{-1} TRA pH 7.5, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT äquilibrierte Fractogel-DEAE-Säule wurden 58 mL ODH-Suspension aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 160 mL Puffer gespült. Anschließend wurde die NaCl-Konzentration im Eluenten für die nächsten 200 mL auf 50 mmol L^{-1} erhöht. Die Elution der ODH erfolgte während eines linearen NaCl-Gradienten ($50\text{--}300 \text{ mmol L}^{-1}$, Länge 640 mL) ab ca. 100 mmol L^{-1} . Die ODH-Aktivität stieg hier von Fraktion zu Fraktion bis auf 1.300 U mL^{-1} an und sank danach wieder ab.

Vereinigt wurden die neun Fraktionen mit der höchsten Aktivität. Sie enthielten ODH mit einer Aktivität von 43.456 U und einem Proteingehalt von 118 mg. Verglichen mit dem Rohextrakt war die Aktivität um 24 % und der Proteingehalt um 85 % reduziert. Die spezifische Aktivität betrug 370 U mg^{-1} . Nach Druckfiltration mit einer Amiconzelle wurden 8 mL ODH-Suspension erhalten, die durch Gelfiltration weiter gereinigt wurden. Das Elutionsprofil dieses chromatographischen Laufs ist in Abbildung 16 gezeigt. Es wurden 42.552 U ODH auf die Säule aufgetragen. Der Proteingehalt betrug 106 mg.

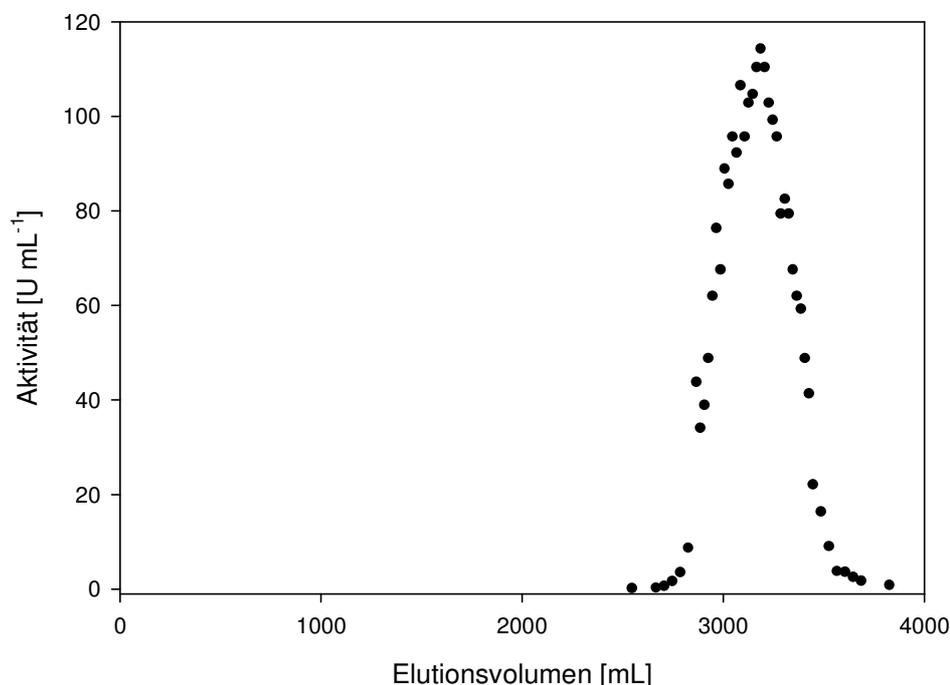


Abb. 16 Elutionsprofil einer Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-100. Die Trennung der ODH erfolgte mit einem 50 mmol L^{-1} Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5, 2 mmol L^{-1} EDTA, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin. Es wurden 20 mL Fraktionen gesammelt. Dargestellt ist die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen. Aufgetragen wurden 8 mL ODH-Suspension nach Fractogel-DEAE mit 42.552 U Aktivität und einem Proteingehalt von 106,4 mg.

Nach 2.550 mL begann die ODH von der Säule zu eluieren. Die ODH-Aktivität nahm von Fraktion zu Fraktion zu, erreichte nach 3.190 mL mit 114 U mL^{-1} ein Maximum und nahm in den folgenden Fraktionen wieder ab. Es wurden die 27 Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt. Sie enthielten 33.642 U ODH und 54 mg Protein . Die spezifische Aktivität nach Gelfiltration betrug 623 U mg^{-1} . Die Suspension wurde anschließend durch Druckfiltration auf $13,4 \text{ mL}$ konzentriert. Dieser Schritt war mit einem Aktivitäts- und Proteinverlust verbunden. Es waren anschließend noch 28.140 U ODH vorhanden. Der Proteingehalt sank auf $45,6 \text{ mg}$. Verglichen mit dem Rohextrakt entsprach dies 50% der Ausgangsaktivität und 6% des anfänglichen Proteingehalts.

Die weitere Reinigung erfolgte durch Hydroxylapatit-Chromatographie. Abbildung 17 zeigt beispielhaft das Elutionsprofil eines Laufs. Es wurden 3 mL ODH (6.300 U) auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit $60 \text{ mL } 10 \text{ mmol L}^{-1}$ Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 gespült. Die Elution der ODH erfolgte während eines linearen Kaliumphosphat-Gradienten von 10 auf 130 mmol L^{-1} ab einer Kaliumphosphatkonzentration von ca. 50 mmol L^{-1} . Die ODH-Aktivität stieg hier bis auf 130 U mL^{-1} an, um anschließend wieder abzufallen.

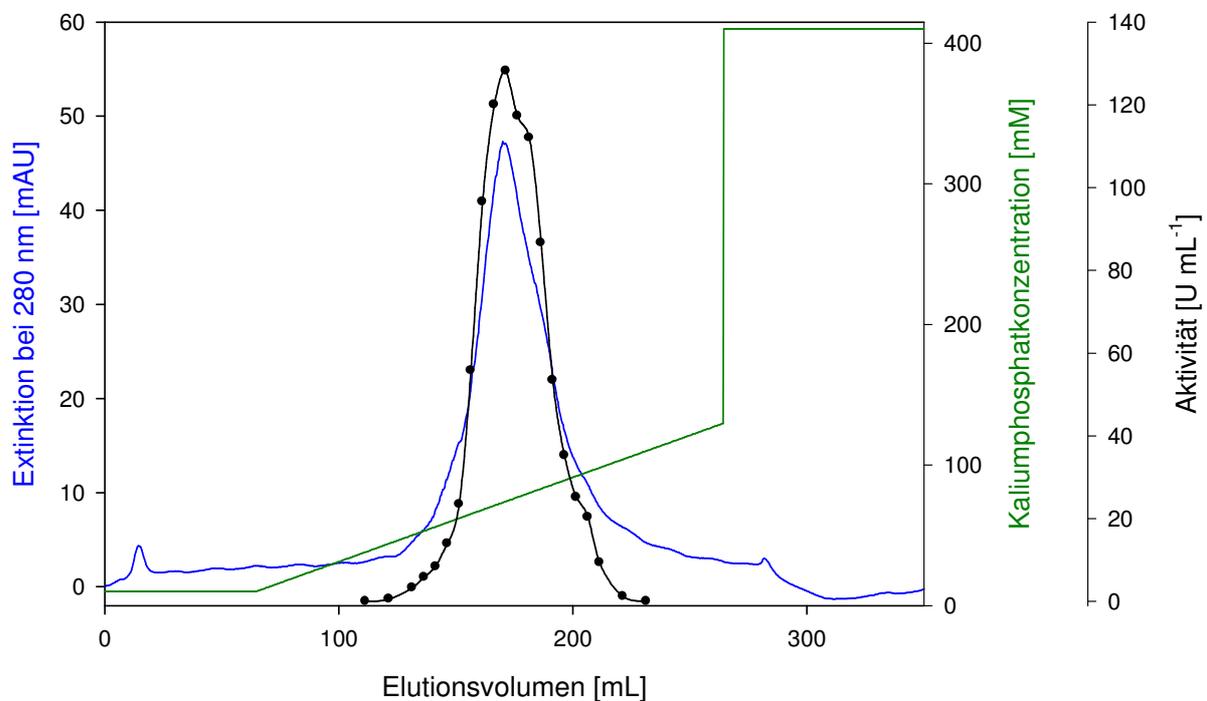


Abb. 17 Chromatogramm einer Hydroxylapatitchromatographie. Dargestellt sind die Extinktion bei 280 nm , der Verlauf des Kaliumphosphatgradienten und die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen. Auf die Säule wurden 3 mL ODH -Suspension mit einer Aktivität von 6.300 U und einem Proteingehalt von $10,2 \text{ mg}$ aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit $60 \text{ mL } 10 \text{ mmol L}^{-1}$ Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 gespült. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen Gradienten von 10 auf 130 mmol L^{-1} Kaliumphosphat mit einer Länge von 200 mL . Es wurden 5 mL Fraktionen gesammelt.

Es wurden vier hydroxylapatitchromatographische Läufe durchgeführt, die Fraktionen mit den höchsten ODH-Aktivitäten vereinigt und durch Druckfiltration konzentriert. Das Endprodukt enthielt 16.430 U ODH (33 % des Ausgangswertes). Der Proteingehalt war im Verlauf der Reinigung auf 6 % gesunken und betrug 29 mg. Die spezifische Aktivität im Endprodukt betrug 567 U mg^{-1} und war im Vergleich zur spezifischen Aktivität nach Gelfiltration (618 U mg^{-1}) leicht erniedrigt. Bezogen auf den Ausgangswert ergab sich ein Reinigungsfaktor von 5,6.

Abbildung 18 zeigt eine SDS-PAGE zur Kontrolle der Reinigung. Aufgetragen wurden der Rohextrakt (1), ODH-Suspension nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung (2), sowie ODH-Proben nach DEAE (3), nach Gelfiltration (4) und das konzentrierte Endprodukt (5). Die Proteine wurden im Gel sowohl durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue R350 (C), als auch durch Silberfärbung (S) nachgewiesen.

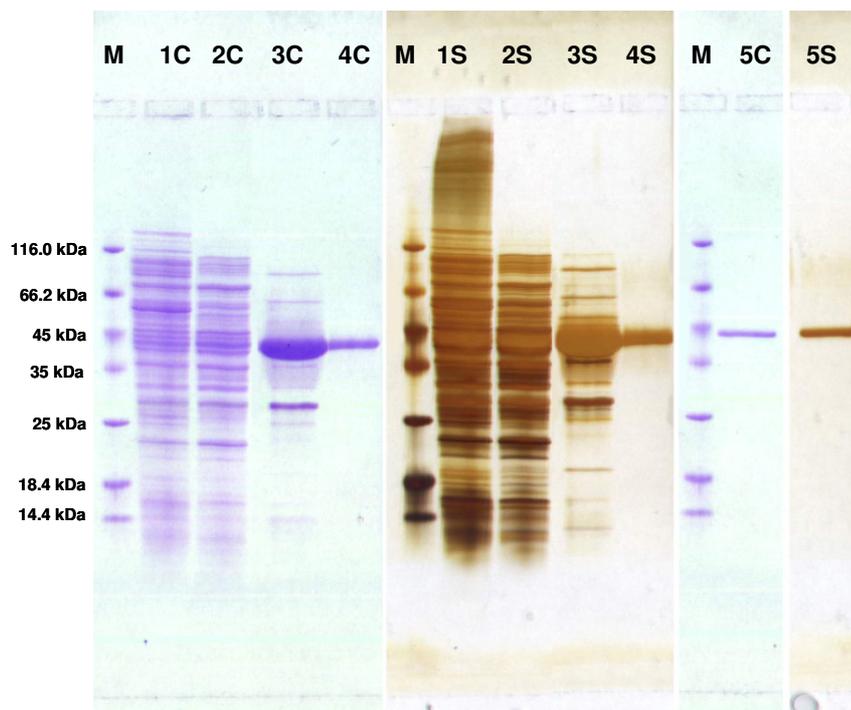


Abb. 18 SDS-PAGE zur Kontrolle des Reinigungserfolgs der ODH-Isolation mit Anionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und Hydroxylapatitchromatographie. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassie (C)- und Silberfärbung (S) sichtbar gemacht. (M) molekularer Größenmarker. (1) Rohextrakt (6,5 μg). (2) Ammoniumsulfatfällung II dialysiert (5,8 μg). (3) Fractogel-DEAE konzentriert (7,2 μg). (4) Gelfiltration (4,8 μg). (5) Endprodukt nach Hydroxylapatitchromatographie (3,5 μg).

Auf dem SDS-Gel ist in der Spur, in der ODH nach DEAE aufgetragen wurde (3) eine dominierende Bande mit einem rf-Wert von 0,38 zu erkennen, die größenmäßig im Bereich der erwarteten ODH-Bande lag. Zusätzlich sind in der Coomassie-Färbung oberhalb und un-

terhalb weitere Proteinbanden sichtbar. In der Spur, in der die Probe nach Gelfiltration aufgetragen wurde, lässt sich sowohl nach Anfärben mit Coomassie (4C) als auch nach Silberfärbung (4S) nur eine Bande erkennen (rf-Wert 0,38). Das ODH-Endprodukt (5) zeigt nach SDS-PAGE sowohl in der Coomassie- als auch in der Silberfärbung ebenfalls nur eine Bande mit einem rf-Wert von 0,38.

3.4.5 Reinigung der ODH ohne Histidin-Tag II

Zusätzlich zu der unter 3.3.4 beschriebenen Reinigungsmethode wurde eine Reinigung durchgeführt, bei der als dritter chromatographischer Schritt eine Affinitätschromatographie mit Arginin-Sepharose verwendet wurde. Der Reinigungsverlauf ist in Tabelle 9 dargestellt. Aus 5 L-Bakterienkultur konnten 89.210 U ODH gewonnen werden. Bei einem Bakteriengewicht von ca. 33 g entsprach das einer ODH-Ausbeute von 2.700 U pro Gramm Frischgewicht. Der Proteingehalt im Rohextrakt betrug 2.162 mg. Für die spezifische ODH-Aktivität wurden 41 U mg^{-1} berechnet. Nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung reduzierte sich die ODH-Aktivität um 10 % auf 80.120 U, der Proteingehalt betrug 680 mg.

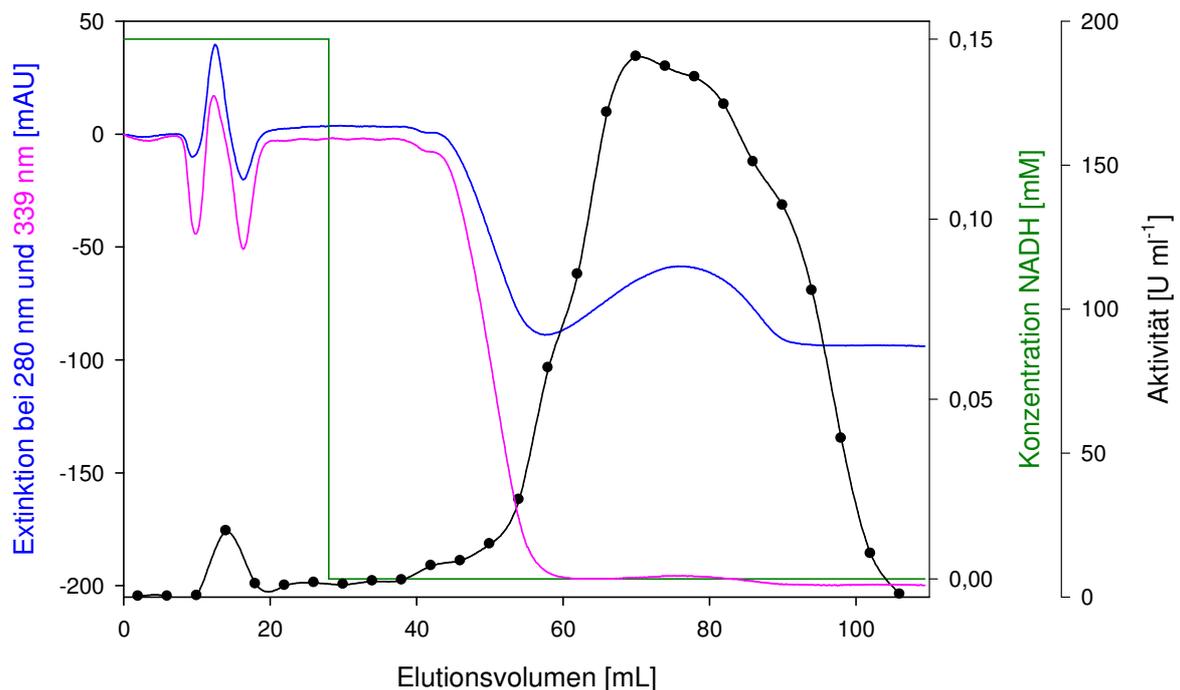


Abb. 19 Chromatogramm einer Affinitätschromatographie mit Arginin-Sepharose. Dargestellt sind die Extinktion bei 280 nm, der Verlauf des NADH-Gradienten und die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen. Auf die Säule wurden 3 mL ODH-Suspension mit einer Aktivität von 8.500 U und einem Proteingehalt von 21 mg aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit $25 \text{ mL } 25 \text{ mmol L}^{-1}$ Kaliumphosphatpuffer pH 6,2 mit $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ NADH gespült. Die Elution der ODH erfolgte durch Kaliumphosphatpuffer ohne NADH. Es wurden 4 mL Fraktionen gesammelt.

Anschließend wurde die ODH-Suspension durch Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration weiter gereinigt. Es wurden jeweils nur die Fraktionen der höchsten ODH-Aktivität vereinigt und konzentriert. Nach Gelfiltration waren noch 25.990 U ODH (29 % der Ausgangsaktivität) vorhanden. Bei einem Proteingehalt von 62 mg (3 % der anfänglichen Proteinmenge) ergab sich eine spezifische Aktivität von 423 U mg⁻¹.

An die Gelfiltration schloss sich nun eine Affinitätschromatographie mit Arginin-Sepharose an. Abbildung 19 zeigt beispielhaft das Chromatogramm eines Laufs. Aufgetragen wurden 3 mL ODH-Suspension mit 2.100 U und einem Proteingehalt von 21 mg. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 25 mL Puffer gespült. Die Elution der ODH erfolgte durch 25 mmol L⁻¹ Kaliumphosphatpuffer ohne NADH. Nach Entfernen des NADH aus dem Puffer stieg die ODH-Aktivität in den Fraktionen bis auf 180 U mL⁻¹ an. Es wurden insgesamt drei Läufe durchgeführt, die Fraktionen höchster Aktivität vereinigt und konzentriert. Das resultierende Endprodukt enthielt 22.104 U ODH und 57 mg Protein. Es war somit noch 25 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Der Proteingehalt wurde im Verlauf der Reinigung auf 3 % der Ausgangsmenge reduziert. Durch die Affinitätschromatographie konnte die spezifische Aktivität nicht weiter erhöht werden. Verglichen mit dem Wert nach der Gelfiltration sank die spezifische Aktivität im Endprodukt leicht auf 385 U mg⁻¹ ab. Es wurde ein Reinigungsfaktor von 9,4 erreicht.

Tab. 9 Protokoll einer ODH-Reinigung aus dem *E. coli*-Stamm ER2566. Verlauf einer ODH-Reinigung mit Ammoniumsulfatfällung, Anionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und Affinitätschromatographie.

	Volumen [mL]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt I	113,2	392	44374		10,8	1223		36	
Rohextrakt II	30	1348	40440		33,6	1008		40	
Rohextrakt vereinigt	143,2	623	89214	100	15,1	2162	100	41	1
Ammoniumsulfat I	179,8	491	88282	99	6,7	1205	56	73	1,8
Ammoniumsulfat II	40	2003	80120	90	17	680	31	118	2,9
dialysiert	45	2049	92205	103	14,7	662	31	139	1,9
Fractogel-DEAE	110	577	63470	71	3,8	418	19	152	3,7
konzentriert	6,8	8646	58793	66	26,4	180	8	328	7,9
Gelfiltration mit Sephadex G-100	440	64,0	28160	32	0,18	79	4	356	8,6
konzentriert	4,1	6339	25990	29	15	62	3	423	10,2
Arginin-Sepharose I-III vereinigt	130	162	21060	24	0,46	60	3	352	8,6
Endprodukt	5,8	3811	22104	25	9,89	57	3	385	9,4

Der Erfolg der Reinigung wurde mit einem SDS-Gel kontrolliert (Abb. 20). Aufgetragen wurden der Rohextrakt (1), ODH-Suspension nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Dialyse (2), sowie Proben nach Fractogel-DEAE (3), nach Gelfiltration (4) und das Endprodukt (5) nach der Arginin-Sepharose. Die Proteine wurden im Gel sowohl durch Anfärben mit Coomassie (C), als auch durch Silberfärbung (S) nachgewiesen. In allen Spuren ist eine deutliche Bande mit einem r_f -Wert von 0,39 zu erkennen, die größenmäßig der erwarteten ODH-Bande entspricht. In der Spur, in der ODH nach DEAE aufgetragen wurde (3), sind in der Coomassie-Färbung oberhalb der ODH-Bande weitere Proteinbanden sichtbar.

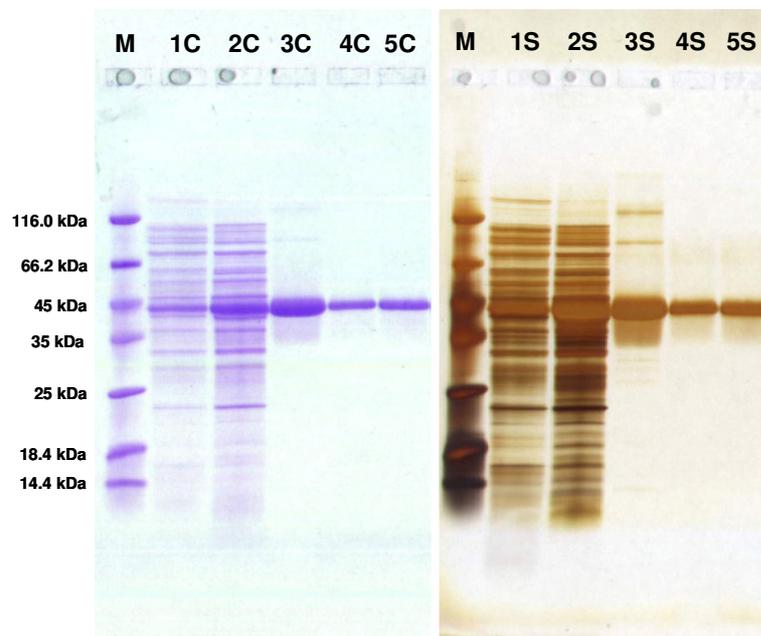


Abb. 20 SDS-Page zur Kontrolle des Reinigungserfolgs der ODH-Isolation mit Anionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und Affinitätschromatographie. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassie (C)- und Silberfärbung (S) sichtbar gemacht. (M) molekularer Größenmarker. (1) Rohextrakt (7,6 μg). (2) Ammoniumsulfatfällung II dialysiert (7,4 μg). (3) Fractogel-DEAE konzentriert (5,8 μg). (4) Gelfiltration (2,2 μg). (5) Endprodukt nach Affinitätschromatographie mit Arginin-Sepharose (2,5 μg).

Die Silberfärbung des Gels lässt in dieser Spur zusätzliche Proteinbanden unterhalb der ODH erkennen. In der Spur, in der die Probe nach Gelfiltration aufgetragen wurde, kann sowohl nach Anfärben mit Coomassie (4C) als auch durch Silberfärbung (4S) nur die ODH-Bande detektiert werden. Das ODH-Endprodukt (5) zeigt nach SDS-PAGE mit beiden Färbemethoden ebenfalls nur eine Bande.

3.5 Kristallisation der ODH

Bis heute existieren keine Kristallstrukturen für Opindehydrogenasen aus marinen Invertebraten. 1981 beschrieb Olomucki einen ersten Kristall, bei dem es aber mehr als fraglich ist, ob es sich um einen ODH-Kristall handelt. Leider folgten keine weiteren Veröffentlichungen und Strukturdaten.

3.5.1 Erste Kristallisationsversuche

Auf der Suche nach Kristallisationsbedingungen für die ODH wurde zuerst die von Olomucki (1981) veröffentlichte Kristallisationsbedingung getestet, bei der PEG-6000 und Ammoniumsulfat verwendet wurde. Weiterhin wurden Reihenversuche mit Ammoniumsulfat, Na-Malonat, NaCl, Methylpentandiol (MPD), PEG 3350 und PEG 6000 als Präzipitanten durchgeführt. Es wurden hierfür jeweils verschiedene Konzentrationen der Substanzen eingesetzt. Zusätzlich wurden vier verschiedene Puffer (0,1 mol L⁻¹ MES pH 6.0, 0,1 mol L⁻¹ Hepes pH 7.0, 0,1 mol L⁻¹ Tris pH 8.0, 0,1 mol L⁻¹ Bicine pH 9.0) getestet und die Proteinkonzentration (5, 10 und 20 mg mL⁻¹) variiert. Es wurde über Ni-NTA und Sephadex G-100 gereinigte ODH verwendet, die gegen 10 mmol L⁻¹ Hepes pH 7.0, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT dialysiert worden war. Die Versuche wurden mit der Sitting-Drop-Methode durchgeführt und erfolgten bei Raumtemperatur (20 °C). Die von Olomucki (1981) angegebene Bedingung führte zu keiner Kristallbildung, die ODH präzipitierte im Ansatz innerhalb von zwei Tagen. In den Ansätzen mit Ammoniumsulfat waren ab einer Konzentration von 2,0 mol L⁻¹ nach wenigen Stunden leichte Präzipitate zu erkennen. Mit steigender Ammoniumsulfat-Konzentration nahm die Stärke der Präzipitate zu. Außerdem änderte sich ihre Farbe von weiß nach dunkelbraun. Letzteres deutet vermutlich auf stark amorphe Präzipitate hin. Das Protein lag vollständig ausgefällt vor. Innerhalb einer Woche war die ODH in allen Ansätzen präzipitiert. Zusätzlich bildete sich bei Ammoniumsulfat-Konzentrationen über 2,0 mol L⁻¹ eine so genannte Haut (Skin) aus, die aus denaturiertem Protein bestand. In keinem Ansatz waren kristalline Strukturen sichtbar. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Na-Malonat erzielt. Auch in allen Ansätzen mit MPD konnte nach wenigen Stunden bei Konzentrationen über 15 % (v/v) die Präzipitation der ODH beobachtet werden. Nach zwei Tagen war das Enzym in allen Ansätzen ausgefallen. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Verwendung von NaCl und den Polyethylenglykolen PEG-3350 bzw. 6000. In allen vier verwendeten Puffern und bei allen Proteinkonzentrationen war spätestens innerhalb einer Woche

sämtliches Protein präzipitiert. In keinem Ansatz konnten kristalline Strukturen beobachtet werden.

3.5.2 Evaluierung geeigneter Kristallisationsbedingungen mittels „Sparse matrix screen“

Für weitere Kristallisationsexperimente wurde ein so genannter “Sparse matrix screen” mit den Puffer-Sets “Crystal Screen I” und “Crystal Screen II” (Hampton Research, USA) durchgeführt.

Tab. 10 Präzipitant-Puffer-Kombinationen der Crystal Screens I (A) und II (B), die nicht zum Ausfällen der ODH führten. Eine vollständige Liste aller verwendeter Puffer-Lösungen findet sich im Anhang.

A	Nr.	Präzipitant	Puffer	Additiv
	7	1,4 mol L ⁻¹ Na-Acetat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	-
	13	30 % PEG 400	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,2 mol L ⁻¹ Na-Citrat
	16	1,5 mol L ⁻¹ Li-Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	-
	29	0,8 mol L ⁻¹ K,Na-Tartrat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	-
	33	4 mol L ⁻¹ Na-Format	-	-
	36	8 % PEG 8000	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	-
	44	0,2 mol L ⁻¹ Mg-Format	-	-
B	Nr.	Präzipitant	Puffer	Additiv
	3	25 % Ethylen Glycol	-	-
	19	2,5 mol L ⁻¹ 1,6-Hexandiol	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	0,01 mol L ⁻¹ Mn-Chlorid
	20	1,6 mol L ⁻¹ Mg-Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	-
	30	10 % PEG 6000, 5 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	-
	42	12 % Glycerin	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	1,5 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat
	48	10 % PEG 20000	0,1 mol L ⁻¹ Bicine pH 9.0	2 % Dioxan

Es wurde über Ni-NTA und Sephadex G-100 gereinigte ODH verwendet, die gegen 10 mmol L⁻¹ Hepes pH 7.0, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT dialysiert worden war. Die Versuche wurden mit der Hanging-Drop-Methode durchgeführt. Die ersten Versuche erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur (20 °C). Einige Puffer-Präzipitant-Kombinationen ließen die ODH direkt nach Zugabe ausfallen. Auch in den meisten anderen Puffern des Screens präzipitierte die ODH innerhalb der folgenden Tage mehr oder weniger stark. Lediglich die in Tabelle 10 aufgelisteten Lösungen führten auch nach Wochen nicht zu einer Präzipitation der ODH, aber es wurden auch in keinem Ansatz kristalline Strukturen ausgebildet. Als nächster Schritt wurde die Inkubationstemperatur der Ansätze auf 12 °C erniedrigt. Auch hier präzipitierte die ODH unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration (5, 10 und 20 mg ml⁻¹) in den meisten Puffern innerhalb der ersten drei Tage mehr oder weniger stark.

3.5.2.1 ODH-5His kristallisiert in PEG-4000 und PEG-6000 bei 12 °C

Wurden die Kristallisationsansätze bei 12 °C inkubiert, so hatten sich nach drei Tagen in einem Ansatz Kristallnadeln (Abb. 21 A, B, C) gebildet. Der verwendete Puffer war 0,1 mol L⁻¹ Tris/HCl, pH 8.5 und enthielt 30 % PEG 4000 sowie 0,2 mol L⁻¹ Mg-Chlorid (Crystal Screen I, Lösung-Nr. 6). Wie in der Abbildung zu erkennen ist, war jedoch zusätzlich ein Großteil des Proteins im Ansatz präzipitiert.

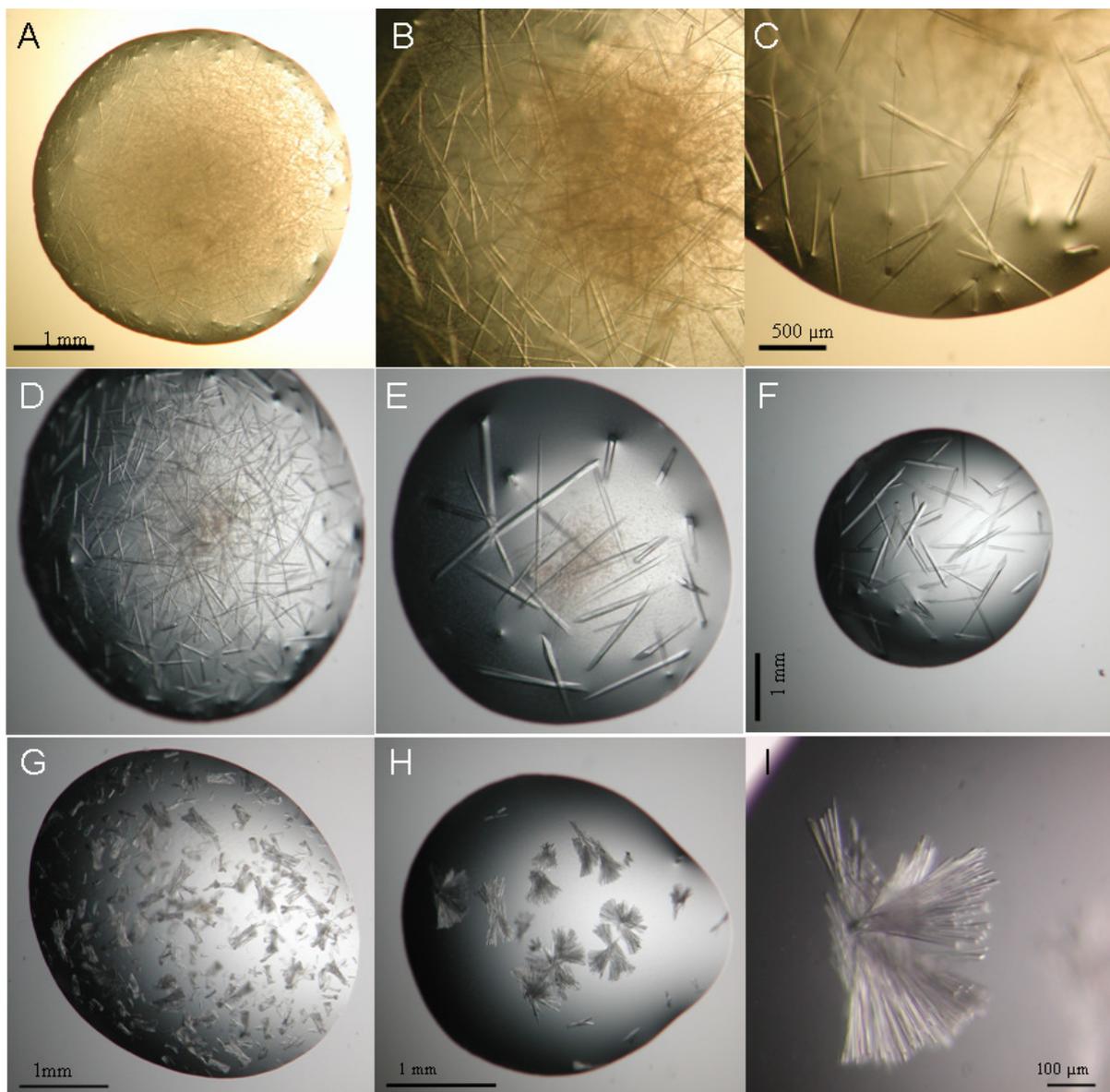


Abb. 21 Kristalline Proteinstrukturen der ODH. Jeder Kristallisationsversuch wurde mit 3 μ L Proteinlösung (20 mg mL⁻¹ in 10 mmol L⁻¹ Hepes pH 7.0, 1 mmol L⁻¹ DTT, 1 mmol L⁻¹ EDTA) und 3 μ L Reservoirlösung angesetzt. Verwendet wurden folgende Reservoirlösungen: (A) 0,1 mol L⁻¹ Tris/HCl pH 8.5, 30 % PEG 4000 und 0,2 mol L⁻¹ MgCl₂ (B) und (C) Detailaufnahmen von (A). (D) 0,1 M Hepes pH 7.5, 30 % PEG 4000, 0,2 mol L⁻¹ MgCl₂ (E) 0,1 mol L⁻¹ Hepes pH 7.5, 25 % PEG 4000, 0,2 mol L⁻¹ MgCl₂ (F) 0,1 mol L⁻¹ Hepes pH 7.0, 0,125 mol L⁻¹ MgCl₂ (G) 0,1 mol L⁻¹ MES pH 6.0, 25 % PEG 6000 (H) 0,1 mol L⁻¹ MES pH 6.0, 20 % PEG 6000 (I) 0,1 mol L⁻¹ MES pH 6.0, 17 % PEG 6000.

Crystal Screen I enthält weitere Lösungen, die PEG-4000 als Präzipitanten enthalten. In diesen Ansätzen jedoch präzipitierte die ODH innerhalb weniger Tage. Reihenversuche mit PEG-4000 und Magnesiumchlorid zeigten, dass zwischen 20 und 30% PEG-4000 und mindestens $0,125 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ im Ansatz enthalten sein muss, damit sich Nadeln ausbilden. Es wurde kein anderes Additiv (s. 2.9.3) gefunden, das zur Kristallbildung beitragen könnte. Als Puffer eignete sich $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Hepes, pH 7.5 am besten. Die Proteinkonzentration im Ansatz musste weiterhin mindestens 15 mg mL^{-1} betragen. In Abbildung 21 (D, E, F) ist zu erkennen, dass die Reduktion der PEG-4000 Konzentration und die Verwendung von Hepes pH 7.5 die Hintergrund-Präzipitation deutlich reduzierte. Zusätzlich nahm die Anzahl der gebildeten Nadeln ab, ihre Dimensionen nahmen allerdings zu.

In allen Ansätzen des Crystal Screen I, die PEG-8000 enthielten, war die ODH nach spätestens drei Tagen ausgefallen. Um den Einfluss verschiedener PEGs zu untersuchen wurden Reihenversuche mit PEG 6000 und PEG 3350 durchgeführt. Bei PEG-3350-Konzentrationen unter 15 % (w/v) fiel das Enzym in allen untersuchten Puffern auch nach Wochen nicht aus. Konzentrationen um 20 % (w/v) PEG-3350 führten zur Präzipitation der ODH. Lediglich in $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Bicine pH 9.0 fiel das Protein auch bei PEG-Konzentrationen über 40 % nicht aus. Allerdings konnten in keinem Ansatz kristalline Strukturen entdeckt werden.

Wurde PEG-6000 in Reihenversuchen bei $12 \text{ }^\circ\text{C}$ eingesetzt, so konnten in $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ MES pH 6.0 mit 25 % (w/v) PEG 6000 die in Abbildung 21G dargestellten Nadelbündel erzeugt werden. Verringerung der PEG 6000-Konzentration reduzierte lediglich die Anzahl der Kristallbündel (Abb. 21H und I). Die Kristalle wachsen sehr schnell (innerhalb von zwei bis drei Tagen), allerdings bevorzugt ebenfalls nur zweidimensional. Zugabe unterschiedlicher Ammoniumsulfatkonzentrationen führten immer zur Präzipitation der ODH. Die meisten getesteten Additive verhinderten die Kristallisation oder führten ebenfalls zu einer Präzipitation des Proteins. Das Coenzym NAD^+ reduzierte die Anzahl der gebildeten Kristalle und präzipitierte zusätzlich einen Großteil des Proteins. Variation des Konzentrations-Verhältnisses von NAD^+ und Enzym führten vornehmlich zur Präzipitation des Enzyms. Weiterhin wurde auch das Protein-zu-Präzipitant-Verhältnis variiert, jedoch ohne Verbesserung der Kristallbildung.

3.5.2.2 ODH-5His kristallisiert in Na-Citrat bei $12 \text{ }^\circ\text{C}$

Zusätzlich zu den Nadeln, die mit PEG-4000 und 6000 erhalten wurden, bildeten sich bei $12 \text{ }^\circ\text{C}$ innerhalb von drei Tagen Mikrokristalle in Crystal-Screen I, Lösung 38 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Hepes pH 7.5, $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ Na-Citrat) (Abb. 22 A und B). Aber zusätzlich war ein Großteil des Proteins im Ansatz präzipitiert. Reduktion der Citrat-Konzentration auf $1,3 \text{ mol L}^{-1}$ führte zur

Bildung der in Abbildung 22C dargestellten Kristallen. Aber auch unter diesen Bedingungen ist noch viel Protein-Präzipitat zu erkennen.

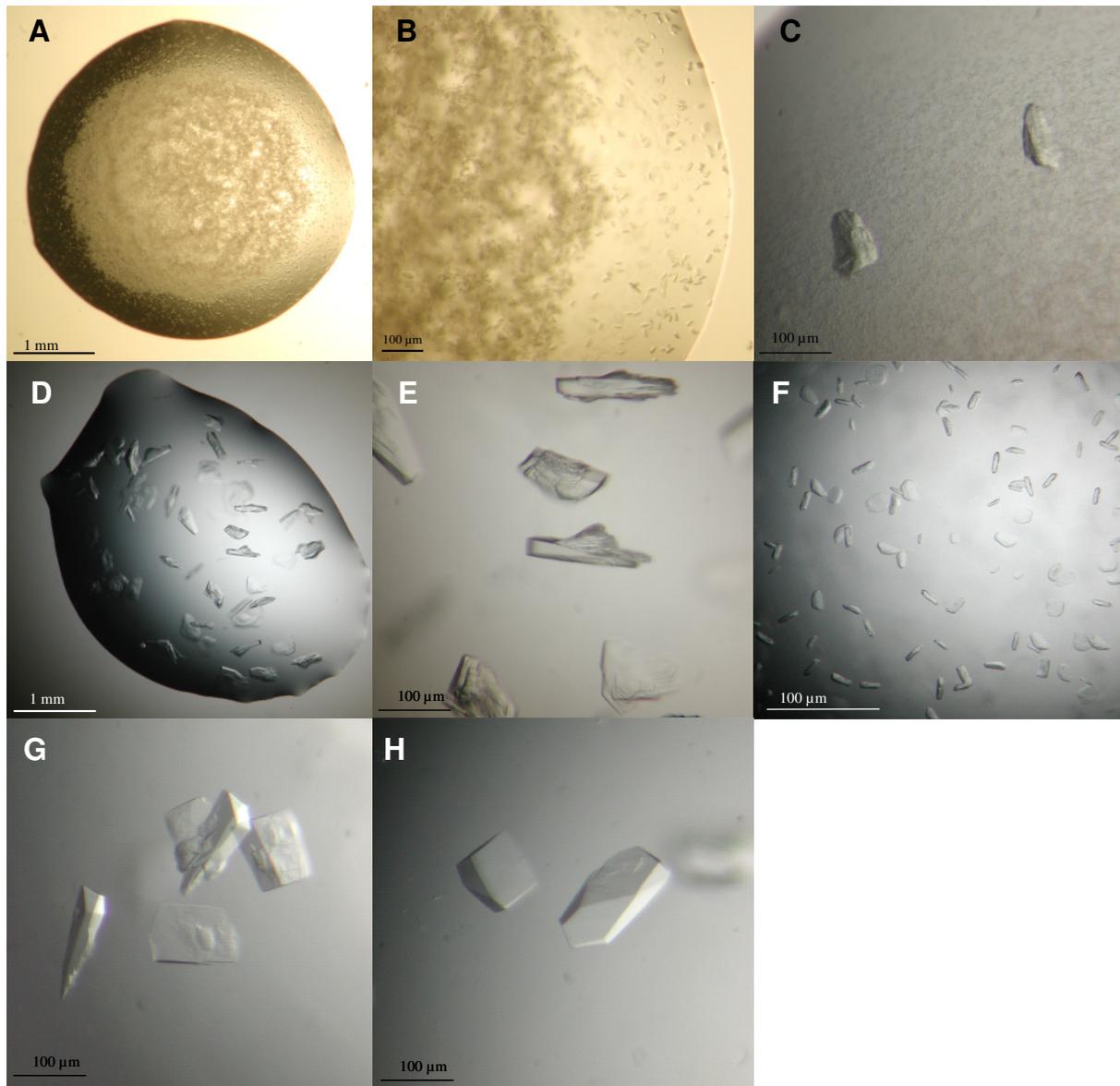


Abb. 22 Kristalline Proteinstrukturen der ODH II. Jeder Kristallisationsversuch wurde mit 3 µL Proteinlösung (20 mg mL^{-1} in 10 mmol L^{-1} HEPES pH 7.0, 1 mmol L^{-1} DTT, 1 mmol L^{-1} EDTA) und 3 µL Reservoirlösung angesetzt. Verwendet wurden folgende Reservoirlösungen: (A) und (B) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HEPES pH 7.5, $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ Na-Citrat (C) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HEPES pH 7.5, $1,3 \text{ mol L}^{-1}$ Na-Citrat (D) und (E) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HEPES pH 7.5, $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ Na-Citrat (F) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HEPES pH 7.5, $1,1 \text{ mol L}^{-1}$ Na-Citrat (G) und (H) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HEPES pH 7.5, $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ Na-Citrat.

Reihenversuche mit Na-Citrat und verschiedenen Puffern führten zu einer weiteren Reduzierung der Hintergrund-Präzipitation. Mit $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ Na-Citrat in $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HEPES pH 7.0 konnten die in Abb. 22D und E gezeigten Kristalle erhalten werden. Deutlich ist zu erkennen, dass es sich nicht um Einkristalle handelt, vielmehr scheinen die Kristalle aus überein-

ander geschichteten Plättchen zu bestehen. Wie schon bei den Ansätzen mit PEG wachsen die Kristalle auch mit Na-Citrat sehr schnell. Nach drei Tagen ist keine weitere Größenzunahme mehr zu erkennen. Versuche, die Äquilibration des Tropfens zu verlangsamen, verbesserten die Kristallmorphologie nur unwesentlich (Abb. 22 G und H). Mit Mikroseeding konnte ebenfalls keine Bildung von Einkristallen erreicht werden (Abb. 22 F). Zugabe von äquimolaren Konzentrationen NAD^+ in den Ansatz führte innerhalb von zwei Tagen zur vollständigen Präzipitation des Proteins. Ebenso wenig erfolgreich war ein Additiv-Screen. In einigen Fällen bildeten sich Kristalle mit unveränderter Morphologie, die Mehrzahl der Bedingungen führte aber zur Präzipitation der ODH.

3.5.2.3 Kristallisationsversuche mit ODH ohne His-Tag und mit ODH-LE6His

Zusätzlich wurden die erfolgreichen Kristallisationsbedingungen mit ODH ohne Affinitätsmarkierung getestet. Es wurden unter den gleichen Bedingungen keinerlei Kristalle erhalten, die ODH präzipitierte in allen Ansätzen. Ein mit dem unverlängerten Enzym durchgeführter „Sparse matrix screen“ sowohl bei 12 °C, als auch bei 20 °C mit verschiedenen Proteinkonzentrationen führte weiterhin nicht zur Entdeckung neuer, Erfolg versprechender Bedingungen. Im Gegensatz dazu verhielt sich ODH-LE6His genau wie die ODH-5His. Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurden Kristalle mit der gleichen Morphologie erhalten. Mit einem durchgeführten „Sparse matrix Screen“ konnten ebenfalls keine zusätzlichen Kristallisationsbedingungen gefunden werden.

3.5.2.4 Kontrolleexperimente

Für alle Bedingungen, in denen sich kristalline Strukturen gebildet hatten, wurden Kontrollen ohne Protein durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich um PEG- bzw. Citrat-Kristalle handelt.

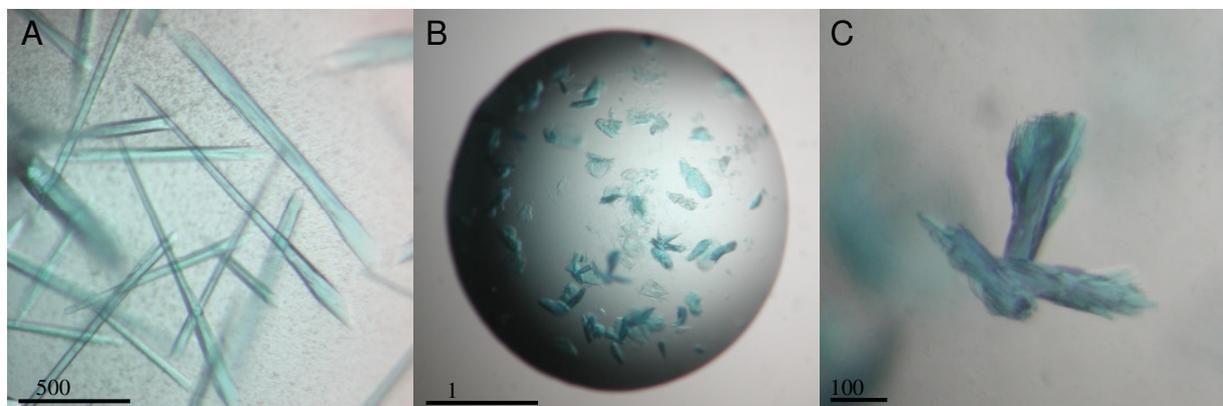


Abb. 23 Anfärbung der ODH-Kristalle mit IZITTM (Hampton Research). Kristallisationsbedingungen: (A) 0,1 mol L⁻¹ Hepes pH 7,5, 25 % PEG 4000, 0,125 mol L⁻¹ MgCl₂ (B) und (C) 0,1 mol L⁻¹ Hepes pH 7,0, 1,2 mol L⁻¹ Na-Citrat.

Weiterhin wurden die erhaltenen Kristalle mit IZIT Crystal DyeTM angefärbt. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, wurden die kristallinen Strukturen, die mit PEG-4000 als Präzipitant erhalten wurden, durch den Farbstoff blau angefärbt. Es handelt sich hierbei eindeutig um Proteinnadeln. Auch die Kristalle, die in Na-Citrat wuchsen, konnten zweifelsfrei als Proteinkristalle identifiziert werden (Abb. 23, B und C).

Zur Überprüfung, ob es sich bei den kristallinen Strukturen um die ODH handelt, wurden die erhaltenen Kristalle zusätzlich gelelektrophoretisch untersucht. Den Ansätzen wurden Kristalle entnommen, diese mehrfach mit Reservoirlösung gewaschen, anschließend in SDS-Probenpuffer erhitzt und auf ein Gel aufgetragen, das in Abbildung 24 dargestellt ist. In den Spuren 1 und 2 ist jeweils eine deutliche Bande mit der erwarteten Größe zu erkennen. In Spur 3, in der ein Aliquot des letzten Waschschrilles aufgetragen wurde, fehlt diese Bande. Zusätzlich ist in den Spuren 1 und 2 jeweils oberhalb der ODH-Bande mindestens eine weitere Bande mit einem r_f -Wert von 0,25 zu erkennen. In Spur 1, in der Kristalle aus dem Ansatz mit Na-Citrat aufgetragen wurden, sind zusätzlich weitere Banden zu erkennen.

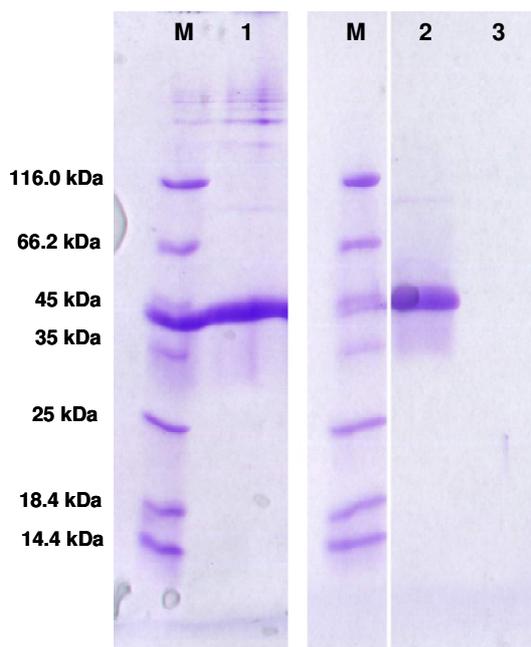


Abb. 24 SDS-Page zur Kontrolle der Kristallidentität. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. (M) molekularer Größenmarker. (1) Kristallprobe aus Ansatz mit Na-Citrat. (2) Kristallnadeln aus einem Ansatz mit PEG-6000. (3) Aliquot letzter Waschschrilt.

3.5.3 Röntgenographische Untersuchung der ODH-Kristalle

Obwohl schon die Kristallmorphologie der in Na-Citrat erhaltenen ODH-Kristalle darauf hindeutete, dass es sich nicht um Einkristalle handelt, wurden ODH-Kristalle röntgenographisch in Zusammenarbeit mit Dr. O. H. Weiergräber vom Institut für Neurowissenschaften und Biophysik - Abteilung Molekulare Biophysik - des Forschungszentrums Jülich unter-

sucht. Die Aufnahmen des Beugungsmusters erfolgten an der ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) in Grenoble (Frankreich) mit Synchrotronstrahlung. Die erhaltenen Diffraktionsaufnahmen sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Auflösung der Daten liegt bei ca. 3 Å. Allerdings handelte es sich, wie erwartet, nicht um einen Einkristall. Scheinbar überlagern sich zwei bis drei Gitter in unterschiedlichen Orientierungen. Eine Elementarzelle war leider nicht zu bestimmen (O. H. Weiergräber, persönliche Mitteilung).

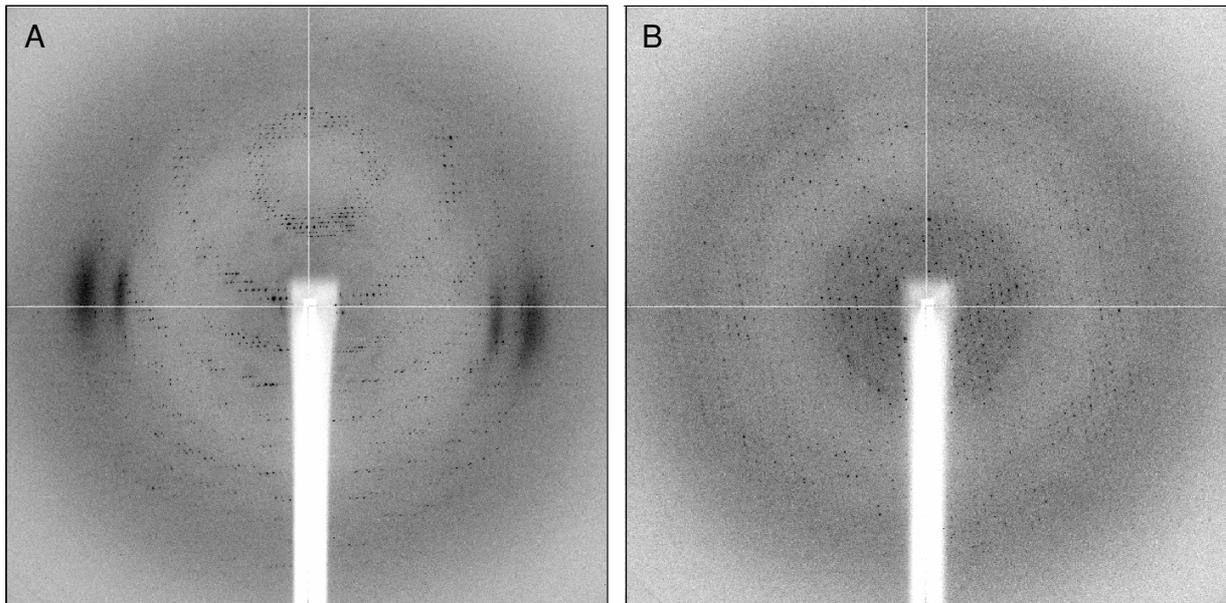


Abb. 25 Diffraktionsaufnahme eines ODH-Kristalls mit Synchrotronstrahlung. Die Messung erfolgte an der ESRF (Grenoble, Frankreich). Die Wellenlänge der Synchrotronstrahlung betrug 0,934 Å. Die Aufnahme erfolgte bei 100 K. Es wurde ein ADSC Q210-Detektor verwendet. In Abbildung **B** ist der Kristall gegenüber **A** um 90 Grad rotiert.

3.5.4 Homogenität der ODH-Präparation

Zur Kontrolle der Homogenität der heterolog überexprimierten ODH-5His wurde das Enzym gelelektrophoretisch mit einer SDS und einer nativen PAGE sowie durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt. Sowohl in der Coomassie- als auch in der Silberfärbung des SDS-Gels (Abb. 26 A) ist eine deutliche Bande zu erkennen, die größtmäßig der ODH zugeordnet werden konnte. In der nativen PAGE (Abb. 26 B) wurden die ODH im Gel durch Anfärben mit Coomassie sichtbar gemacht. Zusätzlich erfolgte ein spezifischer Nachweis der ODH mit einer Aktivitätsfärbung. In der Coomassie-Färbung ist eine Bande mit einem r_f -Wert von 0,3 zu erkennen. Zusätzlich finden sich oberhalb dieser Bande weitere Proteinbanden (r_f -Werte 0,18, 0,14). Alle in der Coomassie-Färbung sichtbaren Banden konnten durch die Formazanfärbung als ODH identifiziert werden. Zusätzlich sind hier noch weitere Banden mit r_f -Werten von 0,1 und 0,03. Wie die

Immunodetektion des His-Tags zusätzlich zeigt, handelt es sich offenbar bei allen sichtbaren Banden um ODH. In der in Abbildung 26.C dargestellten Isoelektrischen Fokussierung lassen sich zwei Banden erkennen, deren isoelektrische Punkte zwischen 5,2 und 5,1 liegen. Die Bande bei pH 5,2 ist dicker ausgeprägt, als die darunter liegende.

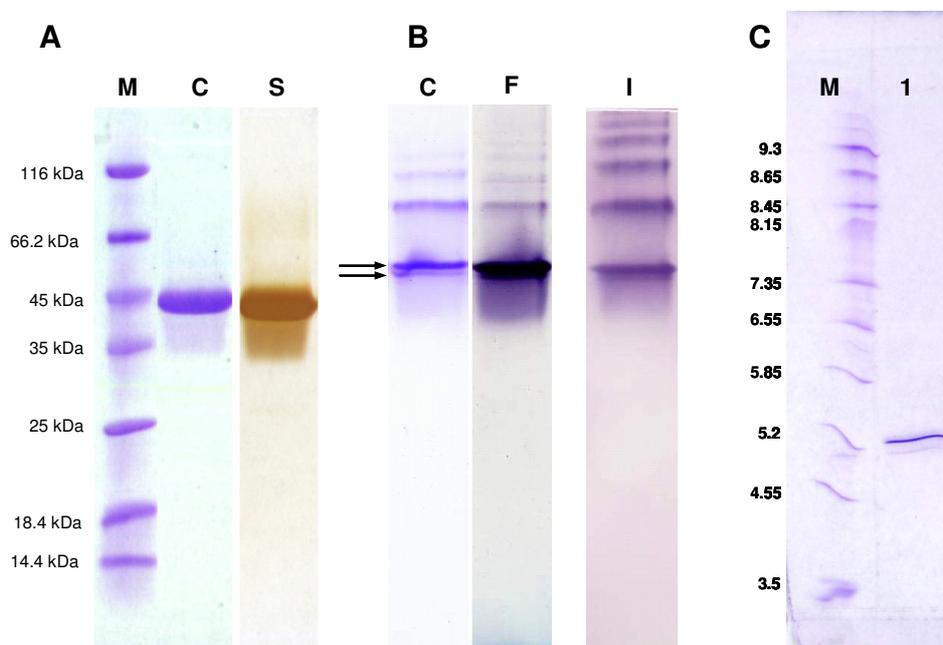


Abb. 26 Elektrophoretische Kontrolle der Homogenität der ODH. (A) SDS-PAGE. Die im Gel getrennte ODH-5His (8 μg) wurde durch Coomassie- (C) und Silberfärbung (S) sichtbar gemacht. (M) molekularer Größenmarker. (B) Native PAGE. Die ODH-5His (6,5 μg) wurde durch Aktivitätsfärbung (F), Coomassiefärbung (C) oder durch Immunodetektion des His-Tags (I) sichtbar gemacht. (C) Isoelektrische Fokussierung. (1) ODH-5His (2,2 μg).

3.6 NMR-Spektroskopische Untersuchung der ODH

3.6.1 Reinigung ^{15}N -markierter ODH-5His

Für die Aufnahme 2-dimensionaler (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektren war es notwendig, ^{15}N markierte ODH herzustellen. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Minimalmedium, dem als einzige Stickstoffquelle ^{15}N -Ammoniumchlorid zugesetzt war. Es wurden fünf 1L-Kulturen verwendet und die Bakterien für 12 h bei 37 °C angezogen. Die Expression der ODH wurde mit 0,35 mmol L⁻¹ IPTG induziert und die Inkubationstemperatur auf 18 °C reduziert. Nach 36 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet. Das Bakterienpellet hatte ein Gewicht von 35 g. Es wurden 75.285 U ODH im Rohextrakt detektiert (2.151 U gFG⁻¹). Die Reinigung erfolgte mit Ni-NTA und Gelfiltration. Nach der Affinitätschromatographie und Druckfiltration waren noch 80 % der Ausgangsaktivität (60.145 U) vorhanden. Der Prote-

ingehalt war um 87 % gesunken und betrug 113 mg. Die weitere Reinigung erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex G-100. Nach Konzentration waren noch 35.348 U ODH vorhanden. Der Proteingehalt betrug 74 mg.

Tab. 11 Reinigungsprotokoll einer ^{15}N -ODH-Reinigung aus dem *E. coli*-Stamm ER2566. Verlauf einer ^{15}N -ODH-Reinigung mit Metallchelataffinitätschromatographie und Gelfiltration. Das Endprodukt wurde gegen 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphat pH 6,8, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT dialysiert.

	Volumen [mL]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	105	717	75285	100	8,76	919,8	100	82	1
NiNTA	40	1586	63440	84	3,89	155,6	17	408	5,0
NiNTA konzentriert	5	12029	60145	80	24,58	122,9	13	489	6,0
Gelfiltration mit Sephadex G-100	700	57	40040	53	0,11	77,0	8	520	6,4
konzentriert	22,5	1571	35348	47	3,29	74,0	8	478	5,8
Endprodukt dialysiert	3,8	7859	29864	40	16,5	62,7	7	476	5,8

Die Probe wurde noch weiter konzentriert und in einen 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 mit 1 mmol L⁻¹ EDTA und 1 mmol L⁻¹ DTT überführt. Dieser Schritt war mit einem Aktivitäts- und Proteinverlust verbunden. Im Endprodukt ließen sich 29.864 U ODH (40 % der Ausgangsaktivität) messen. Bei einem Proteingehalt von 63 mg (7 % der Proteinmenge des Rohextraktes) ergab sich eine spezifische Aktivität, die mit 476 U mg⁻¹ geringfügig niedriger war, als nach der Gelfiltration (520 U mg⁻¹).

3.6.2 $1\text{D-}^1\text{H}$ -Spektrum der ODH

Ob die ODH sich für NMR-spektroskopische Versuche eignet, sollte in einem ersten Versuch durch die Aufnahme eines eindimensionalen Protonenspektrums untersucht werden. Die Konzentration der ^{15}N -markierten ODH betrug 0,3 mmol L⁻¹ (in 50 mmol L⁻¹ K-Phosphat, pH 6,8 mit 1 mmol L⁻¹ EDTA und 1 mmol L⁻¹ DTT, 6 % (v/v) D₂O). Vor der Durchführung zweidimensionaler Experimente sollte so das Vorliegen eines monomeren Proteins mit einer definierten Tertiärstruktur überprüft werden. Das aufgenommene Spektrum ist in Abbildung 27 gezeigt. Die chemischen Verschiebungs-Bereiche für verschiedene ^1H -Resonanzen sind anhand typischer Verschiebungen eingezeichnet. Das Spektrum zeigt eine für die Größe der ODH von 43,3 kDa sehr gute spektrale Dispersion der Amidprotonen in einem Bereich von 5,6 bis 12 ppm mit einigen Resonanzlinien bei den für Indolring-NH-Protonen von Tryptophanen typischen Frequenzen zwischen 10 und 12 ppm. Resonanzen hochfeldig von 0,8 ppm bis hin zu negativen ppm-Werten sind typisch für Proteine in globulär gefaltetem

Zustand. Bei diesen Resonanzen handelt es sich um Methylgruppen, die sich in räumlicher Nähe zu aromatischen Aminosäureseitenketten befinden (Wüthrich, 1986).

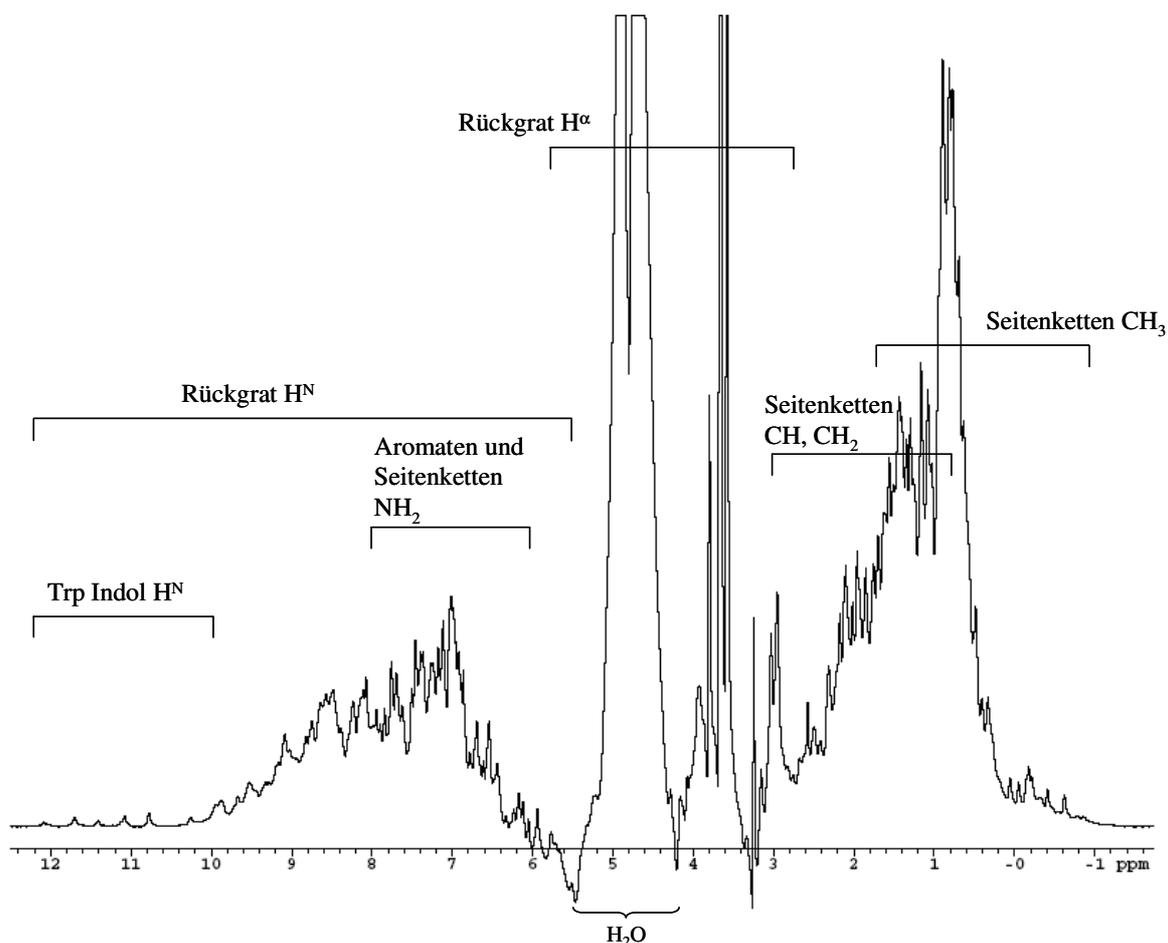


Abb. 27 Eindimensionales Protonen-Spektrum von ODH in Lösung. Das Spektrum wurde bei 296 K mit einer Protonenfrequenz von 800 Mhz aufgenommen. Dargestellt ist das gesamte Protonenspektrum von ODH ($0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ in 50 mmol L^{-1} K-Phosphat pH 6,8, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT, 6 % (v/v) D_2O). Die Markierungen zeigen die chemischen Verschiebungs-Bereiche für verschiedene Typen von ^1H -Resonanzen in der ODH.

3.6.3 2D-Spektren von ^{15}N -markierter ODH

Das 1D- ^1H -Spektrum der ODH zeigte eine starke Überlagerung der Amidprotonenresonanzen, die sich durch zweidimensionale, heteronukleare Einbindungskorrelations-Spektren (HSQC-Spektren; Hetero Single Quantum Correlation) auflösen lassen. Diese Spektren sollen weiterhin als Grundlage für Tripleresonanzspektren dienen, die zur Resonanzzuordnung aufgenommen werden sollen. Ein ($^1\text{H}, ^{15}\text{N}$)-HSQC-Spektrum enthält alle Signale von Protonen, die an einen ^{15}N -Kern gebunden sind, also alle Rückgrat-Amidprotonen (NH, außer Prolin), die Iminoresonanz vom Indolring des Tryptophans, δNH von Argininen, γNH_2 von Asparaginen und δNH_2 von Glutaminen. Die Iminoresonanz des Imidazolrings von Histidin, ϵNH_2 von

Lysininen und ζNH von Arginin sind hingegen nur detektierbar, wenn sie an Salzbrücken oder Wasserstoffbrücken beteiligt sind.

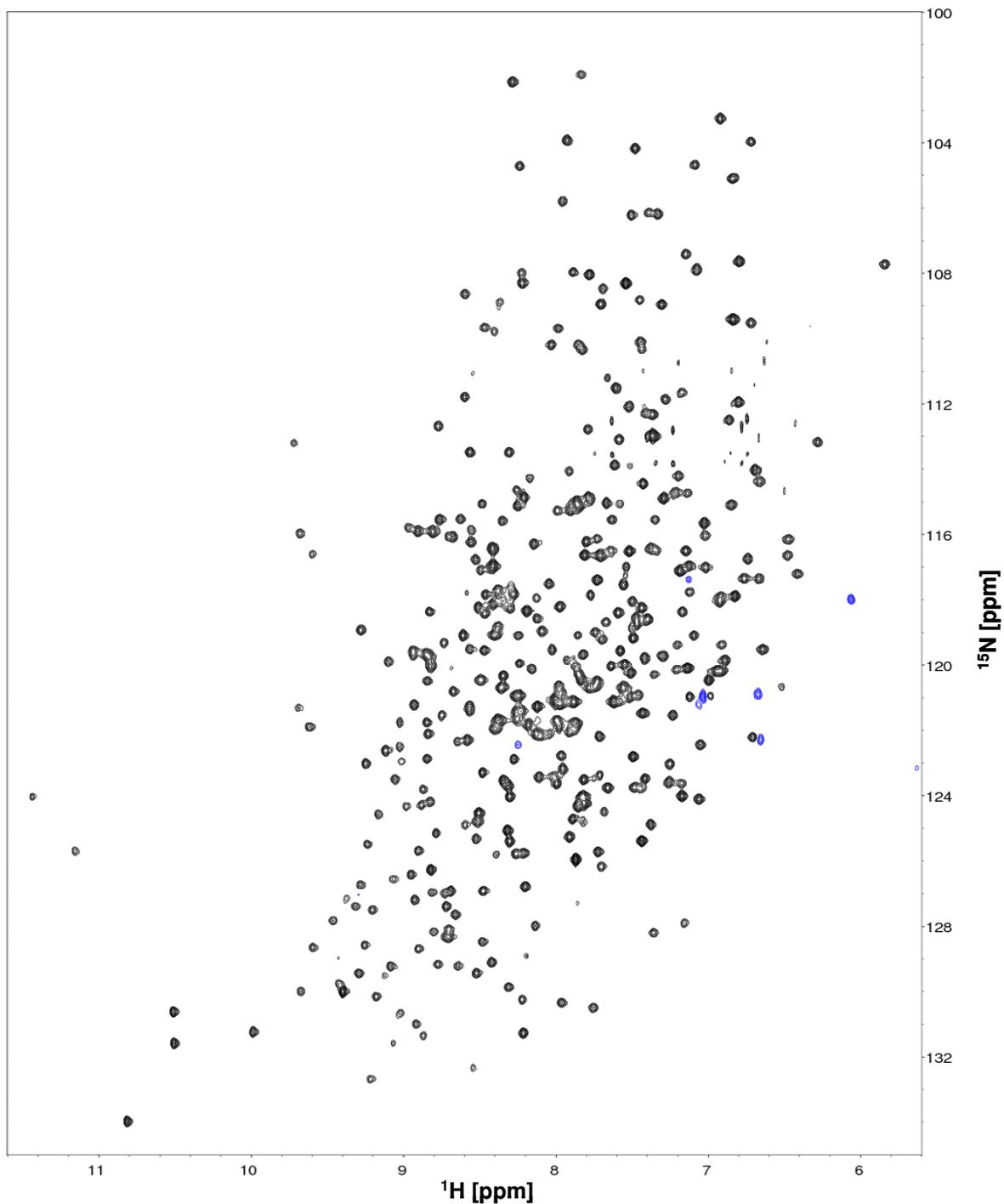


Abb. 28 (^1H - ^{15}N)-HSQC-TROSY-Spektrum von ^{15}N -ODH-5His. Das Spektrum wurde bei 296 K an einem Varian-Spektrometer mit einer Protonenresonanz von 800 MHz aufgenommen. Die Konzentration der ODH betrug $0,37 \text{ mmol L}^{-1}$. Der verwendete Puffer enthielt 50 mmol L^{-1} K-Phosphat pH 6,8, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT und 6 % (v/v) D_2O . Schwarz sind die Rückgrat-Amidprotonen dargestellt, die an ^{15}N -Stickstoff gebunden sind. In blau sind gefaltete Seitenkettenamide z.B. von Arginin abgebildet.

In Abbildung 28 ist ein (^1H - ^{15}N)-HSQC-TROSY-Spektrum von ODH-5His dargestellt. Das Spektrum zeigte eine sehr gute spektrale Dispersion in beiden Dimensionen, um zu

versuchen, die gemessenen Resonanzen mit Hilfe von 3D-NMR-Experimenten zuordnen zu können. Die große Dispersion deutet daraufhin, dass die ODH in gefaltetem Zustand mit einer geordneten Tertiärstruktur vorliegt. Es konnten insgesamt ca. 367 Resonanzpeaks von Rückgrat-Amiden detektiert werden. Zusätzlich wurden auch einige Seitenkettenamide detektiert (Abb. 28, blaue Resonanzpeaks). Die bei 4°C gelagerte ODH-Probe war über Wochen stabil, bis auf geringe Mengen an Protein, die im Verlaufe der Zeit präzipitierten. Zwei (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren, die im Abstand von acht Wochen aufgenommen wurden, zeigten jedoch keinerlei Unterschiede, weder waren Resonanzpeaks verschwunden, noch waren neue Peaks aufgetaucht.

3.6.4 Reinigung dreifach-isotopen-markierter ODH

Für die Aufnahme heteronuklearer 3D-Spektren, die eine sequenzspezifische Resonanzzuordnung ermöglichen sollten, wurde eine uniform ^{13}C , ^{15}N markierte Probe benötigt. Zusätzlich musste die Probe, aufgrund der Größe der ODH, deuteriert sein.

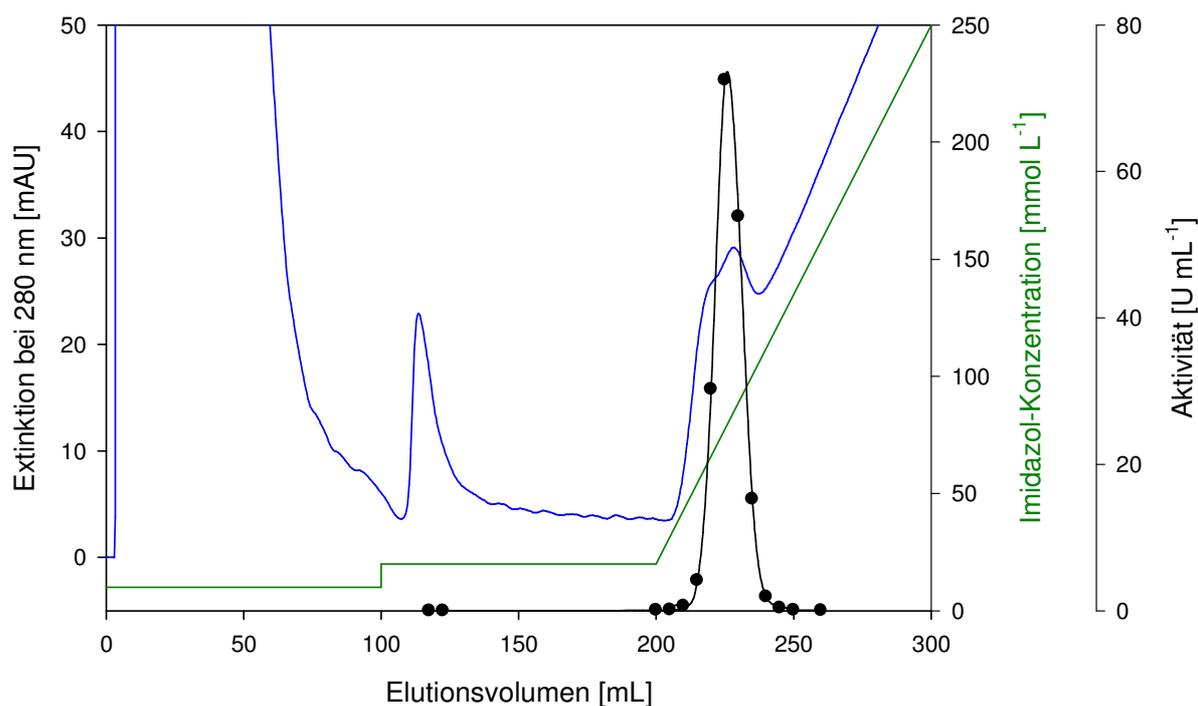


Abb. 29 Chromatogramm einer Metallchelataffinitätschromatographie von ^{15}N , ^{13}C , ^2H -ODH. Dargestellt sind die kontinuierlich aufgezeichnete Extinktion bei 280 nm, der Verlauf des Imidazol-Gradienten und die ODH-Aktivität in ausgewählten Fraktionen. Auf die Säule wurden 60 mL dreifach markierte ODH mit einer Aktivität von 2.076 U und einem Proteingehalt von 58,8 mg aufgetragen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 70 mL Lysepuffer gespült. In den nächsten 100 mL der Elution wurde die Imidazol-Konzentration im Eluenten auf 20 mmol L^{-1} erhöht. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen Imidazol-Gradienten (20-250 mmol L^{-1}) mit einer Länge von 100 mL. Es wurden 5 mL Fraktionen gesammelt.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Minimalmedium, das mit D_2O hergestellt wurde und ^{15}N -Ammoniumchlorid und ^{13}C -Glucose als einzige Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle

enthält. Es wurde eine 1L-Kultur verwendet. Nach 48 stündiger Inkubation bei 18 °C wurden die Bakterien pelletiert. Es konnten 2,5 g *E. coli* aus der Kultur gewonnen werden. Der resultierende Rohextrakt enthielt 1.748 U ODH und 32,4 mg Protein. Um die Ausbeute zu maximieren, wurde das Bakterienpellet erneut in Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Insgesamt wurden 2.076 Units ODH gewonnen. Bei einem Proteingehalt von 58,8 mg ergab sich eine spezifische Aktivität von 35 U mg⁻¹. Der Rohextrakt wurde auf eine mit Lysepuffer voräquilibrierte 12 mL Ni-NTA-Säule aufgebracht. Abbildung 29 zeigt das Chromatogramm des Laufs. Die ODH-Elution erfolgte durch einen linearen Imidazol-Gradienten bei ca. 50 mmol L⁻¹ Imidazol. Der Verlauf der Reinigung ist in Tabelle 12 protokolliert.

Tab. 12 Reinigungsprotokoll einer ¹⁵N, ¹³C, ²H-ODH -Reinigung aus dem *E. coli*-Stamm ER2566. Verlauf einer ¹⁵N, ¹³C, ²H-ODH-Reinigung mit Metallchelataffinitätschromatographie. Das Endprodukt wurde in 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphat pH 6,8, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT mit 6 % (v/v) D₂O überführt.

	Volumen [mL]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	40	43,7	1748		0,81	32,4		54	
Rohextrakt II	60	34,6	2076	100	0,98	58,8	100	35	1
NiNTA	40	15,2	608	29	0,266	10,6	18	57	1,6
NiNTA konzentriert	6	93,5	561	27	1,4	8,4	14	67	1,9
konz. Endprodukt	0,4	1068	427	21	18,2	7,3	12	59	1,7

Nach der Metallchelataffinitätschromatographie wurden die acht Fraktionen mit der höchsten ODH-Aktivität vereinigt und bis auf 6 mL eingengt. Es waren noch 561 U ODH (27 % des Ausgangswertes) vorhanden. Der Proteingehalt betrug 8,4 mg, so dass die spezifische Aktivität durch die Ni-NTA-Chromatographie lediglich auf 67 U mg⁻¹ erhöht werden konnte. Wegen der geringen Proteinmenge wurde auf weitere chromatographische Schritte verzichtet und die ODH lediglich weiter konzentriert und in 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphat pH 6,8, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ DTT mit 6 % (v/v) ²H₂O überführt.

Das in den NMR-Experimenten eingesetzte Endprodukt enthielt 427 U ODH und hatte einen Proteingehalt von 7,3 mg. Abbildung 30 zeigt ein (¹H-¹⁵N)-HSQC-TROSY-Spektrum von ODH-5His (Rot), über das in schwarz ein (¹H-¹⁵N)-HSQC-TROSY-Spektrum von deuterierter ODH gelegt ist. Deutlich zu erkennen ist, dass im Spektrum der deuterierten ODH mindestens 41 Resonanzpeaks fehlen, die im Spektrum mit ¹⁵N-markierter ODH enthalten sind. Die Vielzahl der fehlenden Resonanzen erschwert die sequenzspezifische Zuordnung. Ein nach acht Wochen aufgenommenes Spektrum zeigte einige zusätzliche Resonanzen im Spektrum, die meisten fehlenden Resonanzen blieben aber weiterhin nicht sichtbar.

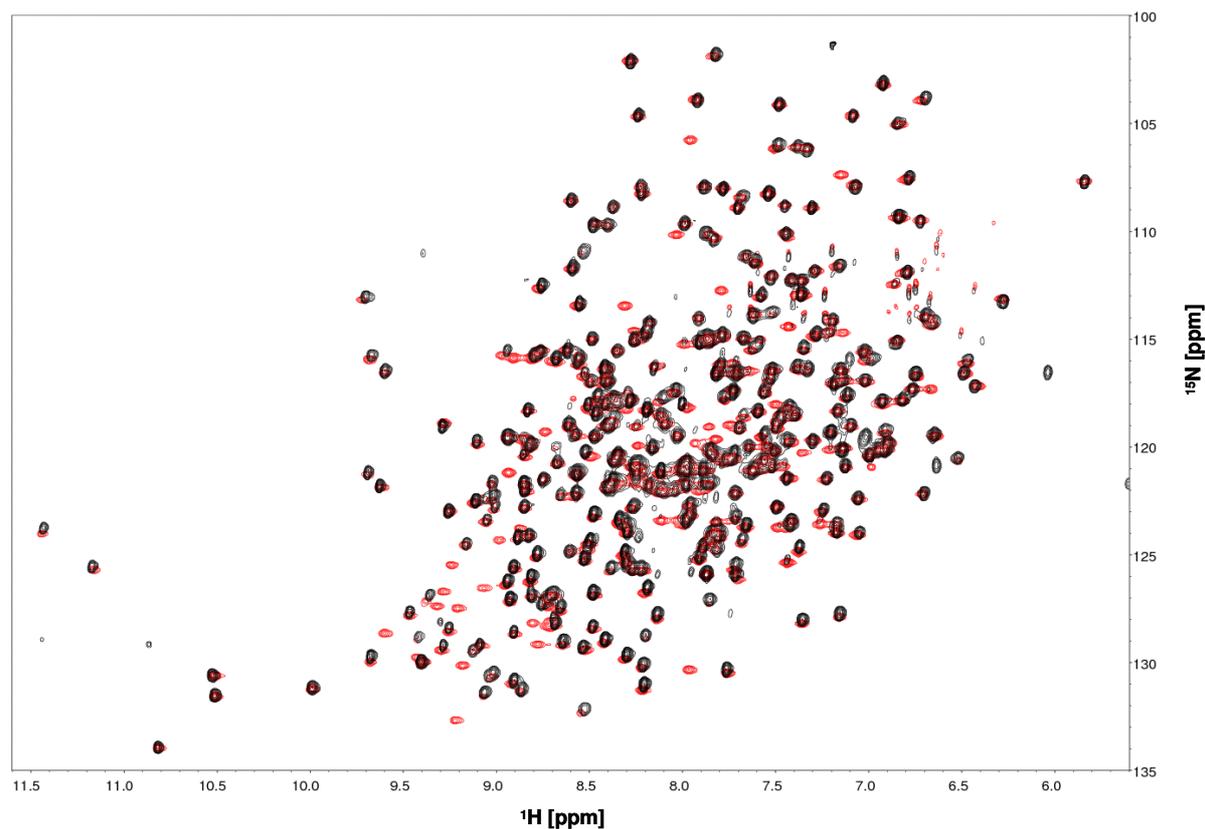


Abb. 30 (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektren von ^{15}N -ODH-5His sowie von deuterierter, ^{15}N - ^{13}C -markierter ODH. Die Spektren wurden bei 296 K an einem Varian-Spektrometer mit einer Protonenresonanz von 800 MHz aufgenommen. Die Konzentration der ^{15}N -markierten ODH (in rot dargestellt) betrug $0,37 \text{ mmol L}^{-1}$. In schwarz ist das (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektrum der dreifach-isotopen-markierten ODH dargestellt. Das Protein lag hier in einer Konzentration von $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ vor. Der verwendete Puffer enthielt 50 mmol L^{-1} K-Phosphat pH 6.8, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT und 6 % (v/v) D_2O .

3.6.5 Versuche zur Denaturierung/Renaturierung der ODH

Eine Möglichkeit, einen vollständigen Austausch der Amiddeuteronen mit ^1H zu erreichen, ist die vollständige Entfaltung des Proteins mit einer sich anschließenden Renaturierung wie z.B. von Tugarinov *et al.* (2002) am Beispiel der 81.4 kDa großen Malat-Synthase G demonstriert wurde. Für die Denaturierung und anschließende Renaturierung der ODH wurden verschiedene Methoden getestet. Zunächst wurde die ODH durch $7,5 \text{ mol L}^{-1}$ Guanidinhydrochlorid bzw. 8 mol L^{-1} Harnstoff denaturiert. Es war keine ODH-Aktivität in der resultierenden Suspension mehr nachweisbar. Anschließend wurde versucht, die ODH in ihre native Konformation zurückzufalten. Dafür wurden sowohl die schnelle Verdünnung mit einem nicht-denaturierenden Puffer (Rapid-Dilution), die stufenweise Dialyse gegen Puffer mit abnehmender Konzentration an Guanidinhydrochlorid bzw. Harnstoff, als auch Auf-der-Säule-Renaturierung mit Ni-NTA und Gelfiltration auf ihren Nutzen für die Renaturierung der ODH untersucht.

Bei der schnellen Verdünnung wurde die Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration der ODH-Probe mit K-Phosphatpuffer schnell auf 94 mmol L^{-1} reduziert. In der resultierenden Suspension konnten lediglich 4 % der ODH-Ausgangsaktivität gemessen werden. Beim Versuch, die ODH durch Dialyse zu renaturieren, wurde die ODH-Suspension gegen Puffer dialysiert, deren Harnstoff- bzw. Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration schrittweise reduziert wurde. Ab einer Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration von 4 mol L^{-1} fiel die ODH im Dialyseschlauch aus. Das entstandene ODH-Pellet wurde in K-Phosphatpuffer mit 5 mmol L^{-1} DTT resuspendiert, allerdings konnte keine ODH-Aktivität nachgewiesen werden. Ähnlich verhielt sich die ODH bei Dialyse gegen harnstoffhaltigen Puffer. Ebenfalls bei einer Konzentration von 4 mol L^{-1} Harnstoff fiel die ODH aus. Durch Resuspendieren des ausgefallenen Proteins in K-Phosphatpuffer pH 7.0 mit 5 mmol L^{-1} DTT konnte keine Aktivität wiederhergestellt werden. Weiterhin wurde die denaturierte ODH mit ihrem His-Tag an eine Ni-NTA-Matrix gebunden. Anschließend wurde die Konzentration des Denaturanten im Elutionspuffer kontinuierlich erniedrigt. Die gebundene ODH konnte durch einen Imidazolpuffer von der Säule eluiert werden, allerdings war im Eluat nur eine ODH-Aktivität zu messen, die ca. 1 % der Ausgangsaktivität entsprach (Ergebnisse nicht gezeigt).

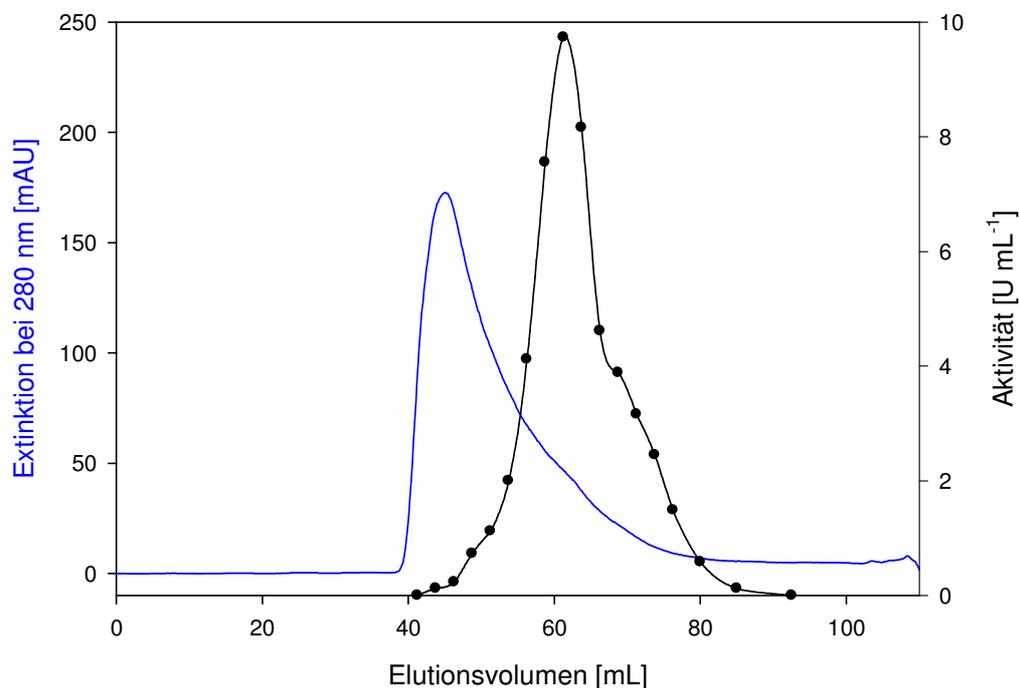


Abb. 31 Renaturierung der ODH durch Gelfiltration mit Sephadex G-75. Dargestellt sind Extinktion bei 280 nm und die ODH-Aktivität ausgewählter Fraktionen. Die Trennung der denaturierten ODH erfolgte mit einem 50 mmol L^{-1} Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5 mit 2 mmol L^{-1} EDTA, 5 mmol L^{-1} DTT und 10 % (v/v) Glycerin. Es wurden 2,5 mL Fraktionen gesammelt. Aufgetragen wurde 5 mg denaturierte ODH.

Abbildung 31 zeigt das Chromatogramm einer Gelfiltration mit denaturierter ODH. 2.500 U (5 mg) ODH wurden durch $7,5 \text{ mol L}^{-1}$ Guanidiniumhydrochlorid denaturiert und auf die

Säule aufgetragen. Es wurde die ODH-Aktivität in ausgewählten Fraktionen bestimmt. Ab 40 mL eluierte Protein von der Gelfiltrationssäule. Es ist allerdings kein scharfer symmetrischer Proteinpeak zu erkennen. Vielmehr nahm die Proteinkonzentration im Eluat über ein Volumen von 40 mL nur allmählich ab. Die ODH-Aktivität stieg im Vergleich dazu von Fraktion zu Fraktion an und erreichte ein Maximum nach 62 mL. In der zugehörigen Fraktion waren ca. 20 U ODH enthalten. Insgesamt lag die Ausbeute an renaturierter ODH bei ca. 5 % der Aktivität vor der Denaturierung.

3.6.6 Titrationsexperimente

Da zunächst keine sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen in einem (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum erfolgen konnte, sollten Titrationsexperimente zeigen, ob sich hiermit die Bindung von Liganden nachweisen lässt.

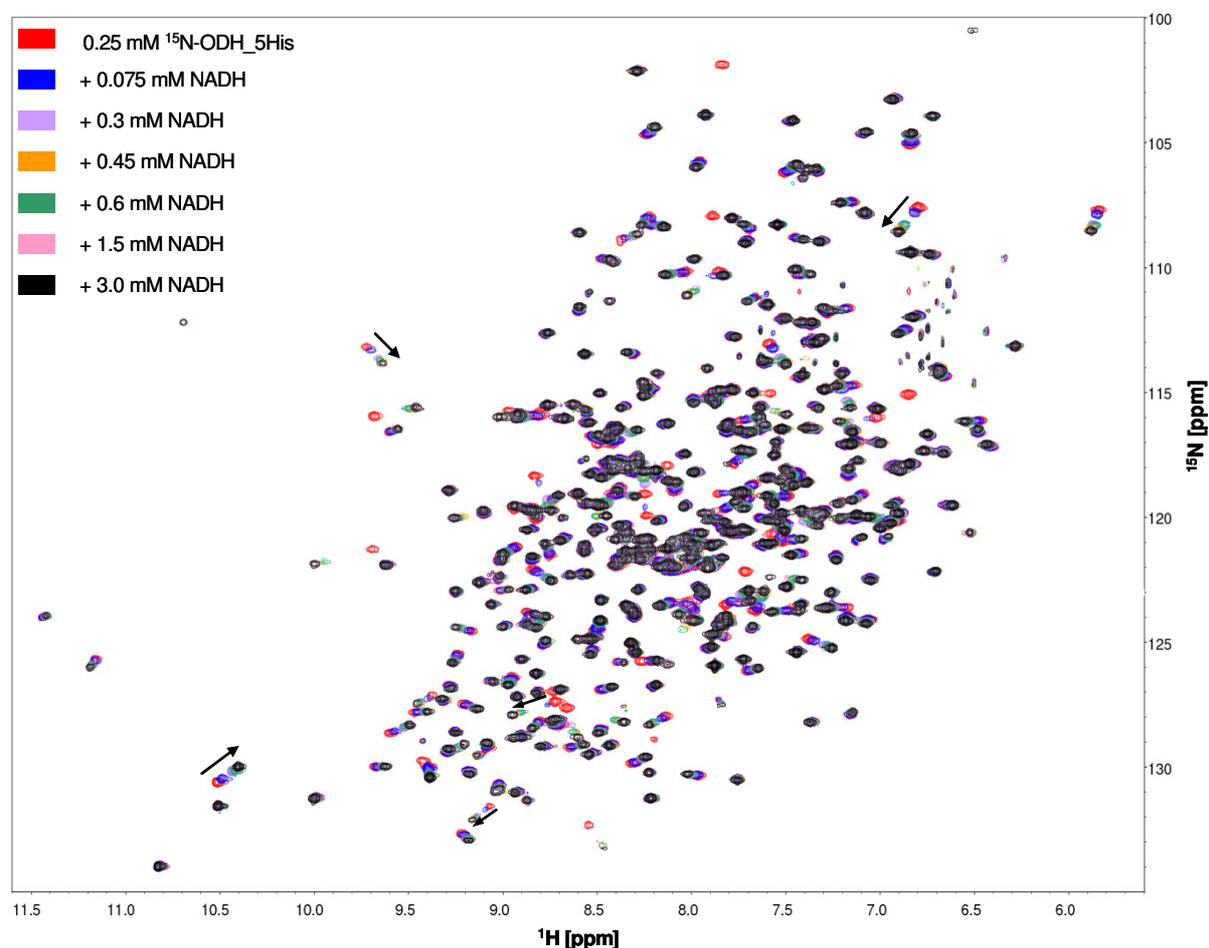


Abb. 32 Überlagerte (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektren von ^{15}N -ODH-5His bei Titration mit verschiedenen NADH-Konzentrationen. Die Spektren wurden bei 296 K an einem Varian-Spektrometer mit einer Protonenresonanz von 800 MHz aufgenommen. Die Ausgangskonzentration der ODH betrug $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Der verwendete Puffer enthielt 50 mmol L^{-1} K-Phosphat pH 6,8, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT und 6 % (v/v) D_2O . Die NADH-Konzentration in der ODH-Suspension wurde in sechs Schritten von $0,075 \text{ mmol L}^{-1}$ (blau) bis auf 3 mmol L^{-1} (schwarz) gesteigert. Die schwarzen Pfeile markieren diejenigen Resonanzen, deren Verschiebung für die Berechnung der Dissoziationskonstante verwendet wurde.

Auch ohne eine vollständige Zuordnung kann die chemische Verschiebung einzelner Resonanzen, die aus der Bindung von Liganden resultiert, dazu benutzt werden, um die Dissoziationskonstante K_D zu bestimmen. Es wurden 2D (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektren zunächst mit freiem Enzym und danach mit steigenden Ligandenkonzentrationen aufgenommen. Abbildung 32 zeigt die HSQC-Spektren, die bei Titration der ODH mit NADH aufgenommen wurden. Schrittweise wurde die NADH-Konzentration von $0,075 \text{ mmol L}^{-1}$ bis 3 mmol L^{-1} erhöht. Bei jeder NADH-Konzentration wurde ein (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektrum aufgezeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich durch Zugabe von steigenden NADH-Konzentrationen die chemische Umgebung verschiedenster Aminosäurereste verändert, was sich in veränderten Positionen der zugehörigen Resonanzen bemerkbar macht. Zusätzlich gibt es einige Resonanzpeaks, die nach NADH-Zugabe vollständig verschwinden und womöglich an völlig anderer Stelle im Spektrum wieder auftauchen. Die Pfeile in Abbildung 32 markieren die Wanderung ausgewählter Amidresonanzen, die für die Bestimmung der Dissoziationskonstante für NADH verwendet wurden.

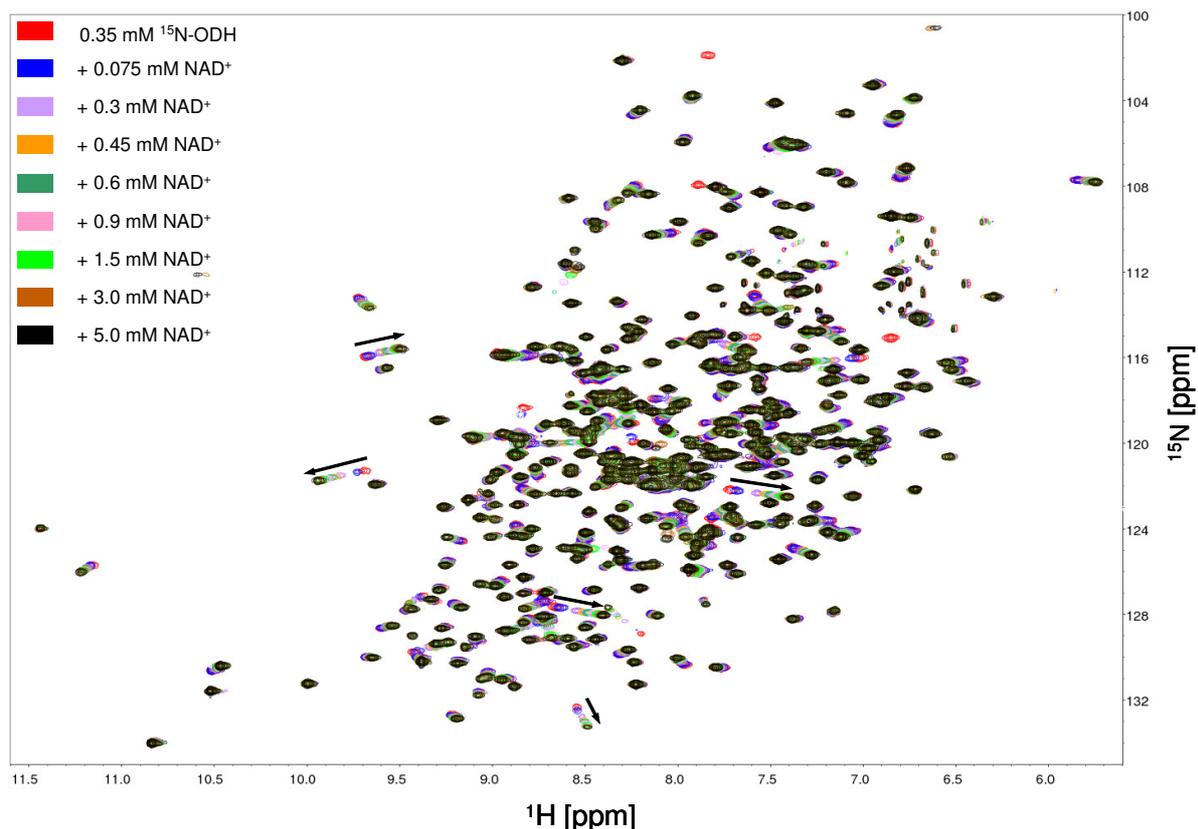


Abb. 33 Überlagerte (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektren von ^{15}N -ODH-5His bei Titration mit NAD^+ . Die Spektren wurden bei 296 K mit einer Protonenresonanz von 800 MHz aufgenommen. Die Ausgangskonzentration der ODH betrug $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Der verwendete Puffer enthielt 50 mmol L^{-1} K-Phosphat pH 6,8, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT und 6 % (v/v) D_2O . Die NAD^+ -Konzentration wurde in sieben Schritten von $0,075 \text{ mmol L}^{-1}$ (blau) bis auf 5 mmol L^{-1} (schwarz) erhöht. Die schwarzen Pfeile markieren ausgewählte Aminosäuren-Resonanzen, die für die Berechnung der Dissoziationskonstante verwendet wurden.

Neben der Bindung von NADH wurden auch HSQC-Spektren aufgenommen, welche die NAD⁺-Bindung an ¹⁵N-ODH zeigen. Schrittweise wurde die NAD⁺-Konzentration von 0,075 mmol L⁻¹ bis 5 mmol L⁻¹ erhöht und bei jeder NAD⁺-Konzentration ein (¹H-¹⁵N)-TROSY-HSQC-Spektrum aufgezeichnet. Abbildung 33 zeigt die überlagerten Spektren dieser Titrationsreihe. Auch während einer Titration mit NAD⁺ ist deutlich zu erkennen, dass sich bei steigender Konzentration des Coenzym die chemische Umgebung verschiedenster Aminosäurereste verändert haben muss, da sich die Positionen der zugehörigen Resonanzen verschieben. Zusätzlich gibt es ebenfalls einige Resonanzpeaks, die nach NAD⁺-Zugabe vollständig verschwinden. Die Pfeile in Abbildung 33 markieren die Verschiebung ausgewählter Amidresonanzen, die für die Bestimmung der Dissoziationskonstante verwendet wurden.

Weiterhin wurde ODH mit verschiedenen Pyruvat-Konzentrationen titriert. In den resultierenden Spektren konnten jedoch keine verschobenen Resonanzen detektiert werden. Gleiches wurde bei der Titration der ODH mit L-Arginin festgestellt. Auch hier war eine Bindung des Liganden an die ODH nicht detektierbar, es verschoben sich keinerlei Resonanzpeaks in den aufgenommenen Spektren (Daten hier nicht dargestellt).

Wurde die ODH vor der Titration mit 3 mmol L⁻¹ NADH abgesättigt, so konnte eine Bindung von L-Arginin nachgewiesen werden. Abbildung 34 zeigt die HSQC-Spektren, die bei Titration der ODH mit L-Arginin aufgenommen wurden. Schrittweise wurde die L-Arginin-Konzentration von 0,075 mmol L⁻¹ bis auf 8 mmol L⁻¹ erhöht. Bei jeder Konzentration wurde ein (¹H-¹⁵N)-TROSY-HSQC-Spektrum aufgezeichnet. Deutlich sind hier die chemischen Verschiebungen zahlreicher Amidresonanzen bei steigender L-Arginin-Konzentration zu beobachten. Ausgewählte Amidresonanzen, die durch Pfeile in Abbildung 34 hervorgehoben sind, wurden für die Bestimmung der Dissoziationskonstante verwendet. In weiteren Experimenten wurde die ODH vor Titration mit Pyruvat mit 3 mmol L⁻¹ NADH abgesättigt. Es ließ sich jedoch keinerlei Bindung des Liganden Pyruvat an den ODH-NADH-Komplex nachweisen.

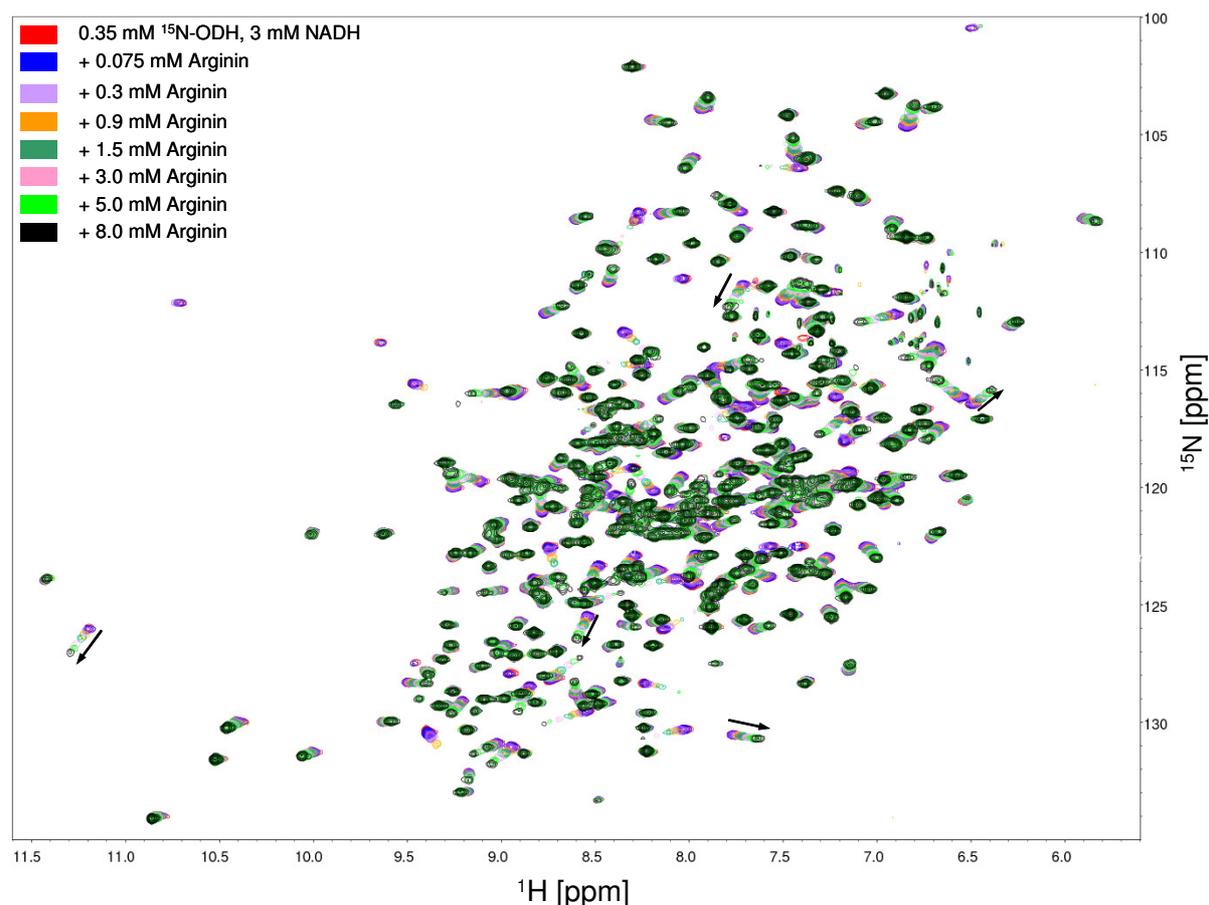


Abb. 34 Überlagerte (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektren von ODH/NADH bei Titration mit L-Arginin. Die Spektren wurden bei 296 K mit einer Protonenresonanz von 800 MHz aufgenommen. Die Ausgangskonzentration der ODH betrug $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Der verwendete Puffer enthielt 50 mmol L^{-1} K-Phosphat pH 6,8, 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT und 6 % (v/v) D_2O . Weiterhin war 3 mmol L^{-1} NADH in der Enzymlösung enthalten. Die L-Arginin-Konzentration wurde in sechs Schritten von $0,075 \text{ mmol L}^{-1}$ (blau) bis auf 8 mmol L^{-1} (schwarz) erhöht. Schwarze Pfeile kennzeichnen diejenigen Resonanzen, die bei der Berechnung der Dissoziationskonstanten verwendet wurden.

Die chemischen Verschiebungen ausgewählter Amidresonanzpeaks wurden dazu benutzt, die Dissoziationskonstanten (K_D) für die Bindung von NADH und NAD^+ an die ODH sowie für die Bindung von L-Arginin an den ODH-NADH-Komplex zu bestimmen. Die chemischen Verschiebungen in der ^1H - und der ^{15}N -Dimension wurden zunächst gemäß Gleichungen 2.5 bis 2.7 normiert und anschließend gegen die Konzentration des Liganden aufgetragen. Die resultierenden Graphen sind in Abbildung 35 dargestellt. Mit Hilfe nicht-linearer Regression wurden die Dissoziationskonstanten bestimmt. Es wurde hierfür das einfachste Bindungsmodell verwendet (One-site saturation, Gleichung 2.9). Für die NADH-Bindung an ODH wurde ein K_D -Wert von $62 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ bestimmt. Als Dissoziationskonstante für den NAD^+/ODH -Komplex wurde ein K_D -Wert von $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ erhalten. Für die Bindung von L-Arginin an den ODH-NADH-Komplex konnte eine Dissoziationskonstante von $4,1 \text{ mmol L}^{-1}$ berechnet werden.

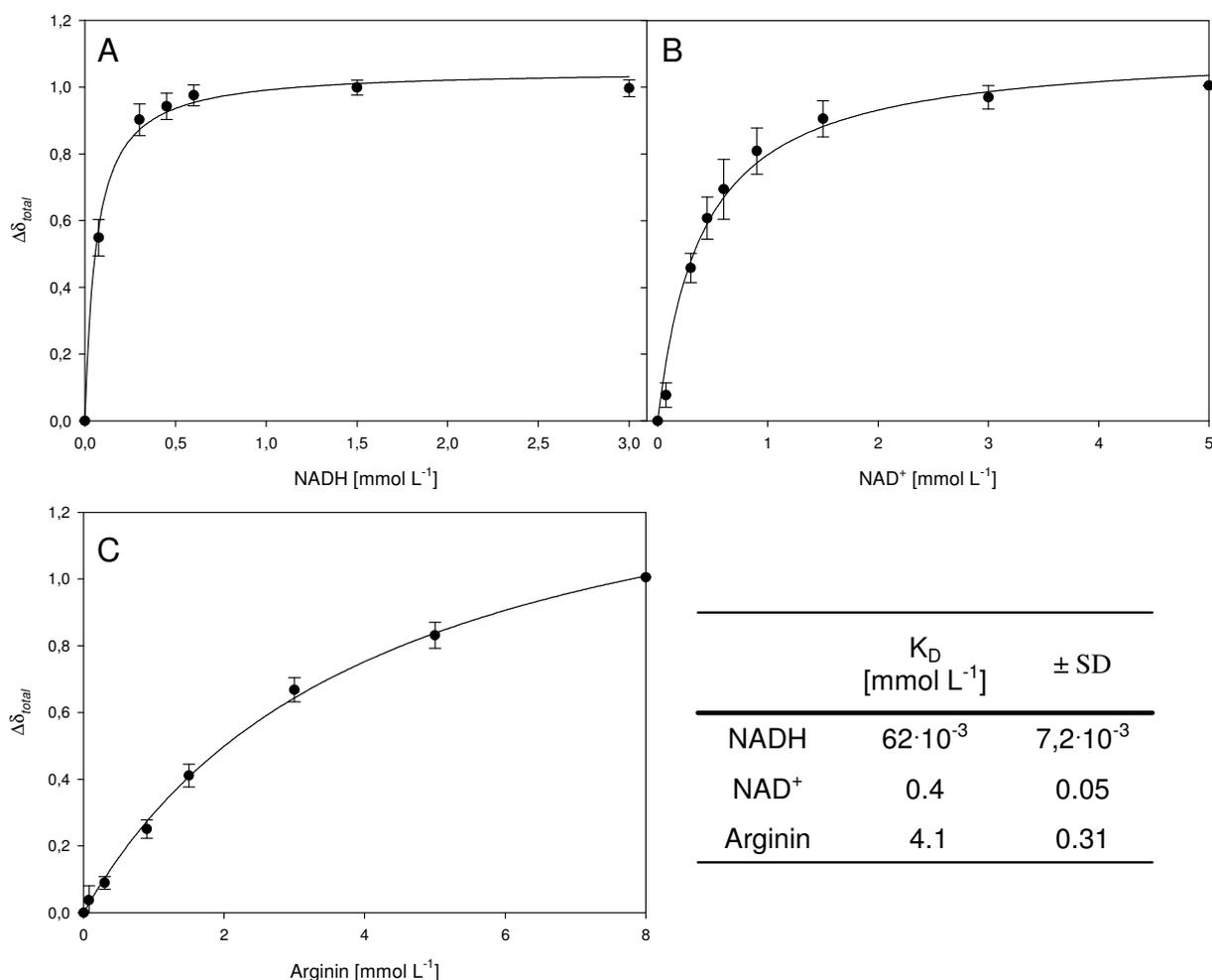


Abb. 35 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D für die Bindung von NADH (A), NAD⁺ (B) und L-Arginin (C) an ODH. Aufgetragen wurde jeweils die normierte chemische Verschiebung ausgewählter Amidresonanzen bei unterschiedlichen Konzentrationen von NADH, NAD⁺ und L-Arginin. Die Dissoziationskonstanten wurden mit Hilfe nicht-linearer Regression berechnet.

3.7 Gerichtete Mutagenese und Charakterisierung der ODH-Mutanten

Da für die ODH noch keine Kristallstrukturen vorhanden sind, ließen sich bis jetzt nur Vermutungen über den möglichen Reaktionsmechanismus und die beteiligten Aminosäuren anstellen. Sequenzvergleiche mit anderen Opindehydrogenasen und mit der bereits kristallisierten bakteriellen CENDH (Britton *et al.*, 1998; Janßen, 2000) zeigen jedoch Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf, die durch gerichtete Mutagenese untersucht wurden. Zum einen sollten so die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren identifiziert werden, zum anderen sollten die für die Substratspezifität verantwortlichen Aminosäuren gefunden werden.

3.7.1 Herstellung der Mutanten

Die Herstellung der Mutanten erfolgte wie unter 2.7 beschrieben. Es wurden jeweils die im Anhang (7.1 Tab. 21) beschriebenen Oligonukleotide verwendet. Positive Klone wurden durch Restriktionsverdau ermittelt. In 70 bis 80 % der erhaltenen Klone war es zu einem erfolgreichen Einbau der Mutation gekommen. Das mutierte ODH-Gen wurde anschließend in den Expressionsvektor pTYBI umklontiert. Der korrekte Einbau der Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt.

3.7.2 Expression und Reinigung der Mutanten

Die Expression und Isolierung der Mutanten wurde wie unter 2.6.2 beschrieben durchgeführt. Nach Aufschluss und Zentrifugation war nicht bei allen Mutanten im Rohextrakt ODH-Aktivität zu detektieren. Deshalb wurden zur Kontrolle der Expression Proben des Rohextraktes und der unlöslichen Fraktion auf einer SDS-PAGE getrennt und die ODH-5His nach Western-Blot durch Immunodetektion des Tags sichtbar gemacht (Abb. 36).

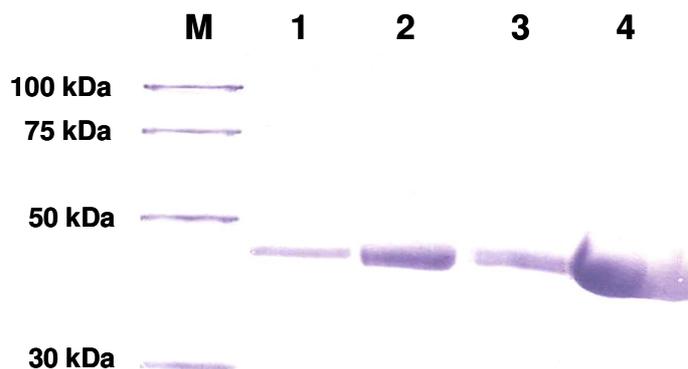


Abb. 36 Western-Blot Analyse mit Immunodetektion des Histidin-Tags nach SDS-PAGE. (M) molekularer Größenmarker. (1) Rohextrakt der Mutante C8A (4,5 µg) (2) unlösliche Fraktion C8A (4 µg) (3) Rohextrakt E252A (6,5 µg). (4) unlösliche Fraktion E252A (7 µg).

In Abbildung 36 ist in allen Spuren eine Bande zu erkennen, die größenmäßig der ODH entspricht. Auffällig ist, dass die ODH-Banden in den Spuren, in denen die lösliche Fraktion des Rohextraktes aufgetragen wurden, schwächer ausgeprägt sind, als die Banden der unlöslichen Fraktionen. Am stärksten ausgeprägt ist die ODH-Bande in der Spur, in der die unlösliche Fraktion der Mutante E252A aufgetragen wurde (Abb. 36, 4).

Die Reinigung der mutierten Proteine erfolgte mit Metallchelataffinitätschromatographie wie unter 2.8.3 beschrieben. Abbildung 37 zeigt beispielhaft den Verlauf einer Ni-NTA-Chromatographie von wildtypischer ODH-5His und ausgewählter Mutanten. Es wurde jeweils der Rohextrakt einer 1L-Kultur auf die Säule aufgetragen. Die Proteinkonzentration lag zwi-

schen 280 (D25N) und 320 mg (C8A). Die Elution der ODH erfolgte ab einer Imidazol-Konzentration von ca. 30 mmol L⁻¹. Diejenigen Fraktionen, die sich unter dem Proteinpeak bei 280 nm befanden (s. Markierung in Abb. 37), wurden vereinigt und anschließend mit Ultrafiltrationseinheiten konzentriert.

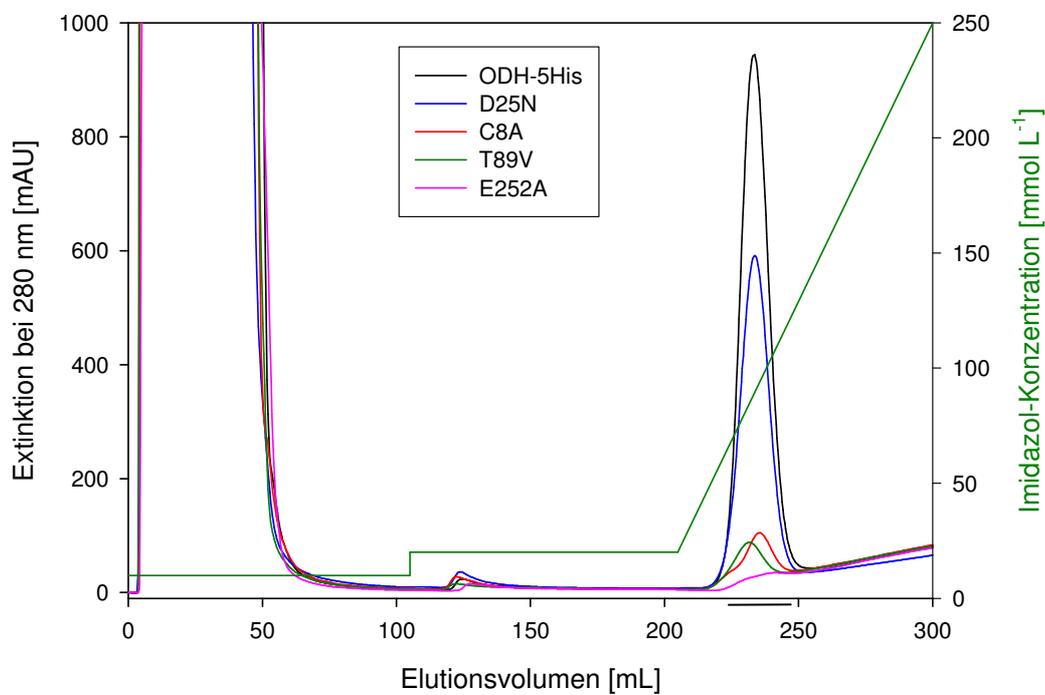


Abb. 37 Elutionsprofile der Ni-NTA-Chromatographie von ODH-5His und ausgewählter ODH-Mutanten. Dargestellt sind Extinktion bei 280 nm und der Verlauf des Imidazol-Gradienten. Aufgetragen wurde jeweils der Rohextrakt, der aus einer 1L-LB-Kultur gewonnen wurde. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 70 mL Lyse-puffer gespült. In den nächsten 100 mL der Elution wurde die Imidazol-Konzentration im Eluenten auf 20 mmol L⁻¹ erhöht. Die Elution der ODH erfolgte durch einen linearen Imidazol-Gradienten (20-250 mmol L⁻¹) mit einer Länge von 100 mL. Die vereinigten Fraktionen sind durch einen Strich gekennzeichnet.

Der Proteinpeak ist bei verschiedenen Mutanten unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei wildtypischer ODH-5His erreicht der Peak noch eine Höhe von ca. 900 mAU. Bei der Mutante D25N ist er schon auf 600 mAU reduziert. Bei den Mutanten C8A und T89V wurde lediglich ein Proteinpeak mit einer Höhe von ca. 100 mAU detektiert. Bei der Mutante E252A ist ein Peak nur zu erahnen. Es konnte jedoch bei allen Mutanten im Eluat der Metallchelataffinitätschromatographie ODH-Aktivität detektiert werden. Einen Überblick über den Reinigungserfolg der verschiedenen Mutanten gibt Tabelle 13.

Es konnten 10.500 U wildtypische ODH aus einer 1L-Kultur gewonnen werden. Bei einem Proteingehalt von ca. 18 mg ergab sich eine spezifische Aktivität von 590 U mg⁻¹. Im Eluat nach Ni-NTA-Chromatographie waren bei C382G zum Beispiel nur 856 U zu messen, der Proteingehalt betrug lediglich 5,3 mg. Hier ergab sich lediglich eine spezifische Aktivität

von 161 U mg⁻¹. Je nach Mutante konnten aus einer 1L LB-Kultur nach Reinigung mit Ni-NTA zwischen 0,5 mg (E252A) und 22,6 mg (C264G) Protein erhalten werden.

Tab. 13 Übersicht des Reinigungserfolges. Dargestellt sind die Ausbeuten einer 1 L-Kultur nach Metallchelataffinitätschromatographie mit Ni-NTA für die beiden wildtypischen Enzyme (ODH A und B) und die ODH-Mutanten.

Probe	Volumen [mL]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]	spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	spez. Akt _{Mut} /spez. Akt _{WT} [%]
ODH A	1	10371	10371	17,3	17,3	599,5	100
ODH B	1,1	10176	11193	17,6	19,36	578,2	
R324A	2	226	452	7,5	15,00	30	5
D329A	3,2	85	272	4,6	14,72	18,5	3
H212A	2,1	11	22	1,6	3,36	6,6	1
T89A	15	578	8667	1,2	18	481	82
T89V	1	605	605	1,6	1,6	378	64
Q118A	1,1	679	747	4,3	4,7	158	27
Q118D	2,4	138	331	1,9	4,6	72,8	12
Y208A	1,6	4032	6450	12	19,2	336	57
H308G	2,1	89	187	2,6	5,46	34,2	6
D25N	2,2	3822	8408	7,59	16,70	504	86
D37A	1,3	660	858	2,1	2,73	314	53
D37N	2,5	1509	3772	3,43	8,58	440	75
D37S	1,6	1420	2272	2,91	4,66	488	83
R41A	1,4	2530	3542	4,4	6,16	575	98
H95G	2,2	541	1191	1,14	2,51	475	81
C148A	1,9	1072	2036	2,72	5,2	394	67
C148S	7,5	516	3871	1,37	10,3	377	64
E252A	25	120	3000	0,0205	0,51	475	81
D369N	2	5708	11416	11,3	22,6	505	86
C6A	1,5	921	1382	2,3	3,5	400	68
C8A	1,4	443	620	1,5	2,1	295	50
C125A	2,5	591	1478	1,27	3,2	466	79
C249A	13	448	5826	1,1	14,3	407	69
C253A	4,5	309	1392	0,78	3,51	397	67
C264G	1,8	6461	11629	12,4	22,3	521	88
C382G	2,8	306	856	1,9	5,32	161	27

Die spezifischen Aktivitäten variierten von 6,6 U mg⁻¹ (H212A) bis 575 U mg⁻¹ (R41A). Bei den Mutanten R324A, D329A, H212A, Q118A, Q118D, H308 und C382G war die spezifische Aktivität deutlich gegenüber dem Wildtyp erniedrigt. Bei den anderen Mutanten variierte die spezifische Aktivität zwischen 350 und 590 U mg⁻¹.

Zur Kontrolle der Reinheit wurden Proben der Mutanten nach Ni-NTA-Chromatographie gelelektrophoretisch untersucht (Abb. 38). Aufgetragen wurden Proben von ODH-5His (1), C264G (2), H95G (3), D369N (4), Q118A (5), H308G (6), und C148S (7). In der Coomassie-Färbung zeigte sich bei allen Proben nur eine Bande mit einem rf-Wert von 0,59. Größtmäßig entsprachen die Banden der ODH. Der Reinigungserfolg war ausreichend, um die Mutanten für kinetische Untersuchungen zu verwenden.

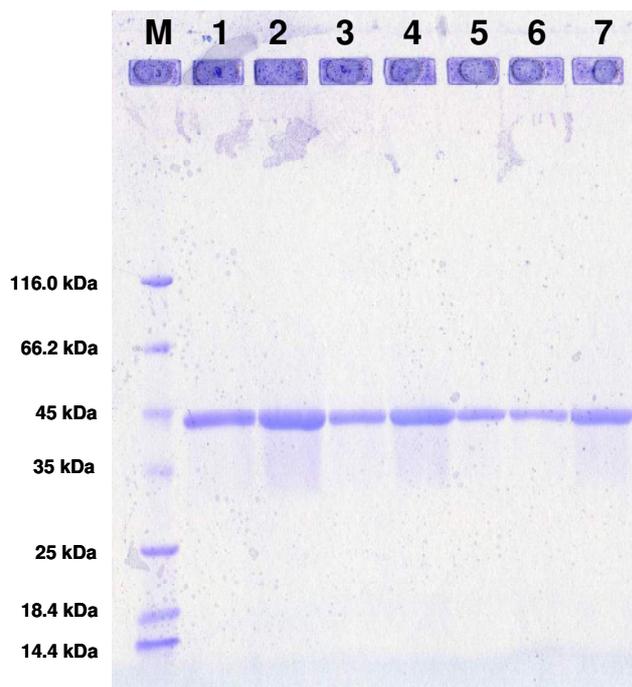


Abb. 38 SDS-Gelelektrophorese verschiedener Mutanten nach Ni-NTA-Chromatographie. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. (M) molekularer Größenmarker. (1) ODH-5His (6,8 µg). (2) C264G (10 µg) (3) H95G (3,4 µg) (4) D369N (5 µg) (5) Q118A (3,3 µg) (6) H308G (3 µg) (7) C148S (4,8 µg).

Weiterhin wurden die Mutanten-Enzyme auch auf einer nativen PAGE untersucht. Die Proteine wurden im Gel durch Anfärben mit Coomassie sichtbar gemacht (Abb. 39 B). Zusätzlich erfolgte ein spezifischer Nachweis der ODH mit einer Aktivitätsfärbung (Abb. 39 A). Außerdem wurde die ODH durch Immunodetektion des His-Tags im Western-Blot sichtbar gemacht. In den Spuren, in denen Proben von ODH-5His, H95G, Q118A, T89V und C264G aufgetragen wurden ist in der Aktivitätsfärbung jeweils eine ODH-Bande mit einem rf-Wert von 0,56 zu erkennen. In Spur 2 (D25N) ist eine Bande mit einem rf-Wert von 0,54 zu erkennen. Zusätzlich finden sich oberhalb noch weitere Aktivitätsbanden (rf-Werte 0,46, 0,41, 0,37,...). Die Spur, in der eine Probe von R41A aufgetragen wurde, zeigte in der Aktivitätsfärbung eine deutliche ODH-Bande mit einem rf-Wert von 0,58. Weiterhin war hier auch eine schwach ausgeprägte Satellitenbande zu detektieren (Pfeile in Abb. 39). Zusätzlich waren oberhalb der Haupt-Bande auch schwächere Banden mit rf-Werten von 0,46, 0,41 und 0,37 zu

erkennen. Alle in der Formazanfärbung sichtbaren Banden konnten auch durch Anfärben mit Coomassie detektiert werden. Zusätzlich sind hier in allen Proben Banden mit einem rf-Wert von 0,54 zu erkennen. Bei Q118A, D25N und R41A sind zusätzlich oberhalb weitere Banden angefärbt worden (rf-Werte 0,46, 0,41, 0,37,...). Wie die Immunodetektion des His-Tags zeigt, handelt es sich offenbar bei allen sichtbaren Banden um ODH.

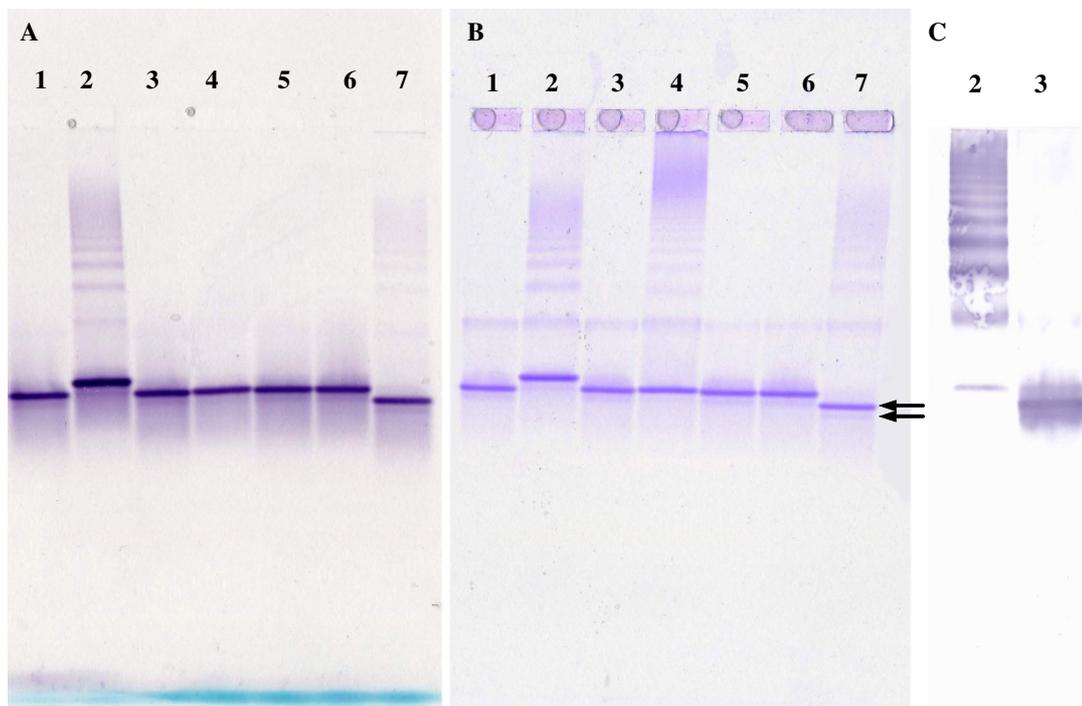


Abb. 39 Native PAGE mit verschiedenen ODH-Mutanten. Die im Gel getrennten Proteine wurden durch Aktivitätsfärbung (A), Coomassiefärbung (B) oder durch Immunodetektion des His-Tags (C) sichtbar gemacht. (1) ODH-5His (2) D25N (3) H95G (4) Q118A (5) T89V (6) C264G (7) R41A. Es wurden zwischen 2,5 und 3,5 μg aufgetragen.

3.7.3 Auswahl der Aminosäurereste für die Mutagenese

Zur Identifizierung geeigneter Reste für die Mutagenese wurde zuerst die Proteinsequenz der ODH mit anderen Opindehydrogenasen verglichen. Neben der Octopindehydrogenase aus den Mollusken *Pecten maximus*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Loligo vulgaris*, *Loligo opalescens*, *Sepia officinalis* und *Pseudocardium sachalinensis*, der Tauropindehydrogenase aus dem Seeohr *Haliotis discus hanai* und aus dem Anneliden *Arabella irricolor* wurden weiterhin die Carboxyethylnorvalindehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec* (Q44297), sowie eine mögliche Alanopindehydrogenase aus *Fusitriton oregonensis* (AB218692) für den Sequenzvergleich herangezogen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Clustal W untereinander verglichen. Das vollständige Alignment findet sich im Anhang (7.5).

31 Positionen (7,7 %) waren in allen zehn Sequenzen identisch. An 53 Positionen (13,1 %) sind die Aminosäuren ähnlich, an 27 Positionen (6,7 %) finden sich weniger ähnliche Aminosäuren. Betrachtet man lediglich die tierischen Sequenzen, so sind die Aminosäuren an 75 Stellen identisch (18,5 %), an 85 Positionen (20,8 %) ähnlich und an 28 Positionen weniger ähnlich (6,9 %).

3.7.4 Bedeutung der Aminosäuren Histidin 212, Arginin 324 und Aspartat 329

Von der Laktatdehydrogenase ist bekannt, dass sich in ihrem aktiven Zentrum ein so genanntes DXXR-Motiv findet. Zusammen mit einem konservierten Histidin wird eine Histidin-Aspartat-Arginin-Triade gebildet, die den Transfer des Hydridions vom NADH auf Pyruvat ermöglicht. Die Opindehydrogenasen katalysieren eine ähnliche Reaktion, allerdings lässt sich in ihren Aminosäuresequenzen kein solches Motiv finden (Britton *et al.*, 1998; Janßen, 2000). Aus Arbeiten von Thomé-Beau (1971 und 1973) und Olomucki (1975) ist jedoch bekannt, dass auch bei der ODH ein Histidyl- und ein Carboxylrest am Reaktionsmechanismus beteiligt sein müssen. In Abbildung 40 sind die drei Reste dargestellt, welche die Aufgabe einer Triade in den Opindehydrogenasen übernehmen könnten.

P. maximus	FVHPAILFGRWGS 222	FGNRYLTEDIPMGIVFKGVA 341
M. yessoensis	FVHPAILYGRWGS 222	FGNRYLTEDIPMGIVFKGVA 341
L. vulgaris	VVHPMMYGTWKD 232	FTYRYMTEDIPFGMVVFRGIA 352
L. opalescens	VVHPMMYGTWKD 231	FTYRYMTEDIPFGMVVFRGIS 351
S. officinalis	VVHPMMYGTWKD 232	FNYRYMTEDIPFGMVVFRGIA 352
H. discus hanai	IIEPPIIMYGKWKD 228	FRYRYLTEDVPNGLVVTKGLA 348
F. oregonensis	IIVHPPLMYGRWKD 225	FGYRYLAEDIPFGLVVTKGLA 345
A. irricolor	MLHPSIMYNRWHD 223	FTGRYFGEDIPFGLAVTRGIA 343
P. sachalinensis	TVHPPLMYAKWKN 231	FKYRYLMEDVPYGLLIKQIA 351
A. spec	VMHPLPTLLNAAR 212	LNTRYFFEDVSTGLVPLSELG 309
	: **	: ** : ** : * :

Abb. 40 Ausschnitt aus einem Proteinalignment verschiedener Opindehydrogenasen. Bei den verwendeten Sequenzen handelt es sich um die Octopindehydrogenase aus *Pecten maximus* (AJ237916), *Mizuhopecten yessoensis* (AB085183), *Loligo vulgaris* (AJ250884), *Loligo opalescens* (AJ278691), *Sepia officinalis* (AJ250885) und *Pseudocardium sachalinensis* (AB197036), die Tauropindehydrogenase aus *Arabella irricolor* (AB081841) und *Haliotis discus hanai* (AB085184), die Carboxyethylnorvalindehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec* (Q44297), sowie um eine mögliche Alanopindehydrogenase aus *Fusitriton oregonensis* (AB218692). Die für die Mutagenese ausgewählten Aminosäuren sind (▼) markiert.

Es handelt sich hierbei um Histidin 212 (Pecten-Nummerierung), Arginin 324 und Aspartat 329. Diese Aminosäuren sind in allen zehn untersuchten Spezies konserviert. Die drei Aminosäuren wurden jeweils gegen Alanin ausgetauscht, die resultierenden mutierten Enzyme in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt.

3.7.4.1 Kinetische Charakterisierung der ODH-Mutanten R324A, D329A und H212A

Mit Hilfe des optisch-enzymatischen Tests wurde die spezifische ODH-Aktivität der unterschiedlichen Mutanten bei variierenden Konzentrationen eines Substrats (Pyruvat, L-Arginin, bzw. NADH) ermittelt. Für die Analyse der Daten wurde zunächst die spezifische Aktivität gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Michaelis-Menten-Diagramm, Abbildung 41.1 A-C und Abb. 41.2 D-I). Wurde die spezifische Aktivität gegen die NADH-Konzentration aufgetragen, so zeigen die resultierenden Graphen bei allen drei Mutanten einen hyperbolischen Verlauf (Abb. 41.1).

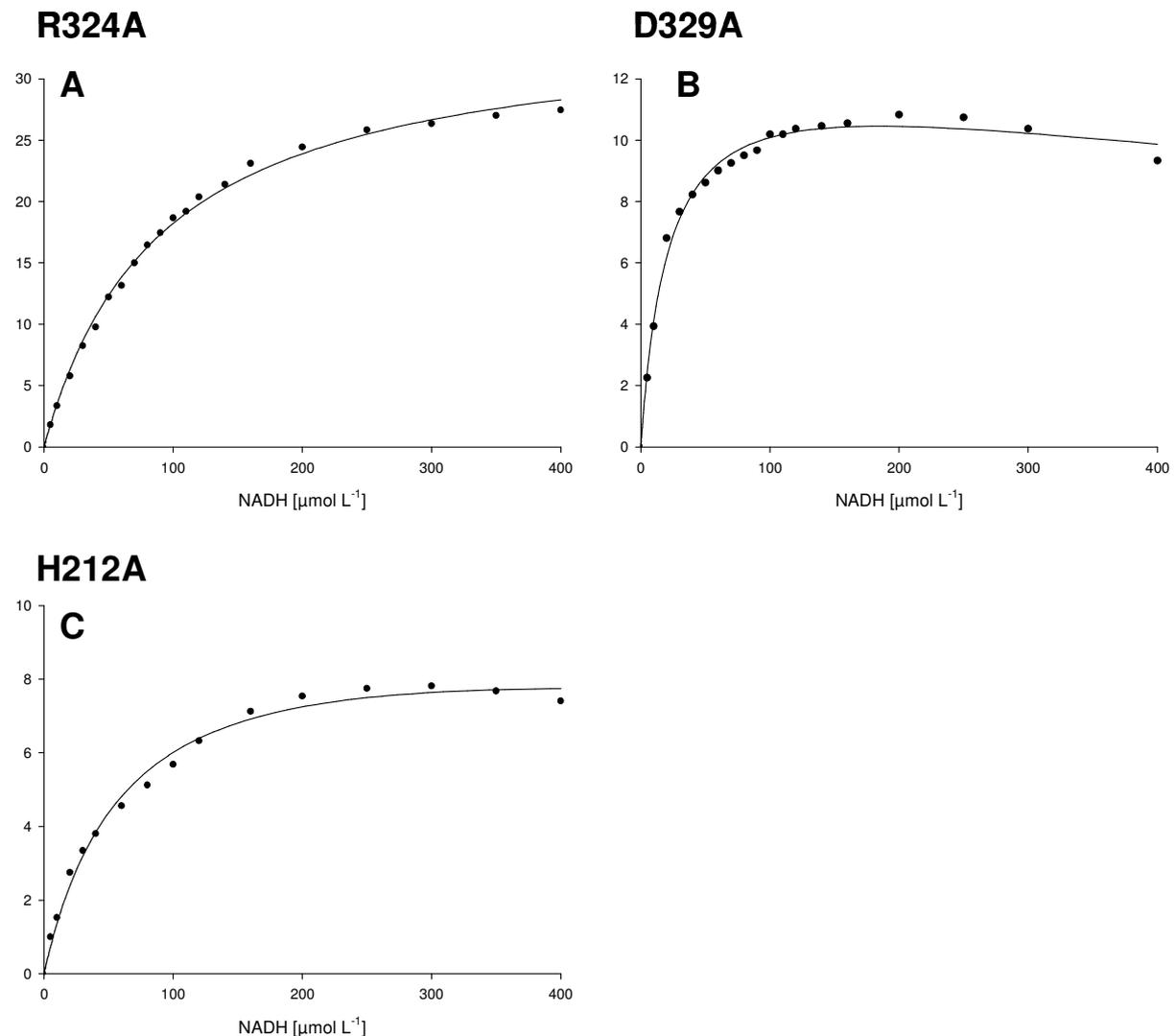


Abb. 41.1 Michaelis-Menten-Diagramme der ODH-Mutanten R324A, D329A und H212A. Aufgetragen wurde jeweils die spezifische ODH-Aktivität in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration (A, B, C). Die Messungen wurden in einem 50 mmol L⁻¹ TRA-Puffer pH 7.0 durchgeführt. Die Testansätze enthielten NADH-Konzentrationen zwischen 5 und 400 μmol L⁻¹ und zusätzlich (A), 250 mmol L⁻¹ Pyruvat und 400 mmol L⁻¹ L-Arginin. (B) Die Pyruvat-Konzentration im Ansatz betrug 100 mmol L⁻¹. Es wurden 400 mmol L⁻¹ L-Arginin verwendet. (C) Die Messungen wurden mit 100 mmol L⁻¹ Pyruvat und 200 mmol L⁻¹ L-Arginin durchgeführt.

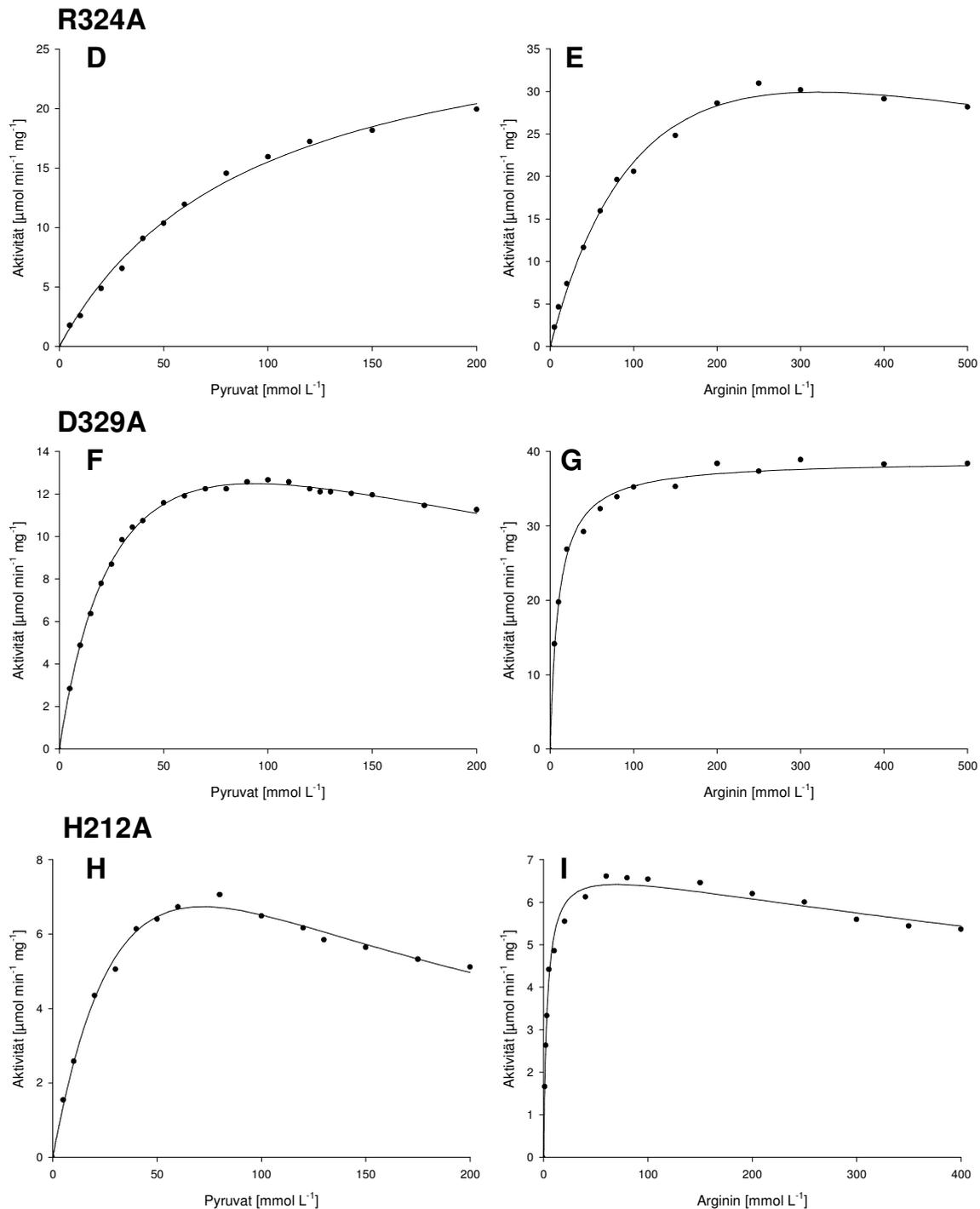


Abb. 41.2 Michaelis-Menten-Diagramme der ODH-Mutanten R324A, D329A und H212A. Aufgetragen wurde jeweils die spezifische ODH-Aktivität in Abhängigkeit von der Pyruvat- (**D, F, H**) bzw. L-Arginin-Konzentration (**E, G, I**). Die Messungen wurden in einem 50 mmol L⁻¹ TRA-Puffer pH 7.0 durchgeführt. (**D**) Die Pyruvat-Konzentration wurde zwischen 5 und 200 mmol L⁻¹ variiert. Die NADH-Konzentration im Testansatz betrug 0.16 mmol L⁻¹. Gestartet wurde die Reaktion mit 400 mmol L⁻¹ L-Arginin. (**E**) Die L-Arginin-Konzentration wurde zwischen 10 und 500 mmol L⁻¹ variiert. Die NADH-Konzentration betrug 0.16 mmol L⁻¹. Es wurden 250 mmol L⁻¹ Pyruvat eingesetzt. (**F**) Die Pyruvat-Konzentration im Testansatz wurde zwischen 5 und 200 mmol L⁻¹ variiert. Die NADH-Konzentration betrug 0.16 mmol L⁻¹. Gestartet wurde die Reaktion mit 400 mmol L⁻¹ L-Arginin. (**G**) Der Testansatz enthielt L-Arginin-Konzentrationen zwischen 5 und 500 mmol L⁻¹, 100 mmol L⁻¹ Pyruvat und 0.16 mmol L⁻¹ NADH. (**H**) Die Pyruvat-Konzentration wurde zwischen 5 und 200 mmol L⁻¹ variiert. Die NADH-Konzentration im Testansatz betrug 0.16 mmol L⁻¹ und die L-Arginin-Konzentration 200 mmol L⁻¹. (**I**) Die L-Arginin-Konzentration wurde zwischen 5 und 500 mmol L⁻¹ variiert. Die NADH-Konzentration im Testansatz betrug 0.16 mmol L⁻¹. Es wurden 100 mmol L⁻¹ Pyruvat eingesetzt.

Mit zunehmender NADH-Konzentration stieg die spezifische Aktivität auf 26 U mg⁻¹ (R324A), 11 U mg⁻¹ (D329A) bzw. 8 U mg⁻¹ (H212A) an. Durch nicht-lineare Regression ließ sich der K_m-Wert für NADH bestimmen. Er beträgt für die Mutante R324A 90 μmol L⁻¹ (4,6 fach erhöht gegenüber dem Wildtyp), für D329A 21 μmol L⁻¹ (ungefähr gleich) und für H212A 65 μmol L⁻¹ (3,3 fach erhöht). Weiterhin war die Wechselzahl der Muteine gegenüber der wildtypischen ODH drastisch reduziert. Sie betrug 7,3 s⁻¹ (H212A), 9,3 s⁻¹ (D329A) und 25 s⁻¹ (R324A). Der Verlust an Übergangszustandsstabilisierungsenergie (ΔΔG) liegt bei allen drei Mutanten zwischen 14 und 17,4 kJ mol⁻¹. Tabelle 14 fasst die berechneten Werte zusammen.

Tab. 14 Kinetische Parameter verschiedener ODH-Mutanten. Die Tabelle enthält die durch nicht-lineare Regression berechneten Werte für V_{max} und den K_m-Wert, sowie die errechnete Wechselzahl (k_{cat}), die katalytische Effizienz, die Übergangszustandsstabilisierungsenergie (ΔG) und der Verlust derselben (ΔΔG), bedingt durch die Mutation. Untersucht wurden die Mutanten H212A, R324A und D329A.

		V _{max} [μmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	K _m [mmol L ⁻¹]	K _m Mut/ K _m Wt	K _i [mmol L ⁻¹]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [Lmol ⁻¹ S ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]	ΔΔG [kJ mol ⁻¹]
Pyruvat	R324A	30	92	119	-	21,5	2,34·10 ²	13,5	-20,7
	D329A	21	33	43	263	15,4	4,64·10 ²	15,2	-19,0
	H212A	18	59	77	87	12,9	2,17·10 ²	13,3	-29,7
Arginin	R324A	60	159	300	645	43,0	2,7·10 ²	13,8	-20,8
	D329A	39	9,8	18	-	28,0	2,85·10 ³	19,6	-14,9
	H212A	7	3,5	6,6	1381	5,1	1,47·10 ³	18,0	-24,7
NADH	R324A	35	90	4,6	-	25,0	2,77·10 ⁵	31,0	-17,4
	D329A	13	21	1,1	-	9,3	4,34·10 ⁵	32,1	-16,3
	H212A	10	65	3,3	-	7,3	1,13·10 ⁵	28,7	-14,0

In Abhängigkeit von der Pyruvat-Konzentration steigt die spezifische Aktivität bei allen drei Mutanten an. Lediglich bei D329A und bei H212A ist eine Inhibition mit zunehmender Substratkonzentration zu erkennen. In beiden Fällen nimmt die Aktivität nach einem Maximum bei ca. 100 mmol L⁻¹ Pyruvat (D329A: 12 U mg⁻¹; H212A 7 U mg⁻¹) wieder ab. Bei der Mutante R324A steigt die Aktivität bis auf 20 U mg⁻¹ bei 200 mmol L⁻¹ Pyruvat an. Für Pyruvat wurden K_m-Werte bestimmt, die zwischen 33 mmol L⁻¹ (D329A, 43 fach erhöht gegenüber dem Wildtyp) und 92 mmol L⁻¹ (R324A, 119 fach erhöht) liegen. Weiterhin ist die Wechselzahl gegenüber der wildtypischen ODH drastisch reduziert. Sie beträgt 12,9 s⁻¹ bei der Mutante H212A, 15,4 s⁻¹ (D329A) bzw. 21,5 s⁻¹ (R324A). Der Verlust an Übergangszustandsstabilisierungsenergie (ΔΔG) liegt bei allen drei Mutanten zwischen 19 und 29,7 kJ mol⁻¹. Für D329A und H212A wurden Inhibitionskonstanten von 87 mmol L⁻¹ bzw. 263 mmol L⁻¹ Pyruvat bestimmt.

3.7.5 Bedeutung von Cystein-Resten

Die ODH aus *Pecten maximus* enthält acht Cysteine. Aus den Arbeiten von Sheikh und Katiyar (1993a und b, 1994) ist bekannt, das mindestens ein Cystidyl-Rest an der Reaktion der ODH beteiligt sein muss. Diese Erkenntnisse wurden durch Inhibitionsstudien mit Cystein-modifizierenden Reagenzien gewonnen. Durch die Technik der gerichteten Mutagenese war es möglich, gezielt Cysteine gegen Alanin bzw. Glycin auszutauschen, um ihre Bedeutung für die Reaktion der ODH zu untersuchen. Abbildung 42 zeigt einen Ausschnitt aus einem Proteinalignment verschiedener Opindehydrogenasen.

P. maximus	VKVCVCGGG 11	PWACRIK 151
M. yessoensis	LKVCVCGGG 11	PWACRIK 151
L. vulgaris	IKLLICGGG 20	PWACRIG 160
L. opalescens	VKLLVCGGG 19	PWACRIG 159
S. officinalis	INLLVCGGG 20	PWACRIG 160
H. discus hannai	ITVLVCGGG 13	PWACRIA 156
F. oregonensis	LTVCVCGGG 13	PWACRIL 153
A. irricolor	VVLTICGGG 10	PWACRIK 150
P. sachalinensis	CNITIFGGG 17	PWACRIA 157
A. spec	KTYAVLGLG 13	LFTCRSE 144
	: * *	::**

Abb. 42 Ausschnitte aus einem Proteinalignment verschiedener Opindehydrogenasen. Bei den verwendeten Sequenzen handelt es sich um die Octopindehydrogenase aus *Pecten maximus*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Loligo vulgaris*, *Loligo opalescens*, *Sepia officinalis* und *Pseudocardium sachalinensis*, die Tauropindehydrogenase aus *Arabella irricolor* und *Haliotis discus hannai*, die Carboxyethylnorvalindehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec*, sowie möglicherweise um eine Alanopindehydrogenase aus *Fusitriton oregonensis*. Die für die Mutagenese ausgewählten Aminosäuren sind markiert (▼).

Drei der acht Cysteine, die in der ODH vorkommen, sind dort zu erkennen. Ein Cystein (C148, *Pecten*-Nummerierung) ist in allen zehn untersuchten Opindehydrogenasen enthalten. Dieses Cystein wurde gegen Serin und gegen Alanin ausgetauscht. Das Cystein an Position 8 findet sich in fast allen tierischen Opindehydrogenasen. Nur bei *Pseudocardium sachalinensis* ist ein Phenylalanin an dieser Position zu finden. Cystein 8 wurde ebenfalls gegen Alanin ausgetauscht. Weiterhin wurden die sechs übrigen Cysteine der ODH aus *Pecten maximus* entweder zu Alanin oder zu Glycin mutiert.

3.7.5.1 Bestimmung des Cysteingehaltes der ODH

Die Anzahl an Cysteinen, die im nativen Zustand für eine Modifikation mit DTNB zugänglich sind, wurden durch Inkubation der ODH mit DTNB bestimmt. Die Thiolgruppe der Cysteine kann mit dem Reagenz zu einem gemischten Disulfid reagieren wobei äquivalente Mengen an 5-Thio-2-nitrobenzoat freigesetzt werden. Aus dem Extinktionsanstieg bei 412 nm ließ sich die Anzahl der modifizierten Cysteine berechnen. Wie in Abbildung 43 zu erkennen ist, reagierte in der nativen ODH ein Cystein-Rest mit DTNB. Nach zehnminütiger Inkuba-

tionszeit war kein weiterer Extinktionsanstieg zu verzeichnen. Wurde die ODH vor Zugabe von DTNB durch 8 M Harnstoff denaturiert, so reagierten acht Cysteine mit DTNB zu einem gemischten Disulfid. Da DTNB keine Disulfidbrücken spalten kann und insgesamt acht Cysteine in der ODH enthalten sind, scheinen keine Cysteine disulfidverbrückt vorzuliegen. Dies bestätigt wiederum eine Vorhersage, die ausgehend von der Aminosäuresequenz der ODH, mit dem Programm Disulfind (Ceroni, 2006; <http://disulfind.dsi.unifi.it/>) erstellt wurde. Wurde die Mutante C148S mit DTNB inkubiert, so waren im nativen Enzym keine reaktiven Cystein-Reste nachweisbar. In der denaturierten Form konnten sieben Cysteine nachgewiesen werden, was mit der Anzahl der in der Mutante enthaltenen Cysteine in Einklang steht.

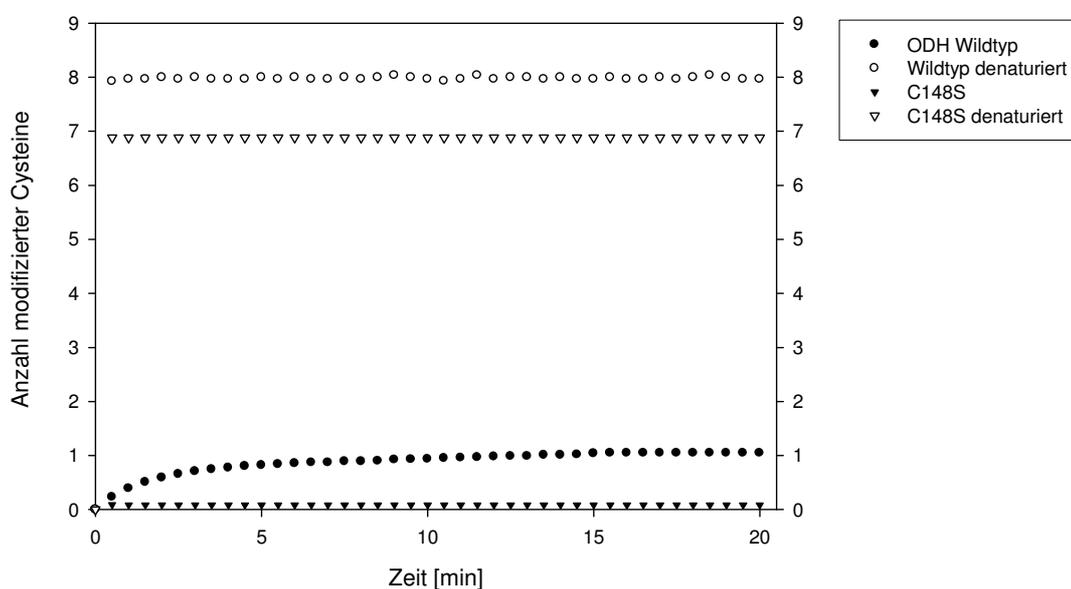


Abb. 43 Bestimmung des Cysteingehaltes der ODH. Aufgetragen wurde die Anzahl der durch DTNB modifizierten Cysteine gegen die Reaktionszeit. Sowohl für den Wildtyp, als auch für die C148S-Mutante wurde die Cysteinanzahl im nativen und im denaturierten Zustand bestimmt.

3.7.5.2 Inhibition der ODH durch thiolmodifizierende Reagenzien

Es wurde weiterhin untersucht, ob thiolmodifizierende Reagenzien zu einer Inhibition der ODH führen. Hierzu wurden wildtypische ODH und verschiedene Cystein-Mutanten sowohl mit 4 mmol L^{-1} DTNB als auch mit $0,16 \text{ mmol L}^{-1}$ p-Chlormercuribenzoat (PCMB) oder Iodacetamid (IAA; 5 und 10 mmol L^{-1}) bei $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und die Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmt (Abb. 44). Bei Inkubation mit DTNB nahm die ODH-Aktivität innerhalb von 100 Minuten bis auf 20 % der Ausgangsaktivität ab. Nach 300 Minuten war keine ODH-Aktivität mehr nachweisbar. Im Vergleich dazu zeigte die Mutante C148S einen sehr viel geringeren Aktivitätsverlust. Nach 100 minütiger Inkubation waren noch 90 %

der Ausgangsaktivität vorhanden. Am Versuchsende nach 420 Minuten war immer noch eine Aktivität von 80 % gegenüber dem Anfangswert zu verzeichnen. Als Kontrolle wurde sowohl wildtypische, als auch C148S-ODH über sieben Stunden ohne Zugabe von DTNB inkubiert. Bei beiden Kontrollen war nach siebenstündiger Inkubation lediglich ein Aktivitätsverlust zwischen 5 und 10 % festzustellen.

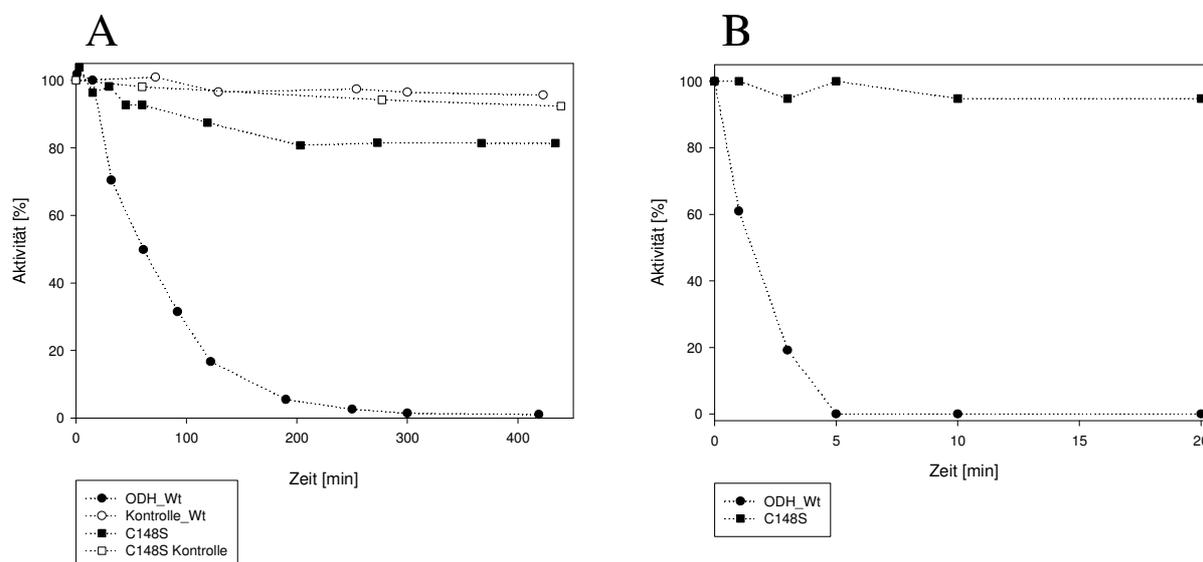


Abb. 44 Inhibition der ODH durch thiolmodifizierende Reagenzien. Dargestellt ist die Aktivität der ODH und der Mutante C148S in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit (A) 4 mmol L⁻¹ DTNB und (B) 0,16 mmol L⁻¹ p-Chlormercuribenzoat (PCMB). Der Versuch wurde bei 25 °C durchgeführt. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Aktivität der ODH und der Mutante C148S ohne Inkubation mit DTNB im zeitlichen Verlauf bei 25 °C bestimmt.

Wurde ODH mit PCMB inkubiert, so war schon nach fünf Minuten keine ODH-Aktivität mehr nachweisbar. Bei der C148S-Mutante war nach einer 20 minütigen Inkubation mit PCMB keinerlei Aktivitätsverlust festzustellen. Ein Austausch der Aminosäure C148 gegen Alanin führte zu den gleichen Ergebnissen, wie der Austausch durch Serin. Nach siebenstündiger Inkubation mit DTNB konnten noch 85 % der Ausgangsaktivität der ODH detektiert werden. Durch PCMB ließ sich keine Hemmung der Reaktion hervorrufen. Nach 30 Minuten war hier noch die vollständige Aktivität nachweisbar. Alle anderen Cystein-Mutanten (C6A, C8A, C125A, C249A, C253A, C264G und C382G) konnten durch DTNB und PCMB genau wie das wildtypische Enzym gehemmt werden. Mit dem alkylierenden Reagenz Iodacetamid konnte die ODH nicht gehemmt werden.

Für die kinetische Analyse der Cystein-Mutanten wurde zunächst die spezifische ODH-Aktivität bei variierenden Konzentrationen eines Substrats (Pyruvat, L-Arginin, bzw. NADH) ermittelt. Anschließend wurden die kinetischen Parameter durch nicht-lineare Re-

gression berechnet (Tab. 15). Bei der Mutante C148 konnte sowohl bei Austausch gegen Serin, als auch bei Austausch gegen Alanin, ein erhöhter K_m für Pyruvat (2,5 bzw. 2,6 mmol L⁻¹) festgestellt werden (ca. dreifach erhöht gegenüber dem Wildtyp).

Auch für L-Arginin und für NADH wurden erhöhte Michaelis-Konstanten bestimmt, die bei beiden Mutanten ähnliche Werte erreichten (K_m L-Arginin 1,6 bzw. 1,7 mmol L⁻¹ und K_m NADH 40 bzw. 38,9 μ mol L⁻¹). Mit der Erhöhung der K_m -Werte für Pyruvat und L-Arginin ging ebenfalls ein starker Anstieg der Inhibitionskonstante K_i einher. Der K_i für Pyruvat war gegenüber dem Wildtyp um das sechsfache erhöht und lag bei 41 mmol L⁻¹ Pyruvat. Für L-Arginin wurde ein K_i von ca. 185 mmol L⁻¹ ermittelt, der somit ungefähr achtfach gegenüber dem Wildtyp erhöht war. Die Effizienz (k_{cat}/K_m) der beiden C148-Mutanten war gegenüber unmutierter ODH geringfügig reduziert. Die Energie zu Stabilisierung des Übergangszustandes (ΔG) war bei Verwendung von NADH um 2,8 kJ mol⁻¹ gegenüber dem Wildtyp reduziert. Auch für L-Arginin ($\Delta\Delta G$ -3,8 kJ mol⁻¹) und Pyruvat ($\Delta\Delta G$ -4,1 kJ mol⁻¹) konnte ein Verlust der Übergangszustandsstabilisierungsenergie festgestellt werden.

Tab. 15 Kinetische Parameter der Cystein-Mutanten. Die Tabelle enthält die durch nicht-lineare Regression berechneten Werte für V_{max} und den K_m -Wert, sowie die errechnete Wechselzahl (k_{cat}), die katalytische Effizienz und die Stabilisierungsenergie des Übergangszustandes (ΔG). Untersucht wurden die ODH-Mutanten C148A, C148S, sowie C6A, C8A, C125A, C249A, C253A, C264G und C382G.

		V_{max} [μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹]	K_m [mmol L ⁻¹]	K_m Mut/ K_m Wt	K_i [mmol L ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [Lmol ⁻¹ s ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]	$\Delta\Delta G$ [kJ mol ⁻¹]
C148A	Pyruvat	691	2,5	3,2	41	499	$1,98 \cdot 10^5$	30,1	-4,1
	Arginin	615	1,6	3,0	192	444	$2,73 \cdot 10^5$	30,9	-3,7
	NADH	585	40,3	2,1	-	422	$1,05 \cdot 10^7$	39,9	-2,8
C148S	Pyruvat	709	2,6	3,4	38	511	$1,97 \cdot 10^5$	30,1	-4,1
	Arginin	618	1,7	3,2	176	446	$2,68 \cdot 10^5$	30,9	-3,8
	NADH	568	38,9	2,0	-	410	$1,05 \cdot 10^7$	39,9	-2,8
C6A	Pyruvat	651	0,77	1,00	8,8	470	$6,11 \cdot 10^5$	32,9	-1,3
	Arginin	541	0,63	1,2	28	390	$6,20 \cdot 10^5$	32,9	-1,7
	NADH	428	13,6	0,70	-	309	$2,27 \cdot 10^7$	41,8	-0,9
C8A	Pyruvat	458	1,0	1,30	14	331	$3,17 \cdot 10^5$	31,3	-2,9
	Arginin	382	0,89	1,70	58	276	$3,10 \cdot 10^5$	31,2	-3,4
	NADH	325	15,8	0,80	-	234	$1,48 \cdot 10^7$	40,8	-1,9
C125A	Pyruvat	638	0,52	0,68	17	461	$8,88 \cdot 10^5$	33,8	-0,4
	Arginin	596	0,71	1,30	118	430	$6,07 \cdot 10^5$	32,9	-1,7
	NADH	717	31,2	1,60	-	518	$1,66 \cdot 10^7$	41,1	-1,6
C249A	Pyruvat	616	0,76	0,98	11	444	$5,85 \cdot 10^5$	32,8	-1,4
	Arginin	570	0,73	1,40	50	411	$5,62 \cdot 10^5$	32,7	-1,9
	NADH	500	19,8	1,00	-	361	$1,82 \cdot 10^7$	41,3	-1,4
C253A	Pyruvat	566	0,53	0,68	14	408	$7,67 \cdot 10^5$	33,5	-0,7
	Arginin	601	1,8	3,30	24	434	$2,46 \cdot 10^5$	30,7	-4,0
	NADH	577	20,1	1,00	-	417	$2,07 \cdot 10^7$	41,6	-1,1
C264G	Pyruvat	812	0,88	1,10	11	586	$6,66 \cdot 10^5$	33,1	1,1
	Arginin	729	0,98	1,80	43	526	$5,40 \cdot 10^5$	32,6	-2,0
	NADH	756	26,0	1,30	-	546	$2,10 \cdot 10^7$	41,6	-1,1
C382G	Pyruvat	399	1,8	2,30	3,6	288	$1,60 \cdot 10^5$	29,6	-4,6
	Arginin	269	1,1	2,00	29	194	$1,77 \cdot 10^5$	29,9	-4,8
	NADH	193	25,9	1,30	-	140	$5,40 \cdot 10^6$	38,3	-4,4

Bei den übrigen Cystein-Mutanten konnten für Pyruvat K_m -Werte zwischen 0,52 (C125A) und 0,80 mmol L⁻¹ (C264G) bestimmt werden. Mit Ausnahme von C382G (1,8 mmol L⁻¹) lagen die Werte in der Größenordnung des wildtypischen K_m -Werts für Pyruvat. Für L-Arginin wurden Michaelis-Konstanten zwischen 0,6 (C6A) und 1,1 mmol L⁻¹ (C382G) bestimmt. Auch diese Werte lagen in der Größenordnung des Wildtyp, lediglich der K_m -Wert für L-Arginin bei der Mutante C382G war mit 1,1 mmol L⁻¹ doppelt so groß. Die katalytischen Effizienzen der Cystein-Mutanten bewegten sich in der Größenordnung, die auch für den Wildtyp bestimmt worden war. Die Übergangszustände für Pyruvat, L-Arginin und NADH waren in fast allen Fällen lediglich um ca. 1-2 kJ mol⁻¹ weniger stabilisiert als beim Wildtyp. Eine Ausnahme stellt die Mutante C382G dar, bei der eine Erniedrigung der Stabilisierungsenergie zwischen 4,4 kJ mol⁻¹ (NADH) und 4,8 kJ mol⁻¹ (Pyruvat) berechnet wurde. Weiterhin zeigte die Mutante C382G eine im Vergleich zu den anderen Cystein-Mutanten stark erniedrigte Maximalgeschwindigkeit. Diese lag zwischen 193 μmol min⁻¹ mg⁻¹ bei Umsatz von NADH und 399 μmol min⁻¹ mg⁻¹ bei Verwendung von Pyruvat.

3.7.6 Mögliche Aminosäurebindestelle

Zur Identifikation der Aminosäuren, die für die Substratspezifität der Opindehydrogenasen verantwortlich sein könnten, wurden verschiedene ODH-Sequenzen mit Sequenzen der TDH und der CENDH verglichen. Sowohl von Britton *et al.* (1998) als auch von Janßen (2000) wurden Vermutungen über die Lokalisation der Aminosäurebindestelle geäußert. Zur Überprüfung wurden die Aminosäuren Threonin 89 (Pecten-Nummerierung), Glutamin 118, Tyrosin 208 und Histidin 308 durch gerichtete Mutagenese verändert. Für die kinetische Analyse der Muteine wurde die spezifische ODH-Aktivität bei variierenden Konzentrationen eines Substrats (Pyruvat, L-Arginin, bzw. NADH) bestimmt und anschließend die kinetischen Parameter für die ODH-Mutanten T89A, T89V, Q118A, Q118D, Y208A und H308G durch nicht-lineare Regression berechnet (Tab. 16).

Bei der Mutante T89A ist der K_m -Wert für Pyruvat um das 1,4 fache auf 1,1 mmol L⁻¹ erhöht. Eine 50 %ige Inhibition der Reaktion tritt erst bei 18 mmol L⁻¹ Pyruvat ein (3fach erhöhter K_i im Vergleich zum Wildtyp). Die katalytische Effizienz ist im Vergleich zum Wildtyp geringfügig reduziert ($4,51 \cdot 10^5$ L mol⁻¹ s⁻¹). Der Übergangszustand ist ebenfalls geringfügig um 2 kJ mol⁻¹ weniger stabilisiert (32,2 kJ mol⁻¹). Für L-Arginin konnte bei der Mutante T89A ein K_m -Wert von 1,3 mmol L⁻¹ (2,5 fach erhöht gegenüber dem Wildtyp) bestimmt werden. Für die Inhibitionskonstante K_i wurde hier eine fünffache Erhöhung (104 mmol L⁻¹

L-Arginin) festgestellt. Die katalytische Effizienz ist im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls geringfügig reduziert ($3,41 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Für die Übergangszustandsstabilisierungsenergie konnte ein Wert von $31,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet werden ($3,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ kleiner als beim Wildtyp). Für NADH wurden die gleichen kinetischen Parameter wie beim Wildtyp bestimmt. Bei der Mutante T89V war die Michaelis-Konstante für Pyruvat ca. siebenfach ($5,4 \text{ mmol L}^{-1}$) gegenüber dem Wildtyp erhöht. Eine 50 % ige Substratinhibition trat bei Pyruvat-Konzentrationen von 15 mmol L^{-1} auf. Die katalytische Effizienz ist im Vergleich zu T89A auf $1,7 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ reduziert. Der K_m -Wert für L-Arginin betrug $3,9 \text{ mmol L}^{-1}$ (7,4 fach erhöht im Vergleich zum Wildtyp). Für NADH hingegen wurden auch bei T89V annähernd die gleichen kinetischen Parameter wie beim Wildtyp bestimmt.

Tab. 16 Kinetische Parameter verschiedener ODH-Mutanten, die an der Aminosäurebindung beteiligt sein könnten. Die Tabelle enthält die durch nicht-lineare Regression berechneten Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) und den K_m -Wert, sowie die errechnete Wechselzahl (k_{cat}), die katalytische Effizienz und die freie Energie ΔG des Übergangszustandes. Untersucht wurden die ODH-Mutanten T89A und T89V, Q118A und Q118D sowie Y208A und H308G.

		V_{\max} [$\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1}]	K_m [mmol L^{-1}]	$K_m^{\text{Mut}}/$ K_m^{Wt}	K_i [mmol L^{-1}]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{Lmol}^{-1}\text{S}^{-1}$]	ΔG [kJ mol^{-1}]	$\Delta\Delta G$ [kJ mol^{-1}]
T89A	Pyruvat	701	1,1	1,4	18,2	506	$4,51 \cdot 10^5$	32,2	-2,0
	Arginin	607	1,3	2,5	104	438	$3,41 \cdot 10^5$	31,5	-3,2
	NADH	960	18,4	0,9	-	693	$3,77 \cdot 10^7$	43,1	-0,4
T89V	Pyruvat	1282	5,4	6,9	15,0	925	$1,7 \cdot 10^5$	29,8	-4,4
	Arginin	779	3,9	7,4	74,6	562	$1,43 \cdot 10^5$	29,3	-5,3
	NADH	446	16	0,8	-	322	$2,01 \cdot 10^7$	41,5	-1,2
Q118A	Pyruvat	393	27	35	32,2	283	$1,04 \cdot 10^4$	22,8	-11,4
	Arginin	166	5,8	11	320	120	$2,07 \cdot 10^4$	24,5	-10,1
	NADH	240	104	5,3	-	173	$1,67 \cdot 10^6$	35,4	-7,3
Q118D	Pyruvat	101	162	208	645	73	$4,52 \cdot 10^2$	15,1	-19,1
	Arginin	169	81	153	149	122	$1,5 \cdot 10^3$	18,1	-16,6
	NADH	65	175	8,9	-	47	$2,68 \cdot 10^5$	30,9	-11,8
Y208A	Pyruvat	633	0,54	0,70	3,6	457	$8,51 \cdot 10^5$	33,7	-0,5
	Arginin	767	0,79	1,50	36,7	553	$7,04 \cdot 10^5$	33,3	-0,2
	NADH	387	9,0	0,5	-	279	$3,12 \cdot 10^7$	42,6	-0,1
H308G	Pyruvat	85	3,17	4,0	11,0	61	$1,93 \cdot 10^4$	24,4	-9,8
	Arginin	56	2,1	4,0	67,1	40	$1,94 \cdot 10^4$	24,4	-10,2
	NADH	32	33	1,7	-	23	$7,00 \cdot 10^5$	33,2	-9,5

Für die Mutante Q118A wurde für Pyruvat ein K_m -Wert bestimmt, der 35fach gegenüber dem Wildtyp erhöht ist (27 mmol L^{-1}). Durch Austausch des Glutamins durch ein Aspartat (Q118D) wurde der K_m -Wert für Pyruvat auf 162 mmol L^{-1} erhöht (208-fach erhöht gegenüber dem Wildtyp). Bei Q118A konnte für die Stabilisierungsenergie des Übergangszustandes ein Wert von $22,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden ($\Delta\Delta G -11,4 \text{ kJ mol}^{-1}$), der Austausch durch ein Aspartat reduzierte die Stabilisierungsenergie auf $15,1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Für L-Arginin wurde ein K_m -Wert von $5,8 \text{ mmol L}^{-1}$ bestimmt (Q118A), der im Vergleich zum Wildtyp 11-fach erhöht ist.

Für die Mutante Q118D beträgt der K_m -Wert 81 mmol L^{-1} (153fach erhöht). Die Wechselzahl für die beiden Q118-Mutanten beträgt bei Umsetzung von L-Arginin 120 s^{-1} . Die katalytischen Effizienzen sind im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt und betragen $2,1 \cdot 10^4$ (Q118A) bzw. $1,5 \cdot 10^3$ (Q118D). Für die Michaelis-Konstante von NADH wurde für die Mutante Q118A ein Wert von $104 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ bestimmt. Für Q118D betrug der K_m -Wert $175 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Bei der Mutante Y208A ist der K_m -Wert für Pyruvat geringfügig gegenüber dem Wildtyp reduziert ($0,54 \text{ mmol L}^{-1}$). Außerdem war die Inhibitionskonstante K_i für Pyruvat von $6,1 \text{ mmol L}^{-1}$ beim Wildtyp auf $3,1 \text{ mmol L}^{-1}$ reduziert. Der K_m für L-Arginin ist leicht erhöht und beträgt $0,79 \text{ mmol L}^{-1}$. Für NADH wurde eine Michaelis-Konstante bestimmt, die mit $9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ nur halb so groß war wie beim Wildtyp. Die katalytischen Effizienzen für Pyruvat, L-Arginin und NADH liegen bei der Mutante Y208A im Bereich der wildtypischen Werte. Es konnten weiterhin nur geringfügige Abweichungen der Übergangszustandsstabilisierungsenergie im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Bei der Mutante H308G fallen, im Vergleich zum Wildtyp, stark reduzierte Maximalgeschwindigkeiten auf, die zwischen $32 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (NADH) und $85 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Pyruvat) liegen. Der K_m -Wert für Pyruvat beträgt $3,17 \text{ mmol L}^{-1}$. Für L-Arginin wurde ein K_m -Wert von $2,1 \text{ mmol L}^{-1}$ bestimmt und für NADH ein Wert von $33 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Die katalytischen Effizienzen für alle drei Substrate sind gegenüber dem Wildtyp stark reduziert, ebenso ist die freie Energie des Übergangszustandes um durchschnittlich 10 kJ mol^{-1} erniedrigt.

Bei den ODH-Mutanten T89, Q118, Y208A und H308G wurde außerdem untersucht, ob der Aminosäureaustausch zu einer veränderten Substratspezifität geführt hat. Allerdings bevorzugt keine Mutante eine andere L-Aminosäure oder L-Norvalin. Auch Taurin wurde von keiner Mutante als Aminosäuresubstrat akzeptiert.

3.7.7 Weitere Aminosäuren, die für die Mutagenese ausgewählt wurden

Neben den bisher beschriebenen Austauschen wurden noch weitere Aminosäuren durch Mutagenese verändert. In Abbildung 45 sind die betreffenden Reste markiert. Histidin 95 (*Pecten*-Nummerierung) wurde ausgewählt, da dieses Histidin genau wie Histidin 212 in allen zehn untersuchten Spezies konserviert ist. In der Sequenz der CENDH schließt sich direkt ein weiteres Histidin (Histidin 87) an, das im Bereich des Adeninringes des Coenzym liegt und für dessen Erkennung notwendig sein soll (Britton *et al.*, 1998). Bei den tierischen Opindehydrogenasen könnte H95 diese Aufgabe übernehmen.

Glutamat 252 wurde für die Mutagenese ausgewählt, da es in allen untersuchten Spezies konserviert ist. Arginin 41 ist ebenfalls in allen untersuchten Sequenzen konserviert und

soll für die Erkennung der Pyrophosphatrestes des Coenzym wichtig sein (Britton *et al.*, 1998).

				
P. maximus	ASRD	GVEVRVLT	TFAD	EAER	WTKALGADEL 51	AFA	HEGYF 99	CSNE	CKD 255
M. yessoensis	ASRD	GVEVRVLT	TFAD	EAER	WTKALGADEL 51	AFA	HEGYF 99	CSDE	CKA 255
L. vulgaris	SSRHNVKVN	VLSLFA	DEAER	WRKTLG	DNHF 60	AFA	HEGYF 108	VSSE	LVQ 265
L. opalescens	SSRHNVKVN	VLSLFA	DEAER	WRNTLAD	NHS 59	AFA	HEGYF 107	VSTEL	VQ 264
S. officinalis	SSRHNVKVN	VLSLFA	DEAER	WRNTLGD	NHF 60	AFA	HEGYF 108	VSTEL	VH 265
H. discus hannai	ASRD	DIETRVLT	TFAD	EAER	WTNIMKENDL 53	AFA	HQSYL 104	ISDEL	VLA 261
F. oregonensis	AAHPGTEAR	VLTTFQ	DEAP	RWANIMKE	ENF 53	AFA	HAQYF 101	VSDEV	L 258
A. irricolor	SNQPNMEVR	VLTLYA	DEAER	WIKSMET	NDF 50	AFA	HAQYL 98	VSNET	IA 256
P. sachalinensis	SDVVNANVT	VDTFQ	DEAER	WTKAMA	ANGF 57	AFL	HEMVL 105	ATNEM	IK 264
A. spec	ALKG----	QSVLAWD	IDAQ	RIKEIQDR	GAI 49	AIH	HASIA 92	VDAER	IA 245
	:	:	:	.* *	:	*:	*	*	

Abb. 45 Ausschnitte aus einem Proteinalignment verschiedener Opindehydrogenasen. Es wurden die Octopindehydrogenase aus *Pecten maximus*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Loligo vulgaris*, *Loligo opalescens*, *Sepia officinalis* und *Pseudocardium sachalinensis*, die Taupindehydrogenase aus *Arabella irricolor* und *Haliotis discus hannai*, die Carboxyethylnorvalindehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec*, sowie eine mögliche Alano-pindehydrogenase aus *Fusitriton oregonensis* untersucht. Die für die Mutagenese ausgewählten Aminosäuren sind (▼) markiert.

Für die NADH-Bindestelle gibt es weitere Kennzeichen. Unter anderem ist eine negativ geladene Aminosäure notwendig, die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxylgruppen der Adeninribose herstellen kann. Bei der CENDH konnte die Position dieser Aminosäure durch die Strukturanalyse identifiziert werden. Es handelt sich um Aspartat 34. In den tierischen Opindehydrogenasen ist an dieser Position überwiegend Alanin enthalten. Allerdings ist in direkter Nachbarschaft ein Aspartat zu finden (D37, *Pecten*-Nummerierung) das durchweg in allen untersuchten Sequenzen an der gleichen Position vorkommt. Zusammen mit einem ebenfalls konservierten Glutamat (E38) könnten diese Aminosäuren für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken benutzt werden. Zusätzlich ist durch Untersuchungen an der Laktatdehydrogenase bekannt, dass ein Aspartat im N-terminalen Bereich der Dehydrogenase für die Unterscheidung zwischen NADH und NADPH verantwortlich ist. Die negative Ladung des Aspartats stößt die ebenfalls negativ geladene Phosphatgruppe des NADPHs ab (Feeney *et al.*, 1990; Scrutton *et al.*, 1990). Neben dem schon erwähnten D37 ist in der *Pecten*-Sequenz ein weiteres Aspartat an Position 25 zu finden, das allerdings nicht konserviert ist, sondern sich nur in *Pecten maximus*, *Mizuhopecten* und *Haliotis* an dieser Position finden lässt.

Das Aspartat 25 wurde durch Mutagenese gegen Asparagin ausgetauscht. Aspartat 37 wurde zu Alanin, Asparagin bzw. Serin mutiert. Arginin 41 wurde gegen Alanin getauscht und Histidin 95 gegen Glycin. Weiterhin wurde das Glutamat 252 gegen Alanin ausgetauscht. Die resultierenden Enzyme wurden in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt. Für die kinetische Analyse der Mutanten wurde die spezifische ODH-Aktivität bei variierenden Kon-

zentrationen eines Substrats (Pyruvat, L-Arginin, bzw. NADH) bestimmt und anschließend die kinetischen Parameter für die ODH-Mutanten durch nicht-lineare Regression berechnet (Tab. 17). Für die Mutanten D25N, D37A, D37N und D37S wurden K_m -Werte für Pyruvat, L-Arginin und NADH bestimmt, die alle annähernd mit den wildtypischen Werten übereinstimmen. Die K_m -Werte für Pyruvat variieren zwischen $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ (D37S) und $0,79 \text{ mmol L}^{-1}$ (D25N). Für L-Arginin wurden K_m -Werte zwischen $0,61 \text{ mmol L}^{-1}$ (D37N) und $0,91 \text{ mmol L}^{-1}$ (D25N) bestimmt. Die Michaelis-Konstanten für NADH liegen zwischen $16,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (D37A, D37N) und $22,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (D37S). Die katalytischen Effizienzen für die Verwendung der verschiedenen Substrate waren nur geringfügig gegenüber den wildtypischen Werten erniedrigt, ebenso die Übergangszustandsstabilisierungsenergien.

Tab. 17 Kinetische Parameter weiterer ODH-Mutanten. Die Tabelle enthält die durch nicht-lineare Regression berechneten Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) und den K_m -Wert, sowie die errechnete Wechselzahl (k_{cat}), die katalytische Effizienz und die Stabilisierungsenergie des Übergangszustandes (ΔG). Untersucht wurden die ODH-Mutanten D25N, D37A, D37N, D37S sowie R41A, H95G und E252A.

		V_{\max} [$\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1}]	K_m [mmol L^{-1}]	K_m Mut/ K_m Wt	K_i [mmol L^{-1}]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{Lmol}^{-1}\text{S}^{-1}$]	ΔG [kJ mol^{-1}]	$\Delta\Delta G$ [kJ mol^{-1}]
D25N	Pyruvat	792	0,79	1	10,4	572	$7,26 \cdot 10^5$	33,3	-0,9
	Arginin	776	0,91	1,70	14,4	560	$6,14 \cdot 10^5$	32,9	-1,7
	NADH	517	19,6	1	-	373	$1,91 \cdot 10^7$	41,4	-1,3
D37A	Pyruvat	495	0,74	0,95	8,9	357	$4,85 \cdot 10^5$	32,3	-1,9
	Arginin	437	0,85	1,60	26,0	316	$3,72 \cdot 10^5$	31,7	-3,0
	NADH	451	16,5	0,84	-	325	$1,97 \cdot 10^7$	41,5	-1,2
D37N	Pyruvat	675	0,74	0,95	9,7	487	$6,62 \cdot 10^5$	33,1	-1,1
	Arginin	580	0,61	1,15	35,4	419	$6,68 \cdot 10^5$	33,2	-1,4
	NADH	528	16,5	0,84	-	381	$2,31 \cdot 10^7$	41,9	-0,8
D37S	Pyruvat	770	0,70	0,90	9,2	556	$7,89 \cdot 10^5$	33,5	-0,7
	Arginin	671	0,86	1,60	28,6	484	$5,62 \cdot 10^5$	32,7	-1,9
	NADH	573	22,5	1,10	-	414	$1,84 \cdot 10^7$	41,3	-1,4
R41A	Pyruvat	1077	1,20	1,5	6,8	778	$6,50 \cdot 10^5$	33,1	-1,1
	Arginin	767	0,79	1,5	36,7	553	$7,04 \cdot 10^5$	33,3	-1,4
	NADH	685	24,67	1,3	-	494	$2,00 \cdot 10^7$	41,5	-1,2
H95G	Pyruvat	687	0,50	0,6	10,7	496	$9,92 \cdot 10^5$	34,1	-0,1
	Arginin	606	0,41	0,8	55,6	437	$1,06 \cdot 10^6$	34,3	-0,4
	NADH	684	15,80	0,8	-	493	$3,12 \cdot 10^7$	42,6	-0,1
E252A	Pyruvat	181	0,98	1,3	18,0	130	$1,33 \cdot 10^5$	29,2	-5,0
	Arginin	237	2,07	3,9	41,9	171	$8,25 \cdot 10^4$	28,0	-6,7
	NADH	168	26,84	1,4	-	122	$4,53 \cdot 10^6$	37,9	-4,8

Im Vergleich der Aspartat 37-Mutanten ist der Austausch gegen Alanin mit einer erniedrigten Maximalgeschwindigkeit und Wechselzahl verbunden. D37S erreicht von den drei Mutanten die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten und besitzt die größten Wechselzahlen für alle drei Substrate. Bei der Mutante R41A sind die K_m -Werte für Pyruvat ($1,2 \text{ mmol L}^{-1}$), L-Arginin ($0,79 \text{ mmol L}^{-1}$) und NADH ($24,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) um ca. 50 % gegenüber dem Wildtyp erhöht. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten entsprechen weitgehend den Werten, wie

sie für den Wildtyp bestimmt wurden. Die Wechselzahlen und die katalytischen Effizienzen für alle drei Substrate sind allerdings geringfügig erniedrigt. Weiterhin ist auch Übergangszustandsstabilisierungsenergie jeweils um ca. $1,2 \text{ kJ mol L}^{-1}$ reduziert. Für die Mutante H95G wurde ein K_m -Wert für Pyruvat von $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ bestimmt, der im Vergleich zur wildtypische ODH um $0,27 \text{ mmol L}^{-1}$ erniedrigt ist. Weiterhin sind ebenfalls die Michaelis-Konstanten für L-Arginin ($0,41 \text{ mmol L}^{-1}$) und NADH ($15,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) gegenüber dem Wildtyp vermindert. Zusammen mit leicht verringerten maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (zwischen 606 und $687 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) ergeben sich Wechselzahlen zwischen 437 s^{-1} (L-Arginin) und 496 s^{-1} (Pyruvat). Die katalytischen Effizienzen erreichen annähernd wildtypische Werte und die Energien zur Stabilisierung der Übergangszustände sind ebenfalls kaum erniedrigt. Bei der Mutante E252A fallen drastisch reduzierte Umsatzraten auf, die zwischen $168 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ für NADH und $237 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ für L-Arginin liegen. Der K_m -Wert für Pyruvat ist leicht erhöht und beträgt $0,98 \text{ mmol L}^{-1}$. Für L-Arginin wurde eine Michaelis-Konstante bestimmt, die mit 2 mmol L^{-1} ca. vierfach im Vergleich zu wildtypischer ODH gesteigert ist. Der K_m -Wert für NADH liegt bei $27 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ und ist um 40% größer als beim Wildtyp. Es können Wechselzahlen zwischen 122 s^{-1} (NADH) und 171 s^{-1} (L-Arginin) bestimmt werden. Die katalytischen Effizienzen sind auf $1,33 \cdot 10^5$ bei Pyruvat, $8,25 \cdot 10^4$ (L-Arginin) und $4,53 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei Umsatz von NADH erniedrigt. Die Stabilisierungsenergie des Übergangszustands ist im Vergleich zum wildtypischen Enzym um $5\text{-}6 \text{ kJ mol}^{-1}$ verringert.

4 Diskussion

Seit der Entdeckung der Opindehydrogenasen in Muskelextrakten mariner Invertebraten war diese Enzymgruppe das Objekt vieler Untersuchungen. Neben einer ersten proteinbiochemischen Charakterisierung der Opindehydrogenasen, waren Untersuchungen über die Bedeutung dieser Enzyme für den anaeroben Energiestoffwechsel verschiedener Invertebraten von besonderem Interesse. Besonders die als erstes entdeckte Octopindehydrogenase aus der Pilgermuschel *Pecten maximus* wurde biochemisch gut charakterisiert (u. a. van Thoai *et al.*, 1969; Thomé *et al.*, 1971; Baici *et al.*, 1974; Doublet *et al.*, 1975a und b; Monneuse-Doublet *et al.*, 1980; Schrimsher und Taylor, 1984). Neben kinetischen Untersuchungen wurde diese kleine Dehydrogenase auch für Faltungsstudien einfacher, monomerer Proteine genutzt (Zettlmeissl *et al.*, 1984; Teschner *et al.*, 1987). Trotz dieser vielen Untersuchungen ist bis heute wenig über die dreidimensionale Struktur dieses Enzyms und den molekularen Reaktionsmechanismus der Octopinbildung bekannt. An der Katalyse vermutlich beteiligte Aminosäuren konnten bisher nur durch Inaktivierungsexperimente identifiziert werden (Huc *et al.*, 1971; Thomé-Beau und Olomucki, 1973; Huc *et al.*, 1975; Sheikh und Katiyar, 1993a, b, 1994). Die Aufklärung der Primärsequenz und heterologe Expression der ODH aus *Pecten maximus* durch Janßen (2000) eröffneten jedoch neue Möglichkeiten, um dieses interessante Enzym eingehender studieren zu können. Endlich standen auch ausreichende Enzymmengen für Kristallisationsversuche zur Verfügung. Zusätzlich können Aminosäuren gezielt mutiert und ihre Funktion untersucht werden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollten neue Einblicke in die Struktur und den Reaktionsmechanismus der Octopindehydrogenase aus der Pilgermuschel *Pecten maximus* gewonnen werden. Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurde zuerst die Reinigungsmethode für die rekombinante ODH weiter optimiert und die gewonnene ODH in Kristallisationsversuchen eingesetzt. Zusätzlich zur Kristallisation wurde die ODH NMR-spektroskopisch untersucht, um möglicherweise diejenigen Aminosäuren identifizieren zu können, die an der Bindung der verschiedenen Substrate beteiligt sind. Schließlich sollten durch gerichtete Mutagenese detailliertere Einblicke in den Reaktionsmechanismus der Octopindehydrogenase erhalten werden, als bislang möglich.

4.1 Isoenzyme der ODH

Zu Beginn dieser Arbeit konnte auf einen von Janßen (2000) erzeugten Expressionsklon für die ODH aus *Pecten maximus* zurückgegriffen werden. Ausgehend von cDNA war das Gen für die ODH in den Vektor pTYBI inseriert worden. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass die ODH in der Pilgermuschel in mindestens drei elektrophoretisch unterschiedlichen Isoformen vorkommt (Monneuse-Doulet *et al.*, 1980). Janßen (2000) konnte aber auf Ebene der Nukleotidsequenz keine unterschiedlichen Isoformen der ODH nachweisen. Es war daher auch nicht eindeutig, welche Isoform kloniert worden war, oder ob sich die in der nativen Gelelektrophorese beobachteten Isoformen überhaupt bezüglich ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Allerdings wurde von Monneuse-Doulet (1980) ein unterschiedliches Laufverhalten im nativen Gel z.B. durch proteolytische Degradation, Oxidation oder Reduktion und Deamidierung der ODH ausgeschlossen.

In dieser Arbeit wurden vor der Amplifikation und Klonierung des ODH-Gens zuerst Extrakte aus dem unpaaren Adduktormuskel einzelner Individuen gewonnen und auf das Vorkommen unterschiedlicher ODH-Isoenzyme überprüft. Es konnten so 2 Individuen identifiziert werden, in deren Adduktormuskeln sich jeweils nur eine Isoform befand (die A- bzw. die B-Form der ODH, s. Abb. 3, S. 52). Die entsprechenden Muskeln wurden benutzt, um das Gen für die ODH zu amplifizieren. Die gefundenen Nukleotidsequenzen unterschieden sich in 24 bzw. 27 Nukleotiden von der Datenbanksequenz. Auf Aminosäureebene waren allerdings lediglich drei Aminosäuren verändert. In der A-Form (Pecten 3, Nummerierung wie in Abb. 3, S. 52 bzw. Tab. 22) war ein Methionin an Position 186 gegen ein Lysin, ein Valin an Position 336 gegen ein Alanin und ein Serin gegen ein Asparagin (S350N) ausgetauscht. Für dieses Enzym wurde ein isoelektrischer Punkt von 5.44 berechnet. Sind in einem Muskel mehrere Isoformen enthalten, wie es z.B. im Muskel von Pecten 2 (A- und B-Form) der Fall war, so lässt sich nicht vorhersagen, welches Isoenzym durch PCR amplifiziert wird. Allerdings zeigte sich, dass bei zwei unabhängig durchgeführten PCRs in beiden Reaktionen die Isoform A amplifiziert werden konnte, die durch den Austausch des Methionins an Position 186 gegen ein Lysin gekennzeichnet ist. Mit diesem Austausch geht ein veränderter isoelektrischer Punkt einher, damit eine geringfügig veränderte Ladung im Vergleich zur B-Form und folglich eine geringere Wanderstrecke während der nativen Gelelektrophorese. Die Sequenzierung der B-Form der ODH (z.B. Pecten 5 und 6) zeigte, dass sich auch diese beiden Proteine von dem Datenbankeintrag sowohl auf Nukleotidebene (24 bzw. 28 Basenaustausche) als auch auf Aminosäureebene (2 oder 3 veränderte Aminosäuren) unterscheiden. Die beobachteten Austausche verändern aber in diesen Fällen nicht die Ladung der ODH und sind lediglich auf ge-

ringfügige, individuelle Unterschiede in der Nukleotidsequenz zurückzuführen. Für beide Proben wurde ein isoelektrischer Punkt von 5.35 bestimmt, der mit dem von Janßen (2000) für die ODH aus *Pecten maximus* übereinstimmt.

Auffallend war allerdings, dass bei allen sequenzierten ODHs, im Vergleich zu der von Janßen (2000) aus *Pecten maximus* gewonnenen Sequenz, ein Serin an Position 350 gegen ein Asparagin ausgetauscht war. Auf die physikochemischen Eigenschaften der ODH hat dieser Austausch keinen Einfluss. Anscheinend hat sich dieser Aminosäureaustausch in der *Pecten*-Population des Ärmelkanals, aus dem sowohl die Versuchstiere für diese, als auch für die Arbeit von Janßen (2000) stammten, innerhalb der letzten Jahre etabliert. Heterologe Expression der A- und B-Form der ODH aus dieser Arbeit und ein Vergleich mit der ODH, die mit dem von Janßen (2000) erzeugten Vektor exprimiert worden war, bestätigten, dass es sich bei der in der Datenbank enthaltenen Sequenz um die B-Form der ODH aus *Pecten maximus* handelt, für die ein isoelektrischer Punkt von 5.35 berechnet wurde.

Zusätzlich konnte ein Adduktormuskel gefunden werden, in dem eine dritte Isoform (C), allerdings immer nur zusammen mit der A-Form, auftrat. Mit cDNA aus diesem Adduktormuskel wurden mehrere unabhängige PCRs durchgeführt, die es schließlich ermöglichten, der Isoform C eine eindeutige Sequenz zuzuordnen. Die Isoform C der ODH ist, neben dem schon beschriebenen Austausch von Serin 350 gegen Alanin, charakterisiert durch den Austausch eines Glycins an Position 26 gegen ein Aspartat. Der Austausch führt zu einem auf 5.27 reduzierten pI. Durch die leicht stärkere negative Ladung im Vergleich zur B-Form, wandert die ODH im nativen Gel weiter zur Anode als die anderen beiden Formen.

Die in der nativen Gelelektrophorese beobachteten Isoformen der ODH lassen sich damit jeweils auf den Austausch einer einzelnen Aminosäure zurückführen. Ähnliches wurde auch von Kan-No *et al.* (2005) berichtet, die zwei Isoformen der Tauropindehydrogenase aus dem Polychaeten *Arabella iricolor* auf Proteinebene sequenzierten. Die beiden Enzymformen unterschieden sich lediglich in einer Aminosäure: Threonin an Position 41 in einer Form und Isoleucin an dieser Position in der anderen Form.

Da die ODH entweder nur in einer Form oder höchstens in zwei Formen gleichzeitig in den Adduktormuskeln der Pilgermuscheln vorkommt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich beim ODH-Gen, wie schon von Beaumont (1980) und Monneuse-Doublet (1980) beschrieben, um einen polymorphen Genlocus handelt. Bei den unterschiedlichen Isoformen handelt es sich um Allozyme, also die Produkte verschiedener Allele desselben Gens, die kodominant exprimiert werden. Allerdings fanden sich in Adduktormuskeln lediglich 4 der 6 möglichen Phänotypen. Eine Erklärung hierfür ist schwer zu finden. Die in der vorliegenden

Arbeit untersuchte Zahl von Adduktormuskeln (ca. 20) ist zu gering, um Aussagen über eine Verteilung von Isoenzymen innerhalb der Pilgermuschel *Pecten maximus* machen zu können. Beaumont *et al.* (1980) untersuchten 40 Individuen und konnten auch nur die vier beschriebenen Isozym-Kombinationen nachweisen. In der Literatur finden sich Berichte über Polymorphismen für ODH, die aus den verschiedensten marinen Invertebraten isoliert wurde. In der Flügelschnecke *Strombus luhuanus* konnten Baldwin und England (1982) z.B. alle sechs möglichen Phänotypen nachweisen, die aus drei kodominanten Allelen des ODH-Genlokus resultieren können. Allerdings gibt es noch keinerlei Belege durch Nukleotidsequenzen.

4.2 Reinigung der ODH

Über die Reinigung der ODH aus Adduktormuskeln von *Pecten maximus* und aus den Geweben anderer mariner Invertebraten wurden die verschiedensten Reinigungsprotokolle veröffentlicht (van Thoai *et al.*, 1969; Monneuse-Doulet *et al.*, 1980; Grieshaber *et al.*, 1978; Gäde und Carlsson, 1984). Sie alle bestehen aus mehreren chromatographischen Schritten und erlauben nur geringe Ausbeuten. Van Thoai und Mitarbeiter (1969) isolierten aus 2800 g Adduktormuskeln von *Pecten maximus* in vier chromatographischen Schritten lediglich 50 mg ODH. Erst die heterologe Überexpression einer C-terminal um fünf Histidine verlängerten ODH in *E. coli* vereinfachte die Reinigung erheblich, da hierdurch eine Affinitäts-Chromatographie mit Ni-NTA Superflow möglich wurde (Janßen, 2000). Jedoch war die Präparation nach Ni-NTA-Chromatographie nicht homogen genug, um einer erfolgreichen Kristallisation überhaupt eine Chance zu geben. Deshalb musste das Reinigungsprotokoll weiter optimiert werden.

Ausgehend von einer 1 L *E. coli*-Kultur wurden 19.013 U ODH erhalten, was 2.925 Units ODH pro Gramm Bakterien entspricht. Um aus Adduktormuskeln die gleiche Menge ODH wie aus einer 1 L Bakterienkultur zu gewinnen, hätten etwa 200 Muskeln präpariert werden müssen.

Für den Aufschluss der Bakterienzellen wurde in dieser Arbeit Ultraschall benutzt. Geringfügig schlechtere Aktivitätswerte im Rohextrakt, verglichen mit Aufschluss durch eine French-Press (Müller, 2001), konnten ausgeglichen werden, indem das Bakterienpellet nach Zentrifugation in Lysepuffer resuspendiert und erneut beschallt wurde (s. 2.6.4). Durch Affinitäts-Chromatographie an Ni-NTA wurden ca. 87 % der im Rohextrakt enthaltenen Proteine von der ODH getrennt. Auf SDS-Gelen, die mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurden, zeigte sich eine ODH, die annähernd homogen vorlag. Nach Gelfiltration mit Sephadex G-100 konnte in SDS-Gelen auch in der Silberfärbung nur noch die ODH detektiert werden.

Die Ausbeute lag bei 44 % der Aktivität des aufgetragenen Rohextraktes. Die spezifische Aktivität des Endprodukts betrug 484 U mg^{-1} . Verglichen mit dem Rohextrakt entsprach das einem Reinigungsfaktor von 7.4, der mit den Reinigungsfaktoren herkömmlicher Methoden nicht zu vergleichen ist. So gibt z.B. Meding (1994) einen Reinigungsfaktor von 96.5 für eine klassische ODH-Reinigung an. Da bei der rekombinanten Methode aber bereits im Rohextrakt sehr hohe spezifische Aktivitäten zu messen sind, ist der Reinigungsfaktor geringer als bei der Reinigung der ODH aus Adduktormuskeln.

Um die für die Kristallisation erforderlichen ODH-Mengen höchster Reinheit zu gewinnen, musste das Protokoll jedoch erweitert werden. Die Kulturgröße wurde auf 8 Liter erhöht und es wurde dazu übergegangen, den Rohextrakt vor Applikation auf die Ni-NTA-Säule einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung zu unterziehen. Durch diesen Schritt wurden bereits 53 % der im Rohextrakt enthaltenen Proteine entfernt. Allerdings war die Ammoniumsulfatfällung auch mit einem Aktivitätsverlust von 16 % verbunden. Zusätzlich wurde das Volumen der Ni-NTA-Säule für den ersten chromatographischen Schritt vergrößert und als zusätzlicher chromatographischer Schritt eine Gelfiltration mit einer 6000 mL Sephadex G-100-Säule hinzugefügt. Mit diesem Protokoll konnten aus 8 Litern *E. coli* 65.718 U ODH erhalten werden. Diese Menge entspricht 36 % der Aktivität im Rohextrakt. Bei einem Proteingehalt von 130 mg im Endprodukt errechnete sich eine spezifische Aktivität von 506 U mg^{-1} . Die gel-elektrophoretische Kontrolle des resultierenden Endproduktes ließ eine homogene ODH-Präparation erkennen.

Da sich die ODH für die Bestimmung von L-Arginin im Hochdurchsatz-Screening eignet, entstand in den vergangenen Jahren ein kommerzielles Interesse an der ODH, das noch höhere Ausbeuten an rekombinanter ODH verlangt. Die ODH wurde zu diesem Zweck in den Vektor pET24-d(+) kloniert und mit einem 6fachen Histidin-Tag am C-Terminus exprimiert. Zusätzlich wurden die Aminosäuren Leucin und Glutamat vor dem Affinitätstag eingefügt (ODH-LE6His). Abbildung 12 (S. 67) zeigt einen Expressionsvergleich der beiden Konstrukte. Die Bakterien waren unter identischen Bedingungen angezogen worden, die Expression der ODH erfolgte bei $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Sowohl die lösliche Fraktion, als auch die mit Harnstoff solubilierte, unlösliche Fraktion der beiden Ansätze wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot verglichen. Die Bande in der Spur, in der Rohextrakt der ODH-Le6His aufgetragen wurde, ist deutlich schwächer ausgeprägt, als die Bande in der Spur von ODH-5His. In der unlöslichen Fraktion ist bei ODH-LE6His eine starke ODH-Bande zu erkennen. Anscheinend ist das Expressionsniveau bei Verwendung des Vektors pET24d sehr hoch, was sich leider auch in einer vermehrten Aggregation der ODH in der unlöslichen Fraktion widerspiegelt. Die ODH, die

ausgehend vom Vektor pTYBI exprimiert wurde, zeigte ebenfalls in der unlöslichen Fraktion eine starke ODH-Bande, allerdings war der Anteil der ODH in der löslichen Fraktion mindestens genauso groß. Vergleich man die Ausbeuten an ODH, die aus jeweils acht Litern *E. coli* mit den beiden Expressionskonstrukten erhalten wurden, so bestätigen sich diese Befunde. Im Rohextrakt von ODH-LE6His finden sich lediglich ca. 50 % der Aktivität (98.720 U) verglichen mit ODH-5His (184.106 U) bei einem annähernd gleichen Proteingehalt. Die Ausbeute an ODH nach der Reinigung mit Ni-NTA und Gelfiltration ist in beiden Fällen ähnlich und liegt zwischen 34 und 36 % bezogen auf die jeweilige Ausgangsaktivität. Die spezifische Aktivität der Endprodukte lag zwischen 506 und 565 U mg⁻¹. Die Klonierung des ODH-Gens in den Vektor pET24d führte also nicht wie erwünscht zu einer höheren Ausbeute an rekombinanter ODH. Für kommerzielle Zwecke kann die Ausbeute an ODH bislang nur durch ein größeres Kulturvolumen erhöht werden.

Abbildung 12 (S. 67) zeigt auch die ersten Versuche zur Expression der ODH aus dem Cephalopoden *Loligo vulgaris*. Das Gen für die ODH wurde hierzu ebenfalls in den Vektor pTYBI inseriert und C-terminal mit einem Pentahistidin-Tag fusioniert. Durch den Western-Blot mit einem gegen den Histidin-Tag gerichteten Antikörper konnte deutlich gezeigt werden, dass sich in der löslichen Fraktion keine ODH befand. Exprimierte *Loligo*-ODH sammelte sich vollständig in „Inclusion bodies“ an, obwohl die Inkubationstemperatur während der Expression auf 18 °C reduziert war. Für die ODH aus *Loligo vulgaris* wurde ausgehend von der Aminosäuresequenz ein isoelektrischer Punkt von 8.3 berechnet, der mit dem von Grieshaber *et al.*, (1978) experimentell ermittelten IEP übereinstimmt. Der alkalische IEP der *Loligo*-ODH könnte für die Aggregation in „Inclusion bodies“ verantwortlich sein, denn eigentlich sollte das reduzierende *E. coli*-Cytoplasma optimale Bedingungen für die Expression bieten, da keine Disulfidbrücken in der *Loligo*-ODH enthalten sind (vorhergesagt durch das Programm „Disulfid“). Hätte *Loligo*-ODH aktiv exprimiert werden können, so hätte auch diese ODH in Kristallisationsversuchen eingesetzt werden können. Auf Grund der Akkumulation in „Inclusion bodies“ wurde jedoch von weiteren Expressions-Versuchen mit *Loligo*-ODH abgesehen. Womöglich lässt sich durch Expression in einem Eukaryoten, z.B. in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, aktives Enzym gewinnen. Allerdings ist fraglich, ob die erzielbaren Ausbeuten für Kristallisationsversuche ausreichen würden.

Zur Durchführung von Kristallisationsversuchen mit rekombinanter ODH, die nicht mit einer Affinitätsmarkierung fusioniert ist, wurde das ODH-Gen in den Vektor pTYBI inseriert

(ODH-CtermPst) und im *E. coli*-Stamm ER2566 exprimiert. Allerdings war es notwendig, das Reinigungsprotokoll anzupassen, wozu auf eine Vielzahl von Veröffentlichungen zurückgegriffen werden konnte. Gäde und Carlsson (1984) z.B. beschrieben eine Reinigungsmethode für ODH aus *Cerebratulus lacteus* und *Pecten maximus*, die als Anhaltspunkt benutzt wurde. Allerdings gelang es den Autoren nicht, ODH homogen aus *Pecten maximus* zu isolieren. Es war nicht zu vermeiden, dass sich Malatdehydrogenase (MDH) in der Präparation befand, da dieses Enzym sich auf den verwendeten Säulenmaterialien ähnlich wie die ODH verhielt.

Für die Reinigung der ODH-CtermPst wurden jeweils nur 5 Liter *E. coli*-Kultur verwendet, um die Kapazität der verwendeten Säulen nicht zu überschreiten. Betrachtet man die zwei beispielhaft aufgeführten Reinigungen, so unterscheiden sich die Aktivitäten im vereinigten Rohextrakt. In einem Fall konnten annähernd 90.000 U ODH gewonnen werden, was mengenmäßig mit der Expression der ODH-5His vergleichbar ist. Bei einer anderen Reinigung der ODH-CtermPst waren im Rohextrakt nur 56.000 Units enthalten. Womöglich wurden die Bakterien bei diesem Ansatz nicht vollständig aufgeschlossen, oder die Anzuchtdauer war nicht identisch und daher variierte die exprimierte Enzymmenge. Nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung wurden die Rohextrakte in einem ersten chromatographischen Reinigungsschritt durch eine Anionenaustauschchromatographie mit Fractogel[®] EMD DEAE gereinigt. Unter den gewählten Pufferbedingungen konnte die ODH an die Säulenmatrix binden und durch einen NaCl-Gradienten eluiert werden. Die spezifische Aktivität konnte bis auf 400 U mg⁻¹ gesteigert werden. Durch Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-100 wurde die ODH-Suspension weiter gereinigt und die spezifische Aktivität bis auf 623 U mg⁻¹ erhöht. Betrachtet man die zugehörigen SDS-Gele, so zeigt sich, dass die ODH schon nach diesen zwei chromatographischen Schritten silberrein vorliegt. Um jedoch eine höchstmögliche Homogenität der Präparation zu erreichen, wurde als dritter chromatographischer Schritt entweder eine Hydroxylapatitchromatographie, oder eine Affinitätschromatographie an Arginin-Sepharose durchgeführt. Entgegen der Darstellung in van Thoai *et al.* (1969), bei denen ODH nicht an Hydroxylapatit band, konnte die ODH an keramisches Hydroxylapatit gebunden und anschließend mit einem Kaliumphosphatgradienten eluiert werden. Allerdings wurde die spezifische Aktivität nicht weiter erhöht.

Alternativ wurde ODH ohne His-Tag in einem dritten chromatographischen Schritt durch eine Affinitätschromatographie an Arginin-Sepharose gereinigt. Das im Auftragspuffer enthaltene NADH führt zu einer Konformationsänderung im Enzym, wodurch eine Bindung an die Arginin-Sepharose möglich wird (Gäde und Carlsson, 1984). Mulcahy und Mitarbeiter (1997) allerdings vermuten, dass die Bindung der ODH an die Arginin-Sepharose vornehm-

lich über elektrostatische Wechselwirkungen erfolgt, da durch Immobilisierung des Arginins angeblich seine Fähigkeit zur spezifischen ODH-Bindung verloren geht. Wie Abbildung 19 (S. 76) zeigt, konnte die ODH unter den gewählten Bedingungen an die Arginin-Matrix gebunden und anschließend durch Kaliumphosphatpuffer ohne NADH eluiert werden. Allerdings führte auch dieser chromatographische Schritt zu keiner Zunahme der spezifischen Aktivität. Anscheinend genügen zwei chromatographische Schritte, um eine ODH zu erhalten, die im silbergefärbten SDS-Gel homogen vorliegt. Ob diese Reinheit allerdings ausreicht, musste durch Einsatz in Kristallisationsversuchen getestet werden.

4.3 Kristallisation der ODH

Für Opindehydrogenasen aus marinen Invertebraten existieren bis heute keine Kristallstrukturen. 1980 beschrieb Olomucki zwar eine Bedingung, die zu einem Kristall der ODH aus *Pecten maximus* geführt haben soll, allerdings folgten auf diesen Artikel keine weiteren Veröffentlichungen und auch keine Strukturdaten. Bis zur ersten heterologen Expression der ODH (Janßen, 2000) waren die Proteinmengen für strukturelle Untersuchungen nicht ausreichend. Ein leistungsfähiges Expressionssystem und ein verbessertes Reinigungsprotokoll erlauben inzwischen die Produktion ausreichender ODH-Mengen. Weiterhin steht für Kristallisationsversuche sowohl ODH ohne Affinitätsmarkierung, als auch ODH mit einem Pentahistidin- sowie mit einem Hexahistidintag zur Verfügung.

Die von Olomucki beschriebene Bedingung, die angeblich zu einem ODH-Kristall führte, enthielt PEG 6000 sowie Ammoniumsulfat. Mit rekombinanter ODH konnte unter diesen Bedingungen keine kristallinen Strukturen erhalten werden. Das Ammoniumsulfat im Ansatz sorgte in allen eingesetzten Konzentrationen und allen verwendeten Puffern für eine Präzipitation der ODH. Auch wenn Ammoniumsulfat durch Malonat ersetzt wurde, kristallisierte die ODH nicht. Nach McPherson (2000) ist Malonat ein Salz, das besonders gut für die Kristallisation geeignet zu sein scheint und deshalb in Reihenversuche und Kristallisations-Screens aufgenommen werden sollte. Malonat ist eine organische Säure mit einer hohen Ladungsdichte, die bei neutralem pH zwei negative Ladungen trägt und anscheinend Proteinstrukturen sehr gut stabilisiert. McPherson (2000) konnte in einem Testversuch 19 von 23 verschiedenen Proteinen mit Malonat kristallisieren.

Reihenversuche mit Malonat ohne PEG 6000 bei verschiedenen pH-Werten führten ebenfalls nicht zu ODH-Kristallen. Ähnlich wie in Anwesenheit von Ammoniumsulfat präzipitierte die ODH in allen Ansätzen innerhalb einer Woche. Auch mit NaCl, Methylpentandiol (MPD), sowie mit PEG 3350 und PEG 6000 konnten keine kristallinen Strukturen erhalten

werden. Neben den Reihenversuchen mit einzelnen Substanzen konnten auch durch einen „Sparse matrix screen“ mit den Puffersets „Crystal screens I und II“ keine kristallinen Strukturen erhalten werden.

McPherson (1990) beschreibt 25 verschiedene Faktoren, die einen Einfluss auf die Kristallisation eines Proteins nehmen können. Neben dem pH und dem verwendeten Puffer kann auch die Temperatur eine entscheidende Rolle spielen (McPherson, 1985c). Die Inkubationstemperatur wurde deshalb von 20 °C, bei dieser Temperatur wurden die ersten Versuche durchgeführt, auf 12 °C erniedrigt. Unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration präzipitierte die ODH bei den meisten getesteten Bedingungen innerhalb der ersten drei Tage. Auch die anfänglichen Reihenversuche mit verschiedenen Präzipitanten wurden bei 12 °C mit verschiedenen Proteinkonzentrationen wiederholt, führten jedoch zu keiner Kristallbildung. Allerdings konnten unter zwei Bedingungen des Crystal Screens I kristalline Strukturen entdeckt werden. Lösung Nr. 6 mit einem Tris/HCl-Puffer pH 8.5, 30 % PEG 4000 und $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ führte zu den in Abbildung 21 (S. 81) gezeigten Proteinnadeln.

Es gibt sieben weitere Bedingungen im Crystal Screen I, die PEG 4000 als Präzipitanten enthalten. Allerdings präzipitierte die ODH in diesen Ansätzen innerhalb weniger Tage. Durch Reihenversuche wurde herausgefunden, dass zwischen 20 und 30 % PEG 4000 und mindestens $0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ im Ansatz enthalten sein musste, damit sich die in Abbildung 21 (S. 81) gezeigten Nadeln ausbilden konnten. Ein verbessertes Kristallwachstum durch Zusatz verschiedener Additive konnte aber leider nicht erreicht werden. Entweder bildeten sich Kristallnadeln oder die ODH präzipitierte im Ansatz.

Crystal Screen I enthält weiterhin neun Bedingungen, die PEG 8000 als Präzipitanten enthalten. Auch in diesen Ansätzen konnten keine Kristalle entdeckt werden. Reihenversuche bei 12 °C mit PEG 6000 führten hingegen zu den in Abbildung 21 (G, H, I, S. 81) dargestellten Kristallbündeln. Bei PEG 6000 handelt es sich um den Präzipitanten, mit dem angeblich auch Olomucki einen ODH-Kristall erhalten konnte. Zusatz von verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen führte jedoch, genau wie bei 20 °C, immer zur Präzipitation der ODH. Auch bei PEG 6000 konnte durch Zugabe von Additiven keinerlei verbesserte Kristallmorphologie erreicht werden. Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Bedingungen konnten mit Crystal Screen I, Lösung Nummer 38 (Hepes pH 7.5, $1,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na-Citrat}$), bei 12 °C die in Abbildung 22 (S. 83) gezeigten Kristalle erhalten werden. Deutlich ist zu erkennen, dass die Kristalle aus übereinander geschichteten Plättchen bestehen. Es ist davon auszugehen, dass es sich auf Grund der Kristallmorphologie nicht um einen Einkristall handelt.

Durch Anfärben mit einem Coomassie-ähnlichen Farbstoff (IZITTM Crystal Dye), der leicht in die großen Lösungsmittelkanäle von Proteinkristallen diffundiert und diese blau anfärbt (Abb. 23 A, B und C, S. 84) konnte gezeigt werden, dass es sich bei den beobachteten kristallinen Strukturen eindeutig um Proteinkristalle handelt. Salzkristalle sind zu dicht gepackt, als dass der Farbstoff hineindiffundieren könnte. Sie werden deshalb bei diesem Test nicht angefärbt. In einer SDS-PAGE konnte weiterhin gezeigt werden, dass es sich bei den Kristallen eindeutig um ODH handelt. Es war jeweils eine deutliche Bande der erwarteten Größe zu erkennen. Zusätzlich sind, besonders bei den Kristallen, die mit Na-Citrat erhalten wurden, einige Proteinbanden bei größeren Molekulargewichten zu erkennen. Hierbei handelt es sich womöglich um ODH-Aggregate, die sich trotz einer Probenvorbereitung mit Aufkochen und Zusatz von DTT als Reduktionsmittel nicht auflösen ließen.

Auffallend ist bei allen drei Kristallisationsbedingungen, dass sich die Kristalle sehr schnell (innerhalb von zwei bis drei Tagen) bilden. Versuche, die Äquilibrierung des Proteintropfens mit der Reservoirlösung durch Zusatz von Öl als Diffusionsbarriere zu verlangsamen (Chayen, 1997), führten zu keiner Verbesserung der Kristallmorphologie. Anscheinend bilden sich die Kristalle bereits, wenn eine Äquilibrierung des Tropfens mit der Reservoirlösung bei 12 °C noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Veränderungen des Verhältnisses von Protein zu Präzipitant im Tropfen führten jedoch auch nicht zu besseren Kristallen.

Abbildung 26 (S. 87) zeigt die elektrophoretische Kontrolle der ODH-Homogenität. Im SDS-Gel ist eine einzelne ODH-Bande zu erkennen. In einem nativen Gel sind jedoch verschiedene Banden zu erkennen. Alle sichtbaren Banden zeigen in der Formazanfärbung ODH-Aktivität und konnten auch durch Western-Blot eindeutig als ODH-5His identifiziert werden. Anscheinend aggregiert die ODH zu Di-, Tri-, und Tetrameren bzw. zu noch größeren Aggregaten. Im nativen Gel wird vornehmlich nach Ladung getrennt, allerdings werden Aggregate im 12 %igen Trenngel auch auf Grund ihrer Größe retardiert. Die Laufstrecken der ODH-Aggregate im nativen Gel werden daher immer kleiner.

Die ODH enthält acht Cysteine, die nicht disulfidverbrückt vorliegen. Im nativen Gel wurde auf Zusatz von DTT bei der Probenvorbereitung verzichtet, da durch DTT bei der Aktivitätsfärbung nicht-enzymatisch Formazan gebildet wird. Durch die starke Hintergrundfärbung sind distinkte ODH-Banden nicht zu erkennen. Womöglich kommt es im Sammelgel, bedingt durch die Konzentrierung der Proteine an der Grenze zum Trenngel, lokal zu einer sehr hohen ODH-Konzentration. Durch die freien Sulfhydrylgruppen können sich leicht ODH-Aggregate bilden, deren Auftrennung im Gel zu beschriebenen Bandenmuster führt.

In Kristallisationsansätzen diffundiert Wasser aus dem Proteintropfen und führt zu einem Anstieg der ODH-Konzentration im Ansatz. Im folgenden beginnen ODH-Moleküle zu aggregieren. Diese Aggregation ist langsam genug, um nicht zur sofortigen Präzipitation der ODH zu führen. Womöglich lagern sich jedoch ODH-Moleküle mit ihren freien Sulfhydrylgruppen ungeordnet an die sich bildenden kristallinen Strukturen an. So entstehende ODH-Kristalle wachsen dann bevorzugt nur in zwei Dimensionen, es bilden sich die beobachteten Kristallnadeln bzw. Kristallplättchen. Um einer möglichen Aggregation über Sulfhydrylgruppen vorzubeugen, wurde die ODH vor dem Einsatz im Experiment in 10 mmol L⁻¹ Hepes pH 7.0, 1 mmol L⁻¹ EDTA und 1 mmol L⁻¹ DTT überführt. DTT in Kristallisationsansätzen ist jedoch ungünstig, da die Konzentration durch Oxidation stetig abnimmt. Nach 3 bis 7 Tagen ist sämtliches DTT oxidiert.

Nach McPherson (1990) können inhomogene Proteinpräparationen, hervorgerufen z.B. durch proteolytische Modifikation des Proteins während der Isolierung oder das Vorhandensein von Isoenzymen, entscheidenden Einfluss auf das Kristallisationsverhalten des Proteins nehmen. In der nativen Page sind zusätzlich zur monomeren ODH-Bande oft Satellitenbanden mit einer etwas weiteren Laufstrecke zu erkennen (s. Pfeile in Abb. 26, S. 87 und 39, S. 104). In der Literatur wurden solche Banden von Beaumont (1980) bei verschiedenen ODHs beschrieben. Durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der ODH-Präparationen konnte die Intensität dieser Banden gesteigert werden (Beaumont *et al.*, 1980). Für Kristallisationsversuche wurde immer frische gereinigte ODH eingesetzt, die nicht eingefroren war, sondern immer bei 4 °C aufbewahrt wurde. Weiterhin wurden unterschiedliche Proteinpräparationen nicht vereinigt. Trotzdem könnte es, z.B. durch Deamidierung von Asparagin- und Glutamin-Resten, zu Mikroheterogenitäten in der ODH-Suspension kommen. In Abbildung 4 (S. 55) ist ein natives Gel mit rekombinanter ODH zum Vergleich der verschiedenen ODH-Isoformen gezeigt. Ebenfalls aufgetrennt wurde dort die ODH-Mutante D369N (erzeugt ausgehend von ODH-5His, Form B), deren Laufstrecke mit der Isoform A der ODH übereinstimmt. Hierdurch zeigt sich, dass schon eine modifizierte Aminosäure, wodurch z.B. eine negative Ladung entfernt wird, ausreicht, um ein verändertes Laufverhalten der ODH in der nativen PAGE zu verursachen. Die Abbildungen 26 (S. 87) und 39 (S. 104) zeigen jeweils eine dominierende ODH-Bande und zusätzlich eine schwächer ausgeprägte Satellitenbande (Pfeile). Denkbar wäre als Erklärung eine Deamidierung, die nur einen Teil der ODH-Moleküle betrifft und so eine inhomogene ODH-Präparation verursacht.

Nicht-enzymatische Deamidierung ist der hauptsächliche Bestandteil einer chemischen Degradierung z.B. bei der Alterung von Proteinen (Wright, 1991a und b). Die Deami-

dierung von L-Asparagin verläuft über ein Succinimidderivat und führt zu einem α - oder β -verknüpften Aspartat (isoAspartat) (Geiger und Clarke, 1987; Patel und Borchard, 1990). Die Geschwindigkeit der Deamidierung wird stark durch die Seitenketten der C-terminal folgenden Aminosäure bestimmt, so erfolgt z.B. eine Deamidierung besonders schnell bei Asn-Gly oder Asn-Ser (Geiger und Clarke, 1987; Capasso *et al.*, 1989; Wright, 1991b). Weiterhin begünstigen hohe Ionenstärken die Deamidierung (Capasso *et al.*, 1991). So könnte z.B. die Ammoniumsulfatfällung oder die hohe Ionenstärke des Lysepuffers ($300 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$) bei der Ni-NTA-Chromatographie eine partielle Deamidierung der ODH begünstigen. Die Heterogenität der ODH-Präparation konnte auch durch isoelektrische Fokussierung bestätigt werden (Abb. 26 C, S. 87). Hier konnte eine Bande mit einem pI von 5.2 sowie eine etwas schwächer ausgeprägte Bande mit einem pI von ca. 5.1 detektiert werden. Womöglich sind die Probleme bei der Kristallisation der ODH mitunter auf diese Mikroheterogenitäten zurückzuführen. Vielleicht wäre es möglich, die negativer geladene ODH-Form z.B. durch einen Anionenaustauscher als dritten chromatographischen Schritt aus der Präparation zu entfernen und so die Kristallisationseigenschaften der ODH zu verbessern.

Von einigen Autoren wurde auch auf Unterschiede im Kristallisationsverhalten von rekombinanten Proteinen mit- bzw. ohne Affinitätsmarkierungen hingewiesen (Bucher *et al.*, 2002). In den letzten Jahren hat die Anzahl der gelösten Strukturen von Proteinen, die mit einem His-Tag kristallisiert wurden, in der Proteindatenbank beträchtlich zugenommen. Um einen Einfluss des His-Tags auf die Kristallisation der ODH auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch ODH ohne Affinitätsmarkierung in Kristallisationsversuchen eingesetzt. Mit dieser unverlängerten ODH konnten aber keine Kristalle erhalten werden. Alle bisher beschriebenen Bedingungen, bei denen sich kristalline Strukturen bildeten, wurden mit ODH-5His bzw. ODH-LE6His erhalten. Auch ein „Sparse matrix Screen“ mit unverlängerter ODH bei $12 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ führte zu keinen neuen Kristallisationsbedingungen. Anscheinend hat im Fall der ODH die C-terminale Verlängerung einen positiven Einfluss auf das Kristallisationsverhalten, wobei es keinen Unterschied zwischen der ODH mit fünf Histidinen oder der ODH-LE6His gibt.

Weiterhin wurde versucht, durch Zugabe von NAD^+ und NADH die Kristallisationseigenschaften zu verbessern. Die Zugabe äquimolarer Mengen an Coenzym führte aber zur Präzipitation der ODH in Bedingungen, unter denen sich ohne Coenzym kristalline Strukturen bildeten. Wie bereits hinreichend von anderen NADH-bindenden Enzymen z.B. LDH, Alkoholdehydrogenase oder GAPDH bekannt ist, führt die Bindung des Coenzym zu strukturellen Veränderungen im Enzym (z.B. Bolotina *et al.*, 1967a und b; Branden und Eklund, 1977; Jae-

nicke *et al.*, 1979, Leslie und Wonacott, 1983). Auch für die ODH wurden von verschiedenen Autoren strukturelle Veränderungen durch die Coenzymbindung beschrieben (Pho *et al.*, 1970; Huc *et al.*, 1971, Olomucki *et al.*, 1972, Oriol und Olomucki, 1972). Im Fall der ODH scheint die Konformationsänderung auszureichen, damit unter bestehenden Bedingungen keine Kristalle mehr gebildet werden. Ein mit Enzym und Coenzym durchgeführter „Sparse matrix screen“ konnte keine alternativen Kristallisationsbedingungen aufzeigen.

Die röntgenographische Untersuchung der ODH-Kristalle, die mit Na-Citrat als Präzipitant gebildet wurden, bestätigten die Vermutung, dass es sich bei den Kristallen nicht um Einkristalle handelt. Anscheinend sind mehrere Kristallplättchen miteinander verwachsen und führen so zu überlagerten Gittern im Diffraktionsbild. Eine Elementarzelle ließ sich leider mit bestehenden Aufnahmen nicht bestimmen (O. H. Weiergräber, persönliche Mitteilung).

In Zukunft müssen die Kristallisationsbedingungen für die ODH noch weiter verbessert und mögliche Heterogenitäten der Enzympräparation ausgeschlossen werden, um zu einem Kristall zu gelangen, der für die Strukturaufklärung verwendbar ist.

4.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen

In den letzten Jahren hat sich die NMR-Spektroskopie neben der Röntgenstrukturanalyse als Methode zur Strukturbestimmung von Proteinen etabliert. Die Größe der zu untersuchenden Moleküle konnte zu immer höheren Molekulargewichten verschoben werden. Insbesondere bei Molekülen über 40 kDa bietet die NMR sich auch für Faltungs- und Bindungsstudien an. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung der 43.3 kDa großen ODH für die NMR-Spektroskopie untersucht.

Abbildung 27 (S. 89) zeigt ein eindimensionales Protonenspektrum der ODH. Das Spektrum zeigt eine starke Überlagerung der Amidresonanzen, wie sie für ein Protein dieser Größe zu erwarten war. Es ließen sich keine Anzeichen für Aggregatbildung sowie für das Vorliegen eines unvollständig gefalteten Proteins finden. Die stark überlagerten Amidresonanzen sollten sich durch heteronukleare Einbindungskorrelationsspektren auflösen lassen, wozu die ODH mit ^{15}N -Ammoniumchlorid markiert wurde. Die spezifische Aktivität lag im Endprodukt bei 476 U mg^{-1} und ist mit der Reinheit unmarkierter ODH vergleichbar. In Abbildung 28 (S. 90) ist ein (^1H - ^{15}N)-HSQC-TROSY-Spektrum der ^{15}N -markierten ODH-5His gezeigt. Die Dispersion der Amidprotonen erschien ausreichend, um zu versuchen, die einzelnen Resonanzen mit Hilfe von 3D-Experimenten den Aminosäuren zuordnen zu können. Es konnten 367 Resonanzen detektiert werden. Die ODH enthält 18 Proline, die im heteronuklearen Einbindungskorrelationsspektrum nicht dargestellt werden, da sie keine Amidprotonen

enthalten. Es fehlen somit die Resonanzen von 14 Aminosäuren (ODH: 399 AS), was aber durchaus nicht ungewöhnlich ist, da immer einige Amide einen ungünstigen Austausch mit dem Lösungsmittel zeigen können.

Für die Aufnahme heteronuklearer 3D-Spektren wurde eine uniform ^{13}C , ^{15}N , ^2H -markierte Probe benötigt. Die ODH wurde dazu in Minimalmedium angezogen, das mit D_2O hergestellt worden war und ^{15}N -Ammoniumchlorid sowie ^{13}C -Glukose enthielt. Obwohl die Bakterien durch Anzucht in M9-Medium mit 50 % D_2O und danach in 100 % D_2O an das deuterierte Wasser gewöhnt wurden, war die Bakterienausbeute sehr gering. Es konnten aus einem Liter Medium lediglich 2.5 g Bakterien gewonnen werden (LB-Medium 6.5 g). Im Rohextrakt fanden sich 2.076 U ODH und lediglich 59 mg Protein. Verglichen mit dem Ergebnis aus einer 1 L LB-Kultur war nur ein zehntel der ODH-Aktivität und ein fünftel der Proteinmenge enthalten. Das geringe Expressionsniveau der ODH wurde auch bei der durchgeführten NiNTA-Chromatographie deutlich, deren Verlauf in Abbildung 29 (S. 91) dargestellt ist. Steigende Imidazol-Konzentrationen im Eluenten führten zu einem Anstieg der Extinktion bei 280 nm, die eluierende ODH ist lediglich als sehr kleiner, zusätzlicher Extinktionsanstieg im Elutionsprofil zu erkennen, der aber durch Aktivitätsmessung der ODH zugeordnet werden konnte. Bedingt durch die geringe Menge an ODH wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet, da diese immer mit Proteinverlust verbunden sind. Das Endprodukt enthielt 427 U ODH. Bei einem Proteingehalt von 7.3 mg ergab sich eine spezifische Aktivität von lediglich 59 U mg^{-1} , die nur kaum gegenüber dem Rohextrakt (35 U mg^{-1}) erhöht war. Die geringe Aktivität der ODH ist wahrscheinlich auf die Deuterierung zurückzuführen.

Durch die geringe Konzentration der Probe von lediglich 0.17 mmol L^{-1} waren die durchzuführenden Experimente eingeschränkt. Abbildung 30 (S. 93) zeigt die überlagerten Spektren von ^{15}N -ODH und dreifach-isotopenmarkiertem Enzym. Deutlich sind mindestens 41 Resonanzen zu erkennen, die in der deuterierten Probe nicht auftauchen. Der größte Teil der Protonen in der ODH bestand durch die Anzucht in deuteriertem Wasser aus Deuteronen. Durch die Reinigung in Puffern, die mit H_2O hergestellt wurden, tauschen labile Amide, z.B. die Amide der Proteinbindung, ihre Deuteronen mit den Lösungsmittel Protonen aus. Anscheinend sind in der ODH aber viele Aminosäuren so stark vom Lösungsmittel abgeschirmt, dass hier kein Austausch mit den Protonen des Wassers erfolgen konnte. Zusammen mit den nicht detektierten Resonanzen im ^{15}N -HSQC fehlen für eine sequenzspezifische Zuordnung nun Resonanzinformationen von ca. 60 Aminosäuren, was eine Zuordnung fast unmöglich macht. In einem nach acht Wochen aufgenommenen Spektrum waren einige der verschwundenen Resonanzen aufgetaucht, die Mehrzahl konnte jedoch immer noch nicht detektiert wer-

den. Diese Aminosäuren scheinen absolut keinen Zugang zu Lösungsmittelmolekülen zu besitzen.

In der Literatur sind Beispiele von Proteinen enthalten, bei denen durch Denaturierung und anschließende Renaturierung der Austausch auch tief im Molekülinnern verborgener Amide erzwungen werden konnte (z.B. Tugarinov *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Methoden versucht ODH zu denaturieren und anschließend wieder in eine native Form zurückzufalten. Zettelmeissl (1984) und Teschner (1987) beschrieben die Rückfaltung denaturierter ODH durch schnelles Verdünnen, wobei sie unter anderem spektrofluorimetrische Methoden zur Detektion des Faltungszustandes benutzten. Es gelang ihnen, 70 % der ODH in ihre ursprünglichen Zustand zurückzufalten. Bei den fehlenden 30 % wurde angeblich ein anderer Faltungszustand am Ende des Experiments erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Enzymaktivität als Indiz für eine korrekt rückgefaltete ODH verwendet. In den beschriebenen Publikationen wurde leider die Aktivität immer auf die nach Rückfaltung erhaltene Aktivität normiert, was einen Vergleich erschwert. Durch schnelles Verdünnen konnten im Fall der rekombinanten ODH lediglich fünf Prozent der ursprünglichen Aktivität wiederhergestellt werden. Ein graduelles Verdünnen des Denaturanten durch Dialyse führte zur irreversiblen Ausfällung der ODH bei Konzentrationen unter 4 mol L^{-1} . Auch Versuche, die ODH durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA oder Gelfiltration zu renaturieren, führten lediglich zu Ausbeuten von höchstens 5 %. Abbildung 31 (S. 94) zeigt exemplarisch einen Gelfiltrationslauf mit denaturierter ODH. Anscheinend aggregieren hier ODH-Moleküle zu hochmolekularen Komplexen, die nach und nach von der Gelfiltrations säule eluieren. Mitunter war auch korrekt gefaltete ODH in den Fraktionen enthalten, jedoch konnte diese nicht durch einen distinkten Proteinpeak von den Aggregationsprodukten unterschieden werden.

Durch Titrationsexperimente sollte jedoch untersucht werden, ob sich einzelne Aminosäuren identifizieren ließen, die an der Substratbindung beteiligt sind. Hierzu wurden Einbindungskorrelationspektren in Abhängigkeit von verschiedenen Ligandenkonzentrationen aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der Rückgratamide werden von lokalen geometrischen und elektrostatischen Änderungen beeinflusst, die durch die Bindung eines Liganden verursacht werden. Die Interaktion mit einem Liganden verändert die magnetische Umgebung der Stickstoff- und NH-Atome am Protein-Substrat-Interface und lässt sich in ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren nachweisen (Fielding, 2003; Meyer und Peters, 2003).

Mit Hilfe der NMR konnte so auf recht unkonventionelle Weise die mögliche Bindungsreihenfolge der Substrate aufgeklärt werden. Bisherige Untersuchungen der ODH und

der Reihenfolge der Substratbindung waren auf kinetische Techniken beschränkt. Allerdings kamen die beteiligten Gruppen teilweise auf unterschiedliche Ergebnisse. Monneuse-Doublert und Olomucki (1975 a & b, Monneuse-Doublert *et al.*, 1978) postulieren für die Ligandenbindung an ODH eine geordnete Reihenfolge bei der zuerst das Coenzym NADH bindet, gefolgt von Pyruvat und L-Arginin. Pyruvat reagiert mit L-Arginin unter Dehydratisierung zu einer Schiffbase. Auf diesen Übergangszustand erfolgt schließlich der Hydridtransfer vom NADH, wodurch D-Octopin entsteht. Auch Schrimsher und Taylor (1984) gehen davon aus, dass zuerst das Coenzym an das Enzym binden muss. Nachfolgend sollen die Substrate in zufälliger Reihenfolge binden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Titrationsexperimente bestätigen, dass als erstes das Coenzym binden muss. Wie die Abbildungen 32 (S. 95) und 33 (S. 96) zeigen, verändert sich durch Coenzymbindung die chemische Umgebung vieler Amidprotonen, wodurch sich ihre Resonanzpeaks verschieben. Es sind aber nicht nur die Resonanzen einzelner Aminosäuren betroffen, sondern es verschieben sich die Peaks eines Großteils der Aminosäuren, was auf eine strukturelle Veränderung der ODH durch die Coenzymbindung hindeuten könnte. Wurden Pyruvat oder L-Arginin zur ODH titriert, so ließ sich keine Bindung nachweisen; es verschoben sich keine Resonanzpeaks in den Spektren.

War die ODH jedoch vor der Titration mit NADH abgesättigt, so ließ sich eine Bindung von L-Arginin detektieren. Auch bei Bindung von L-Arginin war ein Großteil der Amidprotonen von einer Veränderung ihrer chemischen Umgebung betroffen, die sich in wandernden Peaks äußerte (s. Abb. 34, S. 98). Mit einer Titration von Pyruvat zum ODH-NADH-Komplex konnten hingegen keine chemischen Verschiebungen detektiert werden. Anscheinend bindet zuerst das Coenzym NADH, wodurch die ODH strukturell so verändert wird, dass im nachfolgenden L-Arginin gebunden werden kann. Als letztes Substrat bindet dann Pyruvat.

Betrachtet man die Vielzahl der wandernden Amidresonanzpeaks bei Titration von L-Arginin zum ODH-NADH-Komplex, so lässt sich vermuten, dass auch die Argininbindung zu strukturellen Veränderungen im Enzym führt. Einerseits werden damit Bedingungen geschaffen, die es ermöglichen, Pyruvat zu binden, andererseits wird so das Coenzym in räumliche Nähe zum entstehenden Übergangszustand gebracht, damit ein Hydridtransfer stattfinden kann. Die ODH verhindert so, dass Pyruvat ohne L-Arginin zu Laktat reduziert wird. Eine Konformationsänderung durch Bindung des Aminosäuresubstrats wird auch von Britton *et al.* (1998) für die N-(1-D-carboxyethyl)-L-Norvalin Dehydrogenase (CENDH) postuliert. Der Abstand der nukleotidbindenden zur substratbindenden Domäne ist mit 8 Å zu groß, als dass ein Hydridtransfer stattfinden könnte.

Zusätzlich wurden die Titrationsexperimente dazu benutzt, die Dissoziationskonstanten für NADH, NAD⁺ und L-Arginin zu bestimmen. Die chemischen Verschiebungen ausgewählter Resonanzpeaks wurden nach Gleichung 2.7 gewichtet und in Abbildung 35 (S. 99) gegen die jeweilige Liganden-Konzentration aufgetragen. In den resultierenden Graphen wurde durch nicht-lineare Regression die Dissoziationskonstante K_D bestimmt (s. Abb. 35, S. 99). Für NADH ergab sich ein Wert von $62 \mu\text{mol L}^{-1}$, der größenordnungsmäßig im Bereich der Literaturwerte liegt (Baici *et al.*, 1974 sowie Monneuse-Doulet und Olomucki, 1975: K_D $20 \mu\text{mol L}^{-1}$). Auch die Dissoziationskonstante für NAD⁺ liegt mit $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ im Bereich der Literaturangaben (Baici *et al.*, 1974: $260 \mu\text{mol L}^{-1}$; Luisi *et al.*, 1975: $250 \mu\text{mol L}^{-1}$; Monneuse-Doulet und Olomucki, 1975: $375 \mu\text{mol L}^{-1}$). Zusätzlich konnte die Dissoziationskonstante für L-Arginin mit 4.1 mmol L^{-1} bestimmt werden, für die es keine Angaben in der Literatur gibt. Der Wert stimmt jedoch gut mit der Dissoziationskonstante überein, die für L-Arginin durch isothermale Titrationskalorimetrie bestimmt wurde (Nadine van Os, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die ODH durchaus für NMR-spektroskopische Experimente eignet. Probleme bei der sequenzspezifischen Zuordnung der Resonanzen, bedingt durch die Deuterierung des Proteins, könnten sich womöglich durch eine veränderte oder gezieltere Isotopenmarkierung umgehen lassen (Coughlin *et al.*, 1999; Tugarinov und Kay, 2003; Fiaux *et al.*, 2004; Tugarinov *et al.*, 2004).

4.5 Der Reaktionsmechanismus der ODH

Als einziges Enzym aus der Familie der Opindehydrogenasen ist bis heute die bakterielle N-(1-D-carboxyethyl)-L-Norvalin Dehydrogenase (CENDH) kristallisiert worden. Genau wie die tierischen Opindehydrogenasen katalysiert sie die NADH-abhängige, reduktive Kondensation von Pyruvat mit einer Aminosäure.

Vornehmlich werden von der CENDH hydrophobe L-Aminosäuren wie Methionin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin umgesetzt. Die CENDH gehört auch zu Opindehydrogenasen der (D,L)-Familie. Im Unterschied zu tierischen Opindehydrogenasen handelt es sich bei ihr um ein dimeres Protein, das aus zwei identischen Untereinheiten mit je 359 Aminosäuren (36 kDa) besteht (Dairi und Asano, 1995). Britton *et al.* gelang 1998 die Strukturaufklärung dieses Enzyms. Die Sequenzidentität mit tierischen Opindehydrogenasen liegt zwischen 15 und 25 %. Nach Janßen (2000) und Kan-No (2005) kann die CENDH, nicht zuletzt auf Grund des selben Reaktionsmechanismus, als homologes Enzym zu den tierischen Opindehydrogenasen betrachtet werden.

Die Aminosäuresequenz der CENDH wurde daher in Sequenzvergleiche mit tierischen Opindehydrogenasen einbezogen. Weiterhin wurde die Kristall-Struktur der CENDH benutzt, um die Lage konservierter Aminosäuren strukturell einzuordnen (s. Abb. 46). Für die gerichtete Mutagenese wurden in einem ersten Schritt vornehmlich jene Aminosäuren ausgewählt, die in allen Sequenzen konserviert waren und von denen eine Beteiligung an der Katalyse vermutet wurde. Weiterhin sollten diejenigen Aminosäuren identifiziert werden, welche die Substratspezifität der Opindehydrogenasen determinieren.

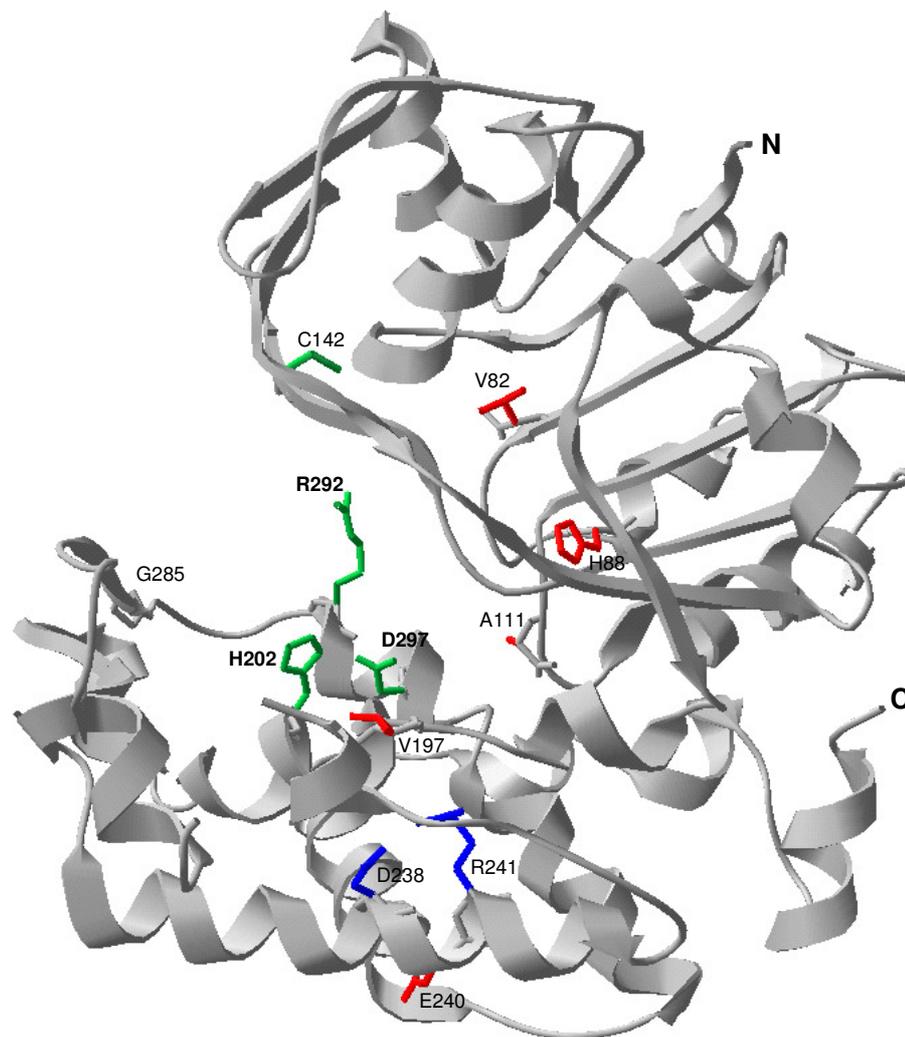


Abb. 46 Kristallstruktur der N-(1-D-carboxyethyl)-L-Norvalin Dehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec.* (pdb-Code 1bg6; Britton *et al.*, 1998). Dargestellt sind ausgewählte Aminosäurereste, die in der *P. maximus*-ODH mutiert wurden. Mit Hilfe der CENDH-Struktur können diese Aminosäuren räumlich eingeordnet werden. Weiterhin sind hier die beiden Aminosäuren, die zu dem von Monneuse und Rouzé (1987) beschriebenen DXXR-Motiv gehören blau markiert (D238 und R241).

Die ODH-Muteine wurden analog zum wildtypischen Enzym im *E. coli*-Stamm ER2566 exprimiert. Erwartungsgemäß konnte nicht bei allen Muteinen ODH-Aktivität im

Rohextrakt detektiert werden. Die Kontrolle der Expression erfolgte durch SDS-PAGE und Westernblot mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper. Abbildung 36 (S. 100) zeigt beispielhaft die Western-Blotanalyse der ODH-Mutanten C8A und E252A. Deutlich ist zu erkennen, dass sich in den löslichen Fraktionen der Rohextrakte weniger ODH-5His befindet, als in den unlöslichen. Anscheinend führt schon der Austausch einzelner Aminosäuren in der ODH zu einer vermehrten Aggregation des Enzyms im bakteriellen Cytoplasma. Betrachtet man die in Abbildung 37 (S. 101) dargestellten Elutionsprofile der Ni-NTA-Chromatographie verschiedener ODH-Muteine, so bestätigen sich diese Beobachtungen. Im Rohextrakt enthaltene ODH-5His konnte an die Ni-NTA-Matrix gebunden und durch Imidazol eluiert werden. Deutlich erkennbar ist, dass der Proteinpeak der eluierenden ODH unterschiedlich ausgeprägt, bzw. z.B. bei der Mutante E252A fast nicht erkennbar ist. Der alleinige Austausch von Glutamat gegen Alanin an Position 252 führt zu einer ODH-Aggregation in der unlöslichen Phase.

Longenecker (2001), Mateja (2002) und Derewenda (2004) beschreiben in einer Reihe von Veröffentlichungen den Einfluss von Lysin- und Glutamatresten auf die Löslichkeit und das Kristallisationsverhalten von Proteinen. Beide Reste zeigen eine ausgeprägte konformationelle Entropie. Obwohl Lysin- und Glutamatreste meistens an der Proteinoberfläche vorkommen (nur 6 % der Lysin- und 12 % der Glutamatreste befinden sich tief im Proteininneren) sind diese Aminosäuren selten an intermolekularen Kontakten von oligomeren Proteinen beteiligt. Ein Austausch dieser großen hydrophoben Reste gegen Alanin führt zu Proteinoberflächen, die über konformationell homogenere Kontaktflächen verfügen, wodurch sich verschiedene Proteine besser oder überhaupt erst kristallisieren lassen (Derewenda, 2004).

Wie die Mutation E252 gegen Alanin zeigt, wird bereits durch den Austausch eines Glutamats die Aggregation der ODH gefördert. Leider findet diese Aggregation bereits im Bakterium statt. Der lösliche Teil des Rohextraktes enthält nur einen geringen Anteil an ODH-E252A, der jedoch durch Ni-NTA-Chromatographie gereinigt werden konnte. Die Proteinmenge war leider zur Durchführung von Kristallisationsexperimenten nicht ausreichend.

T89V und C8A sind ebenfalls Muteine, deren Anteil in der löslichen Phase des Rohextraktes nur gering und deren korrespondierende Proteinpeaks bei der Chromatographie gegenüber wildtypischem Enzym erheblich verringert waren, da sich der größte Teil des exprimierten Proteins in der unlöslichen Phase befand. Bei diesen Mutanten wurden polare, aber ungeladene Aminosäuren gegen unpolare, hydrophobe Reste ausgetauscht, wodurch eine Aggregation im bakteriellen Cytoplasma begünstigt werden könnte. Bei allen Mutanten konnte im

Eluat nach Metallchelataffinitätschromatographie ODH-Aktivität detektiert werden, die jedoch im Vergleich mit wildtypischer ODH-5His oft beträchtlich verringert war.

4.5.1 Kinetische Eigenschaften wildtypischer ODH-5His

Da in dieser Arbeit ODH-Mutante hergestellt und kinetisch charakterisiert werden sollten, war es notwendig, auch das „wildtypische“ Enzym eingehend zu untersuchen. In der Vergangenheit wurden bereits von zahlreichen Arbeitsgruppen die kinetischen Parameter der ODH-Reaktion beschrieben, wofür aus *Pecten maximus* gereinigtes Enzym verwendet worden war (Monneuse-Doulet und Olomucki, 1975a und b; Luisi *et al.*, 1975; Schrimsher und Taylor, 1984). Eine Arbeitsgruppe reinigte die ODH selbst, eine andere kaufte die eingesetzte ODH. Von der kommerziell vertriebenen ODH ist bekannt, dass sie zu einem erheblichen Anteil mit anderen Proteinen, unter anderem mit der Malatdehydrogenase, verunreinigt ist (Grieshaber, persönliche Mitteilung; Gäde und Carlsson, 1984). Für die rekombinante ODH-5His wurden noch keine Michaelis-Konstanten bestimmt. Ein direkter Vergleich der Werte wird allerdings dadurch erschwert, dass damals bei einer heutzutage unüblichen Temperatur von 30 °C oder 33 °C gemessen wurde. In dieser Arbeit wurde die ODH-Aktivität nach Grieshaber *et al.* (1978) in einem TRA-Puffer pH 7.0 bei 25 °C bestimmt. In anderen Publikationen wurde z.B. ein Phosphatpuffer pH 6.6 oder 6.9 benutzt. Für die Rückreaktion (Octopinoxidation) wurde ein Glycin/NaOH-Puffer pH 9.6 nach Luisi *et al.* (1975) benutzt.

Tab. 18 Michaelis-Konstanten für die verschiedenen Substrate der ODH. Die Tabelle zeigt die Literaturwerte für die verschiedenen Substrate im Vergleich zu den Werten für rekombinante ODH-5His und rekombinante ODH ohne Affinitätstag. Die Literaturwerte stammen [a] von Monneuse-Doulet und Olomucki (1975) und [b] von Luisi *et al.* (1975).

Substrat	Literaturwerte	ODH-5His	ODH _{rek} ohne Tag
Pyruvat	1.5 mmol L ⁻¹ [a]	0.77 mmol L ⁻¹	0.5 mmol L ⁻¹
	0.71 mmol L ⁻¹ [b]		
L-Arginin	2.4 mmol L ⁻¹ [a]	0.5 mmol L ⁻¹	0.34 mmol L ⁻¹
	0.89 mmol L ⁻¹ [b]		
D-Octopin	1.1 mmol L ⁻¹ [a]	1.3 mmol L ⁻¹	1 mmol L ⁻¹
	1.6 mmol L ⁻¹ [b]		
NADH	31.2 µmol L ⁻¹ [b]	20 µmol L ⁻¹	12.6 µmol L ⁻¹

Die Michaelis-Konstanten der ODH-5His für Pyruvat, L-Arginin und NADH, sowie für Octopin liegen alle in der Größenordnung, die für nicht-rekombinante ODH aus *Pecten maximus* bestimmt worden waren (Tab. 18). Es wurden in dieser Arbeit für die verschiedenen

Mutagenese jeweils ebenfalls die kinetischen Parameter der einzelnen Substrate bestimmt, um möglicherweise Aussagen über die Beteiligung verschiedener, ausgewählter Aminosäurereste an der ODH-Reaktion machen zu können. Auf die Eigenschaften der verschiedenen Mutagenese wird im weiteren Verlauf der Diskussion eingegangen.

Die getrennt klonierten und exprimierten Isoformen ODH-A und B unterscheiden sich in ihren kinetischen Parametern nicht, wie es auch schon für nicht-rekombinante ODH beschrieben wurde, bei der die beiden Isoformen getrennt voneinander isoliert worden waren (Monneuse-Doulet, 1980; Zettlmeissl *et al.*, 1984). Isoformen, die speziell die Pyruvatreduktion bzw. die Octopinoxidation katalysieren, wie es z.B. bei *Sepia officinalis* beschrieben wurde (Storey, 1977; Storey und Storey, 1979b), sind im Adduktormuskel der Pilgermuschel *Pecten maximus* nicht zu finden.

Es konnte jedoch ein Unterschied in den kinetischen Parametern zwischen der unverlängerten ODH und den Octopindehydrogenasen mit einem His-Tag festgestellt werden. Im Falle des unverlängerten Enzyms waren die K_m -Werte für alle untersuchten Substrate gegenüber der ODH-5His geringfügig erniedrigt. Womöglich unterscheiden sich die beiden Enzyme, z.B. bedingt durch den C-terminalen His-Tag, geringfügig in ihrer Struktur, wodurch sich die leicht unterschiedlichen kinetischen Parameter erklären lassen. Weiterhin lassen sich auch die geringfügigen Unterschiede zwischen ODH aus der Pilgermuschel und rekombinantem Enzym auf eine etwas veränderte Faltung der rekombinanten ODH aus *E. coli* zurückführen, da sich die bakteriellen Faltungshelfer von den eukaryotischen unterscheiden, bzw. bedingt durch hohe Expressionslevel mit der korrekten Faltung der Zielproteine überfordert sein könnten (Baneyx, 1999; Baneyx und Mujacic, 2004).

Zusätzlich zeigt die ODH sowohl bei Verwendung von Pyruvat, L-Arginin und D-Octopin eine Substratinhibition, die auch schon von Schrimsher und Taylor (1984) beschrieben wurde. Dieses Phänomen, das bei vielen Enzymen beobachtet werden kann, wird allerdings oft vernachlässigt, da Substratinhibition meist im nicht-physiologischen Konzentrationsbereich auftritt. Auf die Substratinhibition wird jedoch später in der Diskussion noch ausführlicher eingegangen.

4.5.2 Gerichtete Mutagenese von Cystein-Resten

Die ODH enthält insgesamt acht Cystein-Reste. Nach Sheikh und Katiyar (1993a und b sowie 1994) soll mindestens ein Cystein an der Katalyse beteiligt sein. Mit dem Computer-Programm „Disulfind“ wurden für die ODH keine Disulfidbrücken vorhergesagt, was experimentell durch Titration der Sulfhydrylgruppen mit DTNB (Ellman-Reagenz) im denaturier-

ten Enzym nachgewiesen werden konnte. In der nativen ODH findet sich lediglich eine Sulfhydrylgruppe, die durch DTNB modifiziert werden konnte. Inkubation der ODH mit DTNB oder p-Chlormercuribenzoat (PCMB) führte zu einer Inhibition der ODH. Mit PCMB war innerhalb von fünf Minuten keinerlei ODH-Aktivität mehr zu detektieren, wohingegen mit DTNB die Inhibition erheblich länger dauerte. Nach 100 Minuten waren hier z.B. noch 20 % der ursprünglichen Aktivität im Ansatz enthalten. Die Affinität der Quecksilberverbindung PCMB zu Sulfhydrylgruppen ist erheblich größer, als die Affinität des Ellmans Reagenz. So reichten auch schon mikromolare Konzentrationen, um eine vollständige Inhibition der ODH zu erreichen. Mit DTNB, obwohl höher konzentriert, dauerte die Inhibition erheblich länger. Allerdings konnte DTNB, aufgrund einer geringen Löslichkeit, nicht konzentrierter im Experiment eingesetzt werden.

Um das durch DTNB modifizierbare Cystein zu detektieren, wurden alle acht Cysteine der ODH durch gerichtete Mutagenese entweder gegen Glycin oder gegen Alanin ausgetauscht. Von den resultierenden Muteinen konnten sieben durch PCMB gehemmt werden. Lediglich die Mutante, bei der Cystein 148 gegen Serin und Alanin ausgetauscht worden war, konnte weder durch PCMB noch durch DTNB gehemmt werden. Bei Cystein 148 (*Pecten*-Nummerierung) handelt es sich weiterhin um das einzige Cystein, das in allen untersuchten Sequenzen konserviert ist (s. Abb. 42, S. 109). Bei der CENDH liegt das entsprechende Cystein (C142) am Eingang der Nukleotidbindedomäne (s. Abb. 46, S. 136). Es ist leicht vorstellbar, dass die NADH-Bindung sterisch behindert ist, wenn dort Liganden mit Benzolringen, wie z.B. DTNB oder PCMB gebunden sind. Durch die Lage dieses Cysteins lässt sich weiterhin erklären, warum durch Alkylierung mit Iodacetamid keine Inhibition der ODH erzielt werden konnte. Der Alkylrest ist klein genug, um die Bindung von NADH und anderer Substrate nicht zu behindern.

Cystein 148 wurde sowohl gegen Serin, als auch gegen Alanin ausgetauscht. Die resultierenden Muteine unterschieden sich untereinander nicht in ihren kinetischen Eigenschaften, jedoch gegenüber der ODH-5His. Die K_m -Werte für Pyruvat und L-Arginin waren um den Faktor 3 gegenüber der ODH-5His erhöht, die Michaeliskonstante für NADH um den Faktor 2. Der Übergangszustand der Reaktion war jeweils um ca. 3 kJ mol^{-1} weniger stabilisiert als beim Wildtyp, wodurch sich die erhöhten K_m -Werte für die verschiedenen Substrate erklären lassen. Anscheinend hat Cystein 148 eine strukturelle Bedeutung und die Mutation zu Serin bzw. Alanin verändert die Struktur der ODH so, dass der Übergangszustand der Reaktion ein wenig schlechter stabilisiert wird. Die Auswirkungen sind aber so gering, als dass eine direkte Beteiligung am Reaktionsmechanismus, wie von cysteinabhängigen Dehydrogenasen z.B. der

GAPDH aus *E. coli* bekannt (Mougin *et al.*, 1988), eher unwahrscheinlich erscheint. Zusätzlich sind zahlreiche Dehydrogenasen nur aktiv, wenn Zink fest an ein Cystein im aktiven Zentrum gebunden ist. Die Beteiligung von Metallionen an der Katalyse kann für die ODH jedoch ausgeschlossen werden (van Thoai *et al.*, 1969).

Betrachtet man die Enzym-Ausbeuten einer 1L-Kultur der verschiedenen Cystein-Mutanten, sowie den Vergleich der löslichen mit der unlöslichen Phase des Rohextraktes der Mutante C8A, der in Abbildung 36 (S. 100) dargestellt ist, so wird deutlich, dass auch die Austausch der Cysteine gegen Alanin oder Glycin anscheinend zu einer erhöhten Aggregation der ODH im Bakterium führen. Womöglich erfüllen die Cysteine vornehmlich strukturelle Aufgaben in der ODH, obwohl sie nicht an Disulfidbrücken beteiligt sind. Durch den Austausch gegen Alanin oder Glycin könnten von verschiedenen Cysteinresten ausgehende Wasserstoffbrücken fehlen, was zu einer leicht veränderten Struktur der Muteine führt. Mitunter gelangen so hydrophobe Aminosäurereste an die Enzym-Oberfläche, die zu einer Aggregation im bakteriellen Cytoplasma beitragen. Die strukturellen Veränderungen scheinen aber fast keinen Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften der verschiedenen Cystein-Mutanten zu haben. Lediglich bei der schon beschriebenen Cystein-Mutante 148, sowie bei der Mutante C382G lassen sich Unterschiede zu wildtypischer ODH erkennen. Bei der Mutante C382G sind anscheinend die strukturellen Veränderungen ebenfalls ausreichend, um den Übergangszustand der Reaktion ein wenig schlechter zu stabilisieren. Allerdings sind auch hier die Auswirkungen so gering, als dass man von einer direkten Beteiligung des Cysteins 382 an der Katalyse sprechen könnte.

4.5.3 *Gerichtete Mutagenese weiterer Aminosäurereste*

Zusätzlich wurden weitere konservierte Aminosäurereste durch gerichtete Mutagenese verändert, um ihre Beteiligung an der Katalyse, bzw. an der Bindung einzelner Substrate zu untersuchen. Unter anderem wurde Arginin 41 (*Pecten*-Nummerierung) ausgewählt, das in allen untersuchten Opindehydrogenase-Sequenzen konserviert ist. Dieser Argininrest soll für die Erkennung des Pyrophosphatanteils des Coenzym wichtig sein (Britton *et al.*, 1998). Ein Vergleich der kinetischen Parameter der R41A-Mutante für die Substrate Pyruvat, L-Arginin und NADH mit denen des Wildtyps zeigt allerdings, dass die Mutation nur einen marginalen Einfluss hat. Die K_m -Werte sind geringfügig erhöht und der Übergangszustand ist ein wenig (ca. 1 kJ mol^{-1}) schlechter stabilisiert. Die katalytische Effizienz ist von der Mutation kaum beeinträchtigt. Ohne Kristallstruktur der ODH lässt sich keine direkte Beteiligung an der Bindung eines Teils des Coenzym bestätigen. Da NADH jedoch von verschiedenen Aminosäu-

ren in Position gebracht werden muss, ist es möglich, dass trotz der Mutation des konservierten Arginins gegen ein Alanin die korrekte Orientierung des Coenzym für die Katalyse gewährleistet ist.

Weiterhin ist mindestens eine negativ geladene Aminosäure an der NADH-Bindung beteiligt, die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxylgruppen der Adeninribose herstellt. Bei der CENDH konnte die Position dieser Aminosäure durch die Strukturanalyse als Aspartat 34 identifiziert werden. In den tierischen Opindehydrogenasen ist an dieser Position überwiegend Alanin enthalten. Allerdings ist in direkter Nachbarschaft ein Aspartat zu finden (D37, *Pecten*-Nummerierung), das in allen tierischen Enzymen konserviert ist und somit für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken benutzt werden könnte.

Feeney und Scrutton (1990) zeigten, dass bei der Laktatdehydrogenase ein Aspartat im N-terminalen Bereich, also in der Nähe der Rossmannfalte, eine entscheidende Bedeutung für die Unterscheidung zwischen NADH und NADPH hat. Die negative Ladung dieses Aspartatrestes stößt die ebenfalls negativ geladene Phosphatgruppe des NADPHs ab. Durch Austausch des Aspartats zu Serin konnte die katalytische Effizienz des Enzyms für die Umsetzung von NADPH um den Faktor 20 gesteigert werden (Feeney *et al.*, 1990; Scrutton *et al.*, 1990). In der *Pecten*-Sequenz findet sich neben dem Aspartat 37 ein weiteres Aspartat an Position 25. Allerdings ist dieses Aspartat nicht konserviert und nur in *Pecten maximus*, *Mizuhopecten yessoensis* und *Haliotis discus hannai* an dieser Position zu finden. Durch die gerichtete Mutagenese des Aspartats 25 gegen ein Asparagin (D25N) konnte die Affinität der ODH gegenüber NADPH nicht gesteigert werden. Es ist anscheinend nicht ausreichend, lediglich die negative Ladung zu entfernen. Holmberg *et al.* (1999) berichten, dass sie zusätzlich ein Isoleucin in der Nähe des Aspartats verändern mussten, um die Coenzympezifität der L-LDH von *Bacillus stearothermophilus* zum NADPH hin zu verschieben. Weiterhin hat der Austausch D25N keinen Einfluss auf die kinetischen Parameter der Reaktion, was allerdings auch nicht verwunderlich erscheint, da die Aminosäure nicht in allen untersuchten Sequenzen konserviert ist.

Anders verhält es sich dagegen bei dem konservierten Aspartat 37. Diese Aminosäure wurde gegen Asparagin, Serin und Alanin ausgetauscht. Die kinetischen Parameter aller drei Mutanten sind gegenüber dem Wildtyp kaum verändert. Allerdings fällt auf, dass die katalytische Effizienz von D37S, über D37N bis zu D37A abnimmt. Die Seitenketten von Serin und Asparagin können, ebenso wie Aspartat, Wasserstoffbrücken zum Coenzym ausbilden. Ihr Einbau in das Enzym verändert die Effizienz der Reaktion nicht. Wird Aspartat durch Alanin ersetzt, könnte das Coenzym ein wenig schlechter stabilisiert sein, die Effizienz der Katalyse

nimmt im Vergleich zu den anderen Austauschungen geringfügig ab. Allerdings ist auch hier festzustellen, dass der Beitrag der Aminosäure D37 zur Bindung des Coenzym eher gering ist. Zusätzlich konnte auch bei diesen drei Mutanten keine verbesserte Umsetzung von NADPH gemessen werden. Wie schon bemerkt, scheint nicht nur die fehlende negative Ladung eines Aspartats für die NADPH-Bindung verantwortlich zu sein. Auch hier werden erst durch die Strukturaufklärung der ODH neue Möglichkeiten gegeben sein, gezielter die Coenzym-spezifität zu verändern.

Auf die Aggregation der Mutante E252A wurde bereits zu Beginn dieses Abschnitts eingegangen. Der strukturelle Einfluss dieses durchgehend konservierten Glutamatrestes zeigt sich auch beim Betrachten der kinetischen Parameter des E252A-Muteins. Die Michaelis-Konstanten für Pyruvat, L-Arginin und NADH sind gegenüber der ODH-5His nur leicht erhöht, allerdings ist die Effizienz dieser Enzymvariante sehr eingeschränkt, da der Übergangszustand der Reaktion um bis zu 6.7 kJ mol^{-1} schlechter stabilisiert ist als beim Wildtyp, was durch eine geringfügig veränderte Struktur der ODH bedingt sein könnte.

4.5.4 Die katalytische Triade

Von der Laktatdehydrogenase ist bekannt, dass sich in ihrem aktiven Zentrum ein so genanntes DXXR-Motiv befindet. Zusammen mit einem konservierten Histidin wird eine Histidin-Aspartat-Arginin-Triade gebildet, die den Transfer des Hydridions vom NADH auf Pyruvat ermöglicht (Monneuse und Rouzé, 1987; Clarke *et al.*, 1988; Clarke *et al.*, 1989a und b). Auch in der Malatdehydrogenase ist eine solche Triade nachgewiesen (Birktoft und Banaszak, 1982; Goward und Nicholls, 1994). Obwohl die Opindehydrogenasen eine ähnliche Reaktion katalysieren, lässt sich in ihren Aminosäuresequenzen kein solches Motiv finden (Britton *et al.*, 1998; Janßen, 2000). In der CENDH allerdings wurde ein DXXR-Motiv von Monneuse und Rouzé (1987) nachgewiesen. Röntgenkristallographische Untersuchungen von Britton *et al.* (1998) konnten jedoch eine Beteiligung dieses Motivs an der Katalyse ausschließen, da es sich an der Rückseite des Enzyms, abseits vom postulierten aktiven Zentrum befindet (s. Abb. 46, S. 136; D238 und R241). Weiterhin soll auch in der ODH sowohl ein Histidyl- als auch ein Carboxylrest am Reaktionsmechanismus beteiligt sein, wie Arbeiten von Thomé-Beau (1971 und 1973) und Olomucki (1975) zeigen. Zusätzlich wurden innerhalb der Opindehydrogenase-Sequenzen sowohl konservierte Histidin-, als auch Arginin- und Aspartatreste gefunden, welche die Beteiligung einer ähnlichen Triade an der Katalyse vermuten lassen (Janßen, 2000; Kan-No *et al.* 2005).

Das konservierte Histidin 95 (CENDH H88, Abb. 46, S. 136) wurde gegen Glycin ausgetauscht. Die resultierende ODH-Mutante zeigte die gleichen kinetischen Eigenschaften wie das wildtypische Enzym, so dass eine Beteiligung von Histidin 95 an einer möglichen Triade ausgeschlossen wurde. An Position 212 (*Pecten*-Nummerierung, CENDH-Nr. 202, Abb. 46, S. 136) ist ein weiteres konserviertes Histidin zu finden. Betrachtet man die dreidimensionale Anordnung dieses Restes zusammen mit den ebenfalls konservierten Resten Arginin 324 (bzw. 292 in der CENDH) und Aspartat 329 (CENDH-297) wie in Abbildung 46 (S. 136) dargestellt, so ist vorstellbar, dass diese drei Reste die Funktion einer Triade übernehmen könnten. Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese wurden alle drei Aminosäurereste durch Alanin ersetzt und die resultierenden Muteine in *E. coli* exprimiert.

Bei allen drei Resten hat der Austausch zu Alanin einen gravierenden Einfluss auf die Katalyse der Reaktion. So war z.B. der K_m -Wert für Pyruvat bei der Mutante R324A um 119-fach (92 mmol L^{-1}) gegenüber wildtypischer ODH-5His erhöht, die Michaelis-Konstante für L-Arginin sogar 300-fach (159 mmol L^{-1}). Die K_m -Werte für NADH waren bei allen drei Muteinen lediglich zwischen 1.1- und 4.6-fach gegenüber dem wildtypischen Enzym erhöht. Anscheinend haben die Mutationen einen deutlichen Einfluss auf die Substratbindung, nicht jedoch auf die Bindung des Coenzym NADH. Insgesamt war die Effizienz der Reaktion stark erniedrigt. In allen drei Fällen wurde der Übergangszustand der Katalyse um bis zu 30 kJ mol^{-1} schlechter stabilisiert als beim Wildtyp. Es kann also davon ausgegangen werden, dass den drei ausgewählten Aminosäureresten eine entscheidende Bedeutung bei der Katalyse zukommt. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde der in Abbildung 47 (S. 145) dargestellte Reaktionsmechanismus der ODH-katalysierten Reaktion entwickelt.

In Richtung der Octopinbildung startet die Reaktion mit dem nucleophilen Angriff der α -Aminogruppe von L-Arginin auf das Carbonyl-C-Atom von Pyruvat. Der resultierende Übergangszustand wird anschließend im aktiven Zentrum stabilisiert, indem die Carboxylgruppe des Pyruvats mit dem Aminosäurerest von Arginin 324 interagiert. Histidin 212 fungiert als ein Säure-Base-Katalysator, der neben der korrekten Orientierung des Übergangszustands ein Proton auf die Carbonylgruppe des Pyruvats überträgt. Durch die Anwesenheit von Aspartat 329 wird die Azidität von Histidin 212 erhöht und damit der Protonentransfer ermöglicht. Nach Abspaltung eines Wassermoleküls kann schließlich der Hydridtransfer vom Coenzym NADH auf das intermediäre Carbeniumion erfolgen. D-Octopin, das Produkt der reduktiven Kondensation von Pyruvat und L-Arginin, ist gebildet und verlässt das aktive Zentrum der ODH gefolgt von NAD^+ .

4.5.5 Aminosäurebindestelle

Bei der Untersuchung der Opindehydrogenasen stellt sich erst recht die Frage, weshalb für die Oxidation von NADH außer Pyruvat noch eine Aminosäure benötigt wird. Neben Enzymen, die über ein breites Substratspektrum verfügen, lassen sich bei den Invertebraten auch Opindehydrogenasen finden, die auf ein Aminosäuresubstrat beschränkt sind und bei denen sich unterschiedliche Aktivitäten auf verschiedene Enzymproteine zurückführen lassen. In der Literatur wird für die ODH aus *Pecten maximus* angegeben, dass ausschließlich Aminosäuren mit einer Guanidiniumfunktion umgesetzt werden können (van Thoai und Robin, 1961; Storey und Dando, 1982). Allerdings kann diese festgestellte Beschränkung womöglich auf eine zu geringe Konzentration des Enzyms im Testansatz zurückgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit gelang es nämlich, die Enzym-katalysierte Umsetzung jeder proteinogenen L-Aminosäure durch entsprechend hohe Konzentrationen rekombinanter ODH zu detektieren. Die Aktivität mit allen Aminosäuren war jedoch mindestens um den Faktor 1000 gegenüber der Aktivität mit L-Arginin erniedrigt. Die rekombinante ODH zeigte hingegen keine Aktivität mit Taurin, Agmatin oder D-Arginin. Anscheinend ist besonders die α -Carboxylgruppe bzw. die Position dieser Gruppe wichtig, damit das Aminosäuresubstrat an die ODH gebunden und für die Katalyse richtig positioniert werden kann. Octopin- und Tauropindehydrogenase müssen sich daher in der Fixierung des Aminosäuresubstrates im aktiven Zentrum unterscheiden.

Die Beteiligung der α -Carboxylgruppe der Aminosäure an der Ausrichtung des Substrates könnte auch die beobachtete Substratinhibition bei Pyruvat und L-Arginin erklären. Die negativ geladene α -Carboxylgruppe beider Substrate lässt sich jeweils leicht, z.B. durch einen Argininrest, im Enzym stabilisieren und für die Katalyse korrekt ausrichten. Als ein beteiligter Argininrest konnte Arginin 324 identifiziert werden. Aber sowohl Pyruvat, als auch L-Arginin können nun im aktiven Zentrum jeweils richtig orientiert binden oder aber auch falsch positioniert werden. Bei zunehmenden Substratkonzentrationen wird eine Bindung an falscher Stelle immer wahrscheinlicher, die Substratmoleküle blockieren das aktive Zentrum und führen somit zu der beobachteten Substratinhibition.

Britton *et al.* (1998) und Janßen (2000) äußerten Vermutungen über verschiedene Aminosäurereste, denen eine Bedeutung für die Substratspezifität zukommen könnte. Ausgangspunkt für den Vergleich war die unterschiedliche Substratspezifität von CENDH und ODH bzw. TDH. Die CENDH setzt in der von ihr katalysierten Reaktion vornehmlich hydrophobe Aminosäuren wie L-Methionin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Phenylalanin und L-Leucin um. Die ODH hingegen katalysiert die reduktive Kondensation von Pyruvat mit L-Arginin, einer basi-

schen Aminosäure, die bei pH 7.0 positiv geladen ist. Die Tauropindehydrogenase benutzt Taurin als Substrat, das bei pH 7.0 eine negativ geladenen Sulfonylgruppe besitzt. Ausgehend von der Aminosäure Arginin 292 in der CENDH wurden nun die Sequenzen auf einen Wechsel von hydrophoben zu polaren/geladenen Aminosäuren untersucht.

	▼		▼		▼		▼		▼ ▼	
<i>P. maximus</i>	VILTVP	92	LPSQAG	121	IMSYS-F	210	GLVHPVK	311	VKDIYQWYLEY	282
<i>M. yessoensis</i>	VILTVP	92	LPSQAG	121	IMSYS-F	210	GLVHPVK	311	VKDIYQWYLEY	282
<i>L. vulgaris</i>	IIFTVPA	101	LPSQPG	130	LLADA-V	220	GLVHPMK	321	VIHLFDWYKLN	292
<i>L. opalescens</i>	VIFTVPA	100	LPSQPG	129	LLADA-V	219	GLVHPMK	320	VIHLFDWYKLN	291
<i>S. officinalis</i>	VIFTVPA	101	LPSQPG	130	LLADS-V	220	GMVHPMK	321	VIHLFDWYKLN	292
<i>H. discus hannai</i>	IIFTVPA	97	MPGQPG	126	LATKS-I	216	GLVHPMK	317	VLHLYDWYLRD	288
<i>F. oregonensis</i>	IIFCVPA	94	LPGQPG	123	LMTKS-I	213	GLVHPMK	314	VEHLLWYRQD	285
<i>A. irricolor</i>	IVITVPA	91	FPGQPG	120	IMAVNGM	211	GLTHPCT	312	VIHMHPPYICA	283
<i>P. sachalinensis</i>	VILCMPA	98	LPGQPG	127	FLYRP-T	219	GLVHPMK	320	ISSMQDCFCGE	291
<i>A. spec</i>	ILIVVPA	85	NPGATGC	114	LTNVNAV	200	GIACPIN	288	--SVCEWYKES	262
	::: :**		*. . *		:		*: . * .		:	:

Abb. 48 Ausschnitte aus einem Proteinalignment verschiedener Opindehydrogenasen. Bei den verwendeten Sequenzen handelt es sich um die Octopindehydrogenase aus *Pecten maximus*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Loligo vulgaris*, *Loligo opalescens*, *Sepia officinalis* und *Pseudocardium sachalinensis*, die Tauropindehydrogenase aus *Arabella irricolor* und *Haliotis discus hannai*, die Carboxyethylnorvalindehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec*, sowie um eine mögliche Alanopindehydrogenase aus *Fusitriton oregonensis*. Unpolare, hydrophobe Aminosäuren (AVFPMILW) sind rot, saure (DE) blau, basische (RHK) schwarz und polare, ungeladene Aminosäuren (STYCNGQ) sind grün angefarbt.

Britton *et al.* (1998) benutzten für ihren Vergleich neben der CENDH die Nopalindehydrogenase (AE009420) und die Lysopindehydrogenase (ABC92952) aus *Agrobacter spec.*. Sie identifizierten Tryptophan 258 als einen möglichen Kandidaten, der für eine veränderte Substratspezifität verantwortlich sein könnte, da diese Aminosäure in der Nopalindehydrogenase gegen Glutamat ausgetauscht ist. Ein Vergleich mit den tierischen Opindehydrogenasen zeigt allerdings, dass die Aminosäure an dieser Position fast ausschließlich Tryptophan ist (s. Abb. 48 *Pecten maximus* W278). Sie wurde daher als möglicher Kandidat ausgeschlossen. Weiterhin wurde von Britton Valin 255 (CENDH-Nummerierung) als weiterer Kandidat ausgewählt, da diese Aminosäure bei der Nopalindehydrogenase gegen ein Aspartat ausgetauscht ist. Durch einen Vergleich mit den tierischen Opindehydrogenasen konnte eine Funktion dieser Aminosäure für die Substratspezifität allerdings ausgeschlossen werden. In sämtlichen untersuchten Sequenzen war an dieser Position eine hydrophobe Aminosäure (entweder Isoleucin, Leucin, Methionin oder Valin) konserviert.

Von Janßen wurden weitere Aminosäuren vorgeschlagen, die für die Substratspezifität verantwortlich sein könnten (Janßen, 2000). Sie sind ebenfalls in Abbildung 46 dargestellt. Es handelt sich um Threonin 89 (*Pecten*-Nummerierung), Glutamin 118, Tyrosin 208 und Histidin 308. An Position 89 ist die polare Aminosäure Threonin gegen ein hydrophobes Valin in der CENDH ausgetauscht. Bei *F. oregonensis* und *P. sachalinensis* ist an dieser Position mit Cystein ebenfalls eine polare Aminosäure vorhanden. An Position 118 ist ein in allen tie-

rischen Opindehydrogenasen vorhandenes Glutamin gegen ein Alanin in der CENDH ausgetauscht. Tyrosin 208 (*Pecten*, *Mizuhopecten*) ist gegen Aspartat (*Loligo*, *Sepia*), Lysin (*Halio-tis*, *Fusitriton*), Arginin (*Pseudocardium*) bzw. Valin (*Arabella*, *Arthrobacter*) ausgetauscht. An der Position 308 ist ein Histidin in allen tierischen Opindehydrogenasen konserviert, in der CENDH steht ein Glycin an dieser Position. Das Threonin 89 wurde durch Mutagenese gegen Alanin und Valin ausgetauscht. Glutamin 188 wurde zu Alanin bzw. Aspartat mutiert. Tyrosin 208 wurde gegen Alanin getauscht und Histidin 308 gegen Glycin.

Natürlich wäre es schön gewesen, durch den gezielten Austausch eines einzelnen Aminosäurerestes die Substratspezifität der Octopindehydrogenase zu verändern, um so vielleicht die Evolution dieses Enzyms zu simulieren.

Durch keinen durchgeführten Aminosäureaustausch konnte jedoch die Substratspezifität der ODH von L-Arginin zu einer anderen Aminosäure verschoben werden. Zusammen mit vorangegangener Beobachtung wird deutlich, dass die Tauropindehydrogenase Taurin anders binden muss, als die ODH und auch die CENDH ihre Aminosäure-Substrate. Neben der Notwendigkeit der Stabilisierung der α -Carboxylgruppe ist anzunehmen, dass in der ODH zusätzlich negativ geladene Aminosäuren die positiv geladene Seitenkette des L-Arginin stabilisieren müssen. In der TDH hingegen werden positiv geladene Aminosäuren nötig sein, um die negativ geladene Sulfonylgruppe richtig zu orientieren. Ein Austausch von Glutamin 118 zu Aspartat führte z.B. zu einem Enzym mit einer erheblich verringerten ODH-Aktivität. Womöglich wird durch die zusätzliche negative Ladung im aktiven Zentrum die Carboxylgruppe des L-Arginins abgestoßen, das Substrat kann so nur schlecht orientiert werden, die K_m -Werte für alle Substrate steigen und die katalytische Aktivität ist stark erniedrigt. Mit der Mutation von Q118 zu Alanin verschlechterten sich zwar ebenfalls die kinetischen Parameter der ODH, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei der Mutante Q118D. Offensichtlich hat die negativ geladenen Seitenkette einen starken Einfluss. Betrachtet man die Lage der Aminosäure auf Grundlage der CENDH-Struktur (A111 in Abb. 46, S. 136), so erscheint die beschriebene Abstoßung durchaus möglich.

Die Substratspezifität der Opindehydrogenasen für eine bestimmte Aminosäure lässt sich nicht auf eine Aminosäure des Proteins zurückführen. Es ist wahrscheinlicher, dass L-Arginin in der ODH durch mehrere verschiedene Reste gebunden werden muss. Diese hochspezifische Bindung von L-Arginin führt zu beschriebener Konformationsänderung des Enzyms, wobei sehr wahrscheinlich Wasser aus dem aktiven Zentrum ferngehalten wird. Die α -Aminogruppe von L-Arginin kann anschließend deprotoniert und so der Aminostickstoff für den nucleophilen Angriff auf das Pyruvat-Molekül vorbereitet werden. Die hieran beteiligten Ami-

nosäuren sind allerdings noch unbekannt und lassen sich mit Sicherheit erst durch die Strukturaufklärung der ODH bestimmen. Zusätzlich bewirkt die Konformationsänderung, dass das Coenzym in eine räumliche Nähe zum Übergangszustand gebracht wird, auf den nun ein Hydridion übertragen werden kann. Die ODH verhindert so, dass Pyruvat alleine bindet und anschließend durch NADH zu Laktat reduziert wird.

Es ist vorstellbar, dass sich im Lauf der Evolution die Aminosäurespezifität mehrfach unterschiedlich und unabhängig voneinander in den verschiedenen Opindehydrogenasen entwickelt hat. Ausgehend von einer völlig unspezifischen Opindehydrogenase, wie man sie z.B. in der See-Anemone *Bunodosoma cavernata* findet (Ellington, 1980; Storey und Dando, 1982), könnten sich verschiedene, auf bestimmte Aminosäuren spezialisierte, Enzyme entwickelt haben.

Vielleicht war die „erste“ Opindehydrogenase aber auch eine Octopindehydrogenase. In Zellen mit einem hohen kurzfristigen Energiebedarf waren neben Pyruvat ausreichende Mengen L-Arginin durch die Transphosphorylierung von Argininphosphat vorhanden. Da davon ausgegangen wird, dass es sich bei der urtümlichsten Phosphagenkinase um eine Arginin-kinase gehandelt hat, ist dies durchaus vorstellbar (Ellington, 2001). Aus einem L-Arginin- und einem Nukleotid-bindenden Protein entstand eine Octopindehydrogenase. Durch Mutationen unterschiedlichster Aminosäurereste veränderte sich das Platzangebot im aktiven Zentrum. Das relativ große L-Arginin-Molekül konnte nicht mehr umgesetzt werden und andere Aminosäuren waren bevorzugt. Es ist bekannt, dass die enzymatische Funktion auch oft von Aminosäureresten abhängt, die nicht direkt an der Katalyse beteiligt sind und die sich daher nicht durch eine rationale Herangehensweise erfassen lassen. Solche Aminosäurereste können z.B. durch eine ungerichtete Mutagenese entdeckt werden (Arnold, 1996). Alleine aus der Sequenz ist es daher heute nicht möglich, zu bestimmen, welche Aminosäurespezifität eine Opindehydrogenase besitzt.

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, eignet sich die Octopindehydrogenase aus *Pecten maximus*, bedingt durch die Probleme bei der Kristallisation oder bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung, nicht für alle Fragestellungen als Modellenzym. Allerdings sind die Opindehydrogenasen auch knapp 50 Jahre nach ihrer Entdeckung immer noch eine interessante Enzymklasse. Weitere Einblicke in die von ihnen katalysierte Reaktion werden es ermöglichen, gezielt Einfluss auf die Aminosäurespezifität zu nehmen. Opindehydrogenasen mit veränderter Spezifität könnten sich hervorragend für eine enzymbasierte, chirale Synthese unterschiedlichster Ausgangsstoffe z.B. in der pharmazeutischen Industrie, eignen.

5 Zusammenfassung

Die Octopindehydrogenase gehört zur Familie der Opindehydrogenasen, den terminalen Enzymen der anaeroben Glykolyse in unzähligen Invertebraten. Die ODH katalysiert die reduktive Kondensation von Pyruvat und L-Arginin in Anwesenheit von NADH, wodurch D-Octopin entsteht. Nach Aufklärung der Primärstruktur der ODH aus der Pilgermuschel *Pecten maximus* und heterologer Expression des Enzyms in *E. coli* sind ausreichende ODH-Mengen für strukturelle Untersuchungen verfügbar (Janßen, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Primärstrukturen von drei verschiedenen ODH-Isoenzymen identifiziert. Es ist jeweils nur der Austausch einer einzelnen Aminosäure für die beobachtete, unterschiedliche Wanderung der Isozyme in der nativen PAGE verantwortlich. Diese so genannten Allozyme unterscheiden sich dabei nicht in ihren kinetischen Eigenschaften.

Weiterhin wurden Reinigungsprotokolle für rekombinante ODH mit einer Histidin-Fusion als auch für das rekombinante Enzym ohne Affinitätsmarkierung etabliert bzw. verbessert. Die gereinigte ODH wurde in Kristallisationsversuchen eingesetzt. Es konnten drei Bedingungen identifiziert werden, bei denen sich Protein-Kristalle bildeten. Allerdings wuchsen die Kristalle bevorzugt nur in zwei Dimensionen. Die besten Kristalle wurden röntgenographisch untersucht, waren allerdings für die Datensammlung nicht geeignet, da es sich nicht um Einkristalle handelte. Mögliche Ursachen, z.B. Mikroheterogenitäten der ODH-Präparation, wurden als Grund diskutiert.

Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte die Bindungsreihenfolge der Substrate auf unkonventionelle Weise bestimmt werden. Zuerst muss das Coenzym NADH an die ODH binden. Es kommt zu einer Konformationsänderung, die eine Bindung von L-Arginin ermöglicht. Durch Bindung von L-Arginin an den ODH-NADH-Komplex ändert sich die Konformation erneut und das Coenzym wird in räumliche Nähe zum Übergangszustand der Reaktion gebracht, auf den ein Hydridion übertragen wird. Die ODH verhindert so, dass durch Bindung von Pyruvat und NADH bereits Laktat entsteht.

Durch gerichtete Mutagenese konnten neue Einblicke in den molekularen Reaktionsmechanismus der ODH und die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren erhalten werden. Es wurden drei Aminosäuren identifiziert, welche die Aufgabe einer katalytischen Histidin-Aspartat-Arginin Triade in der ODH übernehmen könnten. Die Carboxylgruppe des Pyruvats wird durch Arginin 324 stabilisiert. Histidin 212 fungiert als ein Säure-Base-Katalysator. Neben der korrekten Orientierung des Übergangszustandes überträgt das Histidin ein Proton auf

die Carbonylgruppe. Aspartat 329 sorgt für eine ausreichende Azidität des Histidins und ermöglicht so die Protonenübertragung.

Aminosäurereste, von denen man vermutete, dass sie für die Substratspezifität verantwortlich sein könnten, wurden ebenfalls durch gerichtete Mutagenese untersucht. Die Substratspezifität der ODH für Aminosäuren konnte jedoch nicht verändert werden. Wahrscheinlich sind die, für die Determinierung der Substratspezifität verantwortlichen Aminosäuren durch eine rationale Herangehensweise ohne vorhandene Kristallstruktur der ODH nicht erfassbar.

Summary

Octopine dehydrogenase belongs to the family of opine dehydrogenases terminating anaerobic glycolysis in many invertebrates. ODH catalyses the reductive condensation of pyruvate and L-arginine resulting in the synthesis of D-octopine. NADH is oxidized as in the lactate dehydrogenase mediated reaction to maintain the redox balance during anaerobiosis. The gene coding for ODH of the scallop *Pecten maximus* was cloned and ODH can be heterologously overexpressed in *E.coli* (Janßen, 2000).

Aim of this work was the optimization of purification conditions for the c-terminally elongated ODH as well as for the recombinant enzyme without an affinitytag. Purified ODH was used in various crystallization trials. Three conditions were found giving yield to crystalline protein structures. ODH crystals favored growth in two dimensions resulting in small needles. The best crystals obtained were examined using X-ray diffraction analysis. Unfortunately, they are not suited for data collection, because they consist of staged thin plates. Probably a microheterogeneous ODH-preparation resulting from deamidation of asparagine residues is responsible inadequate crystallization.

NMR-spectroscopy was used to clarify the binding order of ligands to ODH. NADH must bind to the enzyme first, resulting in conformational changes allowing the binding of L-arginine which induces yet another conformational change avoiding the formation of lactate caused by reduction of pyruvate through NADH. Problems with deuteration of ODH prevented the resonance assignment of NMR-spectra but chemical shifts could be used to calculate dissociation constants for NADH, NAD⁺ und L-arginine.

Site-directed mutagenesis allowed new insights into the molecular reaction mechanism of ODH. Mutagenesis of conserved arginine, histidine and aspartate residues showed that these amino acids could assume the function of a catalytic triad in octopine dehydrogenase. The carboxyl group of pyruvate is stabilized by arginine 324. As well as orienting the substrate, histidine 212 acts as an acid-base catalyst by donating a proton to the carbonyl group of pyruvate. The acidity of this histidine is increased by the proximity of aspartate 329.

Amino acid residues supposed to be involved in binding of amino acid substrate could not be identified by site-directed mutagenesis. Substrate specificity of ODH could not be changed towards another amino acid. Obviously these residues cannot be found using a rational approach without a crystal structure of ODH.

6 Literatur

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

Arnold FH (1996) Directed Evolution: Creating Biocatalysts for the Future. *Chemical Engineering Science* 51: 5091-5102.

Asano Y, Yamaguchi K, Kondo K (1989) A new NAD⁺-dependent opine dehydrogenase from *Arthrobacter sp.* strain 1C. *J Bacteriol* 171: 4466-4471.

Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR (1976) 2-Dimensional Spectroscopy - Application to Nuclear Magnetic-Resonance. *J Chem Phys* 64: 2229-2246.

Baici A, Luisi PL, Olomucki A, Doublet MO, Klincak J (1974) Influence of ligands on the coenzyme dissociation constants in octopine dehydrogenase. *Eur J Biochem* 46: 59-66.

Baker PJ, Britton KL, Rice DW, Rob A, Stillman TJ (1992) Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. Implications for nucleotide specificity. *J Mol Biol* 228: 662-671.

Baldwin J, England WR (1982) Multiple forms of octopine dehydrogenase in *Strombus luhuanus* (mollusca, gastropoda, strombidae): genetic basis of polymorphism, properties of the enzymes, and relationship between the octopine dehydrogenase phenotype and the accumulation of anaerobic end products during exercise. *Biochem Genet* 20: 1015-1025.

Baldwin J, Opie AM (1978) Role of octopine dehydrogenase in adductor muscles of bivalve mollusks. *Comp Biochem Physiol* 61: 85-92.

Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10: 411-421.

Baneyx F, Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22: 1399-1408.

Barucca M, Olmo E, Schiaparelli S, Canapa A (2004) Molecular phylogeny of the family Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial 16S and 12S rRNA genes. *Mol Phylogenet Evol* 31: 89-95.

Beauchamp CJ, Chilton WS, Dion P, Antoun H (1990) Fungal catabolism of crown gall opines. *Appl Environ Microbiol* 56: 150-155.

Beauchamp CJ, Dion P, Kloepper JW, Antoun H (1991) Physiological characterization of opine-utilizing Rhizobacteria for traits related to plant growth-promoting activity. *Plant and Soil* 132: 273-279.

Beaumont AR, Day TR, Gade G (1980) Genetic-variation at the octopine dehydrogenase locus in the adductor muscle of *Cerastoderma edule* (L) and 6 other bivalve species. *Mar Biol Lett* 1: 137-148.

- Beis I, Newsholme EA (1975) The contents of adenine-nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 152: 23-32.
- Bennet AF (1978) Activity metabolism of the lower vertebrates. *Ann Rev Physiol* 400: 447-469.
- Bergfors T (2003) Seeds to crystals. *Journal of Structural Biology* 142: 66-76.
- Birktoft JJ, Banaszak LJ (1983) The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. X-ray refinement of cytoplasmic malate dehydrogenase. *J Biol Chem* 258: 472-482.
- Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser D (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino-acid-sequences. *Electrophoresis* 14: 1023-1031.
- Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE (1994) Reference points for comparisons of 2-dimensional maps of proteins from different human cell-types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15: 529-539.
- Boivin R, Lebeuf H, Dion P (1987) Octopine and octopinic acid utilization in a nonfluorescent *Pseudomonas sp.*: enhancement by spontaneous mutation and lack of effect from curing of a plasmid. *Can J Microbiol* 33: 534-540.
- Bolotina IA, Markovich DS, Volkenstein MV, Zavodsky P (1967) Investigation of conformation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 132: 260-270.
- Bolotina IA, Markovich DS, Volkenstein MV, Zavodzky P (1967) Investigation of conformation of lactate dehydrogenase and of its catalytic activity. *Biochim Biophys Acta* 132: 271-281.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brändén CL, Zeppezauer E, Boiwe T, Söderlund G., Säderberg BO, Nordstrom B (1970) X-ray studies of horse liver alcohol dehydrogenase. In: Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases. *Springer Verlag*: 129-134.
- Brändén CL, Eklund H (1977) Coenzyme-induced conformational changes and substrate binding in liver alcohol dehydrogenase. *Ciba Found Symp* 63-80.
- Brändén CL (1980) Relation between structure and function of α/β -proteins. *Q. Rev. Biophys.* 13: 317-338.
- Brändén CL, Tooze J (1991) Introduction to Protein Structure. *New York: Garland Publishing Co.*: 148-149.

- Bucher MH, Evdokimov AG, Waugh DS (2002) Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 392-397.
- Capasso S, Mazzarella L, Sica F, Zagari A (1989) Deamidation via cyclic imide in asparaginyl peptides. *Pept Res* 2: 195-200.
- Capasso S, Mazzarella L, Zagari A (1991) Deamidation via cyclic imide of asparaginyl peptides: dependence on salts, buffers and organic solvents. *Pept Res* 4: 234-238.
- Ceroni A, Passerini A, Vullo A and Frasconi P (2006) DISULFIND: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server. *Nucleic Acids Res* 34 (Web Server issue):W177-W181.
- Chang CC, Chen CM, Adams BR, Trost BM (1983) Leucinopine, a characteristic compound of some crown-gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 3573-3576.
- Chayen NE (1997) A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals. *Journal of Applied Crystallography* 30: 198-202.
- Chilton WS, Tempe J, Matzke M, Chilton MD (1984) Succinamopine: a new crown gall opine. *Journal Bacteriol* 157: 357-362.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Coughlin PE, Anderson FE, Oliver EJ, Brown JM, Homans SW, Pollak S, Lustbader JW (1999) Improved resolution and sensitivity of triple-resonance NMR methods for the structural analysis of proteins by use of a backbone-labeling strategy. *J Am Chem Soc* 121: 11871-11874.
- Clarke AR, Wilks HM, Barstow DA, Atkinson T, Chia WN, Holbrook JJ (1988) An investigation of the contribution made by the carboxylate group of an active site histidine-aspartate couple to binding and catalysis in lactate dehydrogenase. *Biochemistry* 27: 1617-1622.
- Clarke AR, Atkinson T, Holbrook JJ (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I. *Trends Biochem Sci* 14: 101-105.
- Clarke AR, Atkinson T, Holbrook JJ (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part II. *Trends Biochem Sci* 14: 145-148.
- Clarke FM, Masters CJ (1974) Association of glycolytic components in skeletal-muscle extracts. *Biochim Biophys Acta* 358: 193-207.
- Clarke FM, Masters CJ (1974) Association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal-muscle. *Proc Austral Biochem Soc* 7: 6.
- Connett RJ, Gayeski TEJ, Honig CR (1983) Lactate production in a pure red muscle in absence of anoxia - mechanisms and significance. *Adv Exp Med Biol* 159: 327-335.

Connett RJ, Gayeski TEJ, Honig CR (1984) Lactate accumulation in fully aerobic, working, dog gracilis muscle. *Am J Physiol* 246: 120-128.

Connett RJ, Gayeski TEJ, Honig CR (1985) Energy-sources in fully aerobic rest-work transitions - A new role for glycolysis. *Am J Physiol* 248: 922-929.

Coughlin PE, Anderson FE, Oliver EJ, Brown JM, Homans SW, Pollak S, Lustbader JW (1999) Improved resolution and sensitivity of triple-resonance NMR methods for the structural analysis of proteins by use of a backbone-labeling strategy. *J Am Chem Soc* 121: 11871-11874.

Crabtree B, Newsholme EA (1972) Activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofruktokinase, lactate-dehydrogenase and glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 126: 49-&.

Cudney B, Patel S, Weisgraber K, Newhouse Y, McPherson A (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50: 414-423.

Dairi T, Asano Y (1995) Cloning, nucleotide sequencing, and expression of an opine dehydrogenase gene from *Arthrobacter sp.* strain 1C. *Appl Environ Microbiol* 61: 3169-3171.

Dales RP (1958) Survival of anaerobic periods by 2 intertidal polychaetes, *Arenicola marina* (L) and *Owenia fusiformis* Delle Chiaje. *J Mar Biol Assoc U.K.* 37: 521-529.

Dando PR, Storey KB, Hochachka PW, Storey JM (1981) Multiple dehydrogenases in marine mollusks - Electrophoretic analysis of alanopine dehydrogenase, strombine dehydrogenase, octopine dehydrogenase and lactate-dehydrogenase. *Marine Biology Letters* 2: 249-257.

Davis BJ (1964) Disc electrophoresis - 2: Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 121: 404-427.

De Zwaan A, Zandee DI (1972) Utilization of glycogen and accumulation of some intermediates during anaerobiosis in *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol B* 43: 47-54.

De Zwaan A, Wijsman TCM (1976) Anaerobic metabolism in bivalvia (mollusca) - Characteristics of anaerobic metabolism. *Comp Biochem Physiol B* 54: 313-323.

De Zwaan A, Thompson RJ, Livingstone DR (1980) Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus*. 2. Biochemistry. *J Comp Physiol* 137: 105-114.

Deblaere R, Bytebier B, Degreve H, Deboeck F, Schell J, Vanmontagu M, Leemans J (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for agrobacterium-mediated gene-transfer to plants. *Nucleic Acids Res* 13: 4777-4788.

Dehner A, Kessler H (2005) Diffusion NMR spectroscopy: Folding and aggregation of domains in p53. *Chembiochem* 6: 1550-1565.

- Derewenda ZS (2004) The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods* 34: 354-363.
- Doublet MO, Olomucki A (1975a) Investigations on the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. 1. Steady-state kinetics. *Eur J Biochem* 59: 175-183.
- Doublet MO, Olomucki A, Baici A, Luisi PL (1975b) Investigations on the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. 2. Location of the rate-limiting step for enzyme turnover. *Eur J Biochem* 59: 185-191.
- Ducruix A, Giége R (1999) Crystallization of nucleic acids and proteins, A practical approach. *IRL Press*, UK.
- Dyson HJ, Wright PE (1998) Equilibrium NMR studies of unfolded and partially folded proteins. *Nature Struct Biol* 5: 499-503.
- Ebberink RHM, Salimans M (1982) Control of glycogen-phosphorylase activity in the posterior adductor muscle of the sea mussel *Mytilus edulis*. *J Comp Physiol* 148: 27-33.
- Ebberink RHM (1982) Control of adductor muscle phosphofructokinase activity in the Sea mussel *Mytilus edulis* during anaerobiosis. *Mol Physiol* 2: 345-355.
- Ellington WR (1980) Partial-purification and characterization of a broadly-specific octopine dehydrogenase from the tissues of the sea anemone, *Bunodosoma cavernata* (Bosc). *Comp Biochem Physiol B* 67: 625-631.
- Ellington WR (1989) Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens. *J Exp Biol* 143: 177-194.
- Ellington WR (2001) Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu Rev Physiol* 63: 289-325.
- Feder HM (1963) Gastropod defensive responses and their effectiveness in reducing predation by starfishes. *Ecology* 44: 505-&.
- Fesik SW, Zuiderweg ERP (1988) Heteronuclear 3-Dimensional NMR-spectroscopy - A strategy for the simplification of homonuclear two-dimensional NMR-spectra. *J Magn Reson* 78: 588-593.
- Fiaux J, Bertelsen EB, Horwich AL, Wuthrich K (2002) NMR analysis of a 900K GroEL-GroES complex. *Nature* 418: 207-211.
- Fiaux J, Bertelsen EB, Horwich AL, Wuthrich K (2004) Uniform and residue-specific ¹⁵N-labeling of proteins on a highly deuterated background. *J Biomol NMR* 29: 289-297.
- Fielding L (2003) NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Curr Top Med Chem* 3: 39-53.
- Fields JHA (1976a) A dehydrogenase requiring alanine and pyruvate as substrates from oyster adductor muscle. *Fed Proc Fedn Am Socs exp Biol* 37: 1687.

- Fields JHA, Baldwin J, Hochachka PW (1976b) On the role of octopine dehydrogenase in cephalopod mantle muscle metabolism. *Can J Zool* 54: 871-878.
- Fields JHA, Guderley H, Storey KB, Hochachka PW (1976c) The pyruvate branch point in squid brain: competition between octopine dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Can J Zool* 54: 879-885.
- Fields JHA, Eng AK, Ramsden WD, Hochachka PW, Weinstein B (1980) Alanopine and strombine are novel imino acids produced by a dehydrogenase found in the adductor muscle of the oyster, *Crassostrea gigas*. *Arch Biochem Biophys* 201: 110-114.
- Fields JHA, Quinn JF (1981) Some theoretical considerations on cytosolic redox balance during anaerobiosis in marine invertebrates. *J theor Biol* 88: 35-45.
- Fields JHA (1983) Alternatives to lactic-acid - Possible advantages. *J Exp Zool* 228: 445-457.
- Firmin JL, Stewart IM, Wilson KE (1985) N-2-(1-Carboxyethyl)Methionine - A pseudo-opine in octopine-type crown-gall tumors. *Biochem J* 232: 431-434.
- Fletcher WM, Hopkins FG (1907) Lactic acid in an amphibian muscle. *J Physiol* 35: 247-309.
- Gardner KH, Kay LE (1998) The use of H-2, C-13, N-15 multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 357-406.
- Gäde G, Grieshaber M (1975) Partial-purification and properties of octopine dehydrogenase and formation of octopine in *Anodonta cygnea* L. *J Comp Physiol B* 102: 149-158.
- Gäde G, Weeda E, Gabbott PA (1978) Changes in the level of octopine during the escape responses of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *J Comp Physiol B* 124: 121-127.
- Gäde G (1980) Biological Role of octopine formation in marine molluscs. *Mar Biol Lett* 1: 121-135.
- Gäde G, Carlsson K-H (1984) Purification and characterisation of octopine dehydrogenase from the marine nemertean *Cerebratulus lacteus* (Anopla: Heteronemerta): comparison with scallop octopine dehydrogenase. *Mar Biol* 79: 39-45.
- Gäde G, Grieshaber MK (1986) Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 83: 255-272.
- Geiger T, Clarke S (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides - Succinimide-linked reactions that contribute to protein-degradation. *J Biol Chem* 262: 785-794.
- Glaister D, Kerly M (1936) The oxygen consumption and carbohydrate metabolism of the retractor muscle of the foot of *Mytilus edulis*. *J Physiol* 87: 56-66.
- Goto NK, Kay LE (2000) New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol* 10: 585-592.

- Goward CR, Nicholls DJ (1994) Malate-dehydrogenase - A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci* 3: 1883-1888.
- Graham RA, Ellington WR, Chih CP (1985) Saturation transfer phosphorus nuclear magnetic-resonance studies of arginine phosphokinase in molluscan muscle. *Fed Proc* 44: 1589.
- Graham RA, Ellington WR (1985) Phosphorus nuclear magnetic-resonance studies of energy-metabolism in molluscan tissues - Intracellular pH change and the qualitative nature of anaerobic end products. *Physiol Zool* 58: 478-490.
- Graham RA, Ellington WR, Chih CP (1986) A saturation transfer phosphorus nuclear-magnetic-resonance study of arginine phosphokinase in the muscle of a marine mollusk. *Biochim Biophys Acta* 887: 157-163.
- Grieshaber M, Gäde G (1977) Energy supply and the formation of octopine in the adductor muscle of the scallop, *Pecten jacobaeus* (Lamarck). *Comp Biochem Physiol B* 58: 249-252.
- Grieshaber M, Kronig E, Koormann R (1978) A photometric estimation of phospho-L-arginine, arginine and octopine using homogenous octopine dehydrogenase isoenzyme 2 from the squid, *Loligo vulgaris* Lam. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 359: 133-136.
- Grieshaber M (1978) Breakdown and formation of high-energy phosphates. *J Comp Physiol B* 126: 269-276.
- Grieshaber MK, Kreutzer U (1986) Opine formation in marine invertebrates. *Zool Beitr N F* 30: 205-229.
- Grieshaber MK, Hardewig I, Kreutzer U, Pörtner HO (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 125: 43-147.
- Haas S, Thome-Beau F, Olomucki A, Thoai NV (1973) Purification de l'octopine déshydrogénase de *Sipunculus nudus*. Etude comparative avec l'octopine déshydrogénase de *Pecten maximus*. *CR Séa Soc Biol* 276: 831-834.
- Hammen CS, Bullock RC (1991) Opine oxidoreductases in brachiopods, bryozoans, phoronids and mollusks. *Biochem Syst Ecol* 19: 263-269.
- Hammen CS, Fielding C (1993) Opine oxidoreductases in marine worms of 5 phyla. *Comp Biochem Physiol B* 106: 989-992.
- Hardewig I, Kreutzer U, Pörtner HO, Grieshaber MK (1991a) The role of phosphofructokinase in glycolytic control in the facultative anaerobe *Sipunculus nudus*. *J Comp Physiol B* 161: 581-589.
- Hardewig I, Addink ADF, Grieshaber MK, Pörtner HO, Vandenthillart G (1991b) Metabolic rates at different oxygen levels determined by direct and indirect calorimetry in the oxygen-conformer *Sipunculus nudus*. *J Exp Biol* 157: 143-160.

- Hardewig I, Pörtner HO, Grieshaber MK (1994) Interactions of anaerobic propionate formation and acid-base status in *Arenicola marina* - An analysis of propionyl-CoA carboxylase. *Physiol Zool* 67: 892-909.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Hinkle PC, Kumar MA, Resetar A, Harris DL (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* 30: 3576-3582.
- Holmberg N, Ryde U, Bulow L (1999) Redesign of the coenzyme specificity in L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* using site-directed mutagenesis and media engineering. *Protein Eng* 12: 851-856.
- Holwerda DA, Dezwaan A (1979) Fumarate reductase of *Mytilus edulis* L. *Mar Biol Lett* 1: 33-40.
- Holwerda DA, Dezwaan A (1980) On the role of fumarate reductase in anaerobic carbohydrate catabolism of *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol B* 67: 447-453.
- Huc C, Olomucki A, Le Thi L, Dang BP, Nguyen VT (1971) Essential histidyl residues of octopine dehydrogenase. *Eur J Biochem* 21: 161-169.
- Huc C, Olomucki A, Thome-Beau F (1975) Modification of the essential carboxyl group in octopine dehydrogenase. *FEBS Lett* 60: 414-418.
- Jaenicke R, Gregori E, Laepple M (1979) Conformational effects of coenzyme binding to porcine lactic dehydrogenase. *Biophys Struct Mech* 6: 57-65.
- Jancarik J, Kim SH (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst* 24: 409-411.
- Janßen F (2000) Klonierung, Struktur und Evolution einiger Octopindehydrogenasen aus marinen Invertebraten. *Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Kan-No N, Endo N, Moriyama S, Nagahisa E, Sato M (2005) The amino acid sequence of tauropine dehydrogenase from the polychaete *Arabella iricolor*. *Comp Biochem Physiol B* 140: 475-485.
- Kanno N, Kamimura K, Nagahisa E, Sato M, Sato Y (1996) Application of isoelectric focusing in thin-layer polyacrylamide gels to the study of opine dehydrogenases in marine invertebrates. *Fisheries Science* 62: 122-125.
- Katz A, Sahlin K (1988) Regulation of lactic acid production during exercise. *J Appl Physiol* 65: 509-518.
- Kay LE, Ikura M, Tschudin R, Bax A (1990) 3-dimensional triple-resonance NMR-spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J Magn Res* 89: 496-514.

- Keller R (2005) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and Computer Aided Resonance Assignment. *Dissertation - Institute of Technology Zürich*.
- Kimura T, Nakano T, Yamaguchi T, Sato M, Ogawa T, Muramoto K, Yokoyama T, Kan-No N, Nagahisa E, Janssen F, Grieshaber MK (2004) Complementary DNA cloning and molecular evolution of opine dehydrogenases in some marine invertebrates. *Mar Biotechnol* 6, 493-502.
- Kmetec E, Bueding E (1961) Succinic and reduced diphosphopyridine nucleotide oxidase systems of *ascaris* muscle. *J Biol Chem* 236: 584-&.
- Kreutzer U, Siegmund B, Grieshaber MK (1985) Role of coupled substrates and alternative end-products during hypoxia tolerance in marine invertebrates. *Mol Physiol* 8: 371-392.
- Kreutzer U, Siegmund BR, Grieshaber MK (1989) Parameters controlling opine formation during muscular activity and environmental hypoxia. *J Comp Physiol B* 159: 617-628.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Latner, A. (1968). Isoenzymes in biology and medicine. In: *Isoenzymes in biology and medicine* S. 190. Academic Press, London, New York.
- LeMaster DM (1994) Isotope labeling in solution protein assignment and structural-analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 26: 371-419.
- Leslie AG, Wonacott AJ (1983) Coenzyme binding in crystals of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol* 165: 375-391.
- Livingstone DR, De Zwaan A, Leopold M, Marteiijn E (1983) Studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductases. *Biochem SystemEcol* 11: 415-425.
- Livingstone DR, Stickle WB, Kapper MA, Wang S, Zurburg W (1990) Further-studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductase activities. *Comp Biochem Physiol B* 97: 661-666.
- Longenecker KL, Garrard SM, Sheffield PJ, Derewenda ZS (2001) Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 679-688.
- Luisi PL, Baici A, Olomucki A, Doublet MO (1975) Temperature-determined enzymatic functions in octopine dehydrogenase. *Eur J Biochem* 50: 511-516.
- Manchenko GP, McGoldrick DJ, Hedgecock D (1998) Genetic basis of opine dehydrogenase activities in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B* 121: 251-255.
- Marion D, Kay LE, Sparks SW, Torchia DA, Bax A (1989) 3-dimensional heteronuclear NMR of N-15-labeled proteins. *J Am Chem Soc* 111: 1515-1517.

Masters CJ, Reid S, Don M (1987) Glycolysis - New concepts in an old pathway. *Mol Cell Biochem* 76: 3-14.

Mateja A, Devedjiev Y, Krowarsch D, Longenecker K, Dauter Z, Otlewski J, Derewenda ZS (2002) The impact of Glu → Ala and Glu → Asp mutations on the crystallization properties of RhoGDI: the structure of RhoGDI at 1.3 angstrom resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 1983-1991.

McIntosh LP, Dahlquist FW (1990) Biosynthetic incorporation of N-15 and C-13 for assignment and interpretation of nuclear-magnetic-resonance spectra of proteins. *Q Rev Biophys* 23: 1-38.

McPherson A (1985a) Crystallization of macromolecules: general principles. In: *Methods in Enzymology* 114: 112-120.

McPherson A (1985b) Use of polyethylene glycol in the crystallization of macromolecules. In: *Methods in Enzymology*, 114:120-125.

McPherson A (1985c) Crystallization of proteins by variation of pH or temperature. In: *Methods in Enzymology*, 114:125-127.

McPherson A (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem* 189: 1-23.

McPherson A (2001) A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. *Protein Sci* 10: 418-422.

Meding J (1994) Reinigung der Octopindehydrogenase aus *Pecten maximus* zum molekularbiologischen Vergleich der Opindehydrogenasen. *Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.

Meinardus-Hager G, Gäde G (1986a) The pyruvate branchpoint in the anaerobic energy metabolism of the jumping cockle *Cardium tuberculatum* L. D-lactate formation during environmental anaerobiosis versus octopine formation during exercise. *Exp Biol* 145: 91-110.

Meinardus-Hager G, Gäde G (1986b) The separate function of D-lactate, octopine-, and alanopine dehydrogenase in the foot muscle of the jumping cockle *Cardium tuberculatum* during anaerobiosis. *J Comp Physiol* 156B: 873-881.

Meinardus-Hager G, Gabbott PA, Gäde G (1989) Regulatory steps of glycolysis during environmental anoxia and muscular work in the cockle *Cardium tuberculatum*: control of low and high glycolytic flux. *J Comp Physiol* 159B: 195-203.

Messens E, Lenaerts A, van Montagu M, Hedges RW (1985) Genetic-basis for opine secretion from crown gall tumor-cells. *Mol Gen Genet* 199: 344-348.

Meyer B, Peters T (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* 42: 864-890.

Meyerhof O (1924) Die Energieumwandlung im Muskel. *Naturwissenschaften* 12: 181-186.

- Meyerhof O, Lohmann K (1928) Über die natürlichen Guanidinophosphorsäuren (Phosphagene) in der quergestreiften Muskulatur. I. Das physiologische Verhalten der Phosphagene. *Biochem Z* 196: 23-48.
- Meyerhof O (1928) Über die Verbreitung der Argininphosphorsäure in der Muskulatur der Wirbellosen. *Arch Sci biol Napoli* 12: 536-548.
- Middelberg AP (2002) Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20: 437-443.
- Monneuse-Doulet MO, Olomucki A, Buc J (1978) Investigation on the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. A regulatory behavior. *Eur J Biochem* 84: 441-448.
- Monneuse-Doulet MO, Lefebure F, Olomucki A (1980) Isolation and characterization of two molecular forms of octopine dehydrogenase from *Pecten maximus* L. *Eur J Biochem* 108: 261-269.
- Monneuse MO, Rouze P (1987) Sequence comparisons between *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA-encoded octopine and nopaline dehydrogenases and other nucleotide-requiring enzymes - Structural and evolutionary implications. *J Mol Evol* 25: 46-57.
- Montelione GT, Wagner G (1990) Conformation-independent sequential NMR connections in isotope-enriched polypeptides by H-1-C-13-N-15 triple-resonance experiments. *J Magn Reson* 87: 183-188.
- Moore E, Wilson DW (1937a) Nitrogenous extractives of scallop muscle I. The isolation and a study of the structure of octopine. *J Biol Chem* 119: 573-584.
- Moore E, Wilson DW (1937b) Nitrogenous extractives of scallop muscle II. Isolation from a quantitative analysis of muscle from freshly killed scallops. *J Biol Chem* 119: 585-588.
- Moore L, Warren G, Strobel G (1979) Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 2: 617-626.
- Morizawa K (1927) Über die Extraktstoffe von *Octopus octopodia*. *Acta Schol Med Kyoto* 10: 285-298.
- Mougin A, Corbier C, Soukri A, Wonacott A, Branlant C, Branlant G (1988) Use of site-directed mutagenesis to probe the role of Cys149 in the formation of charge-transfer transition in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Protein Eng* 2: 45-48.
- Müller A (2001) Charakterisierung der heterolog überexprimierten Oktopin-Dehydrogenase aus *Escherichia coli* (ER2566). *Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Mulcahy P, Griffin T, O'Carra P (1997) Biospecific affinity chromatographic purification of octopine dehydrogenase from molluscs. *Protein Expr Purif* 9: 109-114.
- Nester EW, Kosuge T (1981) Plasmids specifying plant hyperplasias. *Annu Rev Microbiol* 35: 531-565.

- Oganesyan N, Kim SH, Kim R (2005) On-column protein refolding for crystallization. *J Struct Funct Genomics* 6: 177-182.
- Olomucki A, Huc C, Lefebure F, Van Thoai N (1972) Octopine dehydrogenase. Evidence for a single-chain structure. *Eur J Biochem* 28: 261-268.
- Olomucki A, Thomebeau F, Biellmann JF, Branlant G (1975) Study of coenzyme binding-site of octopine dehydrogenase using analogues of NAD⁺. *Eur J Biochem* 56: 109-116.
- Olomucki A (1981) Structure and function of octopine dehydrogenase of *Pecten maximus* (great scallop). *Biochem Soc Trans* 9: 278-279.
- Oriol C, Olomucki A (1972) Spectropolarimetric studies of binary and ternary complexes of octopine dehydrogenase. *Eur J Biochem* 29: 288-292.
- Ornstein L (1964) Disc electrophoresis - 1: Background and theory. *Ann NY Acad Sci* 121: 321-349.
- Oschkinat H, Griesinger C, Kraulis PJ, Sorensen OW, Ernst RR, Gronenborn AM, Clore GM (1988) 3-dimensional NMR-spectroscopy of a protein in solution. *Nature* 332: 374-376.
- Perez JE, Nusetti O, Ramirez N, Alfonsi C (2000) Allozyme and biochemical variation at the octopine dehydrogenase locus in the scallop *Euvola ziczac*. *J Shellfish Res* 19: 85-88.
- Pervushin K, Riek R, Wider G, Wüthrich K (1997) Attenuated T-2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12366-12371.
- Pho DB, Olomucki A, Huc C, Thoai NV (1970) Spectrophotometric studies of binary and ternary complex of octopine dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 206: 46-53.
- Plaxton WC, Storey KB (1986) Glycolytic enzyme binding and metabolic control in anaerobiosis. *J Comp Physiol B* 156: 635-640.
- Pörtner HO, Kreutzer U, Siegmund B, Heisler N, Grieshaber MK (1984) Metabolic adaptation of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and environmental hypoxia. *Mar Biol* 79: 237-247.
- Roche J, Robin Y, Thoai NV, Pradel LA (1960) Sur les dérivés guanidiques et le phosphagène de quelques annélides polychètes de la baie de Naples et du mollusque *Arca noae* l. *Comp Biochem Physiol* 1: 44-55.
- Rossignol G, Beaulieu C, Coulombe RL, Granger RL, Miki B, Beauchamp C, Rossignol G, Dion P (1983) Characterization of opine-utilizing bacteria isolated from Québec. *Phytoprotection* 64: 61-68.
- Rossignol G, Dion P (1985) Octopine, nopaline, and octopinic acid utilization in *Pseudomonas*. *Can J Microbiol* 31: 68-74.

- Rossmann MG, Moras D, Olsen KW (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* 250: 194-199.
- Salzmann M, Pervushin K, Wider G, Senn H, Wuthrich K (1998) TROSY in triple-resonance experiments: New perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13585-13590.
- Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Third Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sato M, Gäde G (1986) Rhodoic acid dehydrogenase - A novel amino acid-linked dehydrogenase from muscle-tissue of *Haliotis* species. *Naturwissenschaften* 73: 207-209.
- Sato M, Takahara M, Kanno N, Sato Y, Ellington WR (1987) Isolation of a new opine, beta-alanopine, from the extracts of the muscle of the marine bivalve mollusk, *Scapharca broughtonii*. *Comp Biochem Physiol B* 88: 803-806.
- Sato M, Takeuchi M, Kanno N, Nagahisa E, Sato Y (1993a) Distribution of opine dehydrogenases and lactate-dehydrogenase activities in marine animals. *Comp Biochem Physiol B* 106: 955-960.
- Sato M, Takeuchi M, Kanno N, Nagahisa E, Sato Y (1993b) Purification and properties of tauropine dehydrogenase from a red alga, *Rhodoglossum japonicum*. *Hydrobiologia* 261: 673-678.
- Schell J, Vanmontagu M, Debeuckeleer M, Deblock M, Depicker A, Dewilde M, Engler G, Genetello C, Hernalsteens JP, Holsters M, Seurinck J, Silva B, Vanvliet F, Villarroel R (1979) Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 204: 251-266.
- Schiedek D, Zebe E (1987) Functional and environmental anaerobiosis in the razor-clam *Ensis directus* (Mollusca, Bivalvia). *Mar Biol* 94: 31-37.
- Schöttler U, Wienhausen G, Zebe E (1983) The mode of energy-production in the Lugworm *Arenicola marina* at different oxygen concentrations. *J Comp Physiol* 149: 547-555.
- Schöttler U, Wienhausen G, Westermann J (1984a) Anaerobic metabolism in the Lugworm *Arenicola marina* L. - the transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Comp Biochem Physiol B* 79: 93-103.
- Schöttler U, Surholt B, Zebe E (1984b) Anaerobic metabolism in *Arenicola marina* and *Nereis diversicolor* during low tide. *Mar Biol* 81: 69-73.
- Schrimsher JL, Taylor KB (1984) Octopine dehydrogenase from *Pecten maximus*: steady-state mechanism. *Biochemistry* 23: 1348-1353.
- Schroff G, Schöttler U (1977) Anaerobic reduction of fumarate in body wall musculature of *Arenicola marina* (Polychaeta). *J Comp Physiol* 116: 325-336.

Sheikh S, Katiyar SS (1993a) Chemical modification of octopine dehydrogenase by thiol-specific reagents: evidence for the presence of an essential cysteine at the catalytic site. *Biochim Biophys Acta* 1202: 251-257.

Sheikh S, Katiyar SS (1993b) Involvement of different cysteines in the inactivation of octopine dehydrogenase by p-chloromercuricphenyl sulfonic acid and o-phthalaldehyde. *Biochem Mol Biol Int* 29: 719-727.

Sheikh S, Katiyar SS (1994) Investigation of the nature of o-phthalaldehyde reaction with octopine dehydrogenase. *J Enzyme Inhib* 8: 39-50.

Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW (1996) Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* 274: 1531-1534.

Siegmund B, Grieshaber M, Reitze M, Zebe E (1985) Alanopine and strombine are end products of anaerobic glycolysis in the lugworm, *Arenicola marina* L. (Annelida, Polychaeta). *Comp Biochem Physiol B* 82: 337-345.

Smith EF, Townsend CO (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25: 671-673.

Srivastava DK (1991) Physiological constraints on evolution of enzymes for cellular metabolic pathways. *J Theor Biol* 152: 93-100.

Stanley WC, Connett RJ (1991) Regulation of muscle carbohydrate-metabolism during exercise. *Faseb J* 5: 2155-2159.

Storey KB (1977) Tissue specific isozymes of octopine dehydrogenase in cuttlefish, *Sepia officinalis* - roles of octopine dehydrogenase and lactate-dehydrogenase in sepia. *J Comp Physiol* 115: 159-169.

Storey KB, Storey JM (1979a) Octopine metabolism in the cuttlefish, *Sepia officinalis*: Octopine production by muscle and its role as an aerobic substrate. *J Comp Physiol* 131: 311-319.

Storey KB, Storey JM (1979b) Kinetic characterization of tissue-specific isozymes of octopine dehydrogenase from mantle muscle and brain of *Sepia officinalis*. Functional similarities to the M4 and H4 isozymes of lactate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 93: 545-42.

Storey KB, Dando PR (1982) Substrate specificities of octopine dehydrogenases from marine-invertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 73: 521-528.

Straub FB (1940) Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle. *Biochem J* 34: 483-486.

Surholt B (1980) Metabolite concentrations in electrically stimulated lugworms *Arenicola marina*. *Comp Biochem Physiol B* 67: 187-189.

Suzuki T, Furukohri T (1994) Evolution of phosphagen kinase. Primary structure of glyco-cyaminate kinase and arginine kinase from invertebrates. *J Mol Biol* 237: 353-357.

- Suzuki T, Kawasaki Y, Unemi Y, Nishimura Y, Soga T, Kamidochi M, Yazawa Y, Furukohri T (1998) Gene duplication and fusion have occurred frequently in the evolution of phosphagen kinases - a two-domain arginine kinase from the clam *Pseudocardium sachalinensis*. *Biochim Biophys Acta* 1388: 253-259.
- Tempé, J. (1983). Chemistry and biochemistry of open-chain imino acids. In: *Chemistry and biochemistry of amino-acids, peptides and proteins*, vol. 7 (ed. Weinstein, B.), S. 113-203. New York.
- Tempé J, Petit A (1983) Investigations on crown gall guanidines - Demonstration of a specific biochemical relation between *Agrobacterium tumefaciens* strains and the tumors they induce. *Agriculture Biology & Environmental Sciences* 24.
- Teschner W, Rudolph R, Garel JR (1987) Intermediates on the folding pathway of octopine dehydrogenase from *Pecten jacobaeus*. *Biochemistry* 26: 2791-2796.
- Thoai NV, Robin Y (1959a) Métabolisme des dérivés guanidyles. Biosynthèse de l'octopine et répartition de l'enzyme l'operant chez les invertébrés. *Biochim Biophys Acta* 35: 446-453.
- Thoai NV, Robin Y (1959b) Sur la Biogenese de L'octopine dans differents tissus de *Pecten maximus* L. *Bull Soc Chim Biol* 41: 735-742.
- Thoai NV, Robin Y (1961) [Metabolism of guanidyl derivatives. IX. Biosynthesis of octopine: study of the mechanism of the reaction and some properties of octopine synthetase.]. *Biochim Biophys Acta* 52: 221-233.
- Thoai NV, Roche J (1964) Sur la biochimie comparée des phosphagenes et leur répartition chez les animaux. *Biol Rev Camb Philos Soc* 39: 214-231.
- Thoai NV, Huc C, Pho DB, Olomucki A (1969) [Octopine dehydrogenase. Purification and catalytic properties]. *Biochim Biophys Acta* 191: 46-57.
- Thomas GE, Gruffydd LD (1971) The types of escape reactions elicited in scallop *Pecten maximus* by selected sea-star species. *Mar Biol* 10: 87-&.
- Thome-Beau F, Le Thi L, Olomucki A, Van Thoai N (1971) Essential histidyl residues in arginine oxygenase (decarboxylating). Comparison with amino acid oxidases. *Eur J Biochem* 19: 270-275.
- Thome-Beau F, Olomucki A (1973) Presence of a single essential histidyl residue in octopine dehydrogenase as shown by photooxidation. *Eur J Biochem* 39: 557-562.
- Thompson J, Donkersloot JA (1992) N-(carboxyalkyl)amino acids: occurrence, synthesis, and functions. *Annu Rev Biochem* 61: 517-557.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.

- Thompson RJ, Livingstone DR, De Zwaan A (1980) Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus* .1. Physiology. *J Comp Physiol* 137: 97-104.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Tremblay G, Gagliardo R, Chilton WS, Dion P (1987a) Diversity among opine-utilizing bacteria: Identification of coryneform isolates. *Appl Environ Microbiol* 53: 1519-1524.
- Tremblay G, Lambert R, Lebeuf H, Dion P (1987b) Isolation of bacteria from soil and crown-gall tumors on the basis of their capacity for opine utilization. *Phytoprotection* 68: 35-42.
- Tugarinov V, Muhandiram R, Ayed A, Kay LE (2002) Four-dimensional NMR spectroscopy of a 723-residue protein: chemical shift assignments and secondary structure of malate synthase g. *J Am Chem Soc* 124: 10025-10035.
- Tugarinov V, Kay LE (2003) Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods. *J Am Chem Soc* 125: 13868-13878.
- Tugarinov V, Hwang PM, Kay LE (2004) Nuclear magnetic resonance spectroscopy of high-molecular-weight proteins. *Annu Rev Biochem* 73: 107-146.
- Tugarinov V, Choy WY, Orekhov VY, Kay LE (2005) Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 622-627.
- Turchin A, Lawler JF, Jr. (1999) The primer generator: a program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 26: 672-676.
- Van Larebeke N, Zaenen I, Teuchy H, Schell J (1973) Circular DNA plasmids in *Agrobacterium*-strains - Investigation of their role in induction of crown-gall tumors. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 81: 986.
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, VANDENEL.S, Zaenen I, Schilper RA, Schell J (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252: 169-170.
- Van Montagu M, Holsters M, Zambryski P, Hernalsteens JP, Depicker A, Debeuckeleer M, Engler G, Lemmers M, Willmitzer L, Schell J (1980) The interaction of *Agrobacterium* Ti-plasmid DNA and plant-cells. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 210: 351-365.
- Vuister GW, Boelens R, Kaptein R (1988) Nonselective 3-dimensional NMR-spectroscopy - the 3D NOE-HOHAHA experiment. *J Magn Res* 80: 176-185.
- Wagner G, Wuthrich K (1982) Sequential resonance assignments in protein H-1 nuclear magnetic-resonance spectra - Basic pancreatic trypsin-inhibitor. *J Mol Biol* 155: 347-366.

- Wang W, Malcolm BA (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 26: 680-682.
- Wang W, Malcolm BA (2002) Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol* 182: 37-43.
- Watson B, Currier TC, Gordon MP, Chilton MD, Nester EW (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 123: 255-264.
- Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Kondoh A, Fisher RJ (1994) Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett* 345: 125-130.
- Wierenga RK, Demaeyer MCH, Hol WGJ (1985) Interaction of pyrophosphate moieties with alpha-helices in dinucleotide binding-proteins. *Biochemistry* 24: 1346-1357.
- Willmitzer L, Debeuckeleer M, Lemmers M, Vanmontagu M, Schell J (1980) DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant-cells. *Nature* 287: 359-361.
- Wright HT (1991a) Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 1-52.
- Wright HT (1991b) Sequence and structure determinants of the nonenzymatic deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins. *Protein Eng* 4: 283-294.
- Zammit VA, Newsholme EA (1976) The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. *Biochem J* 160: 447-462.
- Zebe E (1975) In vivo studies on glucose degradation in *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta). *J Comp Physiol* 101: 133-145.
- Zebe E, Grieshaber M, Schöttler U (1980) Biotopbedingte und funktionsbedingte Anaerobiose. *Biologie in unserer Zeit* 10: 175-182.
- Zeeb M, Balbach J (2004) Protein folding studied by real-time NMR spectroscopy. *Methods* 34: 65-74.
- Zettlmeissl G, Teschner W, Rudolph R, Jaenicke R, Gäde G (1984) Isolation, physicochemical properties, and folding of octopine dehydrogenase from *Pecten jacobaeus*. *Eur J Biochem* 143: 401-407.

7 Anhang

7.1 Primersequenzen

Tab. 19 Verwendete Oligonuklotid-Primer. Angegeben sind jeweils die Namen der Primer, ihre Sequenz und die verwendete Anlagerungstemperatur.

Name	Sequenz	Anlagerungs- temperatur (°C)
Lsu3	5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'	53
Lsu2-eco	5'-GGT CTG AAT TCA GAT CAC GT-3'	53
M13	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	54
M13reverse	5'-AAC AGC TAT GAC CAT-3'	54
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	55
T7 Terminator	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'	55
Intein reverse	5'-ACC CAT GAC CTT ATT ACC AAC CTC-3'	55
N6	5'-GAT GTT GTG ATC CTG ACT GTT CC-3'	55
5primeODH	5'-GGA GAG CTA GAA TCC CAA TCA TCG G-3'	58
3primeODH	5'-GAT GGG GAA TTG GTG TCT TGG GTT G-3'	58

Tab. 20 Primerkombinationen für die Vervielfältigung der ODH zum Einbau in Expressionsvektoren. Als Anlagerungstemperatur wurde jeweils 56 °C verwendet. Unterstrichene Basen markieren die Schnittstellen für die angegebenen Restriktionsenzyme. Fettgedruckte Basen zeigen bei 5'-Primern das Startcodon, beim 3'-Primer das Stoppcodon. Doppelt unterstrichene Basen beim Primer Cterm5_neu kodieren für die fünf zusätzlichen Histidine, die C-terminal an die ODH-Sequenz angefügt wurden. Die Primer NtermC6A und NtermC8A wurden für die gerichtete Mutagenese von Cystein6 bzw. Cystein8 verwendet. Kursiv fettgedruckte Basen zeigen die im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz veränderten Basen für den Austausch der Cysteine gegen Alanin.

Name	Sequenz	Restriktions- enzym
Nterm_neu	5'-GGC TAC <u>CAT</u> ATG ACG GTC AAG GTT TGT G-3'	NdeI
Cterm5_neu	5'-TGC TTA <u>GCT CTT CCG CAC</u> CTA <u>GTG ATG GTG ATG GTG</u> CTT TTT GCC CGT GAG TA-3'	SapI
Nterm_Pec	5'-CTG <u>GCG TCT CCC</u> ATG ACG GTC AAG GTT TG-3'	BsmBI
Cterm_Pec	5'-GGT <u>GCT CGA GCT</u> TTT TGC CCG TGA G-3'	XhoI
CtermPst	5'-CGA <u>TCT GCA GTT</u> ACT TTT TGC CCG TGA GTA TAG CG-3'	PstI
NtermC6A	5'-GGT GGT <u>CAT</u> ATG ACG GTC AAG GTT GCC GTT TGC GG-3'	NdeI
NtermC8A	5'-GGT GGT <u>CAT</u> ATG ACG GTC AAG GTT TGT GTT GCC GGA GGA GGC-3'	NdeI

Tab. 21a Primer für die gerichtete Mutagenese. Folgende Primer wurden für die gerichtete Mutagenese eingesetzt. Die Anlagerungstemperatur betrug mindestens 55 °C. Der Name des Primers enthält Informationen über die veränderte Aminosäure, ihre Position in der Sequenz und die Aminosäure, gegen die ausgetauscht wurde. Fettgedruckte Basen markieren von der Wildtyp-Sequenz abweichende Basen. Unterstrichene Basen markieren Schnittstellen für die jeweils angegebenen Restriktionsenzyme, die neu hinzugefügt wurden.

Name	Sequenz	Schnittstelle
D25N_for	5'-GCC <u>GCA</u> TCC CGT AAC GGC GTT GAG G-3'	neue BseGI
D25N_rev	5'-CCT CAA CGC CGT TAC GGG ATG CGG C-3'	
D37A_for	5'-CAC TCT TCG <u>CCG</u> <u>CCG</u> AGG CCG AGC GC-3'	neue BglI
D37A_rev	5'-GCG CTC GGC CTC GGC GGC GAA GAG TG-3'	
D37N_for	5'-CAC TCT TCG <u>CCA</u> <u>ACG</u> AGG CCG AGC GC-3'	neue BglI
D37N_rev	5'-GCG CTC GGC CTC GTT GGC GAA GAG TG-3'	
D37S_for	5'-CAC TCT TCG <u>CTA</u> GCG AAG CCG AGC GC-3'	neue NheI
D37S_rev	5'-GCG CTC GGC TTC GCT AGC GAA GAG TG-3'	
R41A_for	5'-GAC GAA GCC GAG GCC TGG ACA AAA GCG C-3'	neue HaeIII
R41A_rev	5'-GCG CTT TTG TCC AGG CCT CGG CTT CGT C-3'	
T89A_for	5'-GTT GTG ATC CTG GCC GTT CCA GCT TTT-3'	neue EaeI
T89A_rev	5'-AAA AGC TGG AAC GGC CAG GAT CAC AAC-3'	
T89V_for	5'-GCG GAT GTT GTC <u>ATC</u> <u>CTG</u> GTT GTT CCA GCT TTT GC-3'	neue FokI
T89V_rev	5'-GCA AAA GCT GGA ACA ACC AGG ATG ACA ACA TCC GC-3'	
H95G_for	5'-CCA GCT TTT GCC GGC GAG GGG TAT TTC-3'	neue NaeI
H95G_rev	5'-GAA ATA CCC CTC GCC GGC AAA AGC TGG-3'	
Q118A_for	5'-GGC CTG CCA AGT GCT <u>GCA</u> <u>GGT</u> TTT GAA-3'	neue PstI
Q118A_rev	5'-TTC AAA ACC TGC AGC ACT TGG CAG GCC-3'	
Q118D_for	5'-GGC CTG CCA AGT GAC <u>GCA</u> <u>GGT</u> TTT GAA-3'	neue Tsp45I
Q118D_rev	5'-TTC AAA ACC TGC GTC ACT TGG CAG GCC-3'	
C125A_for	5'-GGT TTT GAA TTC CAA GCT <u>CGA</u> <u>GAT</u> ATT TTA GG-3'	neue XhoI
C125A_rev	5'-CCT AAA ATA TCT CGA GCT TGG AAT TCA AAA CC-3'	
C148A_for	5'-CTC TTC <u>CAT</u> <u>GGG</u> CGG CTC GCA TAA AAG AGT TCG-3'	neue NcoI
C148A_rev	5'-CGA ACT CTT TTA TGC GAG CCG CCC ATG GAA GAG-3'	
C148S_for	5'-CTT <u>CCA</u> <u>TGG</u> <u>GCG</u> TCT CGC ATA AAA GAG-3'	neue NcoI
C148S_rev	5'-CTC TTT TAT GCG AGA CGC <u>CCA</u> <u>TGG</u> AAG-3'	
Y208A_for	5'-GTA GAG GCT TAT <u>CAT</u> <u>GAG</u> TGC TTC GTT TGT CCA TCC-3'	neue BspHI
Y208A_rev	5'-GGA TGG ACA AAC GAA GCA CTC <u>ATG</u> <u>ATA</u> AGC ATC TCC-3'	
H212A_for	5'-GTT ATT CGT TTG TCG CTC CCG CCA TTT TG-3'	FokI entfernt
H212A_rev	5'-CAA AAT GGC GGG AGC GAC AAA CGA ATA AC-3'	
C249A_for	5'-CAT GCT TAC AGC TGC <u>TAG</u> <u>CAA</u> CGA ATG C-3'	neue NheI
C249A_rev	5'-GCA TTC GTT GCT AGC AGC TGT AAG CAT G-3'	
E252A_for	5'-GCT TGT AGC AAC GCA TGC AAG GAC GTA-3'	BsmI entfernt
E252A_rev	5'-TAC GTC CTT GCA TGC GTT GCT ACA AGC-3'	
C253A_for	5'-GCT TGT AGC AAC GAA GCC AAG GAC GTA GCA AAC G-3'	BsmI entfernt
C253A_rev	5'-CGT TTG CTA CGT CCT TGG CTT CGT TGC TAC AAG C-3'	

Tab. 21.b Fortsetzung Mutageneseprimer

Name	Sequenz	Schnittstelle
C264G_for	5'-CAT GGC GGC GGG CCC GGG AAA CGA C-3'	neue SmaI
C264G_rev	5'-GTC GTT TCC CGG GCC CGC CGC CAT G-3'	
H308G_for	5'-GGG TCT TGT TGG TCC CGT CAA GGC-3'	neue Avall
H308G_rev	5'-GCC TTG ACG GGA CCA ACA AGA CCC-3'	
R324A_for	5'-GAC TTC GGG AAT GCT TAC CTG ACA GAA-3'	neue BsmI
R324A_rev	5'-TTC TGT CAG GTA AGC ATT CCC GAA GAC-3'	
D329A_for	5'-TAC TTG ACA GAA GCC ATC CCG ATG GGA-3'	NcoI entfernt
D329A_rev	5'-TCC CAT CGG GAT GGC TTC TGT CAA GTA-3'	
D369N_for	5'-GAG TAT CTA GTG AAC GGA GCT CTG ACC GG-3'	neue SacI
D369N_rev	5'-CCG GTC AGA GCT CCG TTC ACT AGA TAC TC-3'	
C382G_for	5'-CTA CAA CC CGG GTC CGC AAC GCT ATG G-3'	neue SacII
C382G_rev	5'-CCA TAG CGT TGC GGA CCG CGG GTT GTA G-3'	

7.2 Sequenzvergleich zur Artbestimmung

Sequenzvergleich der ribosomalen 16S-Untereinheit von *Pecten maximus* (PMA571619) mit einer Sequenz, die ausgehend von DNA der verwendeten Adduktormuskeln mit Hilfe der Universal-Primer Lsu3 und Lsu2-eco amplifiziert worden ist.

```

gi|45434518|emb|AJ571619.1|PMA571619 Pecten maximus partial mitochondrial 16S
rRNA gene
Length=550
Identities = 549/551 (99%), Gaps = 1/551 (0%)

Query 1 CAGATTTTTATGGGCGAACGAACCAACCCTCAAGACCGCCTACAAGCCTTAGGATATCCA 60
      |||
Sbjct 550 CAGATTTTTATGGGCGAACGAACCAACCCTCAAGACCGCCTACAAGCCTTAGGATATCCA 491

Query 61 GAGCCAACATCGAGGTCGCAAACCCGCCATCTATAAGAACTATCAAGACAGATTACGCT 120
      |||
Sbjct 490 GAGCCAACATCGAGGTCGCAAACCCGCCATCTATAAGAACTAT-AAGACAGATTACGCT 432

Query 121 GTTATCCCCGGAGTAACCTTCTTCTGATAATCACACCTTAATGTTTGTGGGTCGTAACACA 180
      |||
Sbjct 431 GTTATCCCCGGAGTAACCTTCTTCTGATAATCACACCTTAATGTTTGTGGGTCGTAACACA 372

Query 181 TCTGTTTTACACCCTAAAGGAGTCTAGCTTTGCTCCTTTGCTGCCCCAGCCAAAACCTGCT 240
      |||
Sbjct 371 TCTGTTTTACACCCTAAAGGAGTCTAGCTTTGCTCCTTTGCTGCCCCAGCCAAAACCTGCT 312

Query 241 ATTATTCACCCCTTCTGAAACACTAAGTTCTAGTGCTCCTCAACGATTCGGCCGCAAATA 300
      |||
Sbjct 311 ATTATTCACCCCTTCTGAAACACTAAGTTCTAGTGCTCCTCAACGATTCGGCCGCAAATA 252

Query 301 GCCTTGGAACTTCCCAATAACTTAAATTTCTAACTTCACGGGGTCTTCTCGTCTTTCTTA 360
      |||
Sbjct 251 GCCTTGGAACTTCCCAATAACTTAAATTTCTAACTTCACGGGGTCTTCTCGTCTTTCTTA 192

Query 361 CCCATGGAAGCATTTCACATCCAATTCAAGTTCACCAAAAAAAAACTAGAGACAGTTGGA 420
      |||
Sbjct 191 CCCATGGAAGCATTTCACATCCAATTCAAGTTCACCAAAAAAAAACTAGAGACAGTTGGA 132

Query 421 AACTCGTCAAACCATTACAGGACCTACAATTAATAGGCCATAATTTAGCTACCTTAGCA 480
      |||
Sbjct 131 AACTCGTCAAACCATTACAGGACCTACAATTAATAGGCCATAATTTAGCTACCTTAGCA 72

Query 481 CGCTTTACCGCGTCCGTTTAAAGCCGCAAGCTCACCGGGAAGGCACGACCCCCCATATTG 540
      |||
Sbjct 71 CGCTTTACCGCGTCCGTTTAAAGCCGCAAGCTCACCGGGAAGGCACGACCCCCCATATTG 12

Query 541 CTCAGGGAGCC 551
      |||
Sbjct 11 CTCAGGGAGCC 1

```

7.3 Einzeltier-Präparationen von *Pecten maximus*

Tab. 22 Übersicht verschiedener *Pecten maximus* Einzeltier-Präparationen. Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die ODH-Aktivität in Extrakten aus acht verschiedenen Individuen der Pilgermuschel *Pecten maximus*. Dargestellt sind jeweils die Aktivitäten im Rohextrakt, nach Ammoniumsulfatfällung, sowie die Aktivitäten im Eluat nach Entsalzung mit Sephadex G-25.

		Volumen [ml]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamt- aktivität [U]	U/g Fg	Protein- gehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamt- protein [mg]	spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]
Pecten 1 (3,8 g FG)	Rohextrakt	25	3,2	81,0	21,3	0,6	15,7	5,2
	AS I	21,5	3,7	80,5		0,5	9,7	8,3
	AS II	4	18,8	75,0		2,2	9,0	8,4
	Eluat nach Sephadex G-25	3,5	7,6	26,4		1,3	4,4	6,0
Pecten 2 (3,6 g FG)	Rohextrakt	23,8	3,5	84,3	23,4	0,8	20,2	4,2
	AS I	19,5	4,6	89,1		0,5	9,9	9,0
	AS II	4	16,1	64,6		2,3	9,1	7,1
	Eluat nach Sephadex G-25	3,5	7,5	26,3		1,3	4,7	5,6
Pecten 3 (4,1 g FG)	Rohextrakt	22	5,0	110,2	26,9	2,7	60,0	1,8
	AS I	21,7	4,8	104,6		1,9	40,4	2,6
	AS II	4	12,9	51,6		4,2	16,6	3,1
	Eluat nach Sephadex G-25	3,5	11,1	38,9		2,7	9,3	4,2
Pecten 4 (3,1 g FG)	Rohextrakt	21,7	4,7	102,0	32,9	2,7	59,4	1,7
	AS I	20	4,4	88,9		1,6	31,8	2,8
	AS II	4	20,9	83,5		3,4	13,7	6,1
	Eluat nach Sephadex G-25	3,5	7,7	27,1		1,8	6,4	4,2
Pecten 5 (4,3 g FG)	Rohextrakt	25	5,0	125,0	29,1	2,7	67,0	1,9
	AS I	19	2,8	53,7		1,9	35,2	1,5
	AS II	4	9,8	39,2		4,2	16,6	2,4
	Eluat nach Sephadex G-25	3,5	6,9	24,1		2,6	9,0	2,7
Pecten 6 (4,5 g FG)	Rohextrakt	22	5,4	119,8	26,6	2,7	59,4	2,0
	AS I	17,5	4,5	78,5		1,6	28,0	2,8
	AS II	4	10,1	40,4		3,4	13,6	3,0
	Eluat nach Sephadex G-25	3,5	5,7	19,9		1,8	6,3	3,2
Pecten 7 (4,7 g FG)	Rohextrakt	21,5	5,1	109,5	23,5	2,5	53,6	2,0
	AS I	22	4,5	99,6		1,1	24,8	4,0
	AS II	4	22,4	89,7		6,5	26,0	3,4
	Eluat nach Sephadex G-25	3,5	13,1	46,0		4,8	16,7	2,8
Pecten 8 (4,7 g FG)	Rohextrakt	21,5	5,1	109,5	23,2	2,6	56,2	1,9
	AS I	21,8	4,4	95,2		1,2	25,5	3,7
	AS II	4	19,3	77,2		6,8	27,4	2,8
	Eluat nach Sephadex G-25	3,5	13,7	48,0		4,9	17,0	2,8

7.4 Sequenzvergleiche der *Pecten maximus* ODH-Isoenzyme

Pecten_Wt	CAAGGATGGCTGTAGGTCGTTGAAACTAGGAGAGCTAGAATCCCAATCATCGGATACAGT	60
Pecten_2	-----ATACAGT	7
Pecten_3	-----ATACAGT	7
Pecten_5	-----ATACAGT	7
Pecten_6	-----ATACAGT	7
Pecten_7	-----ATACAGT	7

Pecten_Wt	CTTCCGAGAGCCATGACGGTCAAGGTTTGTGTTGCGGAGGAGGCAATGGCGCCACACG	120
Pecten_2	CTTCCGAGAGCCATGACGGTCAAGGTTTGTGTTGCGGAGGAGGCAATGGCGCCACACG	67
Pecten_3	CTTCCGAGAGCCATGACGGTCAAGGTTTGTGTTGCGGAGGAGGCAATGGCGCCACACG	67
Pecten_5	CTTCCGAGAGCCATGACGGTCAAGGTTTGTGTTGCGGAGGAGGCAATGGCGCCACACG	67
Pecten_6	CTTCCGAGAGCCATGACGGTCAAGGTTTGTGTTGCGGAGGAGGCAATGGCGCCACACG	67
Pecten_7	CTTCCGAGAGCCATGACGGTCAAGGTTTGTGTTGCGGAGGAGGCAATGGCGCCACACG	67

Pecten_Wt_AA	M T V K V C V C G G G N G A H T	16
Pecten_Wt	CTCTCAGGTCTCGCCGCGTCCCGTGACGGCGTTGAGGTACGTGTCTCACACTCTTCGCT	180
Pecten_2	CTCTCAGGTCTCGCCGCGTCCCGTGACGGCGTTGAGGTGCGTGTCTCACACTCTTCGCT	127
Pecten_3	CTCTCAGGTCTCGCCGCGTCCCGTGACGGCGTTGAGGTGCGTGTCTCACACTCTTCGCT	127
Pecten_5	CTCTCAGGTCTCGCCGCGTCCCGTGACGGCGTTGAGGTGCGTGTCTCACACTCTTCGCT	127
Pecten_6	CTCTCAGGTCTCGCCGCGTCCCGTGACGGCGTTGAGGTGCGTGTCTCACACTCTTCGCT	127
Pecten_7	CTCTCAGGTCTCGCCGCGTCCCGTGACGGCGTTGAGGTGCGTGTCTCACACTCTTCGCT	127

Pecten_Wt_AA	L S G L A A S R D G V E V R V L T L F A	36
Pecten_7_AA	D	
Pecten_Wt	GACGAAGCCGAGCGCTGGACAAAAGCGCTTGGAGCAGATGAATTAACGGTGATTGTAAT	240
Pecten_2	GACGAAGCCGAGCGCTGGACAAAAGCGCTTGGAGCAGATGAATTAACGGTGATTGTAAT	187
Pecten_3	GACGAAGCCGAGCGCTGGACAAAAGCGCTTGGAGCAGATGAATTAACGGTGATTGTAAT	187
Pecten_5	GACGAAGCCGAGCGCTGGACAAAAGCGCTTGGAGCAGATGAATTAACGGTGATTGTAAT	187
Pecten_6	GACGAAGCCGAGCGCTGGACAAAAGCGCTTGGAGCAGATGAATTAACGGTGATTGTAAT	187
Pecten_7	GACGAAGCCGAGCGCTGGACAAAAGCGCTTGGAGCAGATGAATTAACGGTGATTGTAAT	187

Pecten_Wt_AA	D E A E R W T K A L G A D E L T V I V N	56
Pecten_Wt	GAAAAAGACGGAACACAGACTGAAGTGAAGTACGCCCAAAGGTCATTACAAAAGATCCC	300
Pecten_2	GAAAAAGACGGAACACAGACTGAAGTGAAGTACGCCCAAAGGTCATTACAAAAGATCCC	247
Pecten_3	GAAAAAGACGGAACACAGACTGAAGTGAAGTACGCCCAAAGGTCATTACAAAAGATCCC	247
Pecten_5	GAAAAAGACGGAACACAGACTGAAGTGAAGTACGCCCAAAGGTCATTACAAAAGATCCC	247
Pecten_6	GAAAAAGACGGAACACAGACTGAAGTGAAGTACGCCCAAAGGTCATTACAAAAGATCCC	247
Pecten_7	GAAAAAGACGGAACACAGACTGAAGTGAAGTACGCCCAAAGGTCATTACAAAAGATCCC	247

Pecten_Wt_AA	E K D G T Q T E V K S R P K V I T K D P	76
Pecten_Wt	GAAATCGCCATCAGTGGCGCGGATGTTGTGATCCTGACTGTTCCAGCTTTTGACACGAG	360
Pecten_2	GAAATCGCCATCAGTGGCGCGGATGTTGTGATCCTGACTGTTCCAGCTTTTGACACGAG	307
Pecten_3	GAAATCGCCATCAGTGGCGCGGATGTTGTGATCCTGACTGTTCCAGCTTTTGACACGAG	307
Pecten_5	GAAATCGCCATCAGTGGCGCGGATGTTGTGATCCTGACTGTTCCAGCTTTTGACACGAG	307
Pecten_6	GAAATCGCCATCAGTGGCGCGGATGTTGTGATCCTGACTGTTCCAGCTTTTGACACGAG	307
Pecten_7	GAAATCGCCATCAGTGGCGCGGATGTTGTGATCCTGACTGTTCCAGCTTTTGACACGAG	307

Pecten_Wt_AA	E I A I S G A D V V I L T V P A F A H E	96
Pecten_Wt	GGGTATTTCCAAGCCATGGCCCCGTATGTGCAGGATCCGCTCTAATCGTCGGCCTGCCA	420
Pecten_2	GGGTATTTCCAAGCCATGGCCCCGTATGTGCAGGATCCGCTCTAATCGTCGGCCTGCCA	367
Pecten_3	GGGTATTTCCAAGCCATGGCCCCGTATGTGCAGGATCCGCTCTAATCGTCGGCCTGCCA	367
Pecten_5	GGGTATTTCCAAGCAATGGCCCCGTATGTGCAGGATGCCGCTCTAATCGTCGGCCTGCCA	367
Pecten_6	GGGTATTTCCAAGCCATGGCCCCGTATGTGCAGGATCCGCTCTAATCGTCGGCCTGCCA	367
Pecten_7	GGGTATTTCCAAGCAATGGCCCCGTATGTGCAGGATCCGCTCTAATCGTCGGCCTGCCA	367

Pecten_Wt_AA	G Y F Q A M A P Y V Q D S A L I V G L P	116
Pecten_5_AA	A	

Anhang

Pecten_Wt	AGTCAGGCAGGTTTTGAATTCCAATGCCGAGATATTTTAGGAGACAAGGCAGCCGCTGTT	480
Pecten_2	AGTCAGGCAGGTTTTGAATTCCAATGTCGAGACATTTTAGGAGACAAGGCCGCCGCTGTT	427
Pecten_3	AGTCAGGCAGGTTTTGAATTCCAATGTCGAGACATTTTAGGAGACAAGGCCGCCGCTGTT	427
Pecten_5	AGTCAGGCAGGTTTTGAATTCCAATGCCGAGATATTTTAGGAGACAAGGCTGCTGCTGTT	427
Pecten_6	AGTCAGGCAGGTTTTGAATTCCAATGTCGAGATATTTTAGGAGACAAGGCCGCCGCTGTT	427
Pecten_7	AGTCAGGCAGGTTTTGAATTCCAATGCCGAGATATTTTAGGAGACAAGGCTGCTGCTGTT	427

Pecten_Wt_AA	S Q A G F E F Q C R D I L G D K A A A V	136
Pecten_Wt	TCAATGATGTCATTTGAAACTCTTCCTTGGGCGTGTGCGATAAAAAGAGTTCGGCAGGAAA	540
Pecten_2	TCAATGATGTCCTTTGAAACTCTTCCTTGGGCGTGTGCGATAAAAAGAGTTCGGCAGGAAA	487
Pecten_3	TCAATGATGTCCTTTGAAACTCTTCCTTGGGCGTGTGCGATAAAAAGAGTTCGGCAGGAAA	487
Pecten_5	TCAATGATGTCCTTTGAAACTCTTCCTTGGGCGTGTGCGATAAAAAGAGTTCGGCAGGAAA	487
Pecten_6	TCAATGATGTCATTTGAAACTCTTCCTTGGGCGTGTGCGATAAAAAGAGTTCGGCAGGAAA	487
Pecten_7	TCAATGATGTCCTTTGAAACTCTTCCTTGGGCGTGTGCGATAAAAAGAGTTCGGCAGGAAA	487

Pecten_Wt_AA	S M M S F E T L P W A C R I K E F G R K	156
Pecten_Wt	GTTGAAGTACTGGGTACGAAATCCGCTCTAGCCGCTTCGCTCATCAAGGGAACAGCCAAG	600
Pecten_2	GTTGAAGTACTAGGTACTAAATCCGCTCTAGCAGCTTCGCTCATCAAGGGAACAGCCAAG	547
Pecten_3	GTTGAAGTACTAGGTACTAAATCCGCTCTAGCAGCTTCGCTCATCAAGGGAACAGCCAAG	547
Pecten_5	GTTGAAGTACTGGGTACGAAATCCGCTCTAGCAGCTTCGCTCATCAAGGGAACAGCCAAG	547
Pecten_6	GTTGAAGTACTGGGTACGAAATCCGCTCTAGCCGCTTCGCTCATCAAGGGAACAGCCAAG	547
Pecten_7	GTTGAAGTACTGGGTACGAAATCCGCTCTAGCAGCTTCGCTCATCAAGGGAACAGCCAAG	547

Pecten_Wt_AA	V E V L G T K S V L A A S L I K G T A K	176
Pecten_Wt	ACGGTGCACCCGCTATCGACTCTCCAGATGCTCCATGGTGCCGAACCAGTCTTCCGTCTT	660
Pecten_2	ACGGTGCACCCGCTATCGACTCTCCAGATGCTCCATGGTGCCGAACCAGTCTTCCGTCTT	607
Pecten_3	ACGGTGCACCCGCTATCGACTCTCCAGATGCTCCATGGTGCCGAACCAGTCTTCCGTCTT	607
Pecten_5	ACAGTGCACCCGCTATCGACTCTCCAGATGCTCCATGGTGCCGAACCAGTCTTCCGTCTT	607
Pecten_6	ACGGTGCACCCGCTATCGACTCTCCAGATGCTCCATGGTGCCGAACCAGTCTTCCGTCTT	607
Pecten_7	ACAGTGCACCCGCTATCGACTCTCCAGATGCTCCATGGTGCCGAACCAGTCTTCCGTCTT	607
	** *****	
Pecten_Wt_AA	T V D P L S T L Q M L H G A E P V F R L	196
Pecten_2_AA	K	
Pecten_3_AA	K	
Pecten_Wt	GCAAAACACTTCTTGGAGATGCTTATAATGAGTTATTCGTTTGTCCATCCCAGCATTTTG	720
Pecten_2	GCAAAACACTTCTTGGAGATGCTTATAATGAGTTATTCGTTTGTCCATCCCAGCATTTTG	667
Pecten_3	GCAAAACACTTCTTGGAGATGCTTATAATGAGTTATTCGTTTGTCCATCCCAGCATTTTG	667
Pecten_5	GCAAAACACTTCTTGGAAATGCTTATAATGAGTTATTCGTTTGTCCACCCAGCATTTTG	667
Pecten_6	GCAAAACACTTCTTGGAGATGCTTATAATGAGTTATTCGTTTGTCCATCCCAGCATTTTG	667
Pecten_7	GCAAAACACTTCTTGGAAATGCTTATAATGAGTTATTCGTTTGTCCACCCAGCATTTTG	667

Pecten_Wt_AA	A K H F L E M L I M S Y S F V H P A I L	216
Pecten_Wt	TTCGGTCGTTGGGGTTCCTGGGACGGCAAACCTGTTCCAGAAGCACCATTGTTTTACCAA	780
Pecten_2	TTCGGTCGATGGGGTTCCTGGGACGGCAAACCTGTTCCAGAAGCACCATTGTTTTACCAA	727
Pecten_3	TTCGGTCGATGGGGTTCCTGGGACGGCAAACCTGTTCCAGAAGCACCATTGTTTTACCAA	727
Pecten_5	TTTGGTCGATGGAGTTCCTGGGACGGCAAACCTGTTCCAGAAGCACCATTGTTTTACCAA	727
Pecten_6	TTTGGTCGATGGGGTTCCTGGGACGGCAAACCTGTTCCAGAAGCACCATTGTTTTACCAA	727
Pecten_7	TTTGGTCGATGGGGTTCCTGGGACGGCAAACCTGTTCCAGAAGCACCATTGTTTTACCAA	727
	** *****	
Pecten_Wt_AA	F G R W G S W D G K P V P E A P L F Y Q	236
Pecten_5_AA	S	
Pecten_Wt	GGCATCGACCAGGCAACCGCAGACATGCTTACAGCTTGTAGCAACGAATGCAAGGACGTA	840
Pecten_2	GGCATCGACCAGGCAACCGCAGACATGCTTACAGCTTGTAGCAACGAATGCAAGGACGTA	787
Pecten_3	GGCATCGACCAGGCAACCGCAGACATGCTTACAGCTTGTAGCAACGAATGCAAGGACGTA	787
Pecten_5	GGCATCGACCAGGCAACCGCAGACATGCTTACAGCTTGTAGCAACGAATGCAAGGACGTA	787
Pecten_6	GGCATTGACCAGGCAACCGCAGACATGCTTACAGCTTGTAGCAACGAATGCAAGGACGTA	787
Pecten_7	GGCATCGACCAGGCAACCGCAGACATGCTTACAGCTTGTAGCAACGAATGCAAGGACGTA	787

Pecten_Wt_AA	G I D Q A T A D M L T A C S N E C K D V	256
Pecten_6_AA	G	
Pecten_Wt	GCAAACGCTATCATGGCGGCGTGCCCTGGAAACGACCTTTCGGATGTCAAGGACATATAT	900
Pecten_2	GCAAACGCTATAATGGCGGCGTGCCAGGAAACGACCTTTCGGATGTCAAGGACATATAT	847
Pecten_3	GCAAACGCTATAATGGCGGCGTGCCAGGAAACGACCTTTCGGATGTCAAGGACATATAT	847
Pecten_5	GCAAACGCTATCATGGCGGCGTGCCCTGGAAACGACCTTTCGGATGTCAAGGACATATAT	847
Pecten_6	GCAAACGCTATCATGGCGGCGTGCCAGGAAACGACCTTTCGGATGTCAAGGACATATAT	847
Pecten_7	GCAAACGCTATCATGGCGGCGTGCCCTGGAAACGACCTTTCGGATGTCAAGGACATATAT	847

Pecten_Wt_AA	A N A I M A A C P G N D L S D V K D I Y	276

Pecten_Wt	CAGTGGTACCTAGAGTATTACCACGAAGACATTCAAGATGACCACGACCTCTACCACGCA	960
Pecten_2	CAGTGGTACCTAGAGTATTACCACGAGGACATCCAAGATGACCACGACCTCTACCACGCC	907
Pecten_3	CAGTGGTACCTAGAGTATTACCACGAGGACATCCAAGATGACCACGACCTCTACCACGCC	907
Pecten_5	CAGTGGTACCTAGAGTATTACCACGAAGACATTCAAGATGACCACGACCTCTACCATGCA	907
Pecten_6	CAGTGGTACCTAGAGTATTATCACGAAGACATCCAAGATGACCACGACCTCTACCACGCC	907
Pecten_7	CAGTGGTACCTAGAGTATTACCACGAGGACATCCAAGATGACCACGACCTCTACCACGCC	907

Pecten_Wt_AA	Q W Y L E Y Y H E D I Q D D H D L Y H A	296
Pecten_Wt	ATCACCACAAACAAGTCATATAAGGGTCTTGTTTCATCCCCTCAAGGCTGTTGACGGTGGT	1020
Pecten_2	ATCACCACAAACAAGTCATATAAGGGTCTTGTTTCATCCCCTCAAGGCTGTTGACGGTGGC	967
Pecten_3	ATCACCACAAACAAGTCATATAAGGGTCTTGTTTCATCCCCTCAAGGCTGTTGACGGTGGC	967
Pecten_5	ATCACCACAAACAAGTCATATAAGGGTCTTGTTTCATCCCCTCAAGGCTGTTGACGGTGGT	967
Pecten_6	ATCACCACAAACAAGTCATATAAGGGTCTTGTTTCATCCCCTCAAGGCTGTTGACGGTGGC	967
Pecten_7	ATCACCACAAACAAGTCATATAAGGGTCTTGTTTCATCCCCTCAAGGCTGTTGACGGTGGC	967

Pecten_Wt_AA	I T T N K S Y K G L V H P V K A V D G G	316
Pecten_Wt	GTGGCCCCCTGACTTCGGAAATCGTTACCTGACAGAAGACATCCCCTATGGGAATGATAGTT	1080
Pecten_2	GTGGCCCCCTGACTTCGGAAATCGTTACCTGACAGAAGACATCCCCTATGGGGATGATAGTT	1027
Pecten_3	GTGGCCCCCTGACTTCGGAAATCGTTACCTGACAGAAGACATCCCCTATGGGGATGATAGTT	1027
Pecten_5	GTGGCCCCCTGACTTCGGAAATCGTTACCTGACAGAAGACATCCCCTATGGGGATGATAGTT	1027
Pecten_6	GTGGCCCCCTGACTTCGGAAATCGTTACCTGACAGAAGACATCCCCTATGGGGATGATAGTT	1027
Pecten_7	GTGGCCCCCTGACTTCGGAAATCGTTACCTGACAGAAGACATCCCCTATGGGGATGATAGTT	1027

Pecten_Wt_AA	V A P D F G N R Y L T E D I P M G M I V	336
Pecten_3_AA	A	
Pecten_Wt	TTCAAAGGCGTTGCCATAGCAGCTGGTGTGGCCATCCCCAAGCAACGATAAACTTATCATG	1140
Pecten_2	TTTAAAGGCGTTGCCATAGCAGCTGGTGTGGCCATCCCCAACAACGATAAACTTATCATG	1087
Pecten_3	TTTAAAGGCGTTGCCATAGCAGCTGGTGTGGCCATCCCCAACAACGATAAACTTATCATG	1087
Pecten_5	TTTAAAGGCGTTGCTATAGCAGCTGGTGTGGCCATCCCCAACAACGATAAACTTATCATG	1087
Pecten_6	TTTAAAGGCGTTGCTATAGCAGCTGGTGTGGCCATCCCCAACAACGATAAACTTATCATG	1087
Pecten_7	TTTAAAGGCGTTGCCATAGCAGCTGGTGTGGCCATCCCCAACAACGATAAACTTATCATG	1087
	** *****	
Pecten_Wt_AA	F K G V A I A A G V A I P S N D K L I M	356
Pecten_2_AA	N	
Pecten_3_AA	N	
Pecten_5_AA	N	
Pecten_6_AA	N	
Pecten_7_AA	N	
Pecten_Wt	TGGGCCAGGAGAAGATCGGAAAGGAGTATCTAGTGGACGGTGTCTGACCGTAAGGAT	1200
Pecten_2	TGGGCCAGGAGAAGATCGGAAAGGAGTATCTAGTGGATGGTGTCTGACCGTAAGGAT	1147
Pecten_3	TGGGCCAGGAGAAGATCGGAAAGGAGTATCTAGTGGATGGTGTCTGACCGTAAGGAT	1147
Pecten_5	TGGGCCAGGAGAAGATCGGAAAGGAGTATCTAGTGGACGGTGTCTGACCGTAAGGAT	1147
Pecten_6	TGGGCCAGGAGAAGATCGGAAAGGAGTATCTAGTGGACGGTGTCTGACCGTAAGGAT	1147
Pecten_7	TGGGCCAGGAGAAGATCGGAAAGGAGTATCTAGTGGATGGTGTCTGACCGTAAGGAT	1147

Pecten_Wt_AA	W A Q E K I G K E Y L V D G A L T G K D	376
Pecten_Wt	GTGGCTACAACGCGCTGTCCGCAACGCTATGGCTTCAACACACTAGACGCTATACTCACG	1260
Pecten_2	GTGGCTACAACGCGCTGTCCGCAACGCTATGGCTTCAACACACTAGACGCTATACTCACG	1207
Pecten_3	GTGGCTACAACGCGCTGTCCGCAACGCTATGGCTTCAACACACTAGACGCTATACTTACG	1207
Pecten_5	GTGGCTACAACGCGCTGTCCGCAACGCTATGGCTTCAACACACTAGACGCTATACTTACG	1207
Pecten_6	GTGGCTACAACGCGCTGTCCGCAACGCTATGGCTTCAACACACTAGACGCTATACTCACG	1207
Pecten_7	GTGGCTACAACGCGCTGTCCGCAACGCTATGGTTTCAACACACTAGACGCTATACTCACG	1207

Pecten_Wt_AA	V A T T R C P Q R Y G F N T L D A I L T	396
Pecten_Wt	GGCAAAAAGTAAGGACTGACCAGTGTAGGTCAGTGTGACCAGTGTCCGTATACACCGC	1320
Pecten_2	GGCAAAAAGTAAGGACTTACCAGTTCTAGGTCAGTGTGACCAGTGTCCGTATACACCGC	1267
Pecten_3	GGCAAAAAGTAAGGACT-----GACCAGTGTCCGTATACACCGC	1246
Pecten_5	GGCAAAAAGTAAGGACTGACCAGTGTAGGTCAGTGTGACCAGTGTCCGTATACACCGC	1267
Pecten_6	GGCAAAAAGTAAGGACTTACCAGTTCTAGGTCAGTGTGACCAGTGTCCGTATACACCGC	1267
Pecten_7	GGCAAAAAGTAAGGACTTACCAGTTCTAGGTCAGTGTGACCAGTGTCCGTATACACCGC	1267

Pecten_Wt_AA	G K K STOP	399
Pecten_Wt	TTGTAATTCAACCCAAGACACCAATTCCCCTATCATGATTTGCTATCATGGAACAAATATA	1380
Pecten_2	TTGTAATT-----	1275
Pecten_3	TTGTAATT-----	1254
Pecten_5	TTGTAATT-----	1275
Pecten_6	TTGTAATT-----	1275
Pecten_7	TTGTAATT-----	1275

```

Pecten_Wt      CCTTGCAGTCCAGTTAACTTTTATAAAGAGAACAGAAAGTTGTTTCTGTGCCAAAGAAGTT 1440
Pecten_Wt      ACATTCTTCAAAAACACAAAATATGAACCTATAGCAGATAATTACGGAAACTATTTTGGGA 1500
Pecten_Wt      ACCTCAATCTAGTTTTTCGTTATCAGGAAACAACCATTACAGCTGTGATACTTACTTTGGAC 1560
Pecten_Wt      ATCTTTCTAGTGCTAAAACACGCTCTCAAGGTTTAGGATCTAGGTTTACTGCGAAAACGAA 1620
Pecten_Wt      GTTATGAACCTCATTTCGGGAACATGTATTAATCTGCATACGTTAATGTTCACTATTCT 1680
Pecten_Wt      AGTCACAAGATAACGTGTCCAAAATATTTCCAATTTTAGATTGTATTATATATCTATATA 1740
Pecten_Wt      ATTA AATTG TATTTACATCAACATGACTTTTTACACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1793
    
```

Abb. 49 Sequenzen von Octopindehydrogenasen aus verschiedenen Individuen der Pilgermuschel *Pecten maximus*. Dargestellt sind jeweils die DNA-Sequenzen mit 5' und 3' untranslatierten Regionen sowie die abgeleitete Proteinsequenz im Einbuchstabencode. In allen Sequenzen identische Nukleotide sind mit * markiert. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind angegeben.

7.5 Proteinalignment verschiedener Opindehydrogenasen

```

P. maximus      -----MTVKVCVCGGGNGAHTLSGLAASRDGVEVRVLTTFADAEERWTKALGADEL 51
M. yessoensis  -----MTLKVCVCGGGNGAHTLSGLAASRDGVEVRVLTTFADAEERWTKALGADEL 51
L. vulgaris     MAHHQEKPPVLIKLLICGGGNGAHVLTGLASSRHNKVNVLVSLFADEAERWRKTLGDNHF 60
L. opalescens  -MTHQEKPPVLVLLVCGGGNGAHVLTGLASSRHNKVNVLVSLFADEAERWRNLTADNHS 59
S. officinalis MAHHQEKPPVLINLLVCGGGNGAHVLTGLASSRHNKVNVLVSLFADEAERWRNLTADNHF 60
H. discus hannai ---MTKK----ITVLVCGGGNGAHVTLAASRDDIETRVLTTFADAEERWTNIMKENDL 53
F. oregonensis ---MADK----LTVCVCGGGNGAHAMAGLAAAHPGTEARVLTTFQDEAPRWANIMKEENF 53
A. irricolor    -----MVLVTCGGGNAHTLAGIASNQPNMEVRVLTLYADEAERWIKSMETNDF 50
P. sachalinensis ---MSRSLEKSCNITIFGGGNGAHVLSGLSSDVVNANVTVVDTFQDEAERWTKAMAANGF 57
A. spec        -----MIESKTYAVLGLGNGGHAFAYLALKG----QSVLAWDIDAQRIKEIQDRGAI 49
                : * * * . * . : : : : * * * :

P. maximus      TVIVNEKDG---TQTEVKS RPK-VITKDP EIAISGADV VILTVPAFAHEGYFQAMAPYVQ 107
M. yessoensis  TVIVNEKDG---TQTEVKS RPK-VITKDP QVAITGADV VILTVPAFAHEGYFQAMAPYVQ 107
L. vulgaris     VVNFREKDG---SSQI I T SRPN-MITNDP SKAVPGCNLI IFTVPFAFAHEGYFRAIAPYLE 116
L. opalescens  VVNFREKDG---SNKI I T SRPN-MITNDASKAVPGCNLVI FTVPFAFAHEGYFRAIAPYLE 115
S. officinalis VVNFREKDG---TNKI I T SRPN-MITNDP SRAVPGCNLVI FTVPFAFAHEGYFRAIAPYLE 116
H. discus hannai RITVDEGDIKSGESVDFKVKLN-CITKDP SKAVPGADVI IFTVPFAFAHQSYLEAIEPYIQ 112
F. oregonensis TIQQNKPKD---SVVHIKAKPA-LVTKDASQAVPGANI I IFCVPFAFAHQYFKAIEPVYV 109
A. irricolor    TTIKYATGK---DPVHLKTKPK-LVTKNPEQGATGADI I VITVPFAFAHQYLTALKPHVK 106
P. sachalinensis TVKYGNKGD---LVQAPGKPKFTVTKEVQKNVEKADV VILCMPAFLHEMVLTSVAPYVP 113
A. spec        IAEGPGLAG-----TAHPD-LLTSDIGLAVK DADVILIVVPAIHHASIAANIASYIS 100
                : : * . : : : : : * * : : :

P. maximus      DSALIVGLPSQAGFEFQCRDILGDKAA-AVSMMSFETLPWACRIKEFGRKVEVLGTKSVL 166
M. yessoensis  DSALIVGLPSQAGFEFQCRDILGDKAA-AVSMMSFETLPWACRIKEFGRKVEVLGTKSVL 166
L. vulgaris     PNTVIVGLPSQPGFQFQCCDLLIGGR-TSAIVSFESLPWACRIGTFGREVQVLPKDTL 175
L. opalescens  PNTVIVGLPSQPGFQFQACDLLGMGGR-TSAIVSFESLPWACRIGTFGREVQVLPKDTL 174
S. officinalis PNTVIVGLPSQPGFQFQCCDLLGLGGR-TSAIVSFESLPWACRIGTFGREVQVIGPKDTL 175
H. discus hannai PNTTIVGMPPGQPGFEFQVFDVLKDKAK-QCVIMSFESLPWACRIAEFGKFVQILMVKNL 171
F. oregonensis PNTAII GLPQPGFEFQCFDVLKDKAR-QCAILSYESLPWACRILEFGKLV EILGAKDSL 168
A. irricolor    PGTVVVGFPGQPGFDFEIMKIWGD LAK-QCTVMNFVSLPWACRIKEFGKSV EVLATKDMM 165
P. sachalinensis ETCP IVGLPGQPGFEYQALFHLRQNGK-KGSVMSIETLPWACRIAKYGQEV DVIIGTKECI 172
A. spec        EGQLI I LNP GATGGALEFRKILRENGAPEVTI GETSSMLFTCRSERPG-QVTVNAIKGAM 159
                : : * . * : : . : : : * * * * * : * :

P. maximus      AASLIKGTAKT-VDP--LSTLQMLHGAEPVFR LAKHFLEMLIMSYS-FVHPAILFGRWGS 222
M. yessoensis  AASLIKGT AET-VDP--LSTLQKLHGAEPVFR LAKHFLEMLIMSYS-FVHPAILYGRWGS 222
L. vulgaris     ACAIIMRGCRPLFPI--LKTIQYVIGKEPKL TMAANYLSINLLADA-VVHPPMMYGTWKD 232
L. opalescens  ACAIIMRGCKPLFPV--LKTIQYVIGKEPKL TMAANYLSINLLADA-VVHPPMMYGTWKD 231
S. officinalis ACAIIMRGCKTLFPI--LPTIQYIIGKEPKL TLAANYLSINLLADS-VVHPPMMYGTWKD 232
H. discus hannai MGCLIRGQSKPSYDP--MEAVQRVMGKAP I LTQANNYIEPILATKS-I IHPPIMYGKWKD 228
F. oregonensis MGSEIKGKSQLKPD P--AKTLQAMLGEHPVLKMAHNYLEPYLMTKS-IVHPPIMYGRWKD 225
A. irricolor    FGSVRNGTVAPKMDP--TAMIQCGCLGPLRLECSGHL LGMSIMAVNGMLHPSIMYNRWHD 223
P. sachalinensis YFSSVDQSSGYV GAGLVQLIQTL L GAKPVLKREENI IKYTFLYRP-TVHPPIMYAKWKN 231
A. spec        DFLACLPAAKAG-----WALEQIGSVLPQYVA VENVLH TSLTNVNAVMMHPLP TLLNAAR 212
                . : : . * : : : : * *
    
```

P. maximus	WDGKPVPEAPLFYQGIQDQATADMLTACSNECKDVANAIMAACPGNDLSDVKDIYQWYLEY	282
M. yessoensis	WDGNPVSEAPLFYQGIQDQATADMLTACSDECKAVGNAIMAACPGNDLSDVKDIYQWYLEY	282
L. vulgaris	WDGKPVAEKPLFYQGLNEFSANLLDKVSELVQTAQVIHQKYPMDMKDVIHLFDWYKLN	292
L. opalescens	WDGKPVAEKPLFYQGLNEFSADLLDKVSTELVQTAKAHQKYPMDMKDVIHLFDWYKLN	291
S. officinalis	WDGQPVAEKPLFYQGLNEFSADLLDKVSTELVHTAQAIQQKYPEMDMKDVIHLFDWYKLN	292
H. discus hannai	WDGKPIEEKPLFYQGLDEEQARYLGGISDELVATAKAIQAQKPEVDLSGVLHLYDWYLRD	288
F. oregonensis	WDGQPVAEKPLFYQGLDEFGAGSLSTVSDVLDLTARAI TKQKPELDLPHVEHLLLEWYRQD	285
A. irricolor	WDGKPVDAAPLFYHGLSQAGADLLSDVSNETIAIAKKVMEQRQGVDSLNVIHMHPPYYIGA	283
P. sachalinensis	WDGKPLDAAPLFYQGADEEAVKYLDGATNEMIKIADFLQTKYPDMDFSGISSMQDCFI GE	291
A. spec	CESG--TPFQYYLEGITPSVGS LAEKVDAERIAIAKAFDLNVP-----SVCEWYKES	262
	:. :.* * . . :	:
P. maximus	YHEDIQDDHDLYHAITTNKSYKGLVHPVKAVDGG-VAPDFGNRYLTEDIPMGMI VFKGVA	341
M. yessoensis	YHEDIQDDHDLYHAITTNKSYKGLVHPVKTVDGG-VAPDFGNRYLTEDIPMGMI VFKGVA	341
L. vulgaris	YKESIKDMSNLR LAMKCTCTAYDGLVHPMKETPDKMFVPDFTYRYMTEDIPFGMVVFRGIA	352
L. opalescens	YKESIKDMSNLR MAMKCTCTAYDGLVHPMKETPDKMFVPDFTYRYMTEDIPFGMVVFRGIS	351
S. officinalis	YKESIQDMSNLQMAMKCTCSAYDGMVHPMKETPDGKFMDFNYRYMTEDIPFGMVVFRGIA	352
H. discus hannai	HKPYIKDTSLLTLVLQTD TAYDGLVHPMKETEDGKFPDFRFRYLTEDVPNGLVVTKGLA	348
F. oregonensis	YRETVKDP TSLLTAMRNTAYNGLVHPMKDAGNGKWWPDPFGYRYLAEDIPFGLVVTKGLA	345
A. irricolor	YPDDISDKSSLYTCTINTNAGFKGLTHPCTKTADGKFPDFTGRYFGEDIPFGLAVTRGIA	343
P. sachalinensis	YPEQIKDKSTLLSCLKTNQAYDGLVHPMKKTDGKFPDFKYRYLMEDVPYGLLI IKQIA	351
A. spec	YGQSP---ATIEAVQGNPAYRGIAGPIN-----LNTRYFFEDVSTGLVPLSELG	309
	: : : .: *:. * . : **: **:. *: :.	
P. maximus	IAAGVAIPSNDKLIMWAQEKIGKEYLVDGALTGKDVATTRCPQRYGFNTLDAILTGKK-	399
M. yessoensis	IAAGVPIPNDKLI TWAQEKIGKYLVLDGALTGKDVATTRCPQRYGFNTLNAILTGKKE	400
L. vulgaris	ELAGVPTPAMDETIITWGQKILGKEVLVNGKLTGKDMNLT RAPQRFHFHSLFDLVNLR--	409
L. opalescens	ELAGVPTPAMDETI I WGQKILGKEFLVNGKLGKDMNLT RAPQRFHFNSLFDLVNLR--	408
S. officinalis	QLEGVPTPAMDETLTWGQKILGKEFLVDGELGKDMNLT RAPQRFHFNSLFDLVNLR--	409
H. discus hannai	QIAGVPTPYHDEVIWCQQLGKEIIVGDELKGDIGSTRCPQRYGINTMDALVNIM--	405
F. oregonensis	LLAGVPTPETDRVLAWCQDKLGKEFIVGSELGKDMTSSRAPQAYGFKSLDDLMLM--	402
A. irricolor	EIAGCPTPNIDKII EWAQKLMGKEYLVGGKFTGKDISATRAPQRYGFNTLDSIL-----	397
P. sachalinensis	EMAGVATPIIDEIILWAQTKLDAEYLDGKLCFVDRKHGRIPMAFGIKTLEEFVNYCK-	409
A. spec	RAVNVPTPLIDAVLDDLISSLIDTDFRKEG--RTLEKLGSLGLTAAGIRSAVE-----	359
	. . * * : . :. . :	:::

Abb. 50 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Opindehydrogenasen. Bei den verwendeten Sequenzen handelt es sich um die Octopindehydrogenase aus *Pecten maximus* (AJ237916), *Mizuhopecten yessoensis* (AB085183), *Loligo vulgaris* (AJ250884), *Loligo opalescens* (AJ278691), *Sepia officinalis* (AJ250885) und *Pseudocardium sachalinensis* (AB197036), die Tauropindehydrogenase aus *Arabella irricolor* (AB081841) und *Haliotis discus hannai* (AB085184), die Carboxyethylnorvalindehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec.* (Q44297), sowie um eine mögliche Alanopindehydrogenase aus *Fusitriton oregonensis* (AB218692). Identische Aminosäuren sind mit (*) gekennzeichnet, ähnliche Aminosäuren sind mit (:) und weniger ähnliche Aminosäuren mit (.) markiert.

7.6 Crystal Screen I (Hampton Research ,USA)

Tab. 23 Überblick über die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen des Crystal screen I der Firma Hampton Research (USA). Die Lösungen sind nach Präzipitanten in steigender Konzentration geordnet. Die Hampton-Lösungen mit den Nummern 25 und 27 sind ausgelassen worden, da sie bisher noch nicht zur Kristallisation eines Proteins beigetragen haben.

Nr.	Präzipitant	Puffer	Additiv	Hampton-Nr.
1	30 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	0,02 mol L ⁻¹ Ca-Chlorid	1
2	30 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	0,2 mol L ⁻¹ Ammoniumacetat	26
3	30 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ Mg-Acetat	21
4	30 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	0,2 mol L ⁻¹ Na-Citrat	5
5	28 % PEG 400	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	0,2 mol L ⁻¹ Ca-Chlorid	14
6	30 % PEG 400	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	0,2 mol L ⁻¹ Mg-Chlorid	23
7	30 % PEG 400	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,2 mol L ⁻¹ Na-Citrat	13
8	30 % PEG 1500	-	-	43
9	8 % PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	-	37
10	25 % PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	0,2 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	20
11	30 % PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	0,2 mol L ⁻¹ Ammoniumacetat	10
12	30 % PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	0,2 mol L ⁻¹ Ammoniumacetat	9
13	30 % PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,2 mol L ⁻¹ Li-Sulfat	17
14	30 % PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,2 mol L ⁻¹ Mg-Chlorid	6
15	30 % PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,2 mol L ⁻¹ Na-Acetat	22
16	30 % PEG 4000	-	0,2 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	31
17	8 % PEG 8000	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	-	36
18	15 % PEG 8000	-	0,5 mol L ⁻¹ Li-Sulfat	50
19	18 % PEG 8000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ Ca-Acetat	46
20	18 % PEG 8000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ Zn-Acetat	45
21	20 % PEG 8000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ Mg-Acetat	18
22	20 % PEG 8000	-	0,05 mol L ⁻¹ K-Phosphat	42
23	30 % PEG 8000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ Na-Acetat	28
24	30 % PEG 8000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	15
25	30 % PEG 8000	-	0,2 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	30
26	10 % 2-Propanol, 20% PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	-	41
27	20 % 2-Propanol, 20 % PEG 4000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	-	40
28	20 % 2-Propanol	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	0,2 mol L ⁻¹ Ca-Chlorid	24
29	30 % 2-Propanol	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ Na-Citrat	8
30	30 % 2-Propanol	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	0,2 mol L ⁻¹ Mg-Chlorid	12
31	30 % 2-Propanol	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,2 mol L ⁻¹ Ammoniumacetat	19
32	1.4 mol L ⁻¹ Na-Acetat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5	-	7
33	1.4 mol L ⁻¹ Na-Acetat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	-	38
34	0,2 mol L ⁻¹ Mg-Format	-	-	44

Tab. 23 Fortsetzung Crystal Screen I – Zusammensetzung der Lösungen

Nr.	Präzipitant	Puffer	Additiv	Hampton-Nr.
35	2,0 mol L ⁻¹ Na-Format	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	-	34
36	4 mol L ⁻¹ Na-Format	-	-	33
37	1,6 mol L ⁻¹ K,Na-Phosphat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	-	35
38	0,4 mol L ⁻¹ Ammoniumphosphat	-	-	3
39	1,0 mol L ⁻¹ Ammoniumphosphat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	-	11
40	2,0 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	-	48
41	1,5 mol L ⁻¹ Li-Sulfat	-	2 % PEG 8000	49
42	1,5 mol L ⁻¹ Li-Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	-	16
43	2,0 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	-	47
44	2,0 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	-	4
45	2,0 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	-	-	32
46	2,0 mol L ⁻¹ Ammoniumsulfat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	2 % PEG 400	39
47	0,4 mol L ⁻¹ K,Na-Tartrat	-	-	2
48	0,8 mol L ⁻¹ K,Na-Tartrat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Hepes pH 7.5	-	29

7.7 Crystal Screen II (Hampton Research, USA)

Tab. 24 Überblick über die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen des Crystal screen II der Firma Hampton Research (USA). Die Lösungen sind nach Präzipitanten in steigender Konzentration geordnet.

Nr.	Präzipitant	Puffer	Additiv	Hampton-Nr.
1	10 % Jeffamin M-600	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	0,01 mol L ⁻¹ Fe-Chlorid	18
2	20 % Jeffamin M-600	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	-	31
3	30 % Jeffamin M-600	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	0,05 mol L ⁻¹ Cs-Chlorid	24
4	30 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	0,2 mol L ⁻¹ NaCl	10
5	30 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	0,5 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	29
6	50 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,2 mol L ⁻¹ NH ₄ -Phosphat	43
7	70 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	-	35
8	30 % PEG 400	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	0,1 mol L ⁻¹ Cd-Chlorid	12
9	25 % PEG MME 550	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	0,01 mol L ⁻¹ Zn-Sulfat	27
10	30 % PEG MME 550	0,1 mol L ⁻¹ Bicine pH 9.0	0,1 mol L ⁻¹ NaCl	46
11	20 % PEG MME 2000	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,01 mol L ⁻¹ Ni-Chlorid	45
12	30 % PEG MME 2000	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	0,2 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	13
13	20 % PEG MME 5000	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	26
14	10 % PEG 6000	-	2,0 mol L ⁻¹ NaCl	1
15	10 % PEG 6000, 5 % MPD	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	-	30
16	10 % PEG 8000, 10 % PEG 1000	-	-	7
17	10 % PEG 8000, 8 % Ethylen Glycol	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	-	37
18	20 % PEG 10000	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	-	38
19	10 % PEG 20000	0,1 mol L ⁻¹ Bicine pH 9.0	2 % Dioxan	48
20	12 % PEG 20000	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	-	22

Tab. 24 Fortsetzung Crystal Screen II – Zusammensetzung der Lösungen

Nr.	Präzipitant	Puffer	Additiv	Hampton-Nr.
21	4 % Polyethylen-Imin	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	0,5 mol L ⁻¹ NaCl	16
22	25 % tert-Butanol	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,1 mol L ⁻¹ Ca-Chlorid	40
23	35 % tert-Butanol	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	-	17
24	35 % Dioxan	-	-	4
25	10 % Ethanol	-	1,5 mol L ⁻¹ NaCl	8
26	20 % Ethanol	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	-	44
27	25 % Ethylen Glycol	-	-	3
28	12 % Glycerin	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	1,5 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	42
29	1,0 mol L ⁻¹ 1,6-Hexandiol	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	0,01 mol L ⁻¹ Co-Chlorid	11
30	2,5 mol L ⁻¹ 1,6-Hexandiol	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	0,01 mol L ⁻¹ Mn-Chlorid	19
31	3,4 mol L ⁻¹ 1,6-Hexandiol	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,2 mol L ⁻¹ Mg-Chlorid	39
32	1,0 Mol L ⁻¹ Imidazol pH 7.0	-	-	6
33	1,0 mol L ⁻¹ Na-Acetat	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	0,5 mol L ⁻¹ Cd-Sulfat	34
34	2,0 mol L ⁻¹ Mg-Chlorid	0,1 mol L ⁻¹ Bicine pH 9.0	-	47
35	0,5 mol L ⁻¹ NaCl; 0,01 mol L ⁻¹ Mg-Chlorid	-	0,01 mol L ⁻¹ Cetyltrimethylammoniumbromid	2
36	2,0 mol L ⁻¹ NaCl	0,1 mol L ⁻¹ Na-Acetat pH 4.6	-	9
37	2,0 mol L ⁻¹ NaCl	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	0,2 mol L ⁻¹ K,Na-Phosphat	21
38	4,3 mol L ⁻¹ NaCl	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	-	36
39	1,6 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 6.5	-	-	28
40	1,0 mol L ⁻¹ Li-Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	0,5 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	15
41	1,0 mol L ⁻¹ Li-Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ Tris/HCl pH 8.5	0,01 mol L ⁻¹ Ni-Chlorid	41
42	1,6 mol L ⁻¹ Mg-Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	-	20
43	1,6 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	10 % Dioxan	23
44	1,6 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	0,1 mol L ⁻¹ NaCl	32
45	1,8 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6.5	0,01 mol L ⁻¹ Co-Chlorid	25
46	2,0 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	-	5 % Isopropanol	5
47	2,0 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ Na-Citrat pH 5.6	0,2 mol L ⁻¹ K,Na-Tartrat	14
48	2,0 mol L ⁻¹ NH ₄ -Sulfat	0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7.5	-	33

Danke sagen möchte ich all denen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Als erstes danke ich Herrn Professor Dr. Manfred K. Grieshaber. Sein Interesse an meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung in den zurückliegenden Jahren meiner Promotion haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Professor Dr. Dieter Willbold danke ich für die Übernahme des Korreferats. Besonders möchte ich ihm auch für die Idee und die Möglichkeit danken, die ODH mittels NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Meine Arbeit wurde dadurch um ein interessantes Kapitel bereichert.

Juniorprofessor Dr. Matthias Stoldt danke ich für eine Einführung in die NMR-Spektroskopie und seine Unterstützung bei der Spektrenaufnahme, Prozessierung und Auswertung.

Dr. Oliver H. Weiergräber möchte ich für seine Hilfe bei der Kristallisation und der röntgenographischen Untersuchung der ODH-Kristalle danken.

Mein besonderer Dank gilt Silke Jakob für ihre Unterstützung bei der alltäglichen Laborarbeit. Ich danke ihr für die Herstellung hunderter Liter Puffer, ungezählter Gele und für die zahlreichen Protein- und Aktivitätsbestimmungen.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Zoophysologie sei für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die schönen Stunden abseits des Instituts gedankt. Außerdem bedanke ich mich bei Nadine van Os für zahlreiche fachliche Diskussionen über die ODH und die Bindung ihrer Liganden.

Bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken, da sie mich während meiner Ausbildung immer bedingungslos unterstützt haben.

Ich möchte mich bei Ursula für ihr Verständnis, ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und besonders für das Erdulden meiner Launen bedanken.

Ein letzter Dank geht an die „Deutsche Forschungsgemeinschaft“, die meine Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Physiologie“ gefördert hat.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 2.11.2006