

Erkenntnisse zur Evolution von Invertebraten-Opindehydrogenasen

Reinigung, Sequenzierung und heterologe Expression ausgewählter
Alanopin- und Strombindehydrogenasen

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Ulrike Hergert

aus Solingen

Düsseldorf, 2007

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

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

Referent: Prof. Dr. Manfred K. Grieshaber

Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2007

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN.....	V
1 EINLEITUNG.....	1
2 MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 Chemikalien und sonstige Materialien	16
2.2 Opinsynthese	16
2.3 Invertebraten	18
2.3.1 Herkunft und Hälterung der Tiere	18
2.3.2 Präparation und Lagerung von Gewebe	19
2.3.3 Artbestimmung	19
2.4 Bakterienstämme	19
2.5 Proteinbiochemische Methoden	20
2.5.1 Aktivitätsbestimmungen	20
2.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	21
2.5.3 Herstellen von Gewebehomogenaten	21
2.5.4 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	22
2.5.5 Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren von Proteinlösungen	22
2.5.6 Chromatographie	22
2.5.6.1 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration.....	23
2.5.6.2 Reinigung von AloDHs aus <i>A. marina</i>	23
2.5.6.3 Partielle Reinigung möglicher StrDHs aus <i>A. marina</i>	24
2.5.6.4 Reinigung von Alo/StrDHs aus <i>C. gigas</i>	25
2.5.6.5 Reinigung rekombinanter OpDHs	26
2.5.7 Elektrophoretische Verfahren.....	27
2.5.7.1 Native PAGE	27
2.5.7.2 SDS-PAGE	28
2.5.7.3 Isoelektrische Fokussierung	29
2.5.7.4 Western-Blots	30

2.5.8	Proteinsequenzierung	31
2.5.8.1	N-terminale Proteinsequenzierung nach Edman.....	31
2.5.8.2	Peptidsequenzierung durch Tandem-Massenspektrometrie.....	32
2.5.9	MALDI-Massenspektrometrie	33
2.6	Molekularbiologische Methoden	33
2.6.1	Sterilisation von Geräten und Lösungen.....	33
2.6.2	Isolierung von DNA.....	34
2.6.3	Isolierung von RNA	34
2.6.3.1	Saure GTC-Phenol-Chloroform-Extraktion.....	34
2.6.3.2	RNA-Isolierung mit Reagenziensätzen.....	35
2.6.3.3	Anreicherung von mRNA	35
2.6.3.4	Kontrolle der RNA-Qualität.....	36
2.6.4	cDNA-Synthese	36
2.6.5	Polymerase Kettenreaktionen	37
2.6.5.1	PCRs mit degenerierten oder universellen Primern.....	37
2.6.5.2	5'- und 3'-RACE-PCR.....	38
2.6.5.3	5'/3'- und ORF-Amplifikationen	39
2.6.6	Analyse und Reinigung von PCR-Produkten.....	40
2.6.7	Klonierung von PCR-Produkten	40
2.6.8	Transformation.....	41
2.6.9	Plasmidpräparation.....	42
2.6.10	DNA-Sequenzierung	43
2.6.11	Expressionskulturen	43
2.7	Bioinformatische Methoden.....	45
2.7.1	Sequenzanalyse	45
2.7.2	Sequenzvergleiche	46
2.7.3	Datenbanksuche	46
2.7.4	Phylogenetische Analyse	47
2.7.5	Darstellung und Vergleich dreidimensionaler Proteinstrukturen.....	48
2.8	Statistik	49

3	ERGEBNISSE	50
3.1	Pyruvatreduktase-Aktivitäten der untersuchten Arten	50
3.2	Elektrophoretische Isoenzymanalyse	51
3.3	Oxidationsempfindlichkeit der Wattwurm-OpDHs	52
3.4	Enzymreinigungen	53
3.4.1	Reinigung von AloDHs aus <i>A. marina</i>	53
3.4.2	Partielle Reinigung von StrDHs aus <i>A. marina</i>	59
3.4.3	Reinigung von Alo/StrDHs aus <i>C. gigas</i>	63
3.5	Bestimmung des Molekulargewichts verschiedener OpDHs	68
3.6	Peptidsequenzierungen	69
3.7	OpDH-Sequenzen aus <i>A. marina</i>, <i>C. gigas</i>, <i>O. edulis</i> und <i>S. nudus</i>	73
3.8	Heterologe Expression von OpDHs in <i>E. coli</i>	83
3.8.1	Expressionsanalysen.....	83
3.8.2	Reinigung heterolog exprimierter OpDHs	88
3.9	Primär- und Sekundärstrukturvergleich ausgewählter OpDHs	91
3.10	Phylogenie der OpDHs	97
4	DISKUSSION	103
4.1	Pyruvatoxidoreduktasen der untersuchten Arten	103
4.1.1	Pyruvatreduktase-Aktivitäten und ihre physiologische Bedeutung.....	103
4.1.2	Oxidationsempfindlichkeit der Wattwurm-OpDHs	107
4.1.3	Reinigung von AloDHs und StrDHs aus <i>A. marina</i> und <i>C. gigas</i>	112
4.1.4	Proteinbiochemische Isozymanalyse.....	118
4.1.4.1	AloDHs und StrDHs im Hautmuskelschlauch des Wattwurms	119
4.1.4.2	Alo/StrDHs im Adduktor der Pazifischen Auster	127
4.1.4.3	OpDHs aus <i>O. edulis</i> und <i>S. nudus</i>	135

4.1.5	Amplifikation, Klonierung und heterologe Expression von Alo/StrDHs aus <i>A. marina</i> , <i>C. gigas</i> , <i>O. edulis</i> und <i>S. nudus</i>	137
4.1.5.1	Zuverlässigkeit der ermittelten Alo/StrDH-Sequenzen	137
4.1.5.2	Multiple Transkripte und Enzym polymorphismen	142
4.1.5.3	Heterologe Expression und Reinigung rekombinanter OpDHs	149
4.2	Vergleich ausgewählter OpDHs.....	160
4.2.1	Physikochemische und strukturelle Eigenschaften	160
4.2.2	Nukleotidbindestelle und katalytische Triade.....	167
4.2.3	Aminosäurespezifität	172
4.3	Evolution von Invertebraten-OpDHs.....	181
4.3.1	Phylogenetische Beziehungen zwischen Invertebraten-OpDHs.....	181
4.3.2	Verwandtschaft der Invertebraten-OpDHs mit bakteriellen OpDHs und anderen Proteinen	189
4.3.3	Hypothesen zur Entwicklung alternativer Pyruvatoxidoreduktasen.....	210
5	ZUSAMMENFASSUNG	230
6	SUMMARY	233
7	LITERATUR.....	236
8	ANHANG.....	277
8.1	Primer	277
8.2	Sequenzen	281
9	DANKSAGUNG.....	294

Abkürzungen

Å	Ångström
α -KG	α -Ketoglutarat
Ala	Alanin
Alo	Alanopin
Alo/StrDH	Alanopin-/Strombindehydrogenase
AloDH	Alanopindehydrogenase
Am	<i>Arenicola marina</i>
AMAS	Analyse Multiply Aligned Sequences
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β -AloDH	β -Alanopindehydrogenase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CENDH	N-(1-D-Carboxyethyl)-L-Norvalin-Dehydrogenase
Cg	<i>Crassostrea gigas</i>
Cg-Alo/StrDH I, II bzw. III	chromatographisch gereinigte <i>Crassostrea gigas</i> -Alanopin-/Strombindehydrogenasen
Cg-Alo/StrDH1, 2 bzw. 3 _{partiell}	durch cDNA-Sequenzierungen charakterisierte Alanopin-/Strombindehydrogenasen aus <i>Crassostrea gigas</i>
CHT	keramisches Hydroxyapatit
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
3D	dreidimensional
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DH	Dehydrogenase
Disk-Elektrophorese	diskontinuierliche Elektrophorese

Abkürzungen

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extrakt
E ₂₈₀	Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm
EBI	European Bioinformatics Institute
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI-Q-TOF-MS	Elektrospray-Ionisations-Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (Hybridmassenspektrometrie)
E-Wert	Erwartungswert
exp.	experimentell
ExPASy	Expert Protein Analysis System
FAD ⁺ / FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (oxidiert bzw. reduziert)
FG	Frischgewicht
FG-DEAE	Fractogel [®] -EMD-Diethylaminoethyl (M)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G3PDH	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
Gr.	Gruppe
GTC	Guanidinthiocyanat
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
His-Tag	Histidin-Anhang
hyp-	hypothetisch
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Kontrolle
Kan	Kanamycin

kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kd	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
lacI	Gen, das den Repressor des Laktose-Operons codiert
lac-Promotor	Promotor des Laktose-Operons
LB	Luria Broth
LDH	Laktatdehydrogenase
LE6xH	Fusionstag aus Leucin, Aspartat und sechs Histidinen
M	Molekulargewichtsmarker
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
MDH	Malatdehydrogenase
MLV-RT	Maus-Leukämie-Virus-Reverse Transkriptase
MMDB	Molecular Modeling Database
mRNA	messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
n	Zahl der Meßwerte
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+ / $NADH$	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert bzw. reduziert)
$NADP^+$ / $NADPH$	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert bzw. reduziert)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NEB	New England Biolabs
NG	Nachweisgrenze
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NoDH	Nopalindehydrogenase
NOS	Nopalinsynthase
nt	Nukleotide
OCD	Ornithin-Cyclodesaminase
OCS	Octopinsynthase
Oct	Octopin

Abkürzungen

OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ODH	Octopindehydrogenase
Oe	<i>Ostrea edulis</i>
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidin
OpDH	Opindehydrogenase
OpS	Opinsynthase
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Brookhaven Protein Database
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prot	Protein
PSI-BLAST	positionsspezifischer iterativer BLAST
put-	putativ
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RCBS	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RE	Restriktionsendonuklease
RF	Reinigungsfaktor
R _f	relative elektrophoretische Laufweite
RLM-RACE	RNA-Ligase Mediated RACE
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
S	Svedberg-Einheit
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIB	Swiss Institute of Bioinformatics
Sn	<i>Sipunculus nudus</i>

spez. Akt.	spezifische Aktivität
Str	Strombin
StrDH	Strombindehydrogenase
Sym-Plasmid	symbiotisches Plasmid
T _A	Anlagerungstemperatur
TaDH	Tauropindehydrogenase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-Buffered Saline
theor.	theoretisch
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
TMAO	N-Trimethylamin-Oxid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-DNA	Transfer-DNA
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)
UDP-Glucose	Uridindiphosphatglucose
UTR	nicht translatierte mRNA-Region
v/v	Volumen pro Volumen
VAST	Vector Alignment Search Tool
VIS	Vitopinsynthase
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

Nukleinsäurecode

A	Adenosin	M	A oder C (<u>a</u> mino)
C	Cytidin	S	G oder C (<u>s</u> trong)
G	Guanosin	W	A oder T (<u>w</u> eak)
T	Thymidin	B	G, T oder C
U	Uridin	D	G, A oder T
R	G oder A (<u>p</u> urine)	H	A, C oder T
Y	T oder C (<u>p</u> irimidine)	V	G, C oder A
K	G oder T (<u>k</u> eto)	N	A, G, C, T (<u>a</u> ny)

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin	modifizierte Aminosäuren:
C	Cystein	N	Asparagin	C* alkyliertes Cystein
D	Aspartat	P	Prolin	E* Pyroglutamat
E	Glutamat	Q	Glutamin	K* Hydroxylysin
F	Phenylalanin	R	Arginin	M* oxidiertes Methionin
G	Glycin	S	Serin	
H	Histidin	T	Threonin	X beliebige Aminosäure
I	Isoleucin	V	Valin	
K	Lysin	W	Tryptophan	
L	Leucin	Y	Tyrosin	

1 Einleitung

Viele marine Invertebraten, insbesondere Bewohner der Gezeitenzone, sind in ihrem natürlichen Habitat temporärem Sauerstoffmangel ausgesetzt. Auch starke Muskelbeanspruchung kann zu einer Sauerstoffminderversorgung führen. Allerdings verfügen diese Tiere über eine erstaunliche Hypoxietoleranz und können auch länger anhaltende Perioden geringer Sauerstoffverfügbarkeit oder gar Anoxie überdauern (De Zwaan und Putzer, 1985; Grieshaber et al., 1994; Larade und Storey, 2002). Sofern systemische Anpassungen wie eine Steigerung der Atemtätigkeit nicht ausreichen, um das verringerte Sauerstoffangebot bzw. einen erhöhten Sauerstoffbedarf der arbeitenden Skelettmuskulatur auszugleichen, stehen diesen Arten verschiedene anaerobe Mechanismen der Energiebereitstellung zur Verfügung. Genutzt werden anaerobe Stoffwechselwege, die offenbar alte Errungenschaften des Lebens auf der Erde mit ihrer anfangs anoxischen, dann zunächst wenig sauerstoffhaltigen Atmosphäre und Hydrosphäre darstellen (Behm, 1991; Nisbet und Sleep, 2001; Martin et al., 2003; Webster, 2003). Trotz großer artspezifischer Variabilität sind bei allen fakultativ anaeroben Invertebraten ähnliche Grundprinzipien der anaeroben Energiegewinnung verwirklicht (Livingstone, 1983 und 1991; De Zwaan und Dando, 1984; Kreutzer et al., 1985; Grieshaber et al., 1994).

Neben ATP- und Phosphagenspeichern, die in der Anfangsphase biotop- oder funktionsbedingter Hypoxie verwendet werden, bildet Glykogen die Hauptenergiequelle des anaeroben Stoffwechsels (Grieshaber et al., 1994; Larade und Storey, 2002). Es eignet sich besonders als Speichersubstanz, da es als Polymer den osmotischen Druck der Zellen weniger beeinflusst als niedermolekulare Stoffe. Entsprechend kann der Glykogengehalt in den Geweben mariner Invertebraten bis zu 35 % des Trockengewichts betragen (De Zwaan und Zandee, 1972). Während biotopbedingter Hypoxie wirken marine Invertebraten einer raschen Verarmung ihrer Glykogenreserven zudem dadurch entgegen, daß sie ihren ATP-Verbrauch unter den normalen Grundumsatz reduzieren (De Zwaan und Putzer, 1985; Storey und Storey, 1990; Brooks und Storey, 1997; Grieshaber et al., 1994). Außerdem verfügen sie über einen großen Pool freier Aminosäuren, zu dem neben Glycin, L- und D-Alanin, Taurin, L-Glutamat und L-Glutamin auch L-Aspartat substantiell beiträgt (Schoffeniels und Gilles, 1972; Kreutzer et al., 1985; Siegmund, 1986).

Bei der klassischen anaeroben Glykolyse wird NADH aus der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Reaktion durch Reduktion von Pyruvat reoxidiert und so die Aufrechterhaltung des glykolytischen Fluxes auch in Abwesenheit von Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor ermöglicht. Die Reduktion von Pyruvat konkurriert mit der Transaminierung

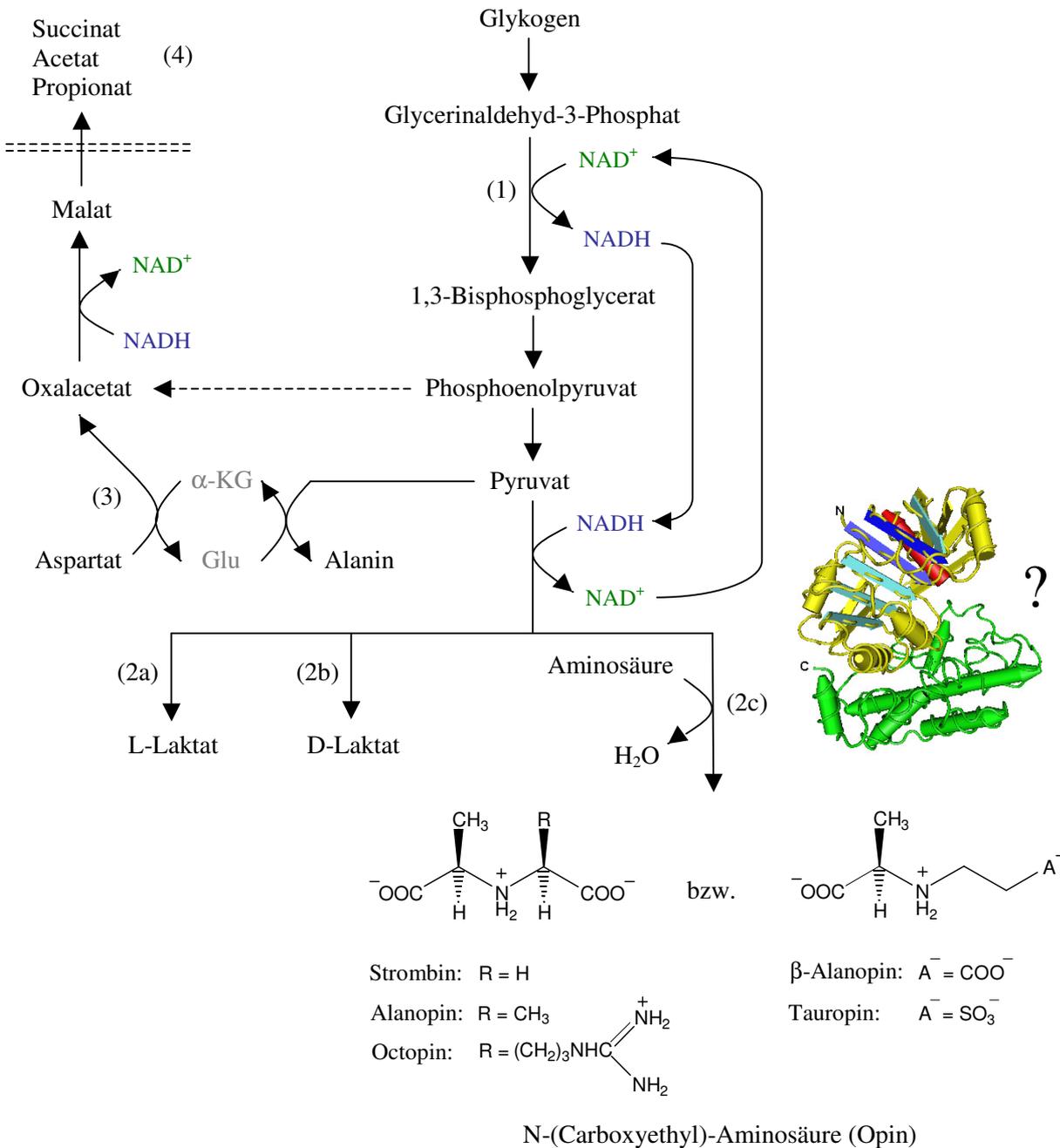


Abb. 1: Reaktionswege des anaeroben Glykogenstoffwechsels bei marinen Invertebraten

Bei vielen marinen Invertebraten wird die anaerobe Glykolyse (vereinfacht dargestellt) statt durch klassische L-LDHs (2a) durch D-LDHs (2b) oder Opindehydrogenasen (OpDHs, 2c) terminiert. Alle diese Pyruvatoxidoreduktasen sichern unter Sauerstoffmangel, indem sie NADH aus der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion (1) reoxidieren, die cytosolische Redoxbalance und damit die Aufrechterhaltung des glykolytischen Fluxes. Invertebraten-OpDHs katalysieren die NADH-abhängige reduktive Kondensation von Pyruvat und einer Aminosäure zu einer als Opine bezeichneten N^2 -(Carboxyethyl)-Aminosäure. Dabei sind Opine wie Strombin, Alanopin oder Octopin, die ausgehend von einer α -Aminosäure (hier Glycin, L-Alanin bzw. L-Arginin) gebildet werden, von solchen zu unterscheiden, an deren Synthese eine β -Aminosäure wie β -Alanin oder Taurin beteiligt ist (β -Alanopin und Tauropin). Sofern das Opine zwei asymmetrische Kohlenstoffatome aufweist, entsteht immer das (D,L)-Stereoisomer.

Bisher sind für Invertebraten-OpDHs keine 3D-Strukturdaten verfügbar. Die Enzyme könnten aber dem abgebildeten Monomer der N-(1-D-Carboxyethyl)-L-Norvalin-Dehydrogenase aus *Arthrobacter spec.* ähneln (Britton et al., 1998a; PDB 1bg6; Zylinder = α -Helices, flache Quader = β -Stränge). Nähere Informationen auch zum Zusammenhang zwischen der Fermentation von Glykogen und der Transaminierung von Aspartat (3; α -KG = α -Ketoglutarat, Glu = Glutamat) sowie zur im Schema nur angedeuteten Beteiligung des mitochondrialen Kompartiments am anaeroben Energiestoffwechsel (4) sind dem Text zu entnehmen.

von Aspartat und Pyruvat zu Oxalacetat und Alanin (Abb. 1). Indem das durch Transaminierung gebildete Oxalacetat NADH-abhängig zu Malat reduziert wird, bleibt auch in diesem Fall die cytosolische Redoxbalance gewährleistet. Malat wiederum kann nachfolgend in die Mitochondrien transportiert und dort unter Energiegewinn zu Succinat, Acetat und Propionat als weiteren Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels umgesetzt werden (Felbeck und Grieshaber, 1980; De Zwaan et al., 1981; De Zwaan und Dando, 1984; Kreutzer et al., 1985; Grieshaber et al., 1994). Allerdings trägt das mitochondrielle Kompartiment erst während länger andauernder Hypoxie maßgeblich zur anaeroben Energieproduktion bei. Dann wird der glykolytische Flux beim Phosphoenolpyruvat aufgespalten und dieses statt zu Pyruvat größtenteils mittels einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase zu Oxalacetat umgesetzt. Oxalacetat wird somit während fortgesetzter Hypoxie anders als in deren Anfangsphase nicht mehr hauptsächlich durch Transaminierung von Aspartat gebildet. Zugleich nimmt die Bedeutung von Pyruvatreduktasereaktionen ab (Ebberink und De Zwaan, 1980; Holwerda et al., 1981; Schöttler et al., 1984b; De Zwaan und Dando, 1984; Grieshaber et al., 1994).

Letztere sind vor allem für den anaeroben Stoffwechsel unter funktionsbedingter Hypoxie wichtig. Zum Einsatz kommen klassische, bei Pro- und Eukaryoten (außer Archäen) praktisch ubiquitär verbreitete L-Laktatdehydrogenasen (L-LDHs, (S)-Laktat : NAD^+ -Oxidoreduktasen, EC 1.1.1.27; Long, 1976; Madern, 2002), die Pyruvat unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu L-Laktat reduzieren. Sie bilden jedoch bei Invertebraten anders als in Wirbeltieren nicht die einzigen terminalen Enzyme der anaeroben Glykolyse. Bei manchen Arten treten zusätzlich oder statt dessen D-Laktatdehydrogenasen (D-LDHs, (R)-Laktat : NAD^+ -Oxidoreduktasen, EC 1.1.1.28) auf (Long und Kaplan, 1968; Long, 1976; Mulcahy et al., 1997). Außerdem verfügen vor allem marine Mollusken und Anneliden vielfach über sogenannte Opindehydrogenasen (OpDHs). Diese alternativen Pyruvatoxidoreduktasen katalysieren die NADH-abhängige reduktive Kondensation von Pyruvat und einer Aminosäure zu einer als Opin bezeichneten N-(Carboxyalkyl)-Aminosäure und sorgen auf diese Weise für einen ausgeglichenen cytosolischen Redoxstatus während der anaeroben Glykolyse (Abb. 1; Gäde, 1980a; De Zwaan und Dando, 1984; Gäde und Grieshaber, 1986; Grieshaber und Kreutzer, 1986).

Invertebraten-Opindehydrogenasen werden abhängig von ihrem bevorzugten Aminosäuresubstrat (L-Arginin, L-Alanin, Glycin, β -Alanin oder Taurin) als D-Octopin- (N^2 -(D-1-Carboxyethyl)-L-Arginin : NAD^+ -Oxidoreduktasen, EC 1.5.1.11, ODHs), Alanopin- (meso-N-(1-Carboxyethyl)-Alanin : NAD^+ -Oxidoreduktasen, EC 1.5.1.17, AloDHs), Strombin- (N-(Carboxymethyl)-D-Alanin : NAD^+ -Oxidoreduktasen, EC 1.5.1.22, StrDHs), β -Alanopin- (N-

(D-1-Carboxyethyl)- β -Alanin : NAD⁺-Oxidoreduktasen, EC 1.5.1.26, β -AloDHs) oder Tauro-pindehydogenasen (N²-(D-1-Carboxyethyl)-Taurin : NAD⁺-Oxidoreduktasen, EC 1.5.1.23, TaDHs) klassifiziert (vgl. Grieshaber et al., 1994). Diese Bezeichnungen sind jedoch in vielen Fällen wenig aussagekräftig, da OpDHs sich vor allem bezüglich der von ihnen umgesetzten Aminosäure häufig durch eine relativ geringe Substratspezifität auszeichnen, so daß von ein und demselben Enzym möglicherweise zwei oder mehr unterschiedliche Opine gebildet bzw. unter geeigneten Reaktionsbedingungen auch wieder abgebaut werden können.

Vor allem AloDH- und StrDH-Aktivitäten scheinen häufig an die gleichen Enzymproteine gekoppelt zu sein (Dando et al., 1981; Meinardus-Hager und Gäde, 1986b; Gäde und Grieshaber, 1986; Kreutzer, 1987; Kanno et al., 1996a; Manchenko et al., 1998). Daneben wurden aber auch kombinierte Alo/ β -AloDHs, Alo/ β -Alo/StrDHs oder Str/TaDHs beschrieben (Kanno et al., 1996a). Die AloDH aus dem Herzmuskel der Schnecke *Concholepas concholepas* verwendet als zusätzliche Aminosäuresubstrate L-Cystein und L-Serin (Carvajal et al., 1994). ODHs wie die aus der Miesmuschel, *Mytilus edulis*, oder der Seeanemone, *Metridium senile*, können vielfach neben L-Arginin auch L-Lysin umsetzen (Coughlan und O'Carra, 1996; Walsh, 1981; Storey und Dando, 1982). Ellington (1979) fand bei Seeanemonen OpDHs besonders breiter Aminosäurespezifität, die außer L-Arginin und L-Lysin auch L-Alanin, Glycin und L-Threonin zu nutzen vermögen. Zahlreiche weitere Beispiele für multiple OpDHs ließen sich anfügen. Opinbildungsreaktionen, an denen andere Aminosäuren als L-Arginin, L-Alanin, Glycin, β -Alanin oder Taurin beteiligt sind, besitzen allerdings möglicherweise keine physiologische Relevanz. Eine Akkumulation der zugehörigen Opine konnte in vivo anders als die von Octopin, Alanopin, Strombin, β -Alanopin und Tauropin (Grieshaber und Gäde, 1976; Gäde et al., 1978; Koormann und Grieshaber, 1980; Fields et al., 1980; Siegmund et al., 1985; Pörtner et al., 1984b; De Zwaan und Zurburg, 1981; Kreutzer et al., 1989; Sato et al., 1987b und 1991; Kan-no et al., 1998) bisher bei keinem Invertebraten nachgewiesen werden.

Verkompliziert wird die Situation dadurch, daß vielfach Enzym polymorphismen und individuell oder gewebsspezifisch variierende Isozymmuster auftreten. Beispielsweise wiesen Beaumont et al. (1980) in Adduktormuskeln der Muschel *Cerastoderma edule* elektrophoretisch insgesamt drei bis acht verschiedene ODH-Isozyme nach, die sie auf einen einzelnen polymorphen Genlocus mit codominanten Allelen zurückführten. Manchenko et al. (1998) fanden bei der Pazifischen Auster, *Crassostrea gigas*, Belege für die Existenz zweier polymorpher OpDH-Loci. Einer von ihnen wird nur im Adduktor exprimiert und codiert Str/AloDHs, die auch L-Serin und β -Alanin umzusetzen vermögen. Die L-Alanin-spezifische

schen Isoenzyme des anderen kommen zusätzlich in weiteren Geweben vor. Im Mantel und Hirn des Tintenfischs, *Sepia officinalis*, aber auch bei anderen Cephalopoden treten gewebespezifische ODH-Isozyme auf, die in ihren kinetischen Eigenschaften den M- bzw. H-Typ-LDHs der Vertebraten entsprechen und in vivo möglicherweise wie diese bevorzugt als Pyruvatreduktase bzw. -oxidase wirken (Storey, 1977b; Storey und Storey, 1979; Fields et al., 1976a und 1976b). ODH-Allozyme mit solchen kinetischen Merkmalen beobachtete Walsh (1981) auch bei einer Seeanemone. In den Geweben der Wellhornschnecke, *Busycotypus canaliculatum*, konnten drei kinetisch differierende ALODHs identifiziert werden (Plaxton und Storey, 1982).

Unabhängig davon, ob dies auf die geringe Substratspezifität einzelner OpDHs oder das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer Enzymproteine zurückzuführen ist, zeichnen sich Invertebratengewebe häufig durch mehrere parallele Pyruvatoxidoreduktase-Aktivitäten aus, denen je nach Stoffwechselsituation unterschiedliche Bedeutung zukommen kann. So wird im Fuß von *Cardium tuberculatum*, der durch hohe spezifische ODH- sowie geringere ALODH-, StrDH- und LDH-Aktivität gekennzeichnet ist, unter biotopbedingter Hypoxie D-Laktat produziert, wohingegen aktivitätsbedingter Sauerstoffmangel zur Akkumulation von Octopin führt (Gäde, 1980b; Meinardus-Hager und Gäde, 1986a und 1986b). In Hautmuskelschläuchen des Spritzwurms, *Sipunculus nudus*, fanden Pörtner et al. (1984b) ODH-, ALODH- und StrDH-Aktivitäten im Verhältnis 48 : 5 : 1. Während bis zu 24-stündiger Inkubation der Tiere in stickstoffäquilibriertem Seewasser erhöhte sich die Strombinkonzentration viel stärker als der Octopin- und Alanopingeht des Gewebes. Dagegen entstand bei intensiver Grabtätigkeit deutlich mehr Octopin als Strombin und kein Alanopin (Pörtner et al., 1984b). Ein ähnlicher Dualismus der Opinbildung wurde von Siegmund et al. (1985) und Siegmund (1986) auch beim Wattwurm, *Arenicola marina*, beschrieben. Sie detektierten im Hautmuskelschlauch dieser Art sechs- bis zehnmals höhere ALODH- als StrDH-Aktivität. Dennoch akkumulierte Alanopin nur unter funktionsbedingter Hypoxie in stärkerem Umfang als Strombin. Hypoxische Inkubation führte zu umgekehrten Mengenverhältnissen.

OpDH-Reaktionen besitzen unabhängig von der Art der beteiligten Aminosäure ähnliche Gleichgewichtskonstanten. Unter biotopbedingter Hypoxie katalysieren alle OpDHs eines Gewebes nahe ihres thermodynamischen Gleichgewichts, so daß vornehmlich das Opin gebildet wird, dessen zugehörige Aminosäure im Gewebe in der höchsten Konzentration vorkommt (Siegmund, 1986; Grieshaber und Kreutzer, 1986; Kreutzer et al., 1989). Arten mit niedrigem Aminosäuregehalt wie etwa *C. tuberculatum* bilden in dieser Situation bevorzugt Laktat (Meinardus-Hager und Gäde, 1986a). Dagegen können während extremer Muskelbeanspruchung

und damit einhergehenden stark gesteigerten Glykolyseraten nur solche OpDHs nahe ihres Gleichgewichts katalysieren, die im Gewebe in ausreichend hoher Aktivität vorkommen. Das unter funktionsbedingter Hypoxie akkumulierende Endprodukt korreliert daher fast immer mit der höchsten Pyruvatoxidoreduktase-Aktivität (Siegmund, 1986; Grieshaber und Kreutzer, 1986; Kreutzer et al., 1989).

Die große art- und gewebsspezifische Diversität in der OpDH-Ausstattung und Opinsynthese mariner Invertebraten hängt jedoch nicht nur von der Variabilität des Aminosäuregehalts in ihren Geweben ab, sondern wird zusätzlich von der Art und Größe ihrer Phosphagenspeicher beeinflusst. ODHs sind stets mit L-Argininphosphat assoziiert. Sie fehlen bei Arten, die wie der Wattwurm Taurocyaminphosphat oder andere Phosphagene nutzen (Grieshaber und Kreutzer, 1986; Grieshaber et al., 1994). Wird L-Argininphosphat im anaeroben Energiestoffwechsel unter ATP-Gewinn abgebaut, so erhöht das dabei freigesetzte L-Arginin die Octopinsynthesekapazität des entsprechenden Gewebes. Zugleich wird durch die ODH-Aktivität eine übermäßige Argininakkumulation verhindert, die möglicherweise den weiteren Phosphagenabbau erschweren (Zammit und Newsholme, 1976) oder sich wegen der Guanidiniumgruppe des Arginins zellschädigend auswirken könnte (Bowlus und Somero, 1979).

Bei manchen Arten wie den Pectiniden *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis* oder *Placopecten magellanicus* erfolgen L-Argininphosphat-Abbau und Opinsynthese allerdings zeitversetzt. Hier wird Octopin erst in der Erholungsphase nach exzessiver Muskeltätigkeit gebildet, wenn während des Wiederauffüllens von ATP-, Phosphagen- und sonstigen Energiespeichern ein erhöhter Energiebedarf besteht, der möglicherweise durch den aeroben Stoffwechsel allein nicht gedeckt werden kann (Gäde et al., 1978; Grieshaber, 1978; Livingstone et al., 1981). Bei Austern, die Eberlee et al. (1983) 96-stündiger experimenteller Hypoxie aussetzten, akkumulierten Alanopin- und Strombin ebenfalls erst in der frühen Erholungsphase. Zurburg et al. (1982) beobachteten Ähnliches im posterioren Adduktor von *Mytilus edulis*.

OpDHs konnten bisher bei Cnidarien, Poriferen, Brachiopoden, Nemertinen, Mollusken, Anneliden, Sipunculiden sowie bei einzelnen Crustaceen und Echinodermen, jedoch nicht bei Chordaten detektiert werden (Zammit und Newsholme, 1976; Livingstone et al., 1983 und 1990; Hammen und Bullock, 1991; Sato et al., 1993a; Hammen und Fielding, 1993). Gerade in den Geweben mariner Invertebraten überwiegt ihre Aktivität häufig gegenüber nur geringer oder ganz fehlender LDH-Aktivität. Dagegen treten bei fast allen limnischen und terrestrischen Arten, bei den meisten Crustaceen, sonstigen Arthropoden, vielen Echinodermen sowie vor allem bei Urchordaten, Acraniern und Vertebraten LDHs als einzige Pyruvatoxidoreduk-

tasen auf. Eine Ausnahme bildet die zu den Polychaeten gehörende Familie der *Nereidae*, deren Vertreter sich mehrheitlich durch das Fehlen von OpDHs bei gleichzeitig hoher D-LDH-Aktivität auszeichnen (Livingstone et al., 1983 und 1990; Grieshaber und Kreutzer, 1986; Sato et al., 1993a). LDH-Aktivität dominiert aber zum Beispiel auch bei Polyplacophoren sowie im Fuß der Schnecke *Littorina littorea* (Livingstone et al., 1983 und 1990). Crustaceen, Echinodermen und Chordaten besitzen in der Regel nur L-LDHs, die meisten LDH-abhängigen Mollusken, Arachniden und einige Anneliden ausschließlich D-LDHs (Long und Kaplan, 1968; Long, 1976, Hammen und Bullock, 1991). Das gleichzeitige Vorkommen von LDHs unterschiedlicher Stereospezifität konnte bisher nur bei Cephalopoden nachgewiesen werden (Mulcahy et al., 1997).

Hohe ODH-Aktivitäten finden sich vor allem bei Pectiniden (van Thoai et al., 1969; Grieshaber, 1978), Cephalopoden (van Thoai und Robin, 1959; Fields et al., 1976a; Hochachka et al., 1978), anderen aktiven Mollusken (Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a) und dem Sipunculiden *Sipunculus nudus* (Pörtner et al., 1984b). Daneben kommen ODHs aber auch bei Anthozoen (Zammit und Newsholme, 1976; Ellington, 1979) und Schnurwürmern (Gäde, 1983) vor. Bei Anneliden fehlen sie fast vollständig (Livingstone et al., 1983; Hammen und Fielding, 1993). Polychaeten lassen statt dessen hohe spezifische AloDH- und zum Teil ebenfalls beträchtliche StrDH-Aktivitäten erkennen. Gleiches gilt für viele Meso- und Neogastropoden sowie diverse Muscheln. Nur bei wenigen Arten (z. B. bei der Wellhornschncke, *Buccinum undatum*) wurde in einem Gewebe AloDH-, jedoch keine StrDH-Aktivität nachgewiesen. Der umgekehrte Fall (StrDH-, aber keine AloDH-Aktivität) scheint vor allem bei Schwämmen aufzutreten (Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a). Auch TaDHs sind weit verbreitet. Sie schienen zunächst nur bei Brachiopoden (z. B. *Glottidea pyramidata*, Doumen und Ellington, 1987) und Archaegastropoden (z. B. beim Seeohr, *Haliotis discus hannai*, Sato und Gäde, 1986) von Bedeutung zu sein (Hammen und Bullock, 1991), konnten später jedoch auch bei Schwämmen (z. B. *Halichondria japonica*), Coelenteraten, Anneliden (z. B. beim Sandwurm, *Arabella iricolor*, Kan-no et al., 1996b), anderen Mollusken und Seesternen (z. B. bei *Asterina pectinifera*) detektiert werden (Sato et al., 1993a). Nennenswerte β -AloDH-Aktivität fand sich nur bei wenigen Arten, darunter dem Polychaeten *Perinereis nuntia*, der Schnecke *Fusitriton oregonensis* und der Muschel *Scapharca broughtonii* (Sato et al., 1993a; Sato et al., 1987b).

Invertebraten-OpDHs sind entsprechend ihrer Aufgabe im Stoffwechsel cytosolische Enzyme. Im Unterschied zu den fast immer tetrameren L- und dimeren D-LDHs (Everse und Kaplan, 1973; Long und Kaplan, 1973; Long et al., 1979; Gäde und Grieshaber, 1986 versus

Ausnahmen entsprechend Gäde, 1979; Storey und Storey, 1977a sowie Ellington und Long, 1978) handelt es sich bei ihnen um monomere Enzyme eines Molekulargewichts von 35 bis 45 kd. Sie ähneln einander in ihren kinetischen Eigenschaften und besitzen, sofern das zugehörige Opin zwei asymmetrische Kohlenstoffatome umfaßt (Abb. 1), stets (D,L)-Stereospezifität (De Zwaan und Dando, 1984; Gäde und Grieshaber, 1986; Thompson und Donkersloot, 1992).

OpDHs dieser Stereospezifität wurden auch in Wurzelhalsgallen dikotyler Pflanzen nachgewiesen, die durch *Agrobacterium tumefaciens* oder andere pathogene Agrobakterien induziert werden. Diese Bodenbakterien verfügen über sogenannte Ti- (Tumor inducing) Plasmide, die neben Onkogenen auch Gene für opinsynthetisierende bzw. -abbauende Enzyme umfassen. Indem die Bakterien einen speziellen, als T-DNA (Transfer-DNA) bezeichneten Abschnitt der Ti-Plasmide in Pflanzenzellen einschleusen und in deren Genom integrieren, veranlassen sie die Zellen zu tumorösem Teilungsverhalten sowie zur Produktion und Exkretion von Opinen, die von den Bakterien selbst als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle genutzt werden können. Zugleich erhöhen die gebildeten Opine die Konjugationsrate der Agrobakterien und sorgen damit für eine verstärkte Ausbreitung der pathogenen Plasmide (Reviews z. B. von Zambryski et al., 1989; Thompson und Donkersloot, 1992; Dessaux et al. 1993). Petit et al. (1978) prägten für diese Interaktion zwischen Agrobakterien und ihren Wirtspflanzen den Begriff „Opinkonzept“.

Aus Wurzelhalsgallen und anderen Pflanzentumoren konnte eine große, ständig wachsende Zahl unterschiedlicher Opine isoliert werden (Tempé, 1983; Thompson und Donkersloot, 1992; Dessaux et al., 1992; Dessaux et al., 1993; Chilton et al., 1995; Moore et al., 1997; Ridé et al., 2000; Chilton et al., 2001). Dabei werden ausgehend von einer funktionellen Begriffsdefinition häufig auch solche Substanzen als Opine bezeichnet, die nicht aus der reduktiven Kondensation einer α -Ketosäure mit einer Aminosäure hervorgehen. Nur Opine im letztgenannten, engeren Sinne und die für ihre Synthese verantwortlichen Enzyme sind jedoch für die vorliegende Arbeit von Interesse. Zu ihnen gehören die von Pyruvat abgeleiteten Opine der sogenannten Octopinfamilie (N^2 -(Carboxyethyl)-Aminosäuren) und N^2 -(Carboxypropyl)-Aminosäuren wie die ausgehend von α -Ketoglutarat und L-Arginin bzw. L-Ornithin gebildeten Opine der Nopalinfamilie (Nopalin und Nopalinsäure), Glutaminopin (aus α -Ketoglutarat + L-Glutamin), Succinamopin (= Asparaginopin, aus α -Ketoglutarat + L-Asparagin) und Leucinopin (aus α -Ketoglutarat + L-Leucin) (Thompson und Donkersloot, 1992; Dessaux et al., 1992 und 1993). Während Glutaminopin und die in Pflanzentumoren nachweisbaren Opi-

ne der Octopin- und Nopalinfamilie sich stets durch (D,L)-Stereospezifität auszeichnen, tritt Succinamopin zusätzlich, Leucinopin nach bisherigem Kenntnisstand ausschließlich als (L,L)-Stereoisomer auf (Chilton et al., 1984, 1985a und 1985b; Dessaux et al., 1993).

Wurzelhalsgallen des Octopintyps sind durch pyruvatabhängige Opinoxidoreduktasen mehr oder weniger breiter Substratspezifität charakterisiert, die je nach infizierendem *Agrobacterium*-Stamm neben L-Arginin und L-Lysin auch L-Ornithin, L-Glutamin, L-Histidin sowie andere L-Aminosäuren umzusetzen vermögen und damit für die Synthese aller Octopintyp-Opine der jeweiligen Tumoren (insbesondere Octopin, Lysopin, Octopinsäure, Vitopin = Heliopin und Histopin) verantwortlich sind (Hack und Kemp, 1980; Birnberg et al., 1983, Tempé, 1983; Otten und Szegedi, 1985; Chilton et al., 2001). Diese OpDHs sind aufgrund ihrer kinetischen Eigenschaften und ihrer Funktion in vivo bevorzugt als D-Octopinsynthasen (OCS) zu bezeichnen (Hack und Kemp, 1980), werden in der Literatur jedoch teilweise auch als D-Octopindehydrogenasen, D-Lysopinsynthasen oder D-Lysopindehydrogenasen tituliert und fälschlich zweierlei EC-Nummern (EC 1.5.1.11 oder EC 1.5. 1.16) zugeordnet (Otten et al., 1977; Schröder et al., 1981; Otten und Szegedi, 1985; Thompson und Donkersloot, 1992). Die monomeren Enzyme eines Molekulargewichts von etwa 38 kd (Hack und Kemp, 1980) unterscheiden sich von den tierischen OpDHs vor allem dadurch, daß viele von ihnen statt NAD(H) bevorzugt NADP(H) als Cofaktor verwenden (Otten et al., 1977; Birnberg et al., 1977; Goldmann, 1977). Offensichtlich nah verwandt mit den OCS ist eine D-Vitopinsynthase (VIS, setzt Pyruvat und L-Glutamin um), deren codierendes Gen Canaday et al. (1992) aus Weinrebumoren (induziert durch *Agrobacterium vitis* des sogenannten Vitopintyps) isolieren konnten.

D-Nopalinsynthasen (D-Nopalindehydrogenasen, NOS bzw. NoDH, EC 1.5.1.19) katalysieren in Wurzelhalsgallen des Nopalintyps die NAD(P)H-abhängige Synthese von Nopalin und Nopalinsäure. Im Unterschied zu den OCS handelt es sich bei den NOS um homotetramere Enzyme eines Molekulargewichts von etwa 158 kd (Kemp et al., 1979; Thompson und Donkersloot, 1992). Sie vermögen augenscheinlich weder Glutaminopin, noch Asparaginopin oder Leucinopin zu produzieren (Thompson und Donkersloot, 1992). Chang und Chen (1983) fanden vielmehr Hinweise auf eine separate (D,L)-stereospezifische Asparaginopin- und Glutaminopin-Synthase, die zum Beispiel in durch *Agrobacterium tumefaciens* 181 oder EU5 induzierten Wurzelhalsgallen exprimiert wird. Andere Agrobakterien-Stämme codieren für eine (L,L)-stereospezifische Leucinopin-Synthase (Chang et al., 1983), die möglicherweise auch (L,L)-Succinamopin bildet (Chilton et al., 1985b; Ti-Plasmid-Klassifizierung gemäß Dessaux et al., 1992).

Die Enzyme für den Opinkatabolismus in den verschiedenen *Agrobacterium*-Stämmen sind im klassischen Fall wie die Opinsynthesen Ti-Plasmid-codiert, differieren aber von ihnen (Bomhoff et al., 1976; Klapwijk et al., 1976; Montoya et al., 1977 und 1978). Eingehend untersucht wurden die Octopinoxidase aus der katabolen Region des Plasmids pTiAch5 sowie die Nopalinoxidase aus dem entsprechenden Abschnitt von pTi58 (Zanker et al., 1994). Bei beiden handelt es sich um membranständige, jeweils zwei Untereinheiten (OoxB und OoxA bzw. NoxB und NoxA) umfassende Enzyme, deren Expression durch Octopin bzw. Nopalin induziert werden kann (Montoya et al., 1978; Palanichelvam und Veluthambi, 1996; Cho et al., 1997). Sie weisen Merkmale einer typischen Nukleotidbindestelle auf, sind jedoch ohne Zusatz von Cofaktoren aktiv, weshalb eine Cytochromabhängigkeit vermutet wurde (Klapwijk und Schilperoort, 1982; Zanker et al., 1994). Nach bisherigem Kenntnisstand besteht keine Verwandtschaft zu den Opinsynthesen aus Pflanzentumoren (Zanker et al., 1994).

Die Fähigkeit, Opine zu verstoffwechseln, beschränkt sich nicht auf Vertreter der Gattung *Agrobacterium*, sondern wurde auch bei anderen Bakterien aus Wurzelhalsgallen, Bodenproben, Pflanzenwurzeln oder Muscheln sowie bei einigen Pilzen nachgewiesen. So können N²-(D-Carboxyalkyl)-L-Aminosäuren wie Octopin, Octopinsäure oder Nopalin auch von verschiedenen fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Pseudomonaden, von manchen Rhizobiaceen, diversen Coryneformen, mutmaßlichen Vertretern der Gattung *Arthrobacter* und bestimmten *Alcaligenes*- und *Flavobacterium*-Stämmen genutzt werden (Beaulieu et al., 1983; Rossignol und Dion, 1985; Dion, 1986; Tremblay et al., 1987a; Beauchamp et al., 1991; Bergeron et al. 1993). Verschiedene Ascomyceten der Gattungen *Cylindrocarpon* und *Fusarium* sind im Stande, von Octopin oder Octopinsäure als einziger Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu leben (Beauchamp et al., 1990).

Asano et al. (1989) gelang es, aus dem Bodenbakterium *Arthrobacter spec.* (Stamm 1C) eine durch N-(1-D-(Carboxyethyl)-L-Phenylalanin induzierbare Opinoxidoreduktase zu reinigen, deren physiologische Funktion vermutlich in der Degradation von Opinen pflanzlichen Ursprungs besteht. Kato et al. (1996) und Britton et al. (1998b) bezeichneten das NAD(H)-abhängige Enzym (EC 1.5.1.28) später als N-(1-D-Carboxyethyl)-L-Norvalin-Dehydrogenase (CENDH). Es katalysiert die oxidative Desaminierung von Opinen wie N-(1-D-Carboxyethyl)-L-Methionin (Methiopin) oder N-(1-D-Carboxyethyl)-L-Phenylalanin und setzt in umgekehrter Reaktionsrichtung vor allem Pyruvat oder Oxalacetat mit hydrophoben Aminosäuren wie L-Norvalin (L-2-Aminovaleriansäure), L-Methionin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Phenylalanin oder L-Leucin um (Asano et al., 1989; Kato et al., 1996).

Besonders interessant ist die CENDH deshalb, weil sie die bisher einzige (D,L)-OpDH bildet, für die röntgenkristallographische Strukturdaten zur Verfügung stehen (Dairi und Asano, 1995; Britton et al., 1998b; Britton et al., 1998a). Das dimere Enzym umfaßt zwei identische 36 kd-Untereinheiten, die sich ihrerseits jeweils in zwei durch einen tiefen Spalt getrennte Domänen gliedern (vgl. Abb. 1). Die N-terminale Domäne (Aminosäuren 1 bis 195, in Abb. 1 gelb dargestellt) schließt ein sechssträngiges paralleles β -Faltblatt und eine $\beta\alpha\beta$ -Einheit ein (in Abb. 1 blau und rot hervorgehoben), die an die Rossmann-Falte typischer nukleotidbindender Enzyme (Rossmann et al., 1974 und 1975) erinnern. Außerdem läßt die Loopregion, die den ersten β -Strang mit der ersten α -Helix verbindet, die glycinreiche Konsensussequenz (GXGXXG/A) klassischer Nukleotidbindungsproteine erkennen (Wierenga et al., 1985). Die C-terminale, ausschließlich α -helikale Domäne (Aminosäuren 196 bis 359, grün in Abb. 1) vermittelt den Kontakt zwischen den Untereinheiten. Sie umfaßt eine Gruppe aus sechs, im Bereich der Domänenspalte lokalisierten Resten (Asparagin-198, Histidin-202, Arginin-292, Tyrosin-293, Glutamat-296 und Aspartat-297), die mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms in Verbindung gebracht wurden (Britton et al., 1998a). Die zu diesem Cluster gehörigen Aminosäuren Histidin-202, Aspartat-297 und Arginin-292 bilden möglicherweise eine für den Hydridtransfer und die gleichzeitige Pyruvatstabilisierung essentielle katalytische Triade wie sie aus anderen Ketosäure-Dehydrogenasen einschließlich der klassischen LDHs bekannt ist (Hart et al., 1987; Clarke et al., 1988). Anders als die Nukleotidbindestelle, die anhand der Elektronendichte von kokristallisiertem NAD^+ eindeutig identifiziert und charakterisiert werden konnte, wurden die an der Pyruvatbindung beteiligten Reste allerdings nicht experimentell identifiziert. Auch hinsichtlich der für die Aminosäurespezifität verantwortlichen CENDH-Reste konnten bisher nur Vermutungen angestellt werden (Britton et al., 1998a; Janßen, 2000).

Außer bei Invertebraten, in tumorösem Pflanzengewebe und bei Bakterien wurden N-(D-Carboxyalkyl)-L-Aminosäuren und die zugehörigen Oxidoreduktasen nur bei Rhodophyceen nachgewiesen (Kuriyama, 1961; Sato et al., 1993b). Sato et al. (1993b) reinigten aus der marinen Rotalge *Rhodoglossum japonicum* eine NAD(H) -spezifische, monomere TaDH, die in ihrer Größe (40 kd) etwa dem Molekulargewicht von Invertebraten-OpDHs entspricht. Da der Tauropingehalt in den Geweben der Alge einem diurnalen Wechsel unterliegt, vermuteten die Autoren eine photosynthesebezogene Funktion des Enzyms. ALoDHs und StrDHs, aber auch β -ALoDHs wurden bislang ausschließlich bei Tieren detektiert.

Die OpDHs höherer mariner Invertebraten scheinen einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung zu besitzen. Von Janßen (2000), Kimura und Mitarbeitern (2005) sowie Kan-no et al. (2005a) durchgeführte Vergleiche in öffentlichen Datenbanken verfügbarer ODH- und TaDH-Sequenzen aus diversen Mollusken und einem Anneliden (ODHs aus den Kamm-Muscheln *Pecten maximus* [CAC36305] und *Mizuhopecten yessoensis* [BAB92087] sowie den Kopffüßern *Loligo opalescens* [CAC20642], *Loligo vulgaris* [CAC36301] und *Sepia officinalis* [CAC36306] sowie TaDHs aus dem Seeohr, *Haliotis discus hannai* [BAB92 088], und dem Sandwurm, *Arabella iricolor* [BAB86769]) ergaben unabhängig von der Aminosäurespezifität der jeweiligen OpDHs paarweise Aminosäure-Sequenzübereinstimmungen von mindestens 40 % und ließen verteilt über die gesamte Sequenzlänge einige hoch konservierte Sequenzmotive erkennen. Immunologisch konnte eine strukturelle Verwandtschaft jedoch nur für OpDHs sehr nah verwandter Arten wie die ODHs aus verschiedenen Cephalopoden bzw. Pectiniden nachgewiesen werden (Fort et al., 1982; Baldwin, 1982).

Nach Kan-no et al. (2005b) sind von den OpDHs der höheren Invertebraten jene des sogenannten *Halichondria*-Typs zu unterscheiden, die durch die TaDH aus dem Schwamm *Halichondria japonica* (BAD52445) repräsentiert werden. Dieses Enzym weist keine signifikante Ähnlichkeit zu den Mollusken- und Anneliden-OpDHs oder sonstigen bereits sequenzierten (D,L)-OpDHs auf, sondern ist homolog zu Proteinen aus der Familie der Ornithin-Cyclodesaminasen (OCDs) und μ -Kristalline (Kan-no et al., 2005b). OCDs (EC 4.3.1.12) sind NAD(H)-abhängige Enzyme des Arginin- und Prolinmetabolismus, die unter Abspaltung von Ammoniak reversibel L-Ornithin zu L-Prolin umsetzen (Cunin et al., 1986; Sans et al., 1988; Goodman et al., 2004). Sie kommen nur bei wenigen Eubakterien und Archäen vor (Soto et al., 1994), konnten aber interessanterweise bei Agrobakterien nachgewiesen werden, wo sie als Ti-Plasmid-codierte Enzyme am Octopin- bzw. Nopalinkatabolismus beteiligt sind (Sans et al., 1987; Schindler et al., 1989; Zanker et al., 1994). μ -Kristalline treten als Strukturproteine in der Augenlinse von Beuteltieren auf, finden sich aber auch in der Linse von Säugern (Wistow et al., 1991; Kim et al., 1992). Zur Verwandtschaftsgruppe der OCDs und μ -Kristalline gehören zudem eine bakterielle Lysin-Cyclodesaminase, eine archaische Alanindehydrogenase sowie menschliches Thyroidhormon-Bindungsprotein (Schröder et al., 2004; Vié et al., 1997).

Ob eine Verwandtschaft zwischen den Invertebraten-OpDHs des Mollusken-Annelidentyps (Kan-no et al., 2005b) und bakteriellen OpDHs einschließlich derer aus Pflanzentumoren besteht, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Ward und Barnes (1983) wiesen durch Hybridisierungsexperimente in den Genomen des Kalmars *Loligo pealii* und der Muschel

Spisula solidissima Sequenzen nach, die offenbar homolog zu einer OCS aus *A. tumefaciens* sind. Janßen (2000) und Kan-no et al. (2005a) fanden bei späteren Sequenzvergleichen allerdings nur eine entfernte Ähnlichkeit zwischen den OpDHs höherer Invertebraten und den Opinsynthesen aus Wurzelhalsgallen bzw. der CENDH aus *Arthrobacter spec.* Die Homologiehypothese wird dadurch nur unzureichend gestützt. Die genannten Autoren vermuteten, daß sich OpDHs durch einen relativ großen Freiheitsgrad und eine hohe Evolutionsrate auszeichnen, wodurch ihre verwandtschaftlichen Beziehungen maskiert werden. Als zusätzliche Hinweise auf einen phylogenetischen Zusammenhang führten sie konservierte Sequenzabschnitte wie das GXGXXG/A-Motiv oder die Histidin-Arginin-Aspartat-Triade an, die außer bei der CENDH aus *Arthrobacter spec.* auch an den korrespondierenden Positionen anderer bakterieller Opinsynthesen und der Invertebraten-OpDHs auftreten und damit auf einen ähnlichen katalytischen Mechanismus dieser Enzyme hindeuten.

Die Vielfalt der bei marinen Invertebraten vorkommenden Pyruvatoxidoreduktasen wirft gegenüber dem einheitlichen Auftreten klassischer L-LDHs bei Vertebraten viele Fragen auf: Wie sind die OpDHs mariner Invertebraten evolutiv entstanden? Mit welchen Selektionsvorteilen ist bzw. war der Besitz alternativer Pyruvatoxidoreduktasen für die entsprechenden Invertebraten aktuell oder im Laufe ihrer Stammesgeschichte verbunden? Haben marine Invertebraten, bei denen die klassische L-LDH fehlt, ihre LDH sekundär verloren oder eine solche nie besessen? Sind bei Arten, in deren Geweben bisher keine OpDHs nachgewiesen werden konnten, die OpDHs sekundär verloren gegangen oder nie vorhanden gewesen? Wie sah die primordiale Enzymausstattung aus? Entwickelten sich zuerst die L-LDHs und nachfolgend die OpDHs oder war es umgekehrt? Wie sind die D-LDHs verschiedener Invertebraten einzuordnen? Welche Verwandtschaftsverhältnisse bestehen zwischen den Pyruvatoxidoreduktasen unterschiedlicher Art und Herkunft?

Da OpDHs sich von LDHs gerade dadurch unterscheiden, daß in die von ihnen katalysierte Reaktion neben NADH und Pyruvat eine Aminosäure eingeht, könnte der Schlüssel zur Beantwortung einiger dieser Fragen in der Evolution von Invertebraten-OpDHs unterschiedlicher Aminosäurepräferenz sowie im Verständnis der molekularen Basis ihrer Substratspezifität liegen. Letztere ist auch deshalb von besonderem Interesse, weil OpDHs sich zur Aminosäurequantifizierung in Hochdurchsatz-Screenings etwa in der Pharmaindustrie eignen (Gaede und Grieshaber, 1975; Grieshaber et al., 1978). Sofern es gelänge, die für die Aminosäurespezifität verantwortlichen Enzymreste zu identifizieren, könnte durch Protein Eng. möglicherweise die Aminosäureaffinität einzelner OpDHs verbessert werden oder es könnten OpDHs neuer, pharmazeutisch relevanter Aminosäurespezifität gewonnen werden. Außerdem

könnte die Charakterisierung der Aminosäurebindestelle dazu beitragen, den molekularen Reaktionsmechanismus der OpDHs zu erhellen, auf den sich schon lange das Augenmerk diverser Forschungsgruppen richtet (Olomucki et al., 1972; Thomé-Beau und Olomucki, 1973; Olomucki et al., 1975; Sheikh und Katiyar, 1993; Janßen, 2000; Müller, 2007; van Os, 2007).

Bisher wurden allerdings neben einigen TaDHs fast ausschließlich Mollusken-ODHs sequenziert (zusätzlich zu den auf Seite 12 aufgeführten Sequenzen auch eine ODH aus der Muschel *Pseudocardium sachalinensis*, BAD81062). Außer einer als AloDH annotierten OpDH aus *Fusitriton oregonensis* (BAE00002), deren Aminosäurespezifität nicht experimentell überprüft wurde, obwohl in den Geweben dieses Gastropoden OpDHs differierender Aminosäurespezifität coexistieren (Sato et al., 1993a; Kanno et al., 1996a), waren bis vor kurzem keine AloDHs oder StrDHs in öffentlichen Sequenzdatenbanken verfügbar. Auf sie fokussierte deshalb die vorliegende Arbeit.

In ihrem Rahmen sollten, ergänzt durch proteinbiochemische Untersuchungen, die Primärstrukturen von AloDHs und StrDHs aus dem Wattwurm, *Arenicola marina*, der Pazifischen Auster, *Crassostrea gigas*, der Europäischen Auster, *Ostrea edulis*, und dem Spritzwurm, *Sipunculus nudus*, ermittelt werden. Dazu sollten zunächst AloDHs und StrDHs aus dem Hautmuskelschlauch des Wattwurms und dem Adduktor der Pazifischen Auster gereinigt werden. Nachfolgende Peptidsequenzierungen sollten Sequenzinformationen zur Konstruktion von Primern für die partielle Amplifikation der zugehörigen Gene liefern. Mit Hilfe der gleichen Oligonukleotide sollten auch Teilstücke von Alo/StrDHs aus den beiden anderen Arten vervielfältigt werden. Alle partiellen OpDH-Sequenzen sollten anschließend mittels RACE-PCR komplettiert werden. Zuletzt sollte überprüft werden, ob die sequenzierten AloDHs und StrDHs tatsächlich funktionsfähige Enzyme der erwarteten Substratspezifität repräsentieren. Es sollte ein System zur heterologen Expression der Alo/StrDHs in *Escherichia coli* etabliert werden, das zugleich die einfache und effiziente Reinigung der Enzyme für zukünftige Kristallisationsexperimente, kinetische oder thermodynamische Analysen sowie industrielle Zwecke erlaubt.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- (1) Werden die AloDH- und die StrDH-Aktivität im Hautmuskelschlauch des Wattwurms durch separate Enzymproteine oder durch die katalytische Aktivität einer bzw. mehrerer OpDHs geringer Aminosäurespezifität determiniert?

-
- (2) Lassen sich Literaturangaben zur OpDH-Ausstattung und zum Auftreten individuell variierender OpDH-Isozyme bei den Austern *C. gigas* und *O. edulis* sowie beim Spritzwurm, *S. nudus*, bestätigen?
 - (3) Differieren die elektrophoretisch oder chromatographisch separierbaren AloDHs und StrDHs einer Art (zum Beispiel die aus Pazifischen Austern) in ihrer Aminosäuresequenz oder unterscheiden sie sich lediglich in ihrer Faltung bzw. durch posttranslationale Modifikationen?
 - (4) Sind die AloDHs und StrDHs aus *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* und *S. nudus* untereinander sowie mit den ODHs und TaDHs des Mollusken-Annelidentyps (bzw. alternativ mit der TaDH aus *Halichondria japonica*) verwandt?
 - (5) Können durch Sequenzvergleiche zwischen OpDHs unterschiedlicher Herkunft und Substratspezifität Reste identifiziert werden, die für die Aminosäurepräferenz der OpDHs verantwortlich sind?
 - (6) Welche Aminosäurespezifität wiesen ursprüngliche OpDHs auf? Sind die OpDHs unterschiedlicher Substratspezifität (AloDHs, StrDHs, ODHs und TaDHs) bei höheren Invertebraten evolutiv nur jeweils einmal oder mehrfach unabhängig entstanden?
 - (7) Lässt sich durch Verwandtschaftsanalysen, in die neben der wachsenden Zahl in öffentlichen Sequenzdatenbanken verfügbarer OpDHs auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs einbezogen werden, ein phylogenetischer Zusammenhang zwischen Invertebraten-OpDHs und bakteriellen OpDHs manifestieren?
 - (8) Welche Hypothesen zur evolutiven Herkunft von Invertebraten-OpDHs lassen sich aus den Verwandtschaftsuntersuchungen ableiten?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen höchstmöglichen Reinheitsgrad auf. Sie wurden neben Enzymen und sonstigen Reagenzien von den folgenden Firmen bezogen: Acros (Geel, Belgien), Amersham Biosciences (Freiburg), Baker (Deventer, Niederlande), BioRad (München), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Messer Griesheim (Krefeld), New England Biolabs (Frankfurt a. M.), Novagen (Darmstadt), peqlab (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Riedel de Haen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Stratagene (Heidelberg), USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA), Wiegandt (Krefeld). Primer (HPSF[®]-Qualität, siehe Anhang 8.1) synthetisierte die Firma MWG-Biotech (Ebersberg).

2.2 Opinsynthese

Da meso-Alanopin (N-(1-D-Carboxyethyl)-L-Alanin) und D-Strombin (N-Carboxymethyl-D-Alanin) nicht käuflich zu erwerben sind, wurden sie nach Abderhalden und Haase (1931) sowie Tempé (1983) stereoselektiv aus L-Alanin und L-2-Brompropionsäure bzw. D-Alanin und Bromessigsäure synthetisiert.

Die Reaktionsansätze enthielten neben 250 mmol L- bzw. D-Alanin und 250 mmol der entsprechenden Halogenacetylsäure eine äquimolare Menge Bariumhydroxid in 600 ml deionisiertem Wasser. Der Alanopinsyntheseansatz wurde unter stetigem Rühren zwei Tage bei einer Temperatur von durchschnittlich 70°C inkubiert. Dagegen lief die Strombinsynthese viereinhalb Tage bei 40°C. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschicht-chromatographisch verfolgt (DC-Alufolien mit Kieselgel 60F254 (Merck, Darmstadt), 5 cm Trennstrecke, Laufmittel bestehend aus Butanol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 1). Während sich die Alaninabnahme und die Opinbildung kolorimetrisch mit Ninhydrin nachweisen ließen, konnten die Halogenacetylsäuren mit Silbertetrafluoroborat (persönliche Mitteilungen von Karsten Knorr, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) detektiert werden. Als Nebenprodukt der Alanopinsynthese fand sich Laktat. Bei der Strombinsynthese entstand offenbar eine geringe Menge Glykolsäure (Hydroxyessigsäure). Sobald sich kein Alanin mehr nachweisen ließ, wurde die Synthese beendet.

Durch Ansäuern mit 10 N Schwefelsäure und nachfolgende Zentrifugation wurden sodann die Bariumionen in Form von Bariumsulfat abgetrennt. Der Zentrifugationsüberstand der Alanopinsynthese wurde wiederholt mit Essigsäureethylester ausgeschüttelt, um Brompropionsäurereste soweit wie möglich zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand wie jener der Strombinsynthese mit deionisiertem Wasser verdünnt und einer Kationenchromatographie über AG 50W-X8, 20-50 mesh¹, H⁺-Form (BioRad, München) unterzogen. Verwendet wurde eine mit 0,01 N HCl voräquilibrierte Säule. Sie wurde nach dem Probenauftrag mit fünf Säulenvolumen HCl gleicher Konzentration gewaschen, ehe drei Säulenvolumen deionisiertes Wasser und anschließend zwölf Säulenvolumen 0,15 M Ammoniumhydroxidlösung appliziert wurden (modifiziert nach Tempé, 1983 und Kreutzer, 1987).

Die gesammelten Fraktionen wurden zunächst mittels Dünnschichtchromatographie analysiert, Alanopin und Strombin später ionenchromatographisch², Laktat und L-Alanin optisch-enzymatisch³ quantifiziert. Da Brompropion- und Bromessigsäure ebenso wie Laktat und Glykolsäure bei pH 2 ungeladen vorliegen, banden diese Substanzen unter den gewählten Startbedingungen nicht an den Kationenaustauscher. Die positiv geladenen Opine sowie Alanin wurden dagegen auf der Säule zurückgehalten. Sie eluierten mit steigendem pH-Wert. Alanopin bzw. Strombin begannen bereits während des Spülens mit 0,01 N Salzsäure von der Säule zu waschen. Ihre Elution erreichte nach dem Umschalten auf Ammoniumhydroxidlösung bei einem pH-Wert zwischen 2 und 3 ihr Maximum. Zeitgleich setzte die Elution von Alanin gerade erst ein.

Nur Opinfraktionen ohne nachweisbare Kontamination wurden vereinigt, mit Hilfe eines Rotationsverdampfers zur Trockne eingengt und über Phosphorpentoxid getrocknet. Um die Reinheit des erhaltenen Alanopins zusätzlich zu steigern, wurde es aus wässrigem Ethanol rekristallisiert und erneut über Phosphorpentoxid getrocknet. Beim getrockneten Strombin handelte es sich übereinstimmend mit Beobachtungen von Kreutzer (1987) um eine gelbliche, sirupartige Flüssigkeit, deren Kristallisation nur sehr langsam fortschritt. Auf ein Umkristallisieren dieses Opins wurde deshalb verzichtet.

Die Endprodukte der Opinsynthesen wurden der gleichen Analytik unterzogen wie die Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie. Ihr Alanopin- und Strombingehalt wurde

¹ Einheit der Partikelgröße (Maschenweite; nach U.S.-Standard 20 - 50 mesh = 0,84 - 0,30 mm)

² nach Haas (2000), basierend auf einer von Siegmund und Grieshaber (1983) entwickelten Methode

³ Laktatmessung modifiziert nach Wahlefeld (1983) mit L-LDH aus Schweinemuskel und D-LDH aus *Lactobacillus leichmanii* (beide Roche Diagnostics, Mannheim); L-Alaninbestimmung nach Williamson (1985) mit L-AlaDH aus *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, Steinheim)

mit Hilfe von StrDH aus *C. gigas* (siehe 2.5.6.4) auch optisch-enzymatisch bestimmt (verändert nach Siegmund und Grieshaber, 1983; Storey und Storey, 1985). Zusätzlich wurden ^1H -NMR-spektroskopische Messungen (NMR-Service der WE Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Das umkristallisierte Alanopin entsprach mit einer Masse von rund 6 g nur einem Viertel des synthetisierten Alanopins, zeichnete sich jedoch durch hohe Reinheit aus. Gemäß ionenchromatographischer und enzymatischer Analyse enthielt es lediglich Spuren von L-Alanin und L- bzw. D-Laktat, die sich zusammen auf etwa 0,05 mol% beliefen. NMR-analytisch ließen sich als einzige Verunreinigung etwa 0,8 % des Enantiomers allo-Alanopin nachweisen. Dagegen bestand das Endprodukt der Strombinsynthese (9 g) nur zu etwa 70 % aus Strombin. Daneben enthielt das getrocknete und kristallisierte Material noch bis zu 30 % Wasser. NMR-spektroskopisch ließ sich zudem eine geringe Kontamination mit D-Alanin sowie Spuren anderer Substanzen erkennen.

2.3 Invertebraten

2.3.1 Herkunft und Hälterung der Tiere

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Wattwürmer (*Arenicola marina*) wurden entweder bei Zierikzee (Oosterschelde, Niederlande) aus intertidalem Habitat gegraben oder über die Firma Zeeaashandel Arenicola (Texel, Niederlande) bezogen. Alle Pazifischen Felsenaustern (*Crassostrea gigas*) kamen aus Yerseke (Oosterschelde, Niederlande). Sie wurden unmittelbar bei dort ansässigen Muschelfabriken oder in der Metro Krefeld gekauft. Von dort stammten auch einige Europäische Austern (*Ostrea edulis*). Weitere Austern dieser Art wurden bei lokalen Händlern in Roscoff und Saint-Pol-de-Léon (Bretagne, Frankreich) erworben. Spritzwürmer (*Sipunculus nudus*) schließlich wurden im Hafenbecken von Locquémeau (ebenfalls Bretagne, Frankreich) gegraben.

Sofern die Tiere nicht in Boxen mit eisgekühltem Seewasser und bei Bedarf in Sediment nach Düsseldorf transportiert wurden, kamen Styroporkartonagen mit Kühlakkus und feuchtem Zeitungspapier zum Einsatz. Die Felsenaustern wurden in handelsüblichen Gebinden befördert. Alle Tiere sind nach Ankunft im Institut für Zoophysiologie möglichst rasch verarbeitet worden. Eine kurzfristige Hälterung erfolgte gegebenenfalls in Becken mit luftbegastem künstlichem Seewasser (Wiegandt, Krefeld). Nur Wattwürmer wurden auch über längere Zeiträume in einer Seewasser-Aquarienanlage gehältert. Die Tiere unterlagen bei einer Umgebungstemperatur von 15°C einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus (12/12).

2.3.2 Präparation und Lagerung von Gewebe

Von *A. marina* und *S. nudus* wurden Hautmuskelschläuche, von den Austern die Adduktormuskeln (phasischer und tonischer Anteil) verwendet. Das Gewebe wurde präpariert, sorgfältig gereinigt, in eisgekühltem Seewasser gewaschen, abgetrocknet und entweder zum unmittelbaren Gebrauch eingewogen oder mit Hilfe einer Wollenberger-Zange (Wollenberger et al., 1960) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Bei der Präparation von Wattwürmern wurde, um den Eintrag von Proteasen aus deren Magen-Darm-Trakt zu minimieren, nach dem Abtrennen von Kopfabschnitt und Schwanz der Darm der Tiere mit einer Pinzette möglichst weitgehend aus der Leibeshöhle entfernt, bevor der Hautmuskelschlauch in Längsrichtung aufgeschnitten wurde. Die übrigen Eingeweide wurden ebenfalls mittels einer Pinzette beseitigt, die Gewebestücke mit Seewasser abgespült und verbliebene Verunreinigungen mit Papiertüchern abgewischt. Erst daran schloß das Waschen und Abtrocknen der Hautmuskelschläuche an.

2.3.3 Artbestimmung

Um sicherzustellen, daß die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Invertebraten tatsächlich den angenommenen Tierarten zuzuordnen sind, wurde neben morphologischen Merkmalen auch eine von Berschick (1997) beschriebene PCR-Methode herangezogen. DNA, die für ein artspezifisch variierendes Teilstück der kleinen ribosomalen Untereinheit codiert, wurde mittels universell geeigneter Primerpaare (Tab. 7, S. 277) amplifiziert, anschließend kloniert und sequenziert (vgl. 2.6.2 und 2.6.5 bis 2.6.10). Sequenzvergleiche mit Einträgen in öffentlichen Datenbanken (2.7.3) erlaubten sodann eine eindeutige Artidentifizierung.

2.4 Bakterienstämme

Für Standard-Transformationen (siehe 2.6.8) wurde der *E. coli* Stamm XL1 Blue (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Daneben fanden chemisch kompetente One Shot[®] TOP10 *E. coli*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) Verwendung. Als Expressionsstamm diente der *E. coli* Stamm BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt). Alle Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

Während die TOP10-Bakterien gebrauchsfertig vom Hersteller bezogen wurden, mußten elektrokompetente Zellen der beiden anderen Stämme selbst hergestellt werden. Dazu wurden zunächst Bakterien einer Glycerinstammlösung auf LB-Agar (0,5 % (w/v) Servabacter[®] Hefeextrakt, 1 % (w/v) Caseinhydrolysat (Peptone), 1 % (w/v) NaCl und 2 % (w/v) Agar Agar, pH 7,0 (außer NaCl alles Serva, Heidelberg)) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen. Mit einer Einzelkolonie wurde sodann eine 20 ml-Über-Nacht-Kultur inokuliert, von der

1 ml zum Animpfen von 500 ml LB-Medium (wie LB-Agar, jedoch ohne Agar Agar) diene. Die Inkubation der Flüssigkulturen erfolgte bei 37°C in einem Luftschüttler. Nach rund vierstündiger Anzucht wurden die Zellen der Hauptkultur durch zehnmütige Zentrifugation bei 4°C (1000 bis 2000 x g) geerntet und nachfolgend viermal mit jeweils 250 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Weil Bakterienpellets mit abnehmendem Salzgehalt immer weicher werden (Mülhardt, 2002), wurden Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeit nach dem letzten Waschen auf 15 Minuten und 3500 x g erhöht. Danach wurden die Bakterien in 1 bis 2 ml kalter 10%iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und in 30 µl-Aliquots eingefroren.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Aktivitätsbestimmungen

Pyruvatreduktase-Aktivitäten sind bei 25°C durch Verfolgen der zeitabhängigen Extinktionsabnahme bei 339 nm bestimmt worden (Warburg und Christian, 1936). Verwendet wurden die Spektralphotometer Uvikon 710 bzw. 810 (Kontron, Eching) oder ein Ultrospec 2000 (Amersham Biosciences, Freiburg). Etwaige Vorlaufaktivitäten wurden von den Meßwerten abgezogen. Zum Starten der Reaktion diene jeweils das spezifische Substrat.

In Anlehnung an Fields und Hochachka (1981) wurden Alanopin- und Strombindehydrogenase-Aktivitäten in Gegenwart von 100 mM Imidazol/HCl (pH 7,0), 0,16 mM NADH, 3 mM Pyruvat und 200 mM L-Alanin bzw. Glycin gemessen. Ansätze zur Octopindehydrogenase-Bestimmung enthielten statt Alanin oder Glycin 5,5 mM L-Arginin (vgl. Pörtner et al., 1984b). Als alternative Aminosäuresubstrate wurden β-Alanin, Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) und L-Norvalin (L-2-Aminovaleriansäure) getestet. Während β-Alanin ebenfalls in einer Endkonzentration von 200 mM eingesetzt wurde, konnten Taurin und L-Norvalin wegen ihrer schlechteren Wasserlöslichkeit nur mit einer Endkonzentration von 100 mM verwendet werden. Laktatdehydrogenase-Aktivitäten wurden in Abwesenheit von Aminosäuren unter ansonsten gleichen Testbedingungen gemessen.

Gewebe- oder Bakterienhomogenate für Spezifitätsanalysen wurden über Sephadex G25 (PD-10-Säulen, Amersham Biosciences, Freiburg) von niedermolekularen Substanzen befreit. Die Aktivitätsmessungen erfolgten in möglichst kurzem zeitlichen Abstand zur Homogenisation (siehe 2.5.3).

2.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Zur Kalibrierung diente Rindeserumalbumin. Je 800 µl Probe geeigneter Verdünnung wurden mit 200 µl Proteinbestimmungsreagenz (BioRad, München) versetzt und die Extinktion bei 595 nm nach exakt 20 min an einem Uvikon Spektralphotometer 941 (Kontron, Eching) gemessen. Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, wurde darauf geachtet, daß einerseits die absolute Extinktion Werte von 1,2 nicht überschritt und sich andererseits nach Abzug des Leerwertes Extinktionsdifferenzen größer 0,1 ergaben. Außerdem wurde ein vorheriges Einfrieren der Proben vermieden, weil hierbei Proteine irreversibel ausfallen und somit die Ergebnisse erheblich verfälscht werden können.

2.5.3 Herstellen von Gewebehomogenaten

Wie alle Schritte der verschiedenen Proteinreinigungen (2.5.6) erfolgten die Homogenisation von Gewebe und die daran anschließende Zentrifugation (1 h, 27000 x g) unter Eiskühlung bzw. bei 4°C. Verwendet wurden gemäß 2.3.2 präparierte und gegebenenfalls eingefrorene Hautmuskelschläuche bzw. Austernadduktoren. Für Enzymreinigungen wurden nur Homogenate frischen Gewebes eingesetzt.

Wegen ihrer im Vergleich zu Austernadduktoren größeren Festigkeit wurden alle Hautmuskelschläuche zunächst mit etwas eiskaltem Homogenisationsmedium (100 mM Imidazol/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0) versetzt und mit mehreren parallel geführten Scheren möglichst fein zerkleinert. Gefrorenes Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Homogenisation erfolgte im vierfachen Volumen Homogenisationsmedium mit einem Sorvall Omnimixer (Du Pont, Newtown, Connecticut, USA). Das Gerät wurde mit zwischenzeitlichen Pausen gleicher Länge dreimal 45 sec (400 ml-Becher) bzw. dreimal 30 sec (80 ml-Becher) auf Höchststufe betrieben. Bei Gewebe aus *A. marina* wurden unmittelbar vor der Homogenisation 0,2 mM PMSF (0,1 M Stammlösung in Isopropanol) und teilweise zusätzlich ein universeller Proteasen-Inhibitor-Cocktail (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim) in den Omnimixer-Becher gegeben.

Einzeltierhomogenate zur gelelektrophoretischen Analyse wurden mit Hilfe eines Ultra-Turrax TP18-10 (Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau) hergestellt. Hier wurden je 0,5 g zerkleinertes Frischgewebe in 1 ml 5 mM DTT dreimal 30 sec auf Stufe 6 homogenisiert.

2.5.4 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Rohhomogenate, die der Reinigung von OpDHs dienten, wurden einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von 0 bis 45 % und von 45 bis 75 % (*A. marina*) bzw. von 0 bis 55 % und von 55 bis 80 % (*C. gigas*, nach Fields und Hochachka, 1981) unterzogen. Nach dem ersten Fällungsschritt wurde der Zentrifugationsüberstand, nach dem zweiten das Sediment weiterverwendet (Zentrifugation jeweils 1 h, 27000 x g). Letzteres wurde in einer geringen Menge des Puffers gelöst, der bei der nachfolgenden Chromatographie den Startpuffer bildete.

2.5.5 Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren von Proteinlösungen

Während der Reinigung von OpDHs fanden verschiedene Methoden des Entsalzens, Umpufferns und Konzentrierens von Proteinlösungen Verwendung. Salze wurden unter anderem durch Dialysieren gegen das mindestens 100-fache Volumen des gewünschten Puffers entfernt (6,3 bzw. 21,5 mm Dialyseschlauch, Ausschlußgröße 12-14 kd, Medicell International, London, GB). Das dialysierte Material wurde anschließend zentrifugiert (1 h, 27000 x g), um eventuell ausgefallene Proteine abzutrennen. Alternativ wurden mit Sephadex G25 gefüllte PD-10-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) eingesetzt. Zum Einengen und Umpuffern kleinerer Probenvolumina dienten Ultrafree 15 Ultrafiltrationseinheiten mit Biomax-10-Membran (Millipore, Eschborn). Größere Mengen Proteinlösung wurden einer Druckfiltration in 50 bzw. 400 ml-Rührzellen (Amicon, Lexington, MA, USA) unterzogen. Die Zellen wurden mit YM10-Membranen geeigneten Durchmessers (Millipore, Eschborn) verwendet.

2.5.6 Chromatographie

Säulenchromatographische Proteinreinigungen wurden überwiegend mit einem computergesteuerten ÄKTAexplorer 100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt, der kombiniert mit einem Fraktionssammler Frac-900 (ebenfalls Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) in einem Chromatographiekühlschrank (Unichromat, Uni Equip, Martinsried) betrieben wurde. Daneben fand ein FPLC-System der Firma Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) mit einer Pumpe P-500 und einem UV-1-Monitor Verwendung. Die in einem Kühlraum (4°C) befindliche Anlage war mit einem Zweikanalschreiber (Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) und einem Foxy-Fraktionssammler 2200 (Colora, Ratingen) ausgestattet.

Sofern keine Fertigsäulen zum Einsatz kamen, wurden diese nach Herstellerangaben selbst gepackt. Die angegebenen Dimensionen (Durchmesser x Höhe) beziehen sich jeweils auf das Bettvolumen. Vor dem Auftragen einer Proteinlösung wurden die Säulen mit dem je-

weiligen Startpuffer äquilibriert. Die Applikation größerer Probenvolumina erfolgte mit Hilfe von Superloops (10 bzw. 50 ml, Amersham Biosciences, Freiburg), die gegebenenfalls mehrfach beladen wurden. Alle zur Chromatographie verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch über 0,45 µm Celluloseacetat (Sartorius, Göttingen) filtriert und entgast.

Während der chromatographischen Läufe wurde die Elution von Proteinen anhand der Extinktion bei 280 nm kontinuierlich verfolgt. OpDHs wurden durch Aktivitätsmessungen wie unter 2.5.1 beschrieben identifiziert.

2.5.6.1 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Gelfiltrationschromatographische Molekulargewichtsbestimmungen wurden mit einer Sephadex G100-Säule (2,6 cm x 86 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Die Säule wurde mit Dextranblau (Ausschlußvolumen), Albumin (67 kd), Ovalbumin (43 kd), Chymotrypsinogen A (25 kd) und Ribonuklease A (13,7 kd) (Amersham Biosciences, Freiburg) kalibriert. Als Laufmittel diente ein 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 2 mM EDTA, 5 mM DTT und 10 % (v/v) Glycerin. Der Puffer wurde mit einer Flußrate von 0,2 ml/min aufwärts gepumpt. Die Fraktionsgröße betrug 5 ml, das Gesamtelutionsvolumen bis zu 600 ml. Aufgetragen wurden jeweils 2 ml Muskelhomogenat nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Dialyse (vgl. 2.5.4. und 2.5.5).

2.5.6.2 Reinigung von AloDHs aus *A. marina*

AloDHs aus *A. marina* wurden ausgehend von bis zu 200 g Gewebe gereinigt. Das entspricht den Hautmuskelschläuchen von etwa 300 Tieren. Das Material wurde zerkleinert und homogenisiert (2.5.3), mit Ammoniumsulfat gefällt (2.5.4) und in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 5 mM DTT und 0,8 M Ammoniumsulfat gelöst. Dann wurde 5 min bei 6000 x g zentrifugiert und der Überstand unmittelbar auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Phenyl Sepharose 6 Fast Flow-Säule (niedriger Substitutionsgrad, 2,6 cm x 15 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen. Der erste chromatographische Schritt, eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), konnte somit noch am Präparationstag der Würmer gestartet werden.

Der Probenauftrag erfolgte mit einer Flußrate von 1 ml/min. Sie wurde während des nachfolgenden Waschens mit Startpuffer (400 ml, Puffer wie oben) auf 4 ml/min erhöht. An das Waschen schloß ein Stufengradient auf 10 % Isopropanol mit 5 mM DTT an. 400 ml dieser Lösung dienten zur Elution gebundener OpDHs und sonstiger Proteine. Es wurden 10 ml-Fractionen gesammelt. Fractionen, die mehr als 10 % der maximalen AloDH-Aktivität ent-

hielten, wurden vereinigt und für die nachfolgende Anionenaustauschchromatographie zweifach mit 20 mM Imidazol/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT (pH 7,0) verdünnt.

Um die Kapazität der für die Ionenchromatographie eingesetzten Mono Q HR10/10-Säule (1 cm x 10 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) nicht zu überschreiten, wurde das aus der HIC resultierende Material in zwei Portionen appliziert. Als Startpuffer diente obiger Imidazolpuffer. Mit 40 ml davon wurde nach dem Auftragen der Probe die Säule gewaschen, bevor gebundene Proteine mit einem linearen 160 ml-Gradienten von 0 auf 400 mM NaCl in Startpuffer eluiert wurden. Abschließend wurde die Säule mit 80 ml Hochsalzpuffer (Startpuffer mit 1 M NaCl) gespült. Während des gesamten chromatographischen Laufs wurde die Flußrate bei konstant 1 ml/min gehalten. Es wurden 5 ml-Fraktionen gesammelt. Die Alo/StrDH-Aktivität konzentrierte sich auf zwei Peaks. Die zugehörigen Fraktionen maximaler Aktivität aus beiden chromatographischen Läufen wurden vereinigt (Peak 1 und Peak 2 getrennt) und jeweils einer nachfolgenden Gelfiltration über Sephadex G100 unterzogen.

Abgesehen davon, daß hier größere Probenvolumina appliziert wurden, entsprachen die Laufparameter der Gelfiltrationschromatographien den unter 2.5.6.1 beschriebenen. Die erhaltenen Fraktionen maximaler OpDH-Aktivität wurden wiederum vereinigt und mittels Ultrafiltrationseinheiten für die Zentrifuge (2.5.5) auf Endvolumina unter 2 ml konzentriert. Versetzt mit 50 % Glycerin und zusätzlichen 5 mM DTT konnten die gereinigten Enzyme über Wochen ohne größere Aktivitätsverluste bei -20°C gelagert werden.

2.5.6.3 Partielle Reinigung möglicher StrDHs aus *A. marina*

Weil die hydrophobe Interaktionschromatographie des unter 2.5.6.2 beschriebenen Reinigungsprotokolls für OpDHs aus *A. marina* mit extremen StrDH-Aktivitätsverlusten einherging, die jene der AloDH-Aktivität deutlich überschritten, wurde zusätzlich eine alternative Reinigungsmethode mit einem Anionenaustauscher im ersten chromatographischen Schritt entwickelt. Das Sediment nach zweiter Ammoniumsulfatfällung wurde hierbei in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5 mit 5 mM DTT (Startpuffer FG-DEAE) aufgenommen, über Nacht gegen diesen Puffers dialysiert und zentrifugiert (2.5.5). Anschließend wurde das Material mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min auf eine mit Fractogel EMD DEAE (M) (Merck, Darmstadt) gefüllte Säule (2,6 cm x 14 cm) aufgetragen. Nach der Probenapplikation wurde die Flußrate auf 4 ml/min gesteigert und die Säule mit 160 ml Startpuffer gespült. Darauf folgte bei konstantem pH und DTT-Gehalt ein 800 ml langer linearer Gradient von 20 auf 75 mM Phosphat. Eine Phosphatkonzentration von 75 mM wurde auch während des Nachwaschens (160 ml) beibehalten. Es wurden 5 ml-Fraktionen aufgefangen.

Neben mehreren ALoDH-Maxima geringer StrDH-Aktivität im Verlauf des Gradienten fand sich im Durchfluß des chromatographischen Laufs viel StrDH-Aktivität. Die Fraktionen maximaler Aktivität aus dem Bereich der ALoDH-Peaks und des Durchflusses wurden jeweils vereinigt. Erstere wurden konzentriert (Ultrafree 15, siehe 2.5.5) und mit Glycerin eingefroren, letztere dialysiert, zentrifugiert (2.5.5) und bei höherem pH-Wert auf derselben Säule rechromatographiert.

Bei der zweiten FG-DEAE-Chromatographie wurde ein Puffersystem aus 20 mM Tris/HCl (pH 8,5) mit 5 mM DTT und bis zu 400 mM NaCl verwendet. Proteine, die in Abwesenheit von NaCl an das Säulenmaterial banden, wurden mit einem linearen Salzgradienten eluiert. Abgesehen davon, daß die Probe diesmal mit nur 0,5 ml/min aufgetragen und auch nachfolgend nur mit 2 ml/min gepumpt wurde, entsprachen alle Parameter denen des ersten FG-DEAE-Laufs. Die Fraktionen maximaler ALoDH- bzw. StrDH-Aktivität wurden vereinigt und mit Ultrafree 15 auf ein Volumen von weniger als 1 ml eingeengt (2.5.5).

2.5.6.4 Reinigung von ALo/StrDHs aus *C. gigas*

ALo/StrDHs aus *C. gigas* wurden in Anlehnung an Fields und Hochachka (1981) gereinigt. Als Ausgangsmaterial dienten die Adduktoren (ca. 120 g Frischgewicht) von rund 100 Austern. Sie wurden homogenisiert (2.5.3), mit Ammoniumsulfat gefällt (2.5.4) und zwecks nachfolgender Gelfiltrationschromatographie gegen Puffer wie unter 2.5.6.1, jedoch mit 14 mM 2-Mercaptoethanol statt DTT, dialysiert (2.5.5).

Für die Gelfiltration wurde eine präparative Sephadex G100-Säule (7,5 cm x 138 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Der Probenauftrag erfolgte mit einer Flußrate von 10 ml/h, die später auf 60 ml/h erhöht wurde. Von den gesammelten 20 ml-Fractionen wurden die mit mehr als 10 % der maximalen ALoDH- und StrDH-Aktivität vereinigt, in einer 400 ml-Amiconzelle konzentriert und in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5 mit 5 mM DTT überführt (2.5.5).

Die eingeengten und umgepufferten Gelfiltrationsfraktionen wurden mit 0,3 ml/min auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sepharcel-Säule (2,6 cm x 25 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen. Daran schloß unter gleichzeitiger Steigerung der Flußrate auf 0,5 ml/min ein 850 ml-Gradient von 20 auf 75 mM Phosphat an. Zuletzt wurden 100 ml Elutionspuffer (75 mM Kaliumphosphat pH 7,5 mit 5 mM DTT) über die Säule gepumpt. ALoDH- und StrDH-Messungen ergaben drei Aktivitätsmaxima. Die zugehörigen 5 ml-Fractionen maximaler Aktivität wurden jeweils vereinigt, mit Ultrafiltrationseinheiten

für die Zentrifuge konzentriert und in 2 mM Kaliumphosphat pH 6,8 mit 5 mM DTT umgepuffert (2.5.5).

Dieses bildete den Startpuffer einer anschließenden Chromatographie über keramisches Hydroxyapatit (CHT[®], Typ 1, BioRad, München). Der Elutionspuffer enthielt 400 mM Kaliumphosphat pH 6,8 und ebenfalls 5 mM DTT. Entsprechend der OpDH-Maxima aus der Anionenaustauschchromatographie wurden drei Läufe durchgeführt. Auf die verwendete CHT-Säule (1,6 cm x 8 cm) wurden jeweils 2 ml konzentrierte und umgepufferte Probe nach DEAE aufgetragen. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min, wurde aber nach der Probenapplikation verdoppelt. Nach Spülen mit 40 ml Startpuffer wurden die Alo/StrDHs mit einem linearen Gradienten (200 ml) auf 20 mM Phosphat von der Säule gewaschen. Es folgte ein Stufengradient auf 400 mM Kaliumphosphat, bevor abschließend 40 ml Elutionspuffer appliziert wurden. Die Fraktionen (je 2 ml) maximaler OpDH-Aktivität aus den verschiedenen Läufen wurden jeweils vereinigt, mit Ultrafree 15 konzentriert (2.5.5) und mit 50 % Glycerin bei -20°C eingefroren.

2.5.6.5 Reinigung rekombinanter OpDHs

Rekombinante OpDHs mit C-terminalem Hexa-Histidin-Tag wurden aus 1 l-Kulturen geeigneter BL21(DE3)-Stämme isoliert, die wie unter 2.6.11 beschrieben angezogen, induziert, geerntet und aufgeschlossen wurden.

Ihre Reinigung erfolgte im wesentlichen durch Affinitätschromatographie via Ni-NTA Superflow (1 cm x 10,5 cm, Qiagen, Hilden). Das ultrazentrifugierte Bakterienlysate wurde auf eine mit Lysepuffer (50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, ggf. 20 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0) äquilibrierte Ni-NTA-Säule geladen (0,2 ml/min). Mit dem gleichen Puffer wurde dann solange gewaschen, bis inklusive Probe ein Applikationsvolumen von 100 ml erreicht war. Nachfolgend wurde die Imidazolkonzentration des Laufpuffers für weitere 100 ml auf 20 mM Imidazol erhöht, bevor sich ein 100 ml umfassender linearer Gradient auf 250 mM Imidazol anschloß. Zuletzt wurde mit 50 ml Elutionspuffer (50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, ggf. 20 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0) nachgewaschen. Außer während des Probenauftrags lag die Fließgeschwindigkeit konstant bei 0,5 ml/min. Es wurden 4 ml Fraktionen gesammelt. In wenigen dieser Fraktionen fand sich fast die gesamte OpDH-Aktivität. Sie wurden vereinigt und mit einer 50 ml-Druckfiltrationszelle (2.5.5) konzentriert sowie in Gelfiltrationspuffer wie unter 2.5.6.1 überführt.

Die Proteinlösung wurde dann über Sephadex G100 (2,6 cm x 86 cm) weiter gereinigt. Alle Laufparameter stimmten mit denen der Gelfiltrationsläufe zur Molekulargewichtsbestim-

mung (2.5.6.1) überein. Die Fraktionen maximaler OpDH-Aktivität wurden wiederum vereint, mit Ultrafree 15 (2.5.5) auf ein Endvolumen kleiner 2 ml konzentriert und mit 50 % Glycerin eingefroren.

2.5.7 Elektrophoretische Verfahren

Elektrophoresen einschließlich isoelektrischer Fokussierungen wurden mit Hilfe eines Multiphor II Horizontalelektrophoresesystems der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Als Spannungsquelle dienten ein Power Pac 3000 (BioRad, München) oder ein Spannungsgerät ECPS 3000/150 (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Während bei isoelektrischen Fokussierungen Fertiggele zum Einsatz kamen, wurden Gele für native und denaturierende Disk-Elektrophoresen unter Anwendung der Kassettentechnik nach Görg et al. (1978) selbst hergestellt. Die Polyacrylamidgele (120 x 250 x 0,5 mm) mit 4%igem Sammel- und 12%igem Trenngel sowie einheitlich 3 % Quervernetzungsgrad wurden auf GelBond[®] PAGfilm (124 x 258 mm, Amersham Biosciences, Freiburg) polymerisiert. Während der elektrophoretischen Trennungen wurden die Gele mit rezirkuliertem Wasser gekühlt, das mit einem Thermostat auf 10°C (native PAGE und IEF) bzw. 15°C (SDS-PAGE) temperiert wurde. Alle untersuchten Proben enthielten 50 % Glycerin und wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.7.1 Native PAGE

Native Disk-Elektrophoresen nach Ornstein und Davis (beide 1964) wurden im alkalischen Gel-Puffer-System von Davis durchgeführt. Dabei wurden Proben geeigneter Verdünnung mit jeweils $\frac{1}{5}$ Volumen Auftragspuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau) und 2 μ l 2,6 M DTT je 50 μ l Probe versetzt. Das Auftragsvolumen betrug 10 μ l. Während des Konzentrierens im Sammelgel wurden konstant 20 mA appliziert, zugleich Spannung und Leistung auf 600 V bzw. 30 W begrenzt. Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 50 mA erhöht. Beendet wurden die Elektrophoresen etwa 15 min nachdem die Bromphenolblaufront den der Probenauftragsstelle gegenüberliegenden Elektrodendocht (Novablot Elektrodenpapier, 200 x 250 mm, Amersham Biosciences, Freiburg) passiert hatte.

Proteine wurden durch Coomassiefärbung modifiziert nach Westermeier (1990) detektiert. Dazu wurden die Gele zunächst 30 min in 20 % Trichloressigsäure fixiert, dann eine Stunde lang mit 0,02 % Coomassie-Brilliantblau R-350 in 10 % Essigsäure (vortemperiert auf

50°C) gefärbt und schließlich so lange mit 10 % Essigsäure gewaschen, bis ein klarer Hintergrund erreicht war.

Der Nachweis von OpDHs erfolgte durch spezifische Aktivitätsfärbung nach Latner und Skillen (1968). Unfixierte Gele wurden kurz in 200 mM Tris/HCl pH 8,1 gespült und dann 30 min bis mehrere Stunden (zum Teil auch über Nacht) im Dunkeln mit Reaktionslösung inkubiert. Diese enthielt 50 mM Tris/HCl (pH 8,1), 1,5 mM NAD⁺, 0,16 mM Phenazinmetasulfat, 1 mM Nitroblautetrazoliumchlorid und 20 mM (selten 10, 30 oder 50 mM) meso-Alanin oder D-Strombin bzw. 1,7 mM D-Octopin. Lösungen für Kontrollfärbungen umfaßten kein Opin. Nach dem Entwickeln der Aktivitätsbanden wurden die Gele 10 bis 15 min in 10 % Essigsäure fixiert.

AloDHs aus *A. marina* ließen sich nur schlecht detektieren, da sie offenbar während der elektrophoretischen Läufe oxidiert und damit zumindest partiell deaktiviert wurden. Deshalb wurden einige native Elektrophoresen unter N₂-Atmosphäre durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Laufpuffer mit Stickstoff (Qualität 4.0, Messer Griesheim, Krefeld) begast, dann die gesamte Multiphor-Elektrophorese-Einheit einschließlich des aufgelegten Gels mit Elektrodendochten in einem Sekuroka[®] Glove Bag (94 x 94 x 64 cm, PE, Roth, Karlsruhe) platziert. Der Sack wurde zusätzlich mit den auf Eis befindlichen Proben, einer Pipette und zugehörigen Spitzen beschickt, verschlossen und mit wassergesättigtem Stickstoff begast. Erst nachdem im Inneren ein Sauerstoffgehalt von weniger als 0,8 % (O₂-Handmeßgerät GMH 3691, Greisinger, Regenstauf) erreicht war, wurden mit Hilfe der eingearbeiteten Handschuhe die Proben aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Mittels eines kontinuierlichen Stickstoffstroms durch den nicht ganz hermetisch schließenden Beutel konnte die Sauerstoffkonzentration während der gesamten Elektrophoresedauer zwischen 0,2 und 0,8 % gehalten werden.

2.5.7.2 SDS-PAGE

Ergänzend sind Proteine unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-Disk-Elektrophorese nach Laemmli (1970) getrennt worden. Dabei wurde eine reduzierende Probenvorbereitung ohne oder mit Alkylierung gewählt. Im ersten Fall wurden die Proben mit dem vierfachen Volumen SDS-Auftragspuffer (wie nativer Auftragspuffer unter 2.5.7.1, jedoch mit zusätzlich 2 % SDS) 3 min bei 80°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 1 µl 2,6 M DTT je 50 µl Lösung versetzt (nach Westermeier, 1990). Im zweiten Fall wurden die Proben mit dem nur 2,5fachen Volumen eines SDS-Auftragspuffers für Alkylierungen (0,4 M Tris/HCl pH 8,0; 1 % SDS; 0,08 mM EDTA; 0,01 % Bromphenolblau; 26 mM DTT) erhitzt. Nach dem

Abkühlen wurde neben DTT (wie zuvor) Iodacetamid ad 4,5 % (w/v) zugegeben und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert (Lane, 1978 und Westermeier, 1990).

Aufgetragen wurden jeweils 10 µl Probe. Als Marker dienten Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14,4 und 116,0 kd (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 50 mA, die jedoch zeitabhängig abnahm, weil mit der Wanderung der Proteine im Gel die auf 600 V begrenzte Spannung limitierend wurde.

SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese wie native Gele mit Trichloressigsäure fixiert und einer Coomassiefärbung unterzogen. Allerdings wurde die Färbedauer auf bis zu zwei Stunden erhöht. Bei Bedarf schloß eine Silberfärbung mit dem SilverXpress™ Silver Staining Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) an. Wegen des DTT-Gehalts der Proben erfolgte die Färbung wie vom Hersteller empfohlen nach dem Tris-Tricin-Protokoll.

Bei Gelen, die nachfolgend für Proteinsequenzierungen nach Edman (2.5.7.4 und 2.5.8.1) geblottet oder aus denen Proteinbanden für massenspektrometrische Untersuchungen (2.5.8.2 und 2.5.9) ausgeschnitten werden sollten, wurden spezielle Vorsichtsmaßnahmen ergriffen (Speicher, 1989), um zu vermeiden, daß die OpDHs N-terminal blockiert oder fragmentiert wurden. Die Proben wurden nicht auf 80°C erhitzt, sondern 15 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von DTT sowie gegebenenfalls Iodacetamid über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Außerdem wurden die Gele bereits am Vortag der Elektrophorese gegossen, so daß sie komplett auspolymerisieren konnten. Dem Kathodenpuffer wurde teilweise 0,1 mM Thioglycolat zugefügt. Außerdem wurde auf das Fixieren der Gele mit Trichloressigsäure verzichtet.

2.5.7.3 Isoelektrische Fokussierung

Isoelektrische Fokussierungen (IEF) wurden in Trägerampholyt-Gradienten und in immobilisierten pH-Gradienten (IPG) durchgeführt. In beiden Fällen kamen getrocknete Polyacrylamid-Fertiggele (CleanGel IEF bzw. Immobiline® Dry Plate pH 4-7, beide Amersham Biosciences, Freiburg) zum Einsatz. CleanGel-IEF-Gele wurden in einer Lösung aus 0,76 % (w/v) Ampholinen pH 3,5-9,5 (Amersham Biosciences, Freiburg), 1,99 % (w/v) Pharmalyten pH 3-10 (Pharmacia, Freiburg), 10 % (w/v) Sorbitol und 1 mM DTT rehydratisiert. Zum Quellen von Immobiline® Dry Plates dienten 1 % (w/v) Ampholine pH 3,5-9,5 mit 1 mM DTT.

Der Abstand zwischen Anode und Kathode betrug 10,5 cm. Nur im Fall der IPG-IEF wurden Elektrodenstreifen (mit Wasser angefeuchtet) genutzt. Um CO₂ zu binden und dadurch einem Kathodendrift entgegenzuwirken, wurde bei der Trägerampholyt-IEF Natronlauge in die Pufferreservoirs der Elektrophoreseapparatur eingefüllt. Je 10 µl Probe geeigneter

Verdünnung wurden mit Filterpapierplättchen (0,25 x 1 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) in 1 cm Kathodenabstand appliziert. Nur für den zur Kalibrierung verwendeten Standard (Broad Range pI, pH 3-10, Amersham Biosciences, Freiburg) wurde wie vom Hersteller empfohlen eine anodische Auftragsposition (7 cm Kathodenabstand) gewählt. Zwischen den einzelnen Trennsuren wurden feine Schnitte eingefügt (CleanGel-IEF) oder nach Westermeyer (1990) ganze Gelstreifen herausgeschnitten (IPG-IEF), um eine laterale Bandenverbreiterung zu vermeiden.

CleanGel-Fokussierungen erfolgten nach Herstellerangaben (20 min Vorfokussierung bei 700 V, 20 min Probenauftrag bei 500 V, 90 min Fokussierung bei 2000 V und 10 min Bandenschärfen bei 2500 V; Stromstärke und Leistung dabei jeweils begrenzt auf Werte zwischen 0,3 und 0,6 mA/cm Gelbreite bzw. zwischen 0,3 und 0,7 W/cm Gelbreite). Immobiline[®] Dry Plates wurden bis zu fünf Stunden einer Spannung von 3000 V ausgesetzt (Stromstärke und Leistung maximal 0,2 mA/cm Gelbreite bzw. 0,6 W/cm Gelbreite).

Nach der Fokussierung wurden OpDHs durch spezifische Aktivitätsfärbung wie unter 2.5.7.1 detektiert bzw. Proteine mit 20 % Trichloressigsäure fixiert und mit 0,1 % Coomassie-Brilliantblau R-350 in 25 % Ethanol, 8 % Essigsäure nachgewiesen. Fertig gefärbte Gele wurden in 10 % (v/v) Glycerin (bei IPG-Gelen 10 % (v/v) Glycerin in einer Lösung aus 25 % Ethanol und 8 % Essigsäure) konserviert, unter Cellophanfolie (Amersham Biosciences, Freiburg) getrocknet und zur Auswertung auf Pappe aufgezogen.

2.5.7.4 Western-Blots

Zwecks anschließender Sequenzierung nach Edman (2.5.8.1) sowie zum immunologischen Nachweis rekombinanter Enzyme mit Histidin-Tag (siehe 2.6.11) wurden Proteine auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen (Sequi-Blot PVDF-Membranen zur Proteinsequenzierung, BioRad, München bzw. Immobilon-P Transfermembranen, Millipore, Eschborn) übertragen. Die Proteine wurden zunächst einer SDS-PAGE wie unter 2.5.7.2 unterzogen. Dann wurde ein geeigneter Gelausschnitt mit Hilfe eines Schneidegeräts nach Westermeyer (1990, Zentralwerkstatt Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) von der Trägerfolie getrennt und wie die Blotmembran in Transferpuffer (bei nachfolgender Proteinsequenzierung 50 mM Tris/Borat mit 0,025 % SDS, sonst 25 mM Tris, 192 mM Glycin mit oder ohne 20 % (v/v) Methanol) äquilibriert. Der elektrische Transfer (100 min, 100 V, Power Pac 300, BioRad, München) erfolgte bei 4°C in einer Mini Trans-Blot-Zelle (BioRad, München).

Sequi-Blot-Membranen für Proteinsequenzierungen wurden anschließend gemäß Herstellerangaben mit 0,025 % Coomassie-Brilliantblau R-250 in 40 % Methanol gefärbt und

mit 50 % Methanol nachbehandelt. Auf Essigsäure wurde verzichtet, um eine N-terminale Blockierung von Proteinen zu vermeiden (Speicher, 1989, vgl. auch die unter 2.5.7.2 beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen). Die gefärbten Membranen wurden in deionisiertem Wasser gespült und getrocknet. Schließlich wurden die Zielbanden ausgeschnitten, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Der Nachweis rekombinanter OpDHs mit Histidin-Tag erfolgte durch Immunodetektion mit einem monoklonalen Maus-IgG1-Penta-His-Antikörper (Qiagen, Hilden). Er wurde zusammen mit einem an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundäntikörper (Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Antikörper aus der Ziege, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingesetzt (Färbeprotokoll modifiziert nach QIAexpress[®] Detection and Assay Handbook, Qiagen, Hilden). Als Molekulargewichtsstandard diente eine 6xHis-Proteinleiter (Qiagen, Hilden).

Nach dem elektrischen Transfer wurde die Blotmembran zunächst zweimal zehn Minuten in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 150 mM NaCl) gespült, danach eine Stunde mit Blockierungslösung (3 % BSA in TBS) inkubiert. Es folgten zweimal zehn Minuten Waschen in TBS-Tween/Triton (20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20 und 0,2 % (v/v) Triton X-100) und nochmals zehnminütiges Spülen in TBS, bevor die Membran über Nacht mit dem Erstantikörper (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Penta-His-Antikörper in Blockierungslösung) hybridisiert wurde. Während alle anderen Schritte bei Raumtemperatur abliefen, erfolgte die Hybridisierung bei 4°C . Nach weiterem Waschen (zweimal zehn Minuten in TBS-Tween/Triton und einmal zehn Minuten in TBS) schloß eine einstündige Inkubation mit Zweitantikörperlösung (1 : 10000 mit Blockierungslösung verdünnter Anti-Maus-IgG-AP Antikörper) an. Danach wurde viermal zehn Minuten mit TBS-Tween/Triton gespült und der Blot schließlich im Dunkeln mit Färbelösung (100 mM Tris/HCl pH 9,5 mit 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0,09 mg/ml NBT und 0,07 mg/ml BCIP) entwickelt. Die Entwicklungszeit betrug 50 bis 60 min. Zuletzt wurde zweimal mit deionisiertem Wasser gespült.

2.5.8 Proteinsequenzierung

2.5.8.1 N-terminale Proteinsequenzierung nach Edman

N-terminale Proteinsequenzierungen nach Edman (1956, 1956a, 1956b und 1967) wurden von Frau Dipl.-Ing. B. Schedding am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie (AG Proteinanalytik, Prof. Dr. G. Mersmann) des Universitätsklinikums Münster durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einem Procise-Sequencer 492-01 (Applied Biosystems, Darmstadt). Sequenziert wurden einerseits AloDHs des Wattwurms, die gemäß dem unter

2.5.6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt wurden, andererseits durch Gelfiltration und Chromatographie über DEAE-Sephacel getrennte Alo/StrDHs aus *C. gigas* (vgl. 2.5.6.4). Die gereinigten OpDHs wurden zunächst mit Iodacetamid alkyliert, einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und auf PVDF-Membranen geblottet (2.5.7.2 und 2.5.7.4). Alle Zielbanden waren auf dem Coomassie-gefärbten Blot deutlich erkennbar. Um die Proteinmenge dennoch zu erhöhen, wurden bis zu vier Banden gleicher Art ausgeschnitten und gemeinsam zur Direktsequenzierung (Matsudaira, 1987) eingesetzt. Während aller Arbeitsschritte wurden Vorsichtsmaßnahmen ergriffen, um eine artifizielle Blockierung der N-terminalen Aminosäure zu vermeiden (siehe 2.5.7.2 und 2.5.7.4).

2.5.8.2 Peptidsequenzierung durch Tandem-Massenspektrometrie

Zusätzlich sind tryptische Spaltpeptide von AloDHs bzw. Alo/StrDHs aus *A. marina* und *C. gigas* mittels ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie sequenziert worden. Die Isoenzyme wurden gemäß 2.5.6.2 und 2.5.6.4 (im Fall der Auster zum Teil unter Verzicht auf die abschließende CHT-Chromatographie) gereinigt, alkyliert und SDS-elektrophoretisch getrennt, dann aus Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten und einem tryptischen In-Gel-Verdau (modifiziert nach Jensen et al., 1998) unterzogen.

Um die zerkleinerten Gelstücke zu entfärben, wurden sie zunächst zweimal 15 min mit 50 % Acetonitril sowie nachfolgend je 5 min mit Acetonitril (100 %) bzw. 100 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen. Dann wurden sie 15 min mit 50 mM Bicarbonat in 50 % Acetonitril behandelt und in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Zu den trockenen Gelstücken wurde portionsweise 10 ng/µl Trypsin (Promega, Mannheim) in 50 mM Bicarbonat hinzugegeben, bis sie vollständig gequollen waren. Überschüssige Trypsinlösung wurde entfernt. Anschließend wurden die Gelstücke mit 25 mM Bicarbonat bedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde nach zweiminütiger Peptidextraktion im Ultraschallbad die Flüssigkeit gesammelt und den verbliebenen Gelstücken 25 mM Bicarbonat zugesetzt. Sie wurden 20 min darin inkubiert, dann wurde im Verhältnis 1 : 1 Acetonitril hinzugefügt, 15 min geschüttelt und eine weitere Ultraschallbehandlung angeschlossen. Die Flüssigkeit wurde erneut abgenommen und mit der vorher gewonnenen vereinigt. Danach wurde die Gelextraktion durch zwei 15-minütige Inkubationen in 2,5 % Ameisensäure, 50 % Acetonitril fortgesetzt. Die dabei erhaltenen Überstände wurden mit der zuvor abgenommenen Flüssigkeit bei 60°C zur Trockne evaporiert (Vakuumzentrifuge wie oben). Das erhaltene Material wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Für die massenspektroskopischen Messungen wurden die Proben mit C18-ZipTips (Millipore, Eschborn) entsalzt. Die Peptide wurde von Dr. Markus Piotrowski (Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum) mit einem Q-TOF2 (Micromass, Manchester, UK) bzw. von Dr. Sabine Metzger (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mit einem QSTAR-XL-Hybridmassenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert.

2.5.9 MALDI-Massenspektrometrie

Das exakte Molekulargewicht von AloDHs bzw. Alo/StrDHs, die gemäß 2.5.6.2 und 2.5.6.4 aus *A. marina* und *C. gigas* gereinigt wurden, ist mittels Matrix-unterstützter Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) bestimmt worden. Die Messungen wurden von Dr. Steffen Schaffer (AG Biochemie, Prof. Dr. M. Bott, Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich) an einer Voyager-DETM STR Biospectrometry Arbeitsstation mit Stickstofflaser (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Das Gerät wurde im linearen Modus betrieben. Als Matrix dienten 10 µg/µl Sinapinsäure in 50 % Acetonitril und 0,05 % Trifluoressigsäure. Aldolase (ca. 39212 d) und Albumin (ca. 66430 d) (wie die Matrix aus dem Proteomass Protein MALDI-MS Kalibrierungskit, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden als interne Standards eingesetzt. Die Proben wurden zunächst mit 2,5%iger Trifluoressigsäure angesäuert, dann mittels C18-ZipTips (Millipore, Eschborn) von Glycerin, DTT und Salzen befreit. Ihre Elution von den ZipTips erfolgte mit gesättigter Sinapinsäurelösung in 75 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure. Die erhaltenen Eluate wurde jeweils im Verhältnis 1 : 1 : 4 mit Standards und Matrix versetzt, auf dem Probenhalter kokristallisiert und zur Messung eingesetzt (25000 V Beschleunigungsspannung, 93 % Gitterspannung, 750 nsec Extraktionsverzögerung).

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Sterilisation von Geräten und Lösungen

Für molekularbiologische Arbeiten verwendete Utensilien, Lösungen und Medien wurden soweit erforderlich autoklaviert (20 min, 121°C, 1 bar Überdruck) oder über 0,22 µm Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert. Gerätschaften für Arbeiten mit RNA wurden mit 0,65%iger Natriumhypochloridlösung (und nachfolgend deionisiertem Wasser) gespült, autoklaviert und falls möglich über Nacht bei 180°C hitzesterilisiert. Elektrophoresewannen, Gelschlitten und Kämmen, die bei RNA-Elektrophoresen zum Einsatz kamen, wurden zuvor in 3 % Wasserstoffperoxid inkubiert.

2.6.2 Isolierung von DNA

Gesamtzell-DNA wurde mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Invertebrate DNA Kit (peqlab, Erlangen) aus Austernadduktoren oder Hautmuskelschläuchen von *A. marina* bzw. *S. nudus* isoliert. Eingesetzt wurden jeweils 30 mg unter flüssigem Stickstoff gemörstertes Gewebe. Die Lyse in Gegenwart von Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und Proteinase K erfolgte über Nacht bei 37°C. Da die Bindekapazität der Silika-Zentrifugensäulen aus dem Reagensatz (30 µg DNA) bei weitem nicht ausgeschöpft wurde, sind teilweise zwei zunächst separat behandelte Einzelansätze auf einer Säule vereinigt worden. Dadurch ließ sich die Konzentration der erhaltenen DNA steigern.

2.6.3 Isolierung von RNA

RNA wurde einerseits gemäß einem nach Chomczynski und Sacchi (1987) modifizierten Protokoll, andererseits mit Hilfe verschiedener kommerzieller Reagensätze extrahiert. Da mit ihnen maximal 30 bis 50 mg Gewebe aufgearbeitet werden können, lieferten die Fertigkits jedoch bloß geringe Mengen RNA. Sie wurden deshalb häufig nur zum Nachreinigen von nach Chomczynski und Sacchi isolierter RNA eingesetzt.

2.6.3.1 Saure GTC-Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur sauren Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987) wurden 1 bis 2 g gefrorenes Gewebe (siehe 2.3.2) sorgfältig unter flüssigem Stickstoff gemörstert und mit Hilfe eines Ultra-Turrax TP18-10 (Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau) dreimal 30 Sekunden in GTC-Puffer (4 M Guanidinthiocyanat; 25 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,5 % N-Laurylsarcosin; 0,1 M 2-Mercaptoethanol) homogenisiert. Das Homogenat wurde, um Gewebefragmente und Glykogen abzutrennen, bei 4°C eine Stunde mit 80000 x g zentrifugiert (Janßen, 2000). Danach wurde der Zentrifugationsüberstand sukzessive mit $\frac{1}{10}$ Volumen 2 M Natriumacetat pH 5,2, einem Volumen Roti[®]-Aqua-Phenol pH 4,5 bis 5,0 (Roth, Karlsruhe) und $\frac{1}{5}$ Volumen Chloroform versetzt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (10 min, 25000 x g, 4°C). Die wäßrige Phase des dabei erhaltenen Überstands wurde nach Janßen (2000) einer weiteren Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Zentrifugation unterzogen, dann die RNA über Nacht bei -20°C mit Isopropanol gefällt. Das durch Zentrifugation (15 min, 14000 x g, 4°C) erhaltene RNA-Pellet wurde schließlich mit 70 % Ethanol gewaschen, vollständig von Ethanol befreit, zwei Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 600 µl RNase-freiem Wasser (65°C) aufgenommen.

2.6.3.2 RNA-Isolierung mit Reagenziensätzen

Kleinere Mengen hochreiner RNA sind mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Invertebrate RNA Kit (peqlab, Erlangen) oder mittels des RNeasy[®] Fibrous Tissue Kit (Qiagen, Hilden) aus den Geweben der untersuchten Arten isoliert worden. In beiden Fällen wurden gemäß Herstellerangaben nicht mehr als 30 bis 50 mg unter flüssigem Stickstoff gemörsertes Gewebe je Einzelansatz verwendet. Um dennoch RNA etwas höherer Endkonzentration zu erhalten, wurden wie bei den DNA-Präparationen (2.6.2) abweichend vom regulären Protokoll jeweils zwei separat extrahierte Ansätze auf einer Silika-Zentrifugensäule vereinigt, deren Kapazität ansonsten weitgehend ungenutzt geblieben wäre. Zur Elution dienten 50 µl (E.Z.N.A.-Kit) bzw. 30 µl (RNeasy-Kit) RNase-freies Wasser je Säule.

Obwohl der E.Z.N.A.[®] Invertebrate RNA Kit laut Hersteller speziell zur RNA-Extraktion aus Invertebratengeweben mit hohem Polysaccharidgehalt konzipiert ist, erwies sich die Lyse der verwendeten Gewebe als schwierig. Selbst bei weit geringeren Einwaagen als oben angegeben löste sich Gewebepulver aus *A. marina* und *S. nudus* im CTAB-Puffer dieses Reagenziensatzes nur unvollständig.

Bessere Ergebnisse lieferte der RNeasy[®] Fibrous Tissue Kit, der in Verbindung mit QIAshredder-Homogenisatoren (Qiagen, Hilden) eingesetzt wurde. Bei ihm schließt an die Homogenisation in GTC-haltigem Puffer ein Proteinase K-Verdau an. Zudem umfaßt die Methode einen 15-minütigen Verdau mit DNase I (RNase-freies Set, Qiagen, Hilden), der bei Raumtemperatur direkt auf der Silikamembran der verwendeten Zentrifugensäule erfolgt. Auf diese Weise wurden mögliche Spuren genomischer DNA aus der RNA-Präparation entfernt. RNAs kleiner 200 nt wurden selektiv ausgeschlossen, was zu einer Anreicherung von mRNA führte (Herstellerangaben und Ergebnis von Agaroseelektrophoresen wie unter 2.6.3.4).

Um mit Hilfe des RNeasy[®] Fibrous Tissue Kit die Qualität von nach Chomczynski-Sacchi präparierter RNA (2.6.3.1) zu steigern, wurde diese mit $\frac{1}{3}$ Volumen RLT-Puffer aus dem Reagenziensatz und $\frac{3}{4}$ Volumen Ethanol versetzt, konzentrationsabhängig auf eine geeignete Zahl von Zentrifugensäulen verteilt und gemäß Herstellerprotokoll weiterbehandelt.

2.6.3.3 Anreicherung von mRNA

Eine Anreicherung von poly-A⁺-RNA erfolgte mit Hilfe des Oligotex[™] mRNA Mini Kits (Qiagen, Hilden), der gemäß dem Zentrifugensäulen-Protokoll verwendet wurde. Als Ausgangsmaterial diente RNA, die unmittelbar zuvor mittels saurer GTC-Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt (2.6.3.1) und mit dem RNeasy[®] Fibrous Tissue Kit (2.6.3.2) nachbehandelt wurde. Die mRNA wurde mit jeweils 40 bis 80 µl 5 mM Tris/HCl pH 7,5 von der

verwendeten Säule eluiert und sofort zur cDNA-Synthese (2.6.4) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6.3.4 Kontrolle der RNA-Qualität

Die Qualität der wie unter 2.6.3.1 bis 2.6.3.3 präparierten RNA wurde durch submarine Agarose-Elektrophorese nach Almeida et al. (2000) überprüft. Die RNA wird dabei vor der Elektrophorese in Gegenwart von Formaldehyd und Formamid auf 75°C erhitzt, während der elektrophoretischen Trennung jedoch statt durch denaturierende Reagenzien in Gel und Laufpuffer durch eine erhöhte Temperatur in denaturiertem Zustand gehalten (vgl. auch Liu und Chou, 1990). Indem der Laufpuffer (TAE = 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) auf 60°C vortemperiert wurde, konnte erreicht werden, daß bis zum Ende der Elektrophorese eine Temperatur von 40°C nicht unterschritten wurde. Verwendet wurden 1,2%ige TAE-Agarosegele (peqGold Universalagarose, peqlab, Erlangen) mit einem Ethidiumbromidgehalt von $0,1\ \mu\text{g/ml}$. Um die Aktivität von RNasen zu minimieren, wurden Gerätschaften und Lösungen wie unter 2.6.1 beschrieben behandelt.

Da die 28S-rRNAs der Protostomia diskontinuierliche Moleküle mit einer internen Sollbruchstelle (bzw. einer gegenüber nukleolytischen Angriffen empfindlichen Spaltstelle) darstellen (Barcia et al., 1997; Cammarano et al., 1975 und 1982), zeigten die RNA-Präparationen nicht das klassische, auf 28S- und 18S-rRNA zurückzuführende Bandenmuster eukaryotischer Zellen, sondern lediglich eine starke rRNA-Bande eines Molekulargewichts von 1,9 kb. Sie entspricht nach Cammarano et al. (1982) nicht nur der 18S-rRNA, sondern je nach artspezifischer Lage der Bruchstelle auch einem oder beiden 28S-rRNA-Fragmente. Für cDNA-Synthesen (2.6.4) wurde nur solche RNA verwendet, die eine scharfe 1,9 kb-Bande und wenig niedermolekulare Abbauprodukte erkennen ließ.

2.6.4 cDNA-Synthese

cDNA wurde mit dem SuperScriptTM Erststrangsynthese-System für RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe) gemäß Herstellerprotokoll synthetisiert. Als Ausgangsmaterial diente mRNA, die wie unter 2.6.3.3 angereichert wurde. An die Erststrangsynthese mit Oligo(dT)-Primer schloß ein RNase H-Verdau an. Kontrollansätze, die keine mRNA bzw. keine Reverse Transkriptase (SuperscriptTM II RT) enthielten, wurden wie Zielansätze behandelt.

Davon abweichend wurde cDNA, die sich zur Amplifikation von cDNA-Enden (RACE, 2.6.5.2) eignete, mit dem GeneRacerTM Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt. Die verwendete RNA ($0,4$ bis $1,6\ \mu\text{g}$ mit dem E.Z.N.A.[®] Invertebrate RNA Kit (peqlab, Erlangen))

oder dem RNeasy[®] Fibrous Tissue Kit (Qiagen, Hilden) isolierte Gesamt-RNA bzw. weniger als 0,2 µg mRNA, vgl. 2.6.3.2 und 2.6.3.3) wurde in diesem Fall vor der reversen Transkription einem Protokoll unterzogen, in dessen Verlauf die G-Kappe intakter mRNA-Moleküle durch ein spezielles RNA-Oligonukleotid ausgetauscht wurde (vgl. 2.6.5.2 und Tab. 9, S. 278). Außerdem kam ein besonderer, um 36 Nukleotide verlängerter Oligo(dT)-Primer (GeneRacer[™] Oligo(dT)-Primer, Invitrogen, Karlsruhe; Tab. 10, S. 278) zum Einsatz. Die erhaltene Erststrang-cDNA wies infolgedessen an ihren 5'- und 3'-Enden bekannte Primerbindungsstellen auf.

2.6.5 Polymerase Kettenreaktionen

PCR-Amplifikationen erfolgten in einem Thermocycler Primus 25/96 (MWG Biotech, Ebersberg). Sofern die verwendete Polymerase keine integrierte Hot-Start-Funktion aufwies, wurden die Reaktionsansätze (12,5 µl oder 50 µl) erst nach Erreichen einer anfänglichen Denaturierungstemperatur von 94°C in das Gerät eingestellt.

2.6.5.1 PCRs mit degenerierten oder universellen Primern

Die durch ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie ermittelten Peptidsequenzen aus OpDHs der Pazifischen Auster und des Wattwurms (2.5.8.2) wurden genutzt, um degenerierte Primer zur Vervielfältigung interner OpDH-Abschnitte zu konstruieren. Die Primer (Tab. 8, S. 277) eigneten sich auch zur Amplifikation von OpDH-Fragmenten aus der Europäischen Auster und dem Spritzwurm. Mit Hilfe von Standard-Taq-DNA-Polymerasen der Firmen Qiagen (Hilden) und Eppendorf (Hamburg) wurden PCR-Produkte zwischen 400 und 700 bp Länge erhalten. Dabei umfaßten die Reaktionsansätze neben dem jeweiligen einfach konzentrierten PCR-Puffer und 1,5 oder 2 mM Magnesiumchlorid bzw. Magnesiumacetat 200 µM dNTPs, je 0,8 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 0,03 U/µl Polymerase und eine geeignete Menge wie unter 2.6.2 isolierte DNA. Auf eine 5-minütige Anfangsdenaturierung von DNA und Primern (94°C) folgten 30 bis 40 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primeranlagerung bei 50 oder 55°C sowie 1 min DNA-Synthese bei 72°C. Um die Vollständigkeit der Syntheseprodukte zu gewährleisten, schlossen daran weitere 5 min bei 72°C an.

Die gleichen Parameter wurden bei den PCRs mit universellen Artbestimmungsprimern (2.3.3) gewählt. Neben obigen Standard-Polymerasen fand hier zum Teil das Hot-Start-Enzym HotMaster[™] Taq (Eppendorf, Hamburg) Verwendung. Ansätze mit dieser Polymerase enthielten gemäß Herstellerempfehlung 2,5 mM Mg²⁺ und je 0,5 µM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer. Sie wurden lediglich 2 min bei 94°C inkubiert, bevor eine 30- bis 40-mal wie-

derholte Reaktionsfolge aus 20 sec bei 94°C, 10 sec bei 50 bzw. 55°C und 30 sec bei 65°C startete. Abschließend folgten 5 min bei 65°C. Die erhaltenen Zielamplifikate umfaßten jeweils rund 500 Basen.

2.6.5.2 5'- und 3'-RACE-PCR

RLM-RACE (RNA-Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends, Maruyama und Sugano, 1994; Volloch et al., 1994) lieferte ausgehend von den partiellen OpDH-Sequenzen, die aus den PCRs mit degenerierten Primern resultierten (2.6.5.1), auch die 5'- und 3'-terminalen Abschnitte der zugehörigen cDNAs.

RACE-fähige cDNA wurde unter Verwendung des GeneRacer™ Kit (Invitrogen, Karlsruhe) produziert, indem Gesamt-RNA oder angereicherte mRNA zunächst mit alkalischer Phosphatase behandelt und dann die G-Kappe intakter mRNAs mit einer Pyrophosphatase abgespalten wurde. Anders als degradierte mRNAs oder andere Nukleinsäuren wiesen vollständige mRNAs anschließend ein freies 5'-Phosphat auf, so daß mit Hilfe von T4 RNA-Ligase ein RNA-Oligonukleotid (siehe Tab. 9, S. 278) an ihr 5'-Ende ligiert werden konnte. Reverse Transkription mit einem modifizierten, am 5'-Terminus um eine spezielle Ankersequenz verlängerten Oligo(dT)-Primer (Tab. 10, S. 278) lieferte somit cDNA mit bekannten Primerbindungsstellen an beiden Enden (2.6.4). Sie diente als Template für RACE-PCRs mit je einem genspezifischen Primer und einem GeneRacer™-Primer, der sich gegen eine dieser Bindungsstellen richtete (Tab. 9 und Tab. 10, beide S. 278).

Es wurden verschachtelte (nested) PCRs durchgeführt. Dabei bildete das verdünnte Produkt der ersten Amplifikation stets das Template einer Zweit-PCR mit zwischen dem ersten Primerpaar gelegenen Oligonukleotiden. Die 12,5 µl-Reaktionsansätze enthielten jeweils 200 µM dNTPs, 0,4 µM eines GeneRacer™-Primers, 0,4 µM genspezifischen Primer, 0,03 U/µl HotMaster™-Taq (Eppendorf, Hamburg), einfach konzentrierten PCR-Puffer mit 2,5 mM Mg²⁺ und als Template 0,5 µl RACE-cDNA bzw. 1 µl fünf- bis fünfzigfach verdünntes PCR-Produkt. Negativkontrollen wurde statt cDNA Wasser bzw. mit Wasser statt cDNA erhaltenes PCR-Produkt zugesetzt. Außerdem wurden in allen Fällen Einzelprimertests durchgeführt.

Nach 2-minütiger Anfangsdenaturierung bei 94°C folgten im Fall der Erst-PCRs jeweils 25 PCR-Zyklen, während die Zyklenzahl bei den nachgeschalteten PCRs zwischen 23 und 35 variierte. Jeder Zyklus umfaßte 20 sec Denaturierung bei 94°C, abhängig von der erwarteten Amplifikatgröße und den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer eine 10 oder 20 sec lange Primeranlagerungsphase bei Temperaturen zwischen 57°C und 69°C sowie 0,5 bis

2 min Synthesezeit bei 65°C. Alle PCRs endeten mit einer zusätzlichen 5-minütigen Inkubation bei 65°C (vgl. Herstellerangaben HotMaster™ Taq).

2.6.5.3 5'/3'- und ORF-Amplifikationen

Durch Überlappen von OpDH-Teilsequenzen, die aus den PCRs mit degenerierten Primern (2.6.5.1) und den RACE-PCRs (2.6.5.2) resultierten, wurden sogenannte Contigs gebildet (2.7.1). Um nachzuweisen, daß diese Contigs wirklich zusammenhängende cDNAs repräsentieren, wurden Amplifikationen mit möglichst weit 5'- bzw. 3'-terminal gelegenen Primern (Tab. 11, S. 279) durchgeführt, die neben dem jeweiligen offenen Leseraster (ORF) auch einen Großteil der nicht translatierten Regionen überspannten. Parallele Minus-RT-Kontrollen, in denen Aliquots ohne Reverse Transkriptase inkubierter cDNA-Syntheseansätze (siehe 2.6.4) als Template dienten, sollten sicherstellen, daß wirklich cDNA und nicht eventuell in den RNA-Präparationen enthaltene DNA vervielfältigt wurde. Negativkontrollen beinhalteten als Template Wasser bzw. mit Wasser statt RNA hergestellte Kontroll-cDNA (vgl. ebenfalls 2.6.4).

Für alle 5'/3'-Amplifikationen wurde die über Korrekturaktivität verfügende PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Die PCR-Ansätze (Volumen je 12,5 µl) umfaßten neben dem zugehörigen PCR-Puffer (Mg²⁺-Konzentration 2 mM) 240 µM dNTPs, 0,48 µM jedes Primers, 0,05 U/µl PfuUltra™ und 1 µl wie unter 2.6.3.3 isolierte mRNA. Auf eine anfängliche Denaturierung bei 95°C (2 min) folgten 30 bis 34 Zyklen, während derer 30 sec bei 95°C, 30 sec bei primerabhängigen Temperaturen zwischen 54°C und 67°C und 1 min je kb Zielamplifikat bei 72°C abwechselten. Zuletzt schlossen 10 min Synthese bei 72°C an (vgl. Herstellerprotokoll PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase).

Die gleiche Polymerase kam auch bei ORF-Amplifikationen zum Einsatz, die zwecks nachfolgender OpDH-Expression in *E. coli* (2.6.11) durchgeführt wurden. Als Template diente dabei in einigen Fällen anstelle von mRNA ein geeignet verdünnter Klonierungsvektor mit entsprechendem 5'/3'-OpDH-Insert (2.6.7). Ausgehend von Plasmid-DNA reduzierte sich die Zahl der PCR-Zyklen auf nur 20 bis 22 Runden (sonst 30 bis 32). Da Primer mit Restriktionschnittstellen für die Klonierung in pET 24d(+) (Novagen, Darmstadt) verwendet wurden (2.6.7 und Tab. 12, S. 280), die nicht völlig komplementär zum Template waren, konnten Annealingtemperaturen von nicht mehr als 50 bis 55°C gewählt werden.

2.6.6 Analyse und Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden durch submarine Elektrophorese in 1 bis 2%igen TAE-Agarosegelen (Ethidiumbromidgehalt 0,1 µg/ml) gereinigt und analysiert. 12,5 µl-Reaktionsansätze wurden in der Regel vollständig auf das jeweilige Gel aufgetragen, gegebenenfalls die Zielbanden nach der Elektrophorese ausgeschnitten und einer DNA-Elution mit dem QIAquick® Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) unterzogen. Um ausreichend hohe DNA-Mengen für nachfolgende Klonierungen zu erhalten, wurden entweder 50 µl-PCR-Ansätze verwendet oder die Zielbanden aus bis zu fünf 12,5 µl-Ansätzen gleicher Art vereinigt. Die Reinigung homogener PCR-Produkte erfolgte alternativ mit Hilfe des QIAquick® PCR-Reinigungskits (ebenfalls Qiagen, Hilden).

2.6.7 Klonierung von PCR-Produkten

Für Standard-TA-Klonierungen wurde das pGEM®-T Easy Vektorsystem der Firma Promega (Mannheim) genutzt. Gereinigte Taq-Amplifikate (vgl. 2.6.6) konnten aufgrund ihrer natürlichen Adenosinüberhänge (Clark, 1988) unmittelbar zur Ligation eingesetzt werden. Dagegen wiesen PCR-Produkte, die mittels PfuUltra™ (Stratagene, Heidelberg) erzeugt wurden, glatte Enden auf und mußten somit zunächst einer A-Addition unterzogen werden. Dazu wurde gereinigtes PCR-Produkt 30 min bei 70°C in einfach konzentriertem PCR-Puffer mit 0,2 mM dATP und 0,5 U/µl einer Standard-Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg oder NEB, Frankfurt a. M.) inkubiert (pGEM®-T Easy Vektorhandbuch, Promega). Die Ligationsansätze wurden gemäß Herstellerprotokoll mit Rapid Ligation Buffer aus dem pGEM®-T Easy-Reagenziensatz (Endkonzentration 30 mM Tris/HCl, pH 7,8 mit 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP und 5 % PEG) oder mit Ligationspuffer für T4 DNA-Ligase (wie Rapid Ligation Buffer, jedoch ohne PEG, Promega, Mannheim) angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Alternativ fand der TOPO TA Cloning® Kit für Sequenzierungen (Invitrogen, Karlsruhe) Verwendung. Die Ligation wurde dabei nicht durch eine Ligase, sondern durch eine Topoisomerase I vermittelt, die über eine 3'-Phosphotyrosylbindung kovalent an den Vektor pCR® 4-TOPO gebunden ist (Shuman, 1991 und 1994). Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei 4 µl PCR-Produkt mit A-Überhängen je Reaktion (6 µl Gesamtvolumen) eingesetzt wurden. Alle Ansätze wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unmittelbar zur Transformation verwendet (2.6.8). Analog wurden einige PCR-Fragmente mit glatten Enden in den Vektor pCR® 4Blunt-TOPO (Zero Blunt® TOPO PCR Klonierungskit für Sequenzierungen, Invitrogen, Karlsruhe) eingebracht.

ORF-Amplifikate wie unter 2.6.5.3 wurden in den Translationsvektor pET-24d(+) (Novagen, Darmstadt) kloniert. Dabei wurden die NcoI- und die XhoI-Restriktionsschnittstelle des Vektors genutzt, um das jeweilige PCR-Produkt in korrektem Leseraster so in das Plasmid einzufügen, daß zwischen OpDH-Sequenz und Stopcodon Triplets für Leucin, Glutamat und sechs Histidine zu liegen kamen. Um Selbstligationen nur einfach geschnittener Vektormoleküle auszuschließen, wurde der Vektor nach Doppelverdau mit NcoI und XhoI (beide MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit Alkalischer Phosphatase (CIAP, ebenfalls MBI Fermentas) dephosphoryliert. Auch die PCR-Fragmente wurden soweit möglich mit NcoI und XhoI geschnitten. Bei OpDHs mit internen NcoI-Schnittstellen wurden NcoI-kompatible Überhänge mit Hilfe von Eco31I (MBI Fermentas), BsmBI (NEB, Frankfurt a. M.) oder PciI (SibEnzyme, Novosibirsk, Rußland, via NEB) erzeugt. Da Restriktionsendonukleasen terminal gelegene Schnittstellen nicht immer zuverlässig erkennen, mußten die Amplifikate in einigen Fällen in pGEM[®]-T Easy oder pCR[®] 4-TOPO (siehe oben) zwischenkloniert und dann aus diesen Vektoren ausgeschnitten werden. Solche Restriktionsansätze wurden wie der pET-24d(+)-Verdau durch Agarose-Elektrophorese und Gelelution gereinigt (2.6.6), während ansonsten der QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) zum Einsatz kam. Die Ligation zwischen geschnittenem Vektor und NcoI/XhoI-kompatiblen PCR-Inserts erfolgte mit T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim) bei 4°C über Nacht.

2.6.8 Transformation

Elektrokompetente Zellen der Stämme XL1 Blue (Stratagene, Heidelberg) oder BL21 (DE3) (Novagen, Darmstadt) (siehe 2.4) wurden unter Einsatz eines Elektroporators 2510 (Eppendorf, Hamburg) oder eines Easyject Prima (Equibio, Maidstone Kent, UK) transformiert. Dazu wurde je ein 30 µl-Bakterienaliquot auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 5 µl Ligationsansatz (2.6.7) oder 1 µl 1000- bis 2000-fach verdünnter Plasmid-DNA (2.6.9) versetzt und in einer 2 mm-Elektroporationsküvette einem kurzen Spannungspuls von 2500 V ausgesetzt. Sodann wurden die Bakterien rasch mit 1 ml LB-Medium gemischt und unter Schütteln eine Stunde bei 37°C angezogen (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg). Bei der Retransformation von Plasmiden (für Sequenzierungen oder Expressionsversuche, siehe 2.6.10 und 2.6.11) wurden Aliquots der Bakteriensuspension anschließend unmittelbar auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin (je nach Antibiotikaresistenz des Vektors, beide Antibiotika von Serva, Heidelberg) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die Zelldichte zu erhöhen und gegebenenfalls (bei Ligationsansätzen mit pGEM[®]-T Easy, Promega, Mannheim) eine Blau-Weiß-Selektion zu ermöglichen, wurden die Bakterien an-

sonsten durch 10-minütige Zentrifugation (5000 x g) sedimentiert, in geringem Flüssigkeitsvolumen (200 µl LB-Medium bzw. 160 µl Medium plus 30 µl 2 % X-Gal in Dimethylformamid und 30 µl 100 mM IPTG) resuspendiert und erst dann ausgestrichen.

Ligationsansätze mit den Vektoren pCR[®] 4-TOPO oder pCR[®] 4Blunt-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) wurden durch Hitzeschocktransformation in chemisch kompetente One Shot[®] TOP10-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) eingebracht. Die Transformation erfolgte gemäß Herstellerangaben. Eingesetzt wurden jeweils 2 µl frisches Klonierungsprodukt (siehe 2.6.7). Die transformierten Bakterien wurden in 250 µl SOC-Medium (2 % Tryptone, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) eine Stunde bei 37°C vermehrt, dann in geeigneten Aliquots auf LB-Agar mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht angezogen. Hier konnte auf eine Blau-Weiß-Selektion verzichtet werden, da beide Vektoren das letale *E. coli*-Gen *ccdB* (Bernard und Couturier, 1992 sowie Bernard et al., 1993 und 1994) umfassen. Lebensfähig sind nur Klone mit rekombinantem Plasmid, bei denen dieses Gen durch Insertion eines PCR-Produkts unterbrochen ist.

Zur Identifikation von Kolonien mit rekombinantem pET-24d(+)-Plasmid (2.6.7), aber auch zur Kontrolle positiver Klone bei Blau-Weiß-Selektionen dienten Kolonie-PCRs (modifiziert nach dem Handbuch zum TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen, Karlsruhe). Hierbei wurden 12,5 µl-PCR-Ansätze (mit HotMaster[™] Taq wie unter 2.6.5.1, jedoch ohne Template), die geeignete, beiderseits der multiplen Klonierungsstelle bindende Vektorprimer enthielten (T7 und T7_Ter bei pET-24d(+)- bzw. M13 und M13_rev bei pGEM[®]-T Easy-Klonen, siehe 8.1), mit je einer mutmaßlich positiven Bakterienkolonie inokuliert. Zugleich wurde die Kolonie auf LB-Agar mit adäquatem Antibiotikum repliziert. Während die Replikaplaten vier bis sechs Stunden bei 37°C angezogen und dann zur späteren Verwendung in den Kühlschrank überführt wurden, durchliefen die Reaktionsansätze eine PCR mit 10 min Anfangsdenaturierung bei 94°C. Die verlängerte Denaturierungsphase zu Beginn diente der Zellyse und Inaktivierung von Nukleasen. Daran schlossen jeweils 25 PCR-Zyklen (20 sec bei 94°C, 10 oder 20 sec bei 55°C, 1 min/kb bei 65°C) und eine 10-minütige finale Synthese bei 65°C an. Durch Agarose-Elektrophorese konnte nachfolgend die Größe der erhaltenen Amplifikate ermittelt und somit das Vorhandensein oder Fehlen eines Vektorinserts festgestellt werden.

2.6.9 Plasmidpräparation

Für Plasmidpräparationen wurden jeweils 3 ml ampicillin- bzw. kanamycinhaltiges LB-Medium in 15 ml-Polypropylenröhrchen mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und

12 bis 16 h bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die Bakterien wurden durch 10-minütige Zentrifugation mit 3000 rpm in einer Minifuge RF (Heraeus, Hanau; komplette Kulturen) oder durch 1-minütige Zentrifugation mit 10000 x g in einer Tischzentrifuge (nur 2 ml Bakteriensuspension) geerntet. Aus den sedimentierten Zellen wurde mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (Classic- oder Safety-Line, peqlab, Erlangen) Plasmid-DNA isoliert. Die Plasmidpräparationen erfolgten gemäß dem Herstellerprotokoll für Plasmide, die in hoher Kopienzahl in Bakterienzellen vorkommen. Nur in Einzelfällen fand alternativ ein FastPlasmid[™] Mini Kit (Eppendorf, Hamburg) Verwendung. Bei diesem dienten lediglich 1,5 ml Bakterienkultur als Ausgangsmaterial. Unabhängig vom Reagenziensatz wurde die Plasmid-DNA schließlich mit jeweils 50 µl sterilem Wasser von den zugehörigen Silika-Zentrifugensäulen eluiert.

Zu Kontrollzwecken wurden Aliquots präparierter pGEM[®]-T Easy-, pCR[®] 4-TOPO- und pCR[®] 4Blunt-TOPO-Konstrukte (2.6.7) einem Restriktionsverdau mit EcoRI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) unterzogen. Das PCR-Fragment wurde so aus dem jeweilige Vektor herausgeschnitten und konnte nachfolgend gelelektrophoretisch erfaßt werden. Alternativ wurden Inserts durch PCR mit vektorspezifischen, die multiple Klonierungsstelle überspannenden Primern und anschließende Gelanalyse nachgewiesen. Eingesetzt wurden die Primer M13 und M13_rev bzw. bei pET-24d(+)-Konstrukten (2.6.7) das Primerpaar T7 plus T7_Ter oder eine Kombination aus einem art- und OpDH-spezifischen Nterm-Primer und T7_Ter (siehe 8.1). In der Regel erfolgte die Amplifikation in 25 PCR-Zyklen mit Hilfe von HotMaster[™] Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg). Die Primeranlagerungstemperatur betrug 55°C, bei Verwendung eines Nterm-Primers zum Teil nur 52°C.

2.6.10 DNA-Sequenzierung

Automatische DNA-Sequenzierungen (Single Reads) inklusive zugehöriger Templatepräparationen wurden von der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dem Sequenzierlabor wurden XL1 Blue-Klone mit Vektorkonstrukten der zu sequenzierenden PCR-Fragmente (siehe 2.6.8) auf LB-Agar mit Ampicillin oder Kanamycin zur Verfügung gestellt. Längere Inserts, die sich durch Sequenzierungen mit Standardprimern nicht komplett erfassen ließen, wurden mit Hilfe interner Sequenzierprimer (siehe Tab. 13, S. 280) sukzessive erschlossen.

2.6.11 Expressionskulturen

Wie unter 2.6.7 beschrieben wurden codierende OpDH-Sequenzen unter Kontrolle eines T7lac-Promotors (Studier et al., 1990; Dubendorff und Studier, 1991) so in den Vektor pET-

24d(+)⁺ (Novagen, Darmstadt) kloniert, daß die Konstrukte die Expression von OpDHs mit natürlichem N-Terminus und einem C-terminalen Fusionstag aus Leucin, Glutamat und sechs Histidinen (LE6xH) ermöglichten. Während sich die Insertion von Leucin und Glutamat klonierungsbedingt nicht vermeiden ließ, wurden den OpDHs die Histidine angefügt, um eine nachfolgende Reinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie (2.5.6.5) zu erlauben.

Die pET-24d(+)-Konstrukte wurden in XL1 Blue (Stratagene, Heidelberg) selektiert und vervielfältigt und dann in den Expressionsstamm BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt) transformiert (2.6.8). Dabei handelt es sich um einen lysogenen Stamm, der unter Kontrolle des Promotors lacUV5 das Gen für die T7-RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen λ DE3 enthält. Die Transkription dieses Gens wird in uninduzierten, rekombinanten BL21(DE3)-Zellen durch lac-Repressormoleküle reprimiert, die durch lacI-Sequenzen im Bakteriengenom und auf dem pET-24d(+)-Plasmid codiert werden. Zusätzlich inhibiert der lac-Repressor den T7lac-Promotor des Vektors. Eine OpDH-Transkription wird auf diese Weise weitgehend verhindert. Sie kann jedoch durch IPTG (Isopropyl-Thiogalactosid) induziert werden, das die Blockade beider Promotoren (lacUV5 und T7lac) aufhebt.

Die Exprimierbarkeit funktionsfähiger OpDHs und deren Aminosäurespezifität wurde ausgehend von 11-LB-Kulturen mit Kanamycin getestet. Diese wurden mit jeweils 1 ml einer Übernachtskultur (20 ml, inokuliert mit einem Einzelklon) angeimpft und vier bis fünf Stunden (bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,7) in einem auf 37°C temperierten Luftschüttler angezogen. Sodann wurde 1 ml uninduzierte Kultur abgenommen, der Rest mit 400 μ M IPTG versetzt und weitere 19 bis 20 Stunden bei nur noch 18°C inkubiert. Durch das Erniedrigen der Temperatur sollte das Expressionsniveau gesenkt und damit die Bildung inaktiver Proteinpräzipitate (Inclusion Bodies) minimiert werden (Janßen, 2000).

Anschließend wurden die Bakterien durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 x g sedimentiert, in 30 ml Homogenisationsmedium (100 mM Imidazol/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0) aufgenommen und mit einer Spatelspitze DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt. Sofern eine Reinigung rekombinanter OpDHs geplant war (vgl. 2.5.6.5), wurde statt des Homogenisationsmediums der Startpuffer der Affinitätschromatographie (siehe 2.5.6.5; im Fall der AloDH-LE6xH aus *A. marina* mit 20 mM 2-Mercaptoethanol) verwendet.

Der Zellaufschluß erfolgte mit einem Sonifier Sonoplus HD 2200 (Bandelin, Berlin), der mit einem Titanteller TT13 betrieben wurde. Die Zellen wurden unter Eiskühlung achtmal 15 sec mit 25 % Leistung beschallt. Dazwischen wurden Pausen von jeweils 15 bis 20 sec eingelegt. Der durch anschließende Zentrifugation (1 h, 88000 x g, 4°C) erhaltene Überstand wurde über Sephadex G25 entsalzt (2.5.5) und für Aktivitätsbestimmungen (2.5.1) verwendet

bzw. zur chromatographischen Reinigung rekombinanter OpDHs (2.5.6.5) genutzt. Das Sediment mit der unter nativen Bedingungen unlöslichen Proteinfraction wurde in 10 ml harnstoffhaltigen Puffer (100 mM Natriumphosphat, 10mM Tris, 8 M Harnstoff, pH 8,0) aufgenommen, eine halbe Stunde auf Eis inkubiert und einer weiteren Sonifierbehandlung plus Zentrifugation unterzogen.

Die vor der IPTG-Zugabe abgenommenen Bakterienaliquots wurden ähnlich wie die induzierten Kulturen behandelt. Hier wurden die Bakterien durch 3-minütige Zentrifugation bei 5000 x g geerntet, in 500 µl Homogenisationsmedium resuspendiert und ohne Zugabe von DNase aufgeschlossen. Der Sonifieraufschluß erfolgte statt mit dem genannten Titanteller mit Hilfe einer Mikrospritze MS72 (fünfmal 5 sec mit 10 % Leistung, dazwischen jeweils 5 bis 10 sec Pause). Schließlich wurde 10 min mit 14000 x g zentrifugiert (4°C). Der erhaltene Überstand wurde ebenso wie die Zentrifugationsüberstände der induzierten Kulturen elektrophoretisch analysiert (2.5.7) und einer Proteinbestimmung nach Bradford (2.5.2) unterzogen.

2.7 Bioinformatische Methoden

2.7.1 Sequenzanalyse

Die Rohdaten (Elektropherogramme) aus DNA-Sequenzierungen (2.6.10) wurden mit Hilfe des Computerprogramms ChromasPro (Version 1.3, Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australien, <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>) nachbearbeitet. Das Programm wurde genutzt, um Primerregionen, Vektorabschnitte und terminale Bereiche geringer Sequenzierqualität zu entfernen sowie überlappende Sequenzfragmente aus verschiedenen Sequenzierreaktionen zu assemblieren. Die von ChromasPro für einzelne Sequenzüberlappungen (sogenannte Contigs) erzeugten Konsensussequenzen konnten bei Bedarf manuell editiert und nachfolgend in das Programm pDraw32 (Version 1.1.86, lizenzfreie Software von Kjeld Olesen, ACACLONE, <http://www.acaclone.com/>) exportiert werden. Dieses diente zur Archivierung und Analyse der Nukleotidsequenzen und lieferte Primerbindungsprognosen.

Vorraussagen der physikochemischen Eigenschaften von Proteinen wie etwa ihres Molekulargewichts oder ihres theoretischen pI wurden mit Hilfe des Online-Tools ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) auf dem ExPASy Proteomics Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB) erhalten. Sekundärstrukturvorhersagen erfolgten mittels PROFsec (Profile fed neural network prediction), das über den PredictProtein-Server des EMBL-Heidelberg (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>) verfügbar ist. PROFsec-Vorhersagen basieren stets auf einer multiplen Alinierung des zu unter-

suchenden Proteins mit ähnlichen Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken und erreichen dadurch eine erhöhte Genauigkeit (Rost und Sander, 1993a; 1993b; Rost et al., 2004).

2.7.2 Sequenzvergleiche

Paarweise und progressive multiple Alinierungen von Nukleotid- oder Proteinsequenzen wurden mit Hilfe von ClustalW (Thompson et al., 1994) erstellt. Genutzt wurde entweder der Online-Service des Europäischen Instituts für Bioinformatik (EBI) (ClustalW 1.82, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) oder eine lokal installierte Programmversion (ClustalW 1.83, frei erhältlich unter <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/dos/clustalw/>). Abgesehen von Modifikationen des Ausgabeformats und der Ausgabereihenfolge wurden stets die Standardeinstellungen beibehalten. Die erhaltenen multiplen Alinierungen wurden mit dem Java-Alignmenteditor Jalview (Version 1.18, <http://www.jalview.org/download.html>; Clamp et al., 2004) visualisiert und soweit erforderlich manuell nachbearbeitet. Einige multiple Alignments wurden zusätzlich mittels Toffee (Poirot et al., 2003, http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi) evaluiert.

Während ClustalW globale Sequenzalinierungen lieferte, wurden lokale Alignments mit dem Programm Lalign (Version 2.1u06, Huang und Miller, 1991) erstellt, auf das über den FASTA-Webserver der Universität von Virginia zugegriffen werden kann (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www/lalign.htm). Der Algorithmus wurde insbesondere verwendet, um die massenspektrometrisch sequenzierten Spaltpeptide chromatographisch separierter Alo/StrDHs aus *A. marina* und *C. gigas* (2.5.8.2) speziellen Positionen innerhalb der für die jeweilige Art ermittelten OpDH-Gesamtsequenzen zuzuordnen. Vor allem für kürzere *Crassostrea*-Peptide wurde teilweise nur dann ein Alignment erhalten, wenn die Lalign-Erwartungswertgrenze über den voreingestellten Standardwert von 0,5 erhöht wurde.

Bei der Suche nach Aminosäureresten, welche die Spezifität von OpDHs determinieren könnten, wurde unterstützend der AMAS (Analyse Multiply Aligned Sequences)-Server der University of Dundee (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/amas/>) eingesetzt. Der AMAS-Algorithmus (Livingstone und Barton, 1993) ermöglicht die Identifikation funktionell wichtiger Reste durch Vergleich von Sequenzgruppen innerhalb eines multiplen Alignments.

2.7.3 Datenbanksuche

Für den Vergleich von Nukleotid- und Proteinsequenzen mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken wurden verschiedene auf der Homepage des NCBI verfügbare BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Algorithmen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml>,

Altschul et al., 1990 und 1997) verwendet. DNA-Fragmente, die für artspezifisch variierende Teilstücke der kleinen ribosomalen Untereinheit codieren, wurden mit Hilfe von BLASTn Sequenzen aus primären Nukleotidbanken (GenBank / EMBL / DDBJ) gegenübergestellt, um so die zugehörige Art zu identifizieren (2.3.3). Außerdem wurden die Proteindatenbanken NR oder SWISS-PROT mit BLASTp und PSI-BLAST (positionsspezifischer iterativer BLAST, Altschul et al., 1997; Schäffer et al., 2001) nach Sequenzen mit signifikanter Ähnlichkeit zu den in der vorliegenden Arbeit sequenzierten OpDHs durchsucht. Die beiden letzten Programme vergleichen Proteinsequenzen. Beim iterativen PSI-BLAST wird, basierend auf einer multiplen Alinierung der Treffer aus einer einfachen BLASTp-Suche, eine positionsspezifische Matrix berechnet, mit deren Hilfe nachfolgend gezielter nach ähnlichen Proteinen gesucht werden kann. Hoch konservierte Positionen werden dabei stärker gewichtet als nicht-konservierte Positionen. Durch Anpassen des Suchprofils nach jeder BLAST-Runde lassen sich sukzessive auch weniger nah mit dem Ausgangsprotein verwandte Sequenzen identifizieren.

Die BLAST-Programme wurden mit Standardparametern verwendet. Als signifikante Treffer wurden nur solche Proteine berücksichtigt, die mit der Ausgangssequenz ein mindestens 300 Aminosäuren langes lokales Alignment ergab, das mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 0,01 % (Erwartungswert kleiner 10^{-4}) auf zufälligen Sequenzähnlichkeiten beruhte. Auch unvollständige Proteinsequenzen wurden ausgeschlossen.

2.7.4 Phylogenetische Analyse

Um Informationen über die verwandtschaftlichen Beziehungen der Invertebraten-OpDHs untereinander sowie ihre phylogenetische Herkunft zu gewinnen, wurden in den Proteindatenbanken SWISS-PROT und NR potentielle Homologe der in dieser Arbeit sequenzierten Invertebraten-OpDHs identifiziert (2.7.3) und mit Hilfe von ClustalW aliniert (2.7.2). Die resultierenden multiplen Alignments wurden manuell nachbearbeitet, dann Positionen mit Lücken entfernt und mit Hilfe des Programms LDDist (Version 1.4a3, Thollessen, 2004) die LogDet-Distanzen der Proteine (nach Tamura und Kumar, 2002) berechnet. Anders als konventionelle Verfahren zur Berechnung phylogenetischer Distanzen liefern LogDet-Algorithmen in der Regel auch für asymmetrisch evolvierende Sequenzen (Sequenzen unterschiedlichen GC-Gehalts bzw. differierender Aminosäurezusammensetzung) zuverlässige Ergebnisse (Lockhart et al., 1994; Lake, 1994; Tamura und Kumar, 2002). LDDist wurde mit Standardeinstellungen betrieben. Nur in Einzelfällen wurden invariante Alignmentpositionen ausgeschlossen.

Ausgehend von den mit LDDist berechneten LogDet-Distanzen wurden mittels des Programms SplitsTree4 (Betaversion 26, www.splitstree.org/, Huson und Bryant, 2006) Neighbor-Netze konstruiert und graphisch dargestellt. Die Neighbor-Net-Methode nach Bryant und Moulton (2004) stellt eine Variante des bekannten Neighbor-Joining-Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) dar, liefert jedoch anders als dieser im Normalfall keine bifurzierenden Stammbäume, sondern Netzwerke, innerhalb derer auch widersprüchliche Signale eines Datensatzes visualisiert und damit gleichzeitig mehrere alternative Topologien veranschaulicht werden können. Signale, die einzelne Sequenzgruppen von allen übrigen Sequenzen im Netz separieren (sogenannte Splits), erscheinen im Graphen als parallele Linien, deren Länge ein Maß für die Gewichtung des Splits darstellt. Inkompatible Splits verleihen dem Graphen einen netzartigen Charakter.

Da die dritte Codonposition beim simultanen Vergleich pro- und eukaryotischer Sequenzen ohnehin gesättigt und somit nicht informativ zu sein pflegt (Horner et al., 2000; Gelius-Dietrich und Henze, 2004), wurden die phylogenetischen Untersuchungen in der Regel auf Proteinebene durchgeführt. Nur bei Verwandtschaftsanalysen, die sich auf die OpDHs der höheren Invertebraten beschränkten, wurden ergänzend auch die codierenden DNA-Sequenzen herangezogen. Um auch in diesem Fall von der Überlegenheit der Alinierungsalgorithmen für Proteinsequenzen (Doolittle, 1981; Wernersson und Pedersen, 2003) profitieren zu können, kam das Perl-Skript transAlign (Version 1.2, www.tierzucht.tum.de/BinindaEmonds/, Bininda-Emonds, 2005) zum Einsatz. Das Programm übersetzt protein-codierende DNA-Sequenzen zunächst in ihre korrespondierenden Aminosäuresequenzen, übergibt diese zur Alinierung an ClustalW (siehe 2.7.2) und ersetzt im resultierenden Aminosäurealignment die einzelnen Reste wieder durch Codons, so daß letztlich ein Nukleotidalignment erhalten wird. Mit transAlign produzierte Nukleotidalignments ausgewählter Invertebraten-OpDHs wurden nach Entfernen aller Positionen mit Lücken ebenso wie Proteinalignments für LogDet-Distanzrechnungen und nachfolgende Neighbor-Net-Analysen genutzt.

2.7.5 Darstellung und Vergleich dreidimensionaler Proteinstrukturen

Die interaktive Darstellung und Analyse von 3D-Proteinstrukturen aus der Proteinstrukturdatenbank des Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB-PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>, Berman et al., 2000) erfolgte mit dem Swiss-PdbViewer (Version 3.7, <http://www.expasy.org/spdbv/>, Guex und Peitsch, 1997). Alternativ wurden Strukturkoordinaten aus der Molecular Modeling Database des NCBI (MMDB, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB/mmdb.shtml>, Ohkawa et al., 1995; Wang et al., 2002) bezogen, die einen

Teil der Proteinstrukturen aus PDB in anderem Dateiformat enthält. Solche Strukturen konnten mit dem Programm Cn3D (Version 4.1, <http://ncbi.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>, Hogue, 1997) visualisiert und bearbeitet werden. Außerdem wurde die letztgenannte Datenbank mit Hilfe des VAST-Algorithmus (VAST = Vector Alignment Search Tool, Gibrat et al., 1996) nach Proteinen mit dreidimensionaler Strukturähnlichkeit zur CENDH aus *Arthrobacter spec.* (1bg6; Britton et al., 1998a) durchsucht.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung diverser Versuchsreihen zur Alo/StrDH-Stabilität (3.3) erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat for Windows (Version 2.03, SPSS GmbH, München). Parametrische Signifikanztests wurden nur dann verwendet, wenn die zu analysierenden Datensätze sich in entsprechenden Vortests als potentiell normalverteilt und varianzgleich erwiesen. Ansonsten kamen verteilungsunabhängige Methoden zum Einsatz (Sachs, 1992). Die Wahl des jeweiligen Tests richtete sich auch danach, ob abhängige oder unabhängige Datensätze zu untersuchen waren. So wurden zum paarweisen statistischen Vergleich unabhängiger Mittelwerte entweder der Zweistichproben-t-Test (parametrisch) oder der Rangsummentest nach Mann und Whitney (verteilungsfrei) eingesetzt, während abhängige Mittelwerte mit dem paarigen t-Test (parametrisch) oder dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (verteilungsfrei) analysiert wurden. Mittelwerte, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,05 differierten, wurden als signifikant verschieden betrachtet.

Bei multiplen Vergleichen mehrerer Mittelwerte konnten stets verteilungsabhängige Tests verwendet werden, da Varianzgleichheit und Normalverteilung hier in allen Fällen gewährleistet waren. Durchgeführt wurden einfache Varianzanalysen (One Way ANOVA) bzw. einfache Varianzanalysen für wiederholte Messungen (One Way Repeated Measures ANOVA), an die, sofern signifikante Unterschiede erkannt wurden, simultane paarweise Mittelwertvergleiche nach Tukey oder multiple Vergleiche gegen eine Kontrollgruppe mittels der Dunnett-Methode anschlossen.

3 Ergebnisse

3.1 Pyruvatreduktase-Aktivitäten der untersuchten Arten

Aktivitätsmessungen in Extrakten des Hautmuskelschlauchs von *A. marina* und *S. nudus* sowie in Adduktorhomogenaten von *C. gigas* und *O. edulis* (2.5.1) zeigten grundlegende Unterschiede in der Pyruvatreduktase-Ausstattung dieser Arten. Die jeweiligen Haupt-OpDH-Aktivitäten sind in Abb. 2 dargestellt.

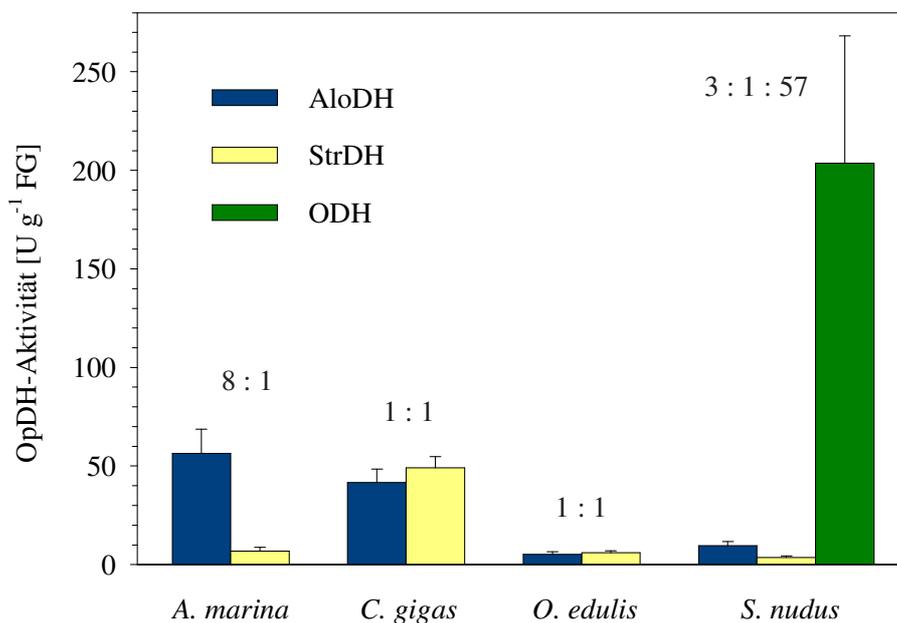


Abb. 2: Dominierende Pyruvatreduktase-Aktivitäten im Gewebe der untersuchten Arten

Aufgetragen sind die spezifischen AloDH-, StrDH- und ODH-Aktivitäten [U·g⁻¹ FG] im Hautmuskelschlauch von *A. marina* und *S. nudus* sowie im Adduktor von *C. gigas* und *O. edulis* als Mittelwerte ± SD von Messungen in mehreren Homogenaten (n = 15 bei *A. marina*, n = 8 bei *C. gigas*, jeweils n = 3 bei *O. edulis* und *S. nudus*). Alle Homogenate wurden ausgehend von mindestens 5 bis 10 g Gewebe hergestellt, was zum Beispiel den Adduktoren von zehn Europäischen Austern entspricht. Mit Ausnahme einiger AloDH- und StrDH-Messungen in verdünnten *Arenicola*- und *Crassostrea*-Extrakten, bei denen sich in Abwesenheit der jeweiligen Aminosäure keinerlei Aktivität detektieren ließ (Vorlaufaktivität Null), fanden entsalzte Homogenate Verwendung. Die Aktivitäten wurden bei 25°C in 100 mM Imidazol/HCl (pH 7,0), 0,16 mM NADH, 3 mM Pyruvat bestimmt. Zum Starten der Reaktion dienten 200 mM L-Alanin (AloDH) oder Glycin (StrDH) bzw. 5,5 mM L-Arginin (ODH).

Während im Hautmuskelschlauch des Wattwurms achtmal mehr AloDH- als StrDH-Aktivität ($56,4 \pm 12,3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$ versus $6,9 \pm 1,9 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$) zu finden war, traten die beiden Aktivitäten bei *C. gigas* in einem Verhältnis von etwa 1 : 1 auf ($41,7 \pm 6,8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$ versus $49,0 \pm 5,8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$ bei gemeinsamer Verarbeitung des phasischen und tonischen Adduktoranteils; Aktivitätsverhältnis in beiden Muskeltypen gleich, Aktivitäten jedoch im tonischen Adduktor

viermal niedriger). Auch bei *O. edulis* lieferten L-Alanin und Glycin etwa gleiche Reaktionsraten, doch lagen die spezifischen OpDH-Aktivitäten hier um den Faktor acht unter denen der Pazifischen Auster. Ähnlich niedrige AloDH- und StrDH-Aktivitäten zeigte der Spritzwurm. Bei ihm wurde aber eine sehr hohe ODH-Aktivität von $203,7 \pm 64,6 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$ gemessen (Verhältnis AloDH : StrDH : ODH = 3 : 1 : 57), die bei den übrigen Arten ganz fehlte.

Außerdem konnten vor allem in Austernhomogenaten geringe β -AloDH-Aktivitäten (*C. gigas* $6,7 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$, *O. edulis* $2,2 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$, *A. marina* $0,4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$, *S. nudus* < NG) nachgewiesen werden. Minimale TaDH-Aktivität ($0,1 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$) fand sich lediglich im Adduktor von *C. gigas*. Bei dieser Art und dem Wattwurm wurden zudem Spuren einer LDH detektiert (jeweils $0,1 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$).

3.2 Elektrophoretische Isoenzymanalyse

Zusätzliche Informationen über die OpDHs der ausgewählten Arten lieferten elektrophoretische Enzymanalysen. Dabei wurden Homogenate, die aus dem Hautmuskelschlauch oder Adduktor jeweils nur eines einzelnen Tieres gewonnen wurden, einer nativen Disk-PAGE mit anschließender Aktivitätsfärbung unterzogen (2.5.7.1). Indem dieselben Homogenate mehrfach auf das gleiche Gel aufgetragen und die entsprechenden Spuren nach der Elektrophorese auf unterschiedliche OpDH-Aktivitäten bzw. unspezifische Redoxaktivität angefärbt wurden, war es möglich, OpDHs verschiedener elektrophoretischer Mobilität und Aminosäurespezifität zu identifizieren (Abb. 3).

So fanden sich in Einzeltierhomogenaten von *C. gigas* neben Enzymbanden, die zumindest unter den gewählten Bedingungen nur AloDH-, jedoch keine StrDH-Aktivität aufwiesen (z. B. die AloDH-Bande geringster elektrophoretischer Mobilität bei Cg1), andere mit beiden Aktivitäten. Das Bandenmuster verschiedener Einzelindividuen differierte deutlich. In einzelnen Austern traten bis zu fünf elektrophoretisch unterscheidbare OpDHs mit R_f -Werten zwischen 0,49 und 0,60 auf (Cg1).

Bei *O. edulis* ergab sich ein ähnliches Bild. Auch hier wurde neben kombinierten Alo/StrDHs eine reine AloDH beobachtet (AloDH-Bande geringster Laufweite bei Oe3, $R_f = 0,38$). Enzymformen, die ausschließlich die Umsetzung von Strombin katalysierten, fanden sich dagegen ebensowenig wie bei *C. gigas*.

Während Abb. 3 die individuelle Enzymvariabilität bei den beiden Austernarten nur exemplarisch dokumentiert, zeigten alle untersuchten Spritzwürmer (vier) das gleiche Bandenmuster (vgl. Sn1). Stets konnten zwei bis drei ODH-Banden ($R_f = 0,42, 0,43$ und $0,46$) von einer schwachen, sich nur langsam entwickelnden Bande geringfügig größerer Laufweite

($R_f = 0,47$) unterschieden werden, die AloDH- und StrDH-, jedoch keine ODH-Aktivität aufwies. Zusätzlich ließ sich eine Alo/StrDH-Bande mit R_f -Wert 0,59 erahnen.

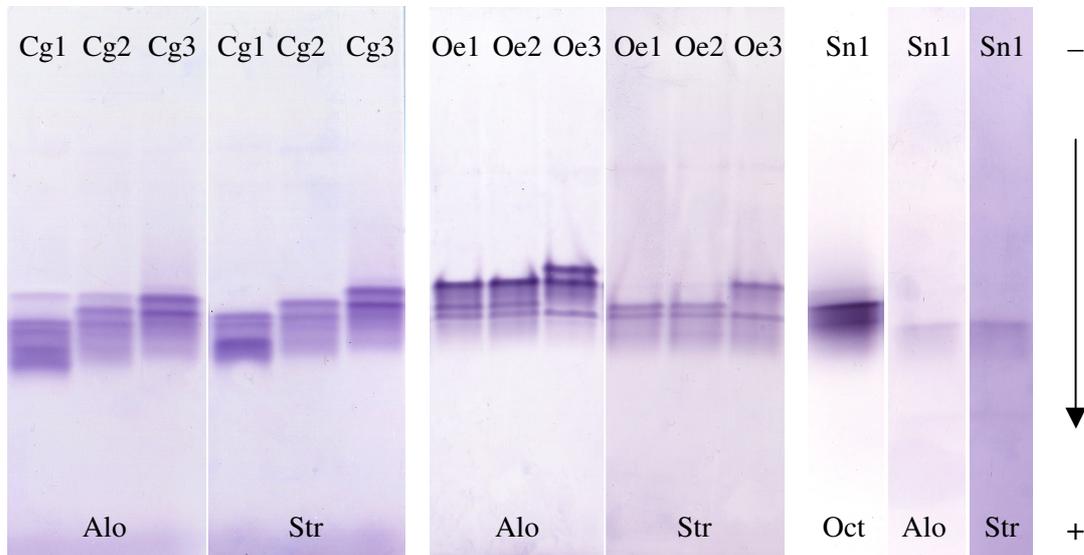


Abb. 3: Native Disk-PAGE von Einzeltierhomogenaten

Dargestellt sind die Elektropherogramme jeweils dreier Einzeltierhomogenate aus *C. gigas* (Cg1 bis Cg3) und *O. edulis* (Oe1 bis Oe3) sowie eines Spritzwurmhomogenats (Sn1). Um die Ionenstärke möglichst gering zu halten, wurde für die Homogenisation 5 mM DTT anstelle des sonst üblichen Homogenisationsmediums verwendet. Die Elektrophorese der *Ostrea*- und *Sipunculus*-Homogenate erfolgte unter N_2 -Atmosphäre. Aufgetragen wurden durchschnittlich $15 \pm 1 \mu\text{g}$ (*C. gigas*), $37 \pm 6 \mu\text{g}$ (*O. edulis*) bzw. 4 und 13 μg (*S. nudus*, ODH- versus AloDH- und StrDH-Färbung) Gesamtprotein entsprechend AloDH- und StrDH-Aktivitäten zwischen 0,01 und 0,05 U bzw. im Fall des Spritzwurmhomogenats entsprechend 0,01 U AloDH-, 0,003 U StrDH- und 0,05 U ODH-Aktivität. In den Reaktionslösungen für die Aktivitätsfärbung waren 20 mM (50 mM bei *S. nudus*) meso-Alanopin (Alo) bzw. D-Strombin (Str) oder 1,7 mM D-Octopin (Oct) enthalten. Kontrollfärbungen in Abwesenheit eines Opins ergaben kein Signal (nicht gezeigt). Die Färbedauer variierte wie folgt: 50 min bei *C. gigas*, 30 min AloDH und 90 min StrDH bei *O. edulis*, 90 min ODH bzw. 18 h AloDH und StrDH bei *S. nudus*. Das gleiche Bandenmuster wie bei Sn1 wurde auch bei drei weiteren Spritzwürmern gefunden. Bei ihnen ließ sich die im Vergleich zu den beiden ODH-Banden größere Laufweite der Alo/StrDH zum Teil deutlicher erkennen.

Eine elektrophoretische Analyse der AloDHs und StrDHs des Wattwurms war ausgehend von Rohextrakten nicht möglich. Selbst nach Elektrophorese unter N_2 -Atmosphäre (2.5.7.1) konnten die OpDHs dieser Art nicht durch Aktivitätsfärbung detektiert werden. Entsprechende Gele (nicht abgebildet) zeigten lediglich unspezifische Banden, die auch bei Kontrollfärbungen in Abwesenheit eines Opins auftraten. Bei den übrigen Arten ergaben solche Kontrollen kein Signal.

3.3 Oxidationsempfindlichkeit der Wattwurm-OpDHs

Bei ersten Versuchen, OpDHs aus dem Hautmuskelschlauch des Wattwurms zu isolieren, erwies sich ihre Instabilität als problematisch. Innerhalb von nur ein bis zwei Tagen traten in

auf Eis gelagerten Rohextrakten, die anders als spätere Homogenate nur 2 mM Dithiothreitol (DTT) und keine Proteaseinhibitoren enthielten, extreme Aktivitätsverluste von teils mehr als 90 % auf. Gleiches wurde bei partiell gereinigten Proteinlösungen ohne Oxidationsschutz beobachtet.

Die ALoDH- und StrDH-Aktivitäten in auf Eis gelagerten Rohhomogenaten höheren DTT-Gehalts (5 mM) blieben allerdings über mindestens drei Tage unverändert, bevor eine zunächst allmähliche und dann zunehmend raschere Aktivitätsabnahme einsetzte. Sie betraf die ALoDH-Aktivität stärker als die StrDH-Aktivität. Nach sieben Tagen fanden sich nur noch rund 22 % der ursprünglichen ALoDH-, jedoch noch 41 % der StrDH-Aktivität. Zehn Tage nach der Homogenisation schließlich waren die Restaktivitäten auf 0,3 und 5 % (ALoDH bzw. StrDH) abgesunken. Die Aktivitäten konnte allerdings durch Zusetzen von 5 mM frischem DTT partiell wiederhergestellt werden. Rund zwei Stunden nach der DTT-Zugabe erreichten die ALoDH- und StrDH-Aktivitäten bereits wieder 44 bzw. 30 % der Ausgangswerte. Am folgenden Morgen wurden sogar 88 und 45 % der Anfangsaktivitäten gemessen. Sofern den Homogenaten von vornherein alle vier Tage 5 mM frisches DTT zugesetzt wurde, konnten die ALoDH- und StrDH-Aktivitäten der Rohhomogenate über mindestens zwei Wochen konstant gehalten werden.

Zusätzliche Stabilisierungsversuche etwa durch 10 % Glycerin, bis zu 10 mM EDTA, 2 mM des Proteaseinhibitors PMSF oder einen universellen Proteasen-Inhibitor-Cocktail (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim) zeigten nur geringe Erfolge. Die Proteaseinhibitoren besaßen zwar bei Raumtemperatur einen signifikant stabilisierenden Effekt, konservierten die Aktivität auf Eis gelagerter Proteinlösungen jedoch lediglich tendenziell.

Versuche mit Adduktorhomogenaten aus *C. gigas* zeigten eine gegenüber den Wattwurm-ALo/StrDHs deutlich geringere Oxidationsempfindlichkeit ihrer OpDHs. Auch ohne zusätzliches DTT fanden sich hier nach zwei Wochen noch 71 % der anfänglichen ALoDH- und 83 % der ursprünglichen StrDH-Aktivität.

3.4 Enzymreinigungen

3.4.1 Reinigung von ALoDHs aus *A. marina*

Die Reinigung von Wattwurm-OpDHs erfolgte durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, hydrophobe Interaktionschromatographie über Phenyl Sepharose 6, Anionenaustauschchromatographie über Mono Q und Sephadex G100-Gelfiltration (2.5.6.2). Im Fall der gezeigten Musterreinigung (Abb. 4 und Tab. 1) wurden aus den Hautmuskelschläuchen von 300

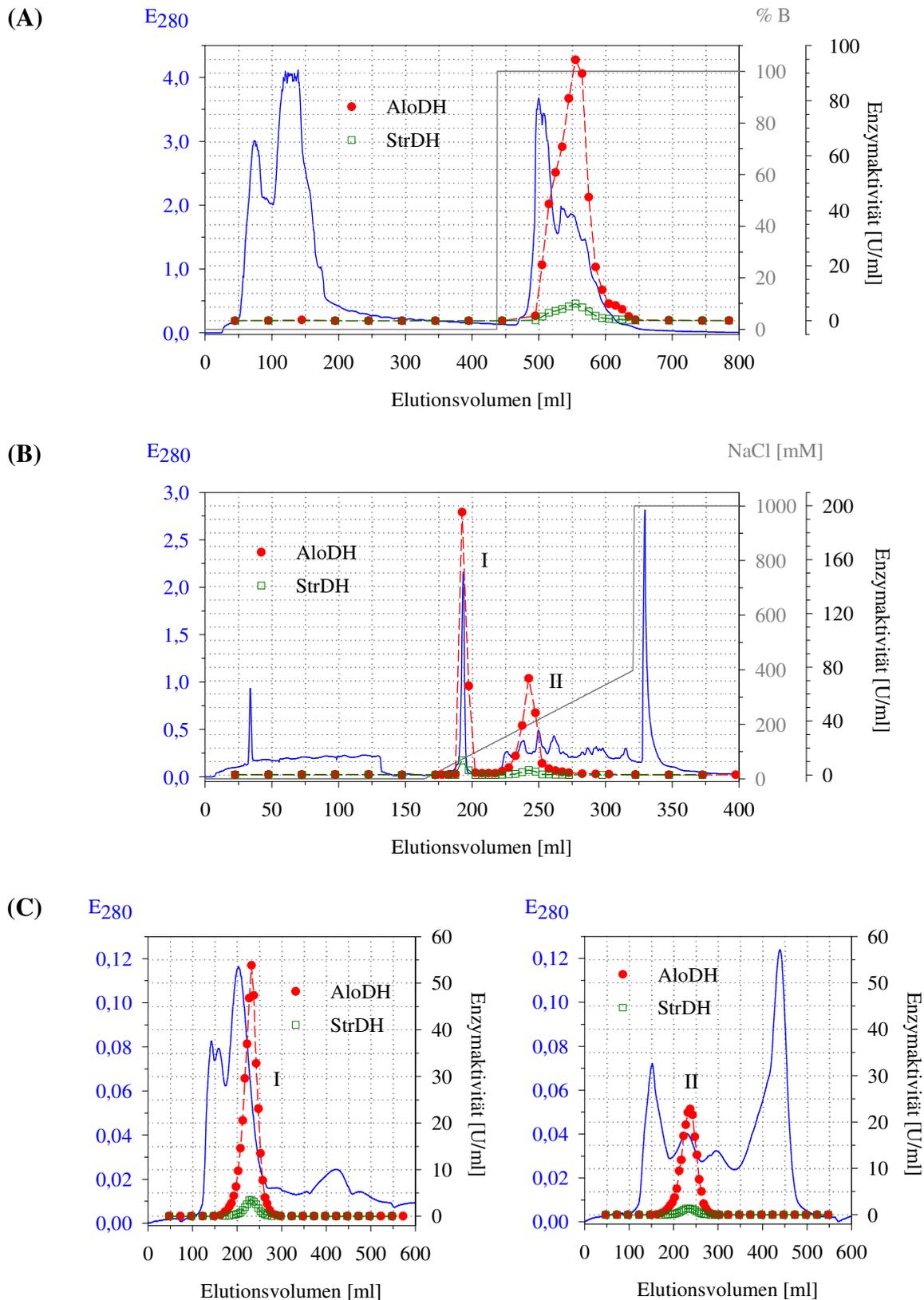


Abb. 4: Chromatographische Reinigung von ALoDHs aus *A. marina*

(A) Hydrophobe Interaktionschromatographie über Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (niedriger Substitutionsgrad, 2,6 cm x 15 cm). Aufgetragen wurde Hautmuskelschlauchextrakt nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung. Als Startpuffer dienten 50 mM Natriumphosphat pH 7,0 mit 5 mM DTT und 0,8 M Ammoniumsulfat. Die Elution von OpDHs erfolgte mit 10 % Isopropanol, 5 mM DTT. (B) Anionenaustauschchromatographie der vereinigten Fraktionen maximaler OpDH-Aktivität aus (A) über Mono Q HR10/10. Es

wurden zwei chromatographische Läufe durchgeführt, von denen hier nur einer exemplarisch dargestellt ist. Der Laufpuffer enthielt 20 mM Imidazol/HCl (pH 7,0), 2 mM EDTA und 5 mM DTT. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Dabei traten zwei deutlich separierte Alo/StrDH-Peaks auf (Peak I: Elutionsvolumen 190 bis 200 ml, 65 bis 85 mM NaCl; Peak II: Elutionsvolumen 235 bis 250 ml, 180 bis 220 mM NaCl). (C) Gelfiltration via Sephadex G100 (2,6 cm x 86 cm). Die Säule wurde mit einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 betrieben, der 2 mM EDTA, 5 mM DTT und 10 % (v/v) Glycerin enthielt. Appliziert wurden die vereinten Fraktionen des ersten (links) bzw. zweiten (rechts) Aktivitätspeaks aus beiden Mono Q-Läufen.

Tab. 1: Reinigung von AloDHs aus *A. marina*

Ausgehend von 206 g Hautmuskelschlauch wurden Wattwurm-OpDHs durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung sowie sukzessive Chromatographie über Phenyl Sepharose 6, Mono Q und Sephadex G100 gereinigt. Bei der Anionenaustauschchromatographie traten zwei Alo/StrDH-Peaks (Mono Q I und Mono Q II) auf, die nachfolgend separat weiterbearbeitet wurden (Sephadex I bzw. Sephadex II). Bei den angegebenen Aktivitäten und Gesamtproteinmassen handelt es sich um Mittelwerte von Doppelbestimmungen mit weniger als 10 % Abweichung.

Reinigungsschritt	AS	Aktivität		AloDH StrDH	Protein		spez. Akt. [U/mg]	RF
		[U]	[%]		[mg]	[%]		
Homogenisation	Ala	12246	100	9	3762	100,0	3,3	1,0
	Gly	1398	100					
2 x (NH ₄) ₂ SO ₄	Ala	8543	70	8	2117	56,3	4,0	1,2
	Gly	1048	75					
Phenyl Sepharose	Ala	4623	38	15	298	7,9	15,5	4,8
	Gly	316	23					
Mono Q I	Ala	2298	19	18	33	0,9	70,3	21,6
	Gly	131	9					
Mono Q II	Ala	1323	11	20	20	0,5	66,1	20,3
	Gly	65	5					
Sephadex I _{konz}	Ala	1206	10	13	8	0,2	147,7	45,4
	Gly	90	6					
Sephadex II _{konz}	Ala	589	5	14	5	0,1	118,2	36,3
	Gly	43	3					

Wattwürmern (206 g Frischgewicht) 12246 U AloDH- und 1398 U StrDH-Aktivität extrahiert (59 bzw. 7 U·g⁻¹ FG, Rohhomogenat mit universellem Proteasen-Inhibitor-Cocktail). Die auf das lösliche Gesamtprotein bezogenen AloDH- und StrDH-Aktivitäten des Rohhomogenats lagen bei 3,3 bzw. 0,4 U·mg⁻¹. Sie konnten durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung nur geringfügig gesteigert werden.

Als effektvoller erwies sich die anschließende hydrophobe Interaktionschromatographie. Wie Abb. 4A zeigt, konnten durch sie zahlreiche Proteine von den OpDHs abgetrennt werden. So enthielt der Durchfluß zwar viel Protein (bei Elutionsvolumina zwischen 50 und 200 ml teilweise E280 > 4), doch wiesen die zugehörigen Fraktionen kaum AloDH- und StrDH-

Aktivität auf (maximal 0,3 U/ml). Diese konzentrierte sich in den Fraktionen, die nach dem Umschalten von Hochsalzpuffer auf 10 % Isopropanol mit 5 mM DTT bei einem Elutionsvolumen von 500 bis 630 ml aufgefangen, später vereinigt und weiterverwendet wurden. Allerdings traten bei der HIC große Aktivitätsverluste auf. In den vereinigten HIC-Fractionen wurden lediglich 54 % der ALoDH- und 30 % der StrDH-Aktivität nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung wiedergefunden. Zudem verschob sich das Verhältnis von ALoDH- zu StrDH-Aktivität. Während es vor der Chromatographie bei 8 : 1 oder 9 : 1 lag, überschritt die ALoDH- danach die StrDH-Aktivität um den Faktor 15.

Bei der nachfolgenden Anionenaustauschchromatographie (Abb. 4B) wurden die vereinten HIC-Fractionen, um die Kapazität der verwendeten Mono Q-Säule nicht zu überschreiten, in zwei Portionen appliziert. Indem die Proteinlösung zweifach mit dem zugehörigen Startpuffer (20 mM Imidazol/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0) verdünnt wurde, konnte die Leitfähigkeit der Probe auf unter 5 mS gesenkt und damit das Binden der OpDHs sichergestellt werden. Die Enzyme eluierten im Verlauf eines linearen NaCl-Gradienten in zwei distinkten Peaks (bei NaCl-Konzentrationen von 65 bis 85 mM (Mono Q I) bzw. von 180 bis 220 mM (Mono Q II), Abb. 4B). In beiden übertraf die ALoDH- die StrDH-Aktivität etwa um den Faktor 20, weshalb die zugehörigen OpDHs im folgenden als ALoDHs bezeichnet werden. Insgesamt konzentrierten sich 78 % der aufgetragenen ALoDH- und 62 % der StrDH-Aktivität in nur fünf (Mono Q I zwei und Mono Q II drei) 5 ml-Fractionen je chromatographischem Lauf. Die Fractionen des ersten bzw. zweiten Peaks beider Läufe wurden vereinigt. Ihre spezifischen Enzymaktivitäten lagen um das drei- bis fünffache über denen nach der HIC.

Die vereinten Fractionen der beiden Aktivitätsmaxima wurden jeweils einer abschließenden Gelfiltration unterzogen (Abb. 4C). Maximale OpDH-Aktivitäten traten dabei nach 231 bzw. 235 ml Elutionsvolumen auf, was einem Molekulargewicht von rund 41 kd entspricht. Im Fall der Gelfiltrationschromatographie zum ersten Mono Q-Peak (Abb. 4C, links) erschienen die maximalen ALoDH- und StrDH-Aktivitäten geringfügig gegenüber dem dominierenden Proteinpeak verschoben. Der Hauptproteinpeak repräsentierte offenbar nicht die Ziel-ALoDH, überlagerte sie jedoch. Trotzdem verdoppelten beide Gelfiltrationsläufe die spezifischen ALoDH-Aktivitäten und verdreifachten die spezifischen StrDH-Aktivitäten. Die vereinigten und konzentrierten Gelfiltrationsfractionen maximaler OpDH-Aktivität (Elutionsvolumen jeweils zwischen 210 und 255 ml) besaßen mit 148 bzw. 118 U·mg⁻¹ (Sephadexlauf I bzw. II) eine um das 45- bzw. 36-fache höhere spezifische ALoDH-Aktivität als das Rohhomogenat. Bezogen auf die StrDH-Aktivität, die in den Endprodukten um den Faktor 13 bis 14 unter der ALoDH-Aktivität lag, ergaben sich etwas niedrigere Gesamtreinigungsfaktoren (30

und 23). Insgesamt wurden 8 bzw. 5 mg gereinigtes Protein erhalten, die zusammen 15 % der AloDH- und 9 % der StrDH-Aktivität des Ausgangshomogenats enthielten (Tab. 1).

Eine SDS-elektrophoretische Überprüfung des Reinigungserfolgs zeigte, daß keines der beiden Endprodukte (Sephadex I_{konz} bzw. Sephadex II_{konz}) eine homogene Proteinfraktion bildete. In der Probe Sephadex I_{konz} fanden sich neben der mutmaßlichen Zielbande eines Molekulargewichts von 42 kd noch zwei weitere stark ausgeprägte (ca. 66 kd und 26 kd) sowie diverse schwache Proteinbanden (Abb. 5, Ia). Bei Sephadex II_{konz} (Abb. 5, IIa) dominierte mit einer einzelnen 42 kd-Bande zwar offenbar die Ziel-OpDH, doch wurden auch hier feine Nebenbanden detektiert. Durch Alkylierung mit Iodacetamid verringerten sich die R_f-Werte beider AloDHs (AloDH I ∈ Sephadex I_{konz} und AloDH II ∈ Sephadex II_{konz}) von 0,50 auf 0,48 (Abb. 5, Ia und IIa versus Ib und IIb), was einer Molekulargewichtserhöhung um 3 kd entspricht. Das Laufverhalten der meisten übrigen Proteine (z. B. der 66- und 26 kd-Proteine aus Sephadex I_{konz}) veränderte sich dagegen nicht. Auch ein bandenschärfender Effekt konnte nur bei den AloDHs beobachtet werden.

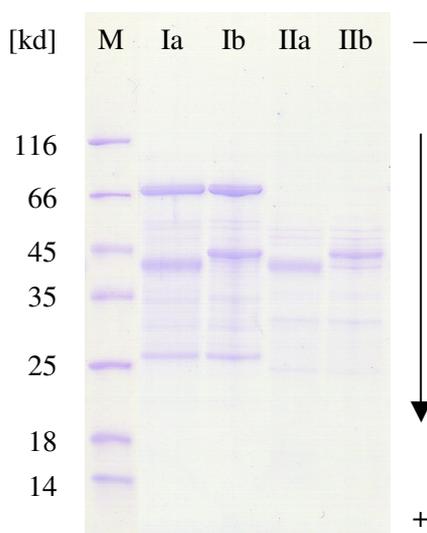


Abb. 5: SDS-PAGE gereinigter AloDHs aus *A. marina*

Aufgetragen wurden die Endprodukte der AloDH-Reinigung Sephadex I_{konz} (I, 4 µg Protein) und Sephadex II_{konz} (II, 2 µg Protein) nach reduzierender Probenvorbereitung ohne (a) oder mit Alkylierung (b). Der verwendete Marker (M) umfaßte Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14 und 116 kd. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliantblau R-350 gefärbt.

Native Disk-Elektrophoresen zur AloDH-Reinigung aus *A. marina* (Abb. 6) wurden, um einer Oxidation der Wattwurm-OpDHs während der elektrophoretischen Trennung und einem damit einhergehenden Aktivitätsverlust entgegenzuwirken (vgl. 3.3), unter N₂-Atmosphäre durchgeführt (2.5.7.1). Dennoch konnten in Spuren mit unchromatographierter Proteinlösung durch spezifische Aktivitätsfärbung keine OpDHs nachgewiesen werden (siehe auch 3.2). Der hohe Gesamtproteingehalt beispielsweise des Zentrifugats nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung (38 mg·ml⁻¹ im Fall der mit 50 % Glycerin eingefrorenen Probe, vgl. 2.5.7) machte eine verdünnte Auftragung auf das Gel (hier Verdünnungsfaktor 5) erforderlich. Wegen der

zugleich niedrigen spezifischen OpDH-Aktivität ($4,0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ AloDH und $0,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ StrDH, Tab. 1) sank damit jedoch die Menge applizierter Alo/StrDH ($0,14 \text{ U}$ AloDH und $0,02 \text{ U}$ StrDH) unter die Nachweisgrenze. So wurden in der Probe nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Zentrifugation (Abb. 6, 1) zwar insgesamt fünf Formazanbanden detektiert (drei starke Banden mit R_f -Werten von 0,29, 0,34 und 0,35 sowie zwei schwache Banden mit R_f -Werten von 0,27 und 0,41, die in Abb. 6 nur schwer zu erkennen sind), doch traten diese außer bei AloDH- oder StrDH-spezifischer Färbung auch in der zugehörigen Kontrolle ohne Opin auf, repräsentierten also offenbar keine OpDHs. Bei der durch hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigten Probe fand sich das gleiche Bandenmuster. Allerdings zeigten die vorherigen Hauptbanden deutlich geringere Intensität, während die schwachen Banden etwas besser hervortraten (Abb. 6, 2).

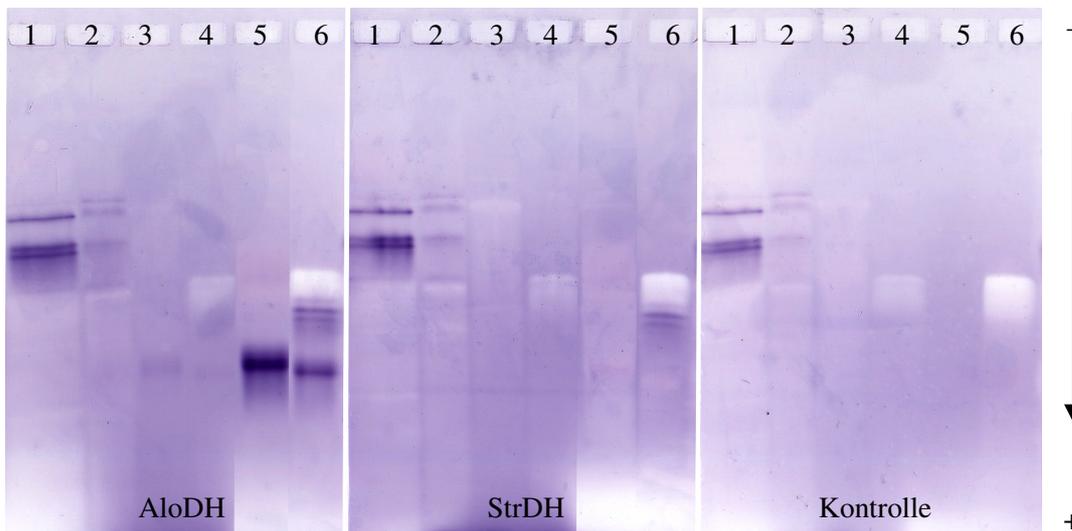


Abb. 6: Native PAGE zur AloDH-Reinigung aus *A. marina*

Die Elektrophorese erfolgte unter Stickstoffatmosphäre. Aufgetragen wurden (1) Zentrifugat nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung ($34 \mu\text{g}$ Protein, $0,1 \text{ U}$ AloDH, $0,02 \text{ U}$ StrDH), (2) vereinte Aktivitätsfraktionen der Phenyl Sepharose 6-Chromatographie ($10 \mu\text{g}$ Protein, $0,2 \text{ U}$ AloDH, $0,01 \text{ U}$ StrDH), (3) Fraktionen des ersten Mono Q-Peaks (Mono Q I, $8 \mu\text{g}$ Protein, $0,5 \text{ U}$ AloDH, $0,03 \text{ U}$ StrDH), (4) Fraktionen des zweiten Mono Q-Peaks (Mono Q II, $3 \mu\text{g}$ Protein, $0,2 \text{ U}$ AloDH, $0,09 \text{ U}$ StrDH), (5) Sephadex I_{konz} ($32 \mu\text{g}$ Protein, $4,7 \text{ U}$ AloDH, $0,4 \text{ U}$ StrDH) und (6) Sephadex II_{konz} ($15 \mu\text{g}$ Protein, $1,7 \text{ U}$ AloDH, $0,1 \text{ U}$ StrDH). Mit Ausnahme des Zentrifugats nach Ammoniumsulfatfällung wurden alle Proben unverdünnt appliziert. Nach der Trennung wurde je ein Drittel des Gels auf AloDH-, StrDH- bzw. unspezifische Redoxaktivität angefärbt. Die Färbelösungen enthielten 30 mM Alanopin oder Strombin bzw. im Fall der Kontrolle kein Opin. Gefärbt wurde 17 h im Dunkeln.

Weder die vereinten Fraktionen des ersten, noch die des zweiten Aktivitätspeaks der Mono Q-Chromatographie (Mono Q I bzw. II, Abb. 6, 3 und 4) ergaben ein deutliches Signal. Lediglich nach AloDH-Färbung ließ sich je eine diffuse Bande erahnen. Die Bande des zweiten Peaks besaß eine geringfügig weitere Laufweite als jene des ersten Peaks ($R_f = 0,57$ ver-

sus $R_f = 0,56$). Beide Banden lagen viel weiter anodisch als die zuvor beschriebenen unspezifischen Signale und fanden sich auch in den Endprodukten nach Gelfiltration (Abb. 6, 5 und 6), wo sie entsprechend der größeren Menge applizierten Enzyms (z. B. 4,7 U ALoDH bei Sephadex I_{konz} statt nur 0,5 U bei Mono Q I) intensiv gefärbt erschienen. Besonders die Probe Sephadex I_{konz} (Abb. 6, 5) ergab eine breite ALoDH-Bande, die sich im Originalgel tendenziell als Doppelbande ($R_f = 0,54$ und $0,56$) auflösen ließ. Daneben fand sich eine dritte, kaum erkennbare Bande etwas geringerer Laufweite ($R_f = 0,53$). Auch die Haupt-ALoDH-Bande der Probe Sephadex II_{konz} (Abb. 6, 6) setzte sich aus drei Unterbanden ($R_f = 0,55, 0,56$ und $0,57$) zusammen. Darüber hinaus traten hier noch drei bis vier weitere Banden geringerer Mobilität ($R_f = 0,44, 0,46, 0,48$ und $0,49$) auf. Unter ihnen zeigten die drei am weitesten kathodisch gelegenen ($R_f = 0,44, 0,46$ und $0,48$) auch schwache StrDH-Aktivität. Bei der Kontrollfärbung erzeugten weder Sephadex I_{konz} noch Sephadex II_{konz} ein Signal.

Violette Wolken nahe der Bromphenolblaufront, die sich häufig über die gesamte Breite formazangefärbter Gele erstreckten (im Gelausschnitt der Abb. 6 nicht sichtbar), wurden durch das DTT in den applizierten Proben verursacht.

3.4.2 Partielle Reinigung von StrDHs aus *A. marina*

Obwohl bei der Reinigung von Wattwurm-OpDHs gemäß 2.5.6.2 auf allen chromatographischen Säulen eine Coelution von ALoDH- und StrDH-Aktivität beobachtet werden konnte (Abb. 4), verschob sich das Aktivitätsverhältnis durch die hydrophobe Interaktionschromatographie zugunsten von ALoDH (3.4). Dieser Effekt trat nicht nur im Fall der dargestellten Musterreinigung, sondern auch bei wenigstens einem halben Dutzend ähnlicher Reinigungen auf. Regelmäßig überschritt der prozentuale StrDH-Verlust bei der HIC die prozentuale ALoDH-Abnahme (Tab. 1). Um dem nachzugehen und festzustellen, ob durch die hydrophobe Interaktionschromatographie eine oder mehrere StrDHs verloren gingen oder möglicherweise eine Konformationsänderung verursacht wurde, die sich auf die Aminosäurepräferenz der OpDHs auswirkte, kam im ersten chromatographischen Schritt alternativ ein Anionenaustauscher zum Einsatz (2.5.6.3).

Protein aus den Hautmuskelschläuchen von 250 Wattwürmern wurde nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Dialyse auf eine mit 20 mM Kaliumphosphat, 5 mM DTT (pH 7,5) äquilibrierte Fractogel DEAE-Säule aufgetragen. Rund 2 % der applizierten ALoDH- und 40 % der StrDH-Aktivität banden unter diesen Bedingungen nicht an das Säulenmaterial. Sie eluierten zwischen 45 und 100 ml, wobei in der Durchflußfraktion maximaler Aktivität die ALoDH-Aktivität mit $4,1 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ gegenüber $14,6 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ um den Faktor drei hinter der

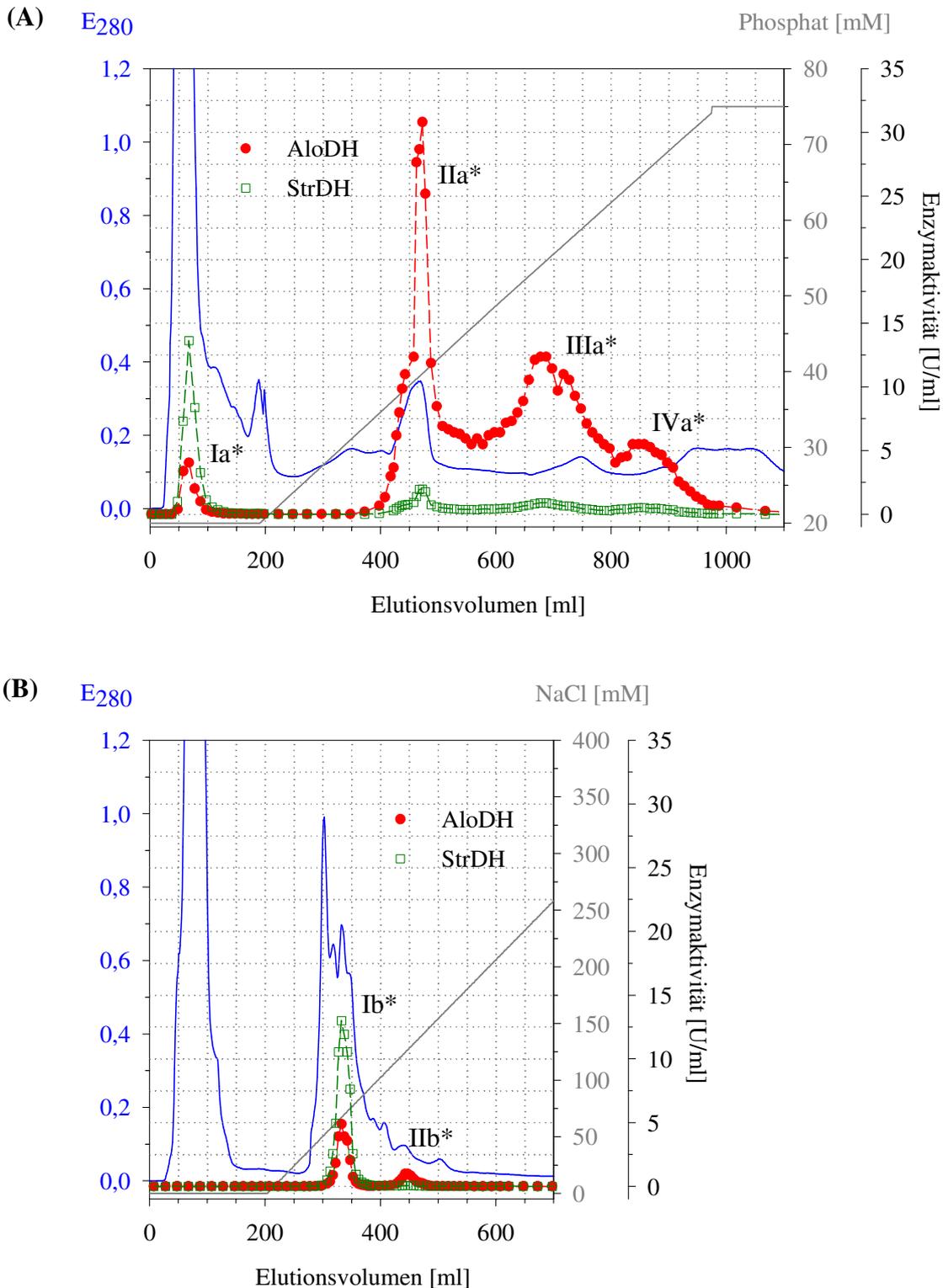


Abb. 7: Ionenchromatographische Trennung von Wattwurm-OpDHs über Fractogel EMD DEAE
 (A) Chromatographie von durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Dialyse vorgereinigtem Wattwurmextrakt in einem Puffersystem aus 20 bis 75 mM Kaliumphosphat pH 7,5 mit 5 mM DTT. Neben OpDH-Aktivität im Durchfluß (Ia*, ALoDH : StrDH = 1 : 3) traten im Verlauf eines linearen Phosphatgradienten drei weitere Aktivitätsmaxima unterschiedlichen ALoDH : StrDH-Verhältnisses auf (IIa* 16 : 1, IIIa* 14 : 1, IVa* 10 : 1). (B) Rechromatographie von Durchflußfraktionen (Peak Ia*) wie unter (A) in einem Puffersystems aus 20 mM Tris/HCl pH 8,5 mit 5 mM DTT und bis zu 400 mM NaCl. Bei dem um eine Einheit erhöhten pH-Wert banden alle OpDHs an das Säulenmaterial. Sie eluierten mit steigender NaCl-Konzentration in zwei Peaks. Während im ersten StrDH-Aktivität dominierte (Ib*, ALoDH : StrDH = 1 : 3), fand sich im zweiten fast ausschließlich ALoDH-Aktivität (IIb*, ALoDH : StrDH = 14 : 1).

StrDH-Aktivität zurückblieb (Abb. 7A). Der größte Teil der ALoDH-Aktivität (Gesamtwiederfindungsrate für ALoDH- und StrDH-Aktivität jeweils rund 70 %) eluierte erst im Verlauf eines linearen Phosphatgradienten. Dabei traten drei Peaks auf (bei rund 40, 55 und 66 mM Phosphat), die alle nur geringe StrDH-Aktivität zeigten. Während die ALoDH-Aktivität in der Maximalfraktion des ersten Peaks um das 16-fache über der StrDH-Aktivität lag ($30,8 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ versus $2,0 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), betrug das Aktivitätsverhältnis im Zentrum des zweiten Gipfels 14 : 1 ($12,4 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ gegenüber $0,9 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die Fraktion maximaler Aktivität aus dem Bereich des dritten Peaks schließlich wies zehnmal mehr ALoDH- als StrDH-Aktivität auf ($5,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ bzw. $0,5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Die Durchflußfraktionen höchster Aktivität aus einem Fractogel DEAE-Lauf wie in Abb. 7A wurden vereinigt, dialysiert und in 20 mM Tris/HCl pH 8,5 mit 5 mM DTT auf derselben Säule rechromatographiert (Abb. 7B). Die zuvor im Durchfluß befindlichen OpDHs banden unter diesen Bedingungen vollständig an den Ionenaustauscher. Sie wuschen im Verlauf eines linearen NaCl-Gradienten bei etwa 67 mM und bei 124 mM Natriumchlorid in zwei distinkten Peaks von der Säule. Während die Hauptfraktion des ersten Aktivitätsgipfels dreimal mehr StrDH- als ALoDH-Aktivität umfaßte ($13,0 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ StrDH und $4,9 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ALoDH), dominierte in der Maximalfraktion des kleineren zweiten Peaks mit $0,97 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ALoDH- gegenüber nur $0,1 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ StrDH-Aktivität eine ALoDH (Aktivitätsverhältnis 14 : 1).

Eine Analyse der bei den FG-DEAE-Chromatographien erhaltenen OpDH-Peaks durch native PAGE und anschließende Aktivitätsfärbung (2.5.7.1) ergab für die Durchflußfraktionen eines bei pH 7,5 durchgeführten Laufs (Abb. 7A, Ia*) sechs Banden, von denen die drei am wenigsten weit gelaufenen ($R_f = 0,36, 0,40$ und $0,41$) gleichermaßen bei ALoDH-, StrDH- und Kontrollfärbungen auftraten (Abb. 8, Ia*). Die übrigen ($R_f = 0,44, 0,46$ und $0,48$) wurden nur in Gegenwart von Alanopin bzw. Strombin detektiert. Der durch Rechromatographie bei pH 8,5 erhaltene Peak mit dominierender StrDH-Aktivität (Abb. 7B, Ib*) zeigte ein sehr ähnliches Bandenmuster (Abb. 8, Ib*). Allerdings fehlte hier die Bande mit R_f -Wert 0,36. Dafür ließ sich eine zusätzliche, äußerst schwache Bande mit einer relativen Laufweite von 0,42 erahnen. Da die Probe konzentrierter als die Durchflußfraktionen des ersten Laufs appliziert wurde (vgl. Bildunterschrift Abb. 8), traten alle Banden deutlicher hervor. OpDH-spezifisch waren offenbar wiederum nur die drei am weitesten anodisch gelegenen Banden ($R_f = 0,44, 0,46$ und $0,48$). Sie wiesen nach StrDH-Färbung eine größere Intensität auf als nach gleich langer Inkubation in alanopinhaltiger Reaktionslösung. Ein völlig anderes Bild ergaben die kombinierten ALoDH-Peaks der FG-DEAE-Chromatographie bei pH 7,5 (Abb. 7A und Abb. 8, IIa*-IVa*). Hier konnte nur eine diffuse, ALoDH-spezifische Bande detektiert werden,

die mit einem R_f -Wert von 0,60 eine deutlich höhere elektrophoretische Mobilität als die zuvor beschriebenen StrDHs aufwies.

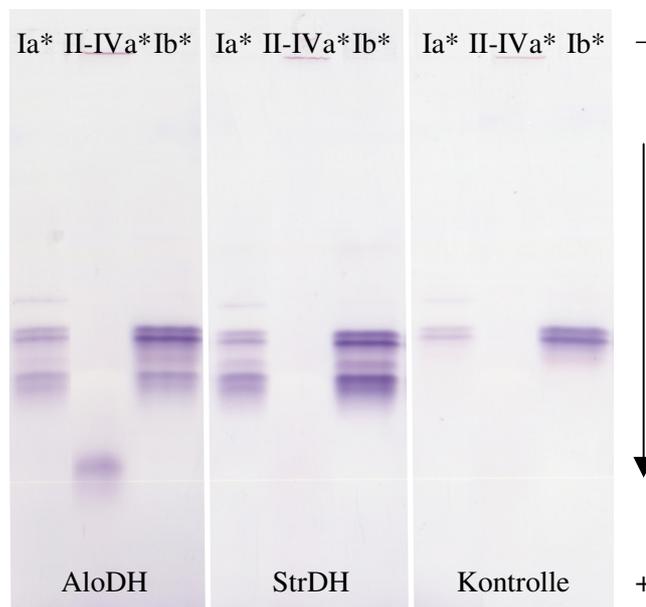


Abb. 8: Native Disk-PAGE ionenchromatographisch getrennter Wattwurm-OpDHs

Die Elektrophorese erfolgte unter N_2 -Atmosphäre. Appliziert wurden (**Ia***) die vereinten Aktivitätsfraktionen aus dem Durchfluß einer FG-DEAE-Chromatographie wie unter Abb. 7A (50 μ g Protein, 0,01 U AloDH, 0,03 U StrDH), (**II-IVa***) die vereinigten und konzentrierten AloDH-Peakfraktionen des gleichen Laufs (51 μ g Protein, 0,30 U AloDH, 0,02 U StrDH) sowie (**Ib***) die Summe vereinter, eingenger Fraktionen maximaler StrDH-Aktivität aus dem unter Abb. 7B dargestellten FG-DEAE-Lauf (62 μ g Protein, 0,04 U AloDH, 0,10 U StrDH). OpDHs wurden durch spezifische Aktivitätsfärbung in Gegenwart von 20 mM meso-Alanopin bzw. D-Strombin detektiert. Die Kontrollreaktionslösung enthielt kein Opin. Gefärbt wurde jeweils 1,5 h im Dunkeln.

Die gleichen Proben wurden auch mittels isoelektrischer Fokussierung in Trägerampholyt-gestützten pH-Gradienten analysiert (2.5.7.3). Wegen der geringen Reinheit der Enzymlösungen mußten die OpDHs auch in diesem Fall durch Formazanfärbung detektiert werden. Obwohl das in den Proteinlösungen enthaltene DTT dabei starke Hintergrundsignale in der Gelmitte verursachte und eine Reihe mutmaßlich artifizieller Signale erhalten wurden, konnte in Spuren, in denen Aliquots der StrDH-Peaks aus den FG-DEAE-Chromatographien bei pH 7,5 und 8,5 (Abb. 7, Ia* und Ib*) appliziert wurden, mindestens zwei spezifische Enzymbanden identifiziert werden (ohne Abbildung). Sie fokussierten bei isoelektrischen Punkten von 6,12 (dominierende Bande) bzw. 5,65 und zeigten beide nach StrDH-Färbung stärkere Intensität als nach gleich langer AloDH-Färbung (jeweils 25 min). Die vereinigten AloDH-Maxima (IIa*-IVa*) ergaben eine diffuse AloDH-spezifische Bande mit einem pI von 5,26.

3.4.3 Reinigung von Alo/StrDHs aus *C. gigas*

Auch aus Adduktoren der Pazifischen Auster, *C. gigas*, wurden OpDHs durch Kombination einer Reihe chromatographischer Techniken sukzessive gereinigt (2.5.6.4). Bei der in Tab. 2 zusammengefaßten Musterreinigung enthielt das Rohhomogenat aus 121 g Muskelgewebe (Adduktoren von 90 Tieren) 5544 U AloDH- und 6160 U StrDH-Aktivität (46 bzw. 51 U·g⁻¹ FG) sowie fast 3 g lösliches Gesamtprotein. Die spezifischen AloDH- und StrDH-Aktivitäten von jeweils 2 U·mg⁻¹ konnten durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung verdoppelt und durch nachfolgende Gelfiltration über eine präparative Sephadex G100-Säule nochmals um das Sieben- bis Achtfache gesteigert werden. Bedingt durch das große Volumen der verwendeten Säule (ca. 6 l) war die Gelfiltration (Chromatogramm nicht gezeigt) allerdings mit einem starken Verdünnungseffekt verbunden. Obwohl nur 18 ml Probe auf die Säule

Tab. 2: Reinigung von Alo/StrDHs aus *C. gigas*

Ausgehend von 221 g Adduktorgewebe wurden Alo/StrDHs der Pazifischen Auster durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung sowie sukzessive Chromatographie über Sephadex G100, DEAE-Sephacel und keramisches Hydroxyapatit (CHT) gereinigt. Bei der Anionenaustauschchromatographie traten drei Alo/StrDH-Peaks (DEAE I bis III) auf, die nachfolgend separat weiterbearbeitet wurden (CHT I bis III). Die angegebenen Aktivitäten und Gesamtproteinmassen entsprechen Mittelwerten von Doppelbestimmungen mit weniger als 10 % Abweichung.

Reinigungsschritt	AS	Aktivität		AloDH StrDH	Protein		spez. Akt. [U/mg]	RF
		[U]	[%]		[mg]	[%]		
Homogenisation	Ala	5544	100	0,9	2670,8	100,00	2	1
	Gly	6160	100				2	1
2 x (NH ₄) ₂ SO ₄	Ala	3490	63	0,9	739,1	27,67	5	2
	Gly	4097	67				6	2
Sephadex _{konz}	Ala	2546	46	0,8	68,4	2,56	37	18
	Gly	3101	50				45	20
DEAE I _{konz}	Ala	412	7	1,0	1,6	0,06	262	126
	Gly	430	7				273	118
DEAE II _{konz}	Ala	618	11	0,9	2,5	0,09	251	121
	Gly	688	11				280	121
DEAE III _{konz}	Ala	257	5	0,9	1,1	0,04	229	110
	Gly	281	5				250	108
CHT I _{konz}	Ala	88	2	0,9	0,1	< 0,01	783	376
	Gly	97	2				860	372
CHT II _{konz}	Ala	172	3	0,8	0,3	< 0,01	663	319
	Gly	207	3				798	346
CHT III _{konz}	Ala	68	1	0,9	0,1	< 0,01	689	331
	Gly	79	1				793	343

le aufgetragen wurden, umfaßten die Fraktionen mit mehr als 10 % der Maximalaktivität, die anschließend vereinigt wurden, ein Volumen von 680 ml. Sie wurden unter gleichzeitigem Umpuffern auf 15 ml Proteinlösung reduziert, die noch etwa 50 % der Ausgangsaktivitäten im Rohextrakt enthielt.

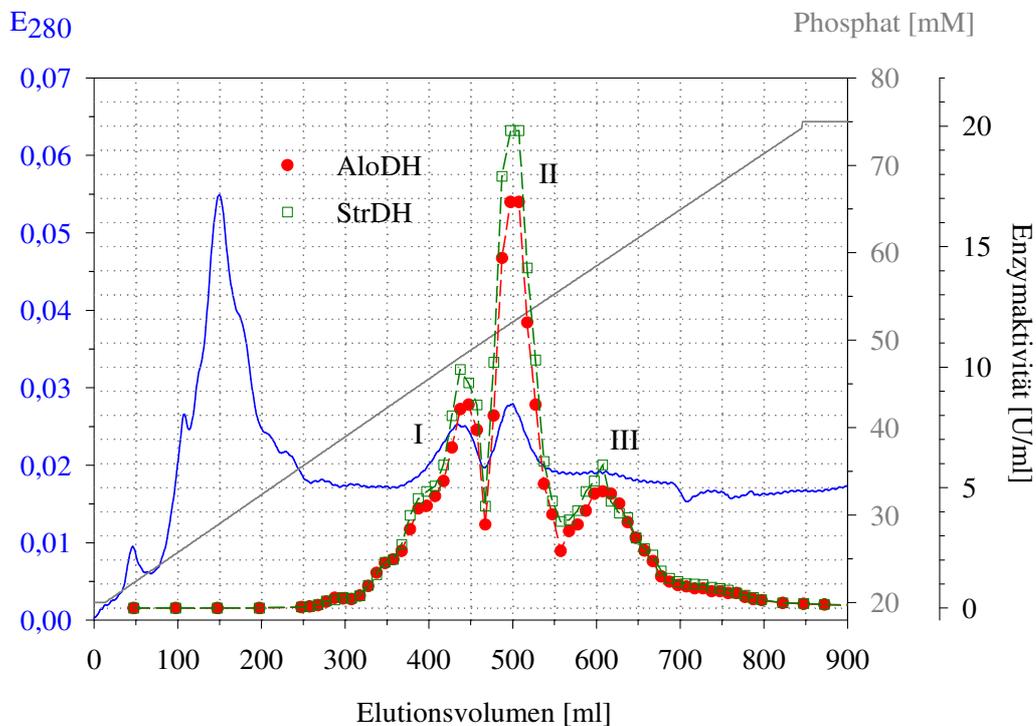


Abb. 9: Ionenchromatographische Trennung verschiedener Alo/StrDHs aus *C. gigas*

Bei der Reinigung von Austern-OpDHs wurde im zweiten chromatographischen Schritt eine Anionenaustauschchromatographie über DEAE Sephacel (2,6 cm x 25 cm) durchgeführt. Die Säule wurde mit 20 bis 75 mM Kaliumphosphat, 5 mM DTT, pH 7,5 betrieben. Aufgetragen wurde durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, Dialyse und Gelfiltration vorgereinigte, konzentrierte und geeignet umgepufferte Proteinlösung. Mit steigender Ionenstärke eluierten drei Alo/StrDH-Peaks, die nur geringfügig mehr StrDH- als AloDH-Aktivität zeigten.

Für die nachfolgende Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephacel (Abb. 9) wurde das gleiche Puffersystem (20 bis 75 mM Phosphat, 5 mM DTT, pH 7,5) verwendet wie für die bei pH 7,5 durchgeführten FG-DEAE-Läufe mit Wattwurmextrakt (Abb. 7A). Die applizierten OpDHs wurden diesmal vollständig gebunden. Sie eluierten während eines im Vergleich zu den Wattwurmchromatographien fast doppelt so steilen Phosphatgradienten (20 auf 75 mM Phosphat innerhalb von sechs statt elf Säulenvolumen) in drei Peaks, die alle ein AloDH- zu StrDH-Verhältnis von etwa 1 : 1 aufwiesen. Der erste, der bei Phosphatkonzentrationen zwischen 47 und 50 mM aufgefangen wurde (DEAE I, Elutionsvolumen 415 bis 465 ml), umfaßte rund anderthalbmal weniger Aktivität als der dominierende zweite Gipfel (DEAE II, 51 bis 53 mM Phosphat, Elutionsvolumen zwischen 480 und 520 ml), dessen

Maximalfraktion $16,9 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ AloDH- und $19,8 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ StrDH-Aktivität zeigte. Die Gesamtaktivität des dritten Peaks (DEAE III, 58 bis 61 mM Phosphat, Elutionsvolumen 585 bis 635 ml) schließlich blieb um den Faktor 2,4 hinter der des Hauptpeaks zurück. In allen drei Fällen besaßen die vereinigten, konzentrierten Peakfraktionen spezifische Enzymaktivitäten von mehr als $200 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. Das Chromatogramm aus Abb. 9 läßt erkennen, daß die Hauptproteinmenge früher als die Ziel-OpDHs (schon nach 100 bis 200 ml) eluierte.

Die vereinigten Maximalfraktionen der verschiedenen Aktivitätspeaks wurden jeweils über keramisches Hydroxyapatit (CHT) nachgereinigt. Abb. 10 zeigt exemplarisch das Chromatogramm, das mit den konzentrierten, umgepufferten Fraktionen des ersten DEAE-Peaks (Abb. 9, I) erhalten wurde. Die beiden anderen sahen ähnlich aus. Verwendet wurde stets ein Puffersystem aus 2 bis 400 mM Kaliumphosphat pH 6,8 mit 5 mM DTT. Alo/StrDHs eluieren im Verlauf eines linearen Gradienten von 2 auf 20 mM Phosphat (bei DEAE I und III zwischen 12 und 14 mM, bei DEAE II zwischen 11 und 12 mM Phosphat). Vereinigt und konzentriert wurden je neun bzw. elf 2 ml-Fractionen maximaler OpDH-Aktivität.

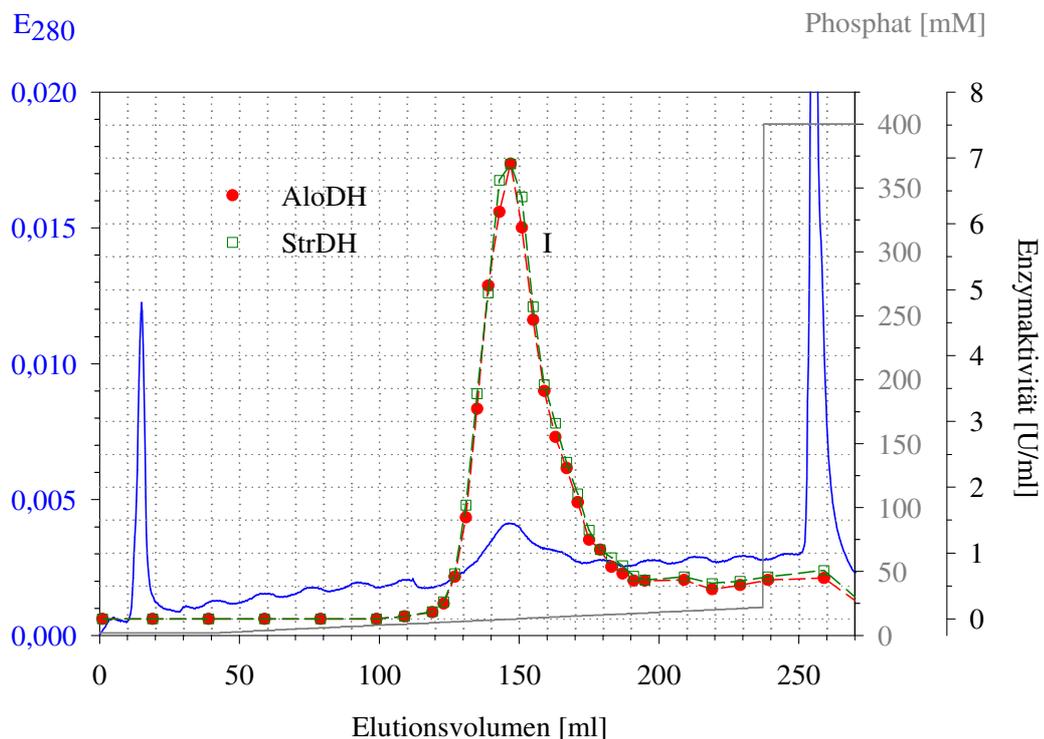


Abb. 10: CHT-Chromatographie der Alo/StrDH I aus *C. gigas*

Durch Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration und Anionenaustauschchromatographie vorgereinigte Austern-OpDHs wurden abschließend einer Chromatographie über keramisches Hydroxyapatit (CHT, 1,6 cm x 8 cm) unterzogen. Die drei ionenchromatographisch getrennten Isoformen (DEAE I bis III, Abb. 9) wurden separat appliziert. Exemplarisch dargestellt ist der Lauf mit DEAE I. Als Laufmittel dienten 2 bis 400 mM Kaliumphosphat mit 5 mM DTT, pH 6,8. Maximale AloDH- und StrDH-Aktivitäten (Verhältnis etwa 1 : 1) traten im Verlauf eines linearen Gradienten von 2 auf 20 mM Phosphat auf.

Alle Endprodukte, die zusammen 6 % der Ausgangsaktivitäten im Rohextrakt umfaßten, besaßen spezifische AloDH- und StrDH-Aktivitäten zwischen 700 und 900 U·mg⁻¹ (Tab. 2). Somit wurde gegenüber dem Rohextrakt eine mehr als 300-fache Reinigung erzielt. Anders als bei der Anreicherung von Wattwurm-OpDHs blieb während aller Schritte ein gleichbleibendes AloDH- zu StrDH-Aktivitätsverhältnis von 1 : 1 erhalten. Je Isoform wurden 0,1 bis 0,3 mg Protein isoliert, das auf silbergefärbten SDS-Gelen homogen erschien (Abb. 11). Für alle Isoenzyme ergab sich SDS-elektrophoretisch ein Molekulargewicht von 44 kd.

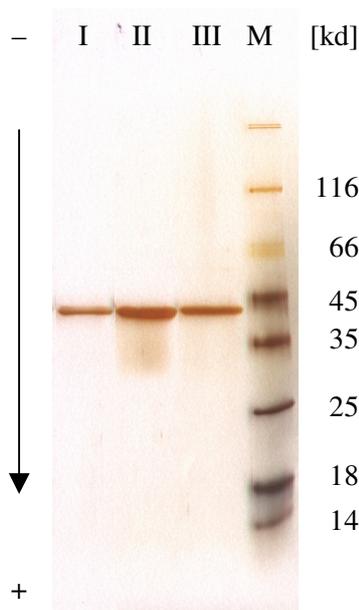


Abb. 11: SDS-PAGE zur Alo/StrDH-Reinigung aus *C. gigas*

Analysiert wurden die verschiedenen Aktivitätspeaks der DEAE-Chromatographie aus Abb. 9 nach zusätzlicher Reinigung über keramisches Hydroxyapatit (I bis III entsprechend CHT I bis III). Die Masse applizierten Gesamtproteins betrug: I = 0,5 µg, II = 1,1 µg, III = 0,4 µg. Als Marker (M) dienen Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14 und 116 kd. Alle Proben wurden einer reduzierenden Probenvorbereitung ohne Iodacetamid unterzogen. Proteine wurden durch Silberfärbung detektiert.

Die gereinigten Alo/StrDHs aus *C. gigas* wurden auch durch native Disk-PAGE mit anschließender Coomassie- und Aktivitätsfärbung analysiert (Abb. 12). Bei letzterer traten nur AloDH- und StrDH-spezifische Banden auf. Sie erschienen nach Inkubation in alanopin- bzw. strombinhaltiger Reaktionslösung gleich intensiv. Von fünf elektrophoretisch unterscheidbaren Isoformen mit R_F-Werten zwischen 0,41 und 0,48, die im Dialysat nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung (Abb. 12, E) detektiert wurden, konnten durch die Reinigung drei (R_F = 0,43, 0,45 und 0,46) isoliert werden. Die elektrophoretische Mobilität der Isoformen variierte entsprechend deren Verhalten auf DEAE-Sephacel (Abb. 9). Je später im Phosphatgradient eine Isoform vom Anionenaustauscher eluierte, desto mobiler verhielt sie sich in der nativen PAGE. Alle Enzympräparationen waren mit Spuren der jeweils anderen Isoformen kontaminiert.

Isoelektrische Fokussierungen in Trägerampholyt-Gradienten von pH 3,9 bis 9,5 sowie in immobilisierten pH-Gradienten zwischen pH 4,0 und 7,0 (2.5.7.3) zeigten ebenfalls, daß die verschiedenen Enzympräparationen ein Gemisch jeweils mehrerer Isoformen darstellten. Ob-

wohl bei Trägerampholyt-IEFs mit anschließender Coomassiefärbung jede Enzymfraktion auf den ersten Blick nur eine breite, diffuse Bande ergab (Abb. 13, links), fiel bei näherem Hinsehen eine Inhomogenität vor allem der Alo/StrDH II auf. So wurde die breite Bande an der anodischen Front durch eine feine Doppelbande begrenzt. Eine solche fand sich teilweise (nicht im Fall der IEF aus Abb. 13) auch bei der dritten Enzymform. Wegen der nur mäßigen Auflös- und Reproduzierbarkeit der feinen Einzelbanden wurden in allen Fällen ausgehend vom Zentrum der jeweiligen Gesamtbande durchschnittliche isoelektrische Punkte ermittelt. Drei Trägerampholyt-Fokussierungen mit Fokussierungszeiten von 90 bzw. 120 min ergaben für die Alo/StrDH I einen pI von $5,30 \pm 0,09$. Dagegen fokussierte die zweite Isoform bei $\text{pH } 5,22 \pm 0,08$ und die dritte bei einem $\text{pH } 5,15 \pm 0,03$.

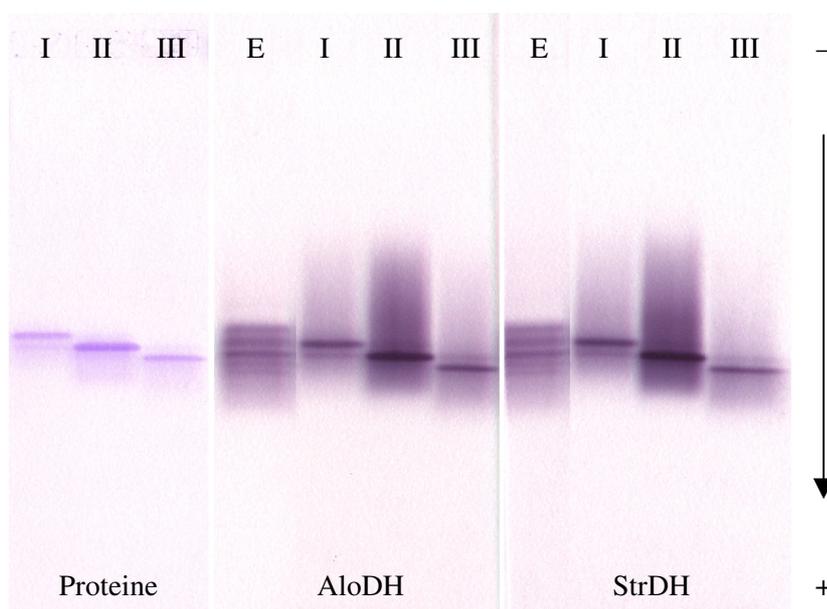


Abb. 12: Native Disk-PAGE zur Reinigung von Alo/StrDHs aus *C. gigas*

Appliziert wurden (**E**) Austernextrakt nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Dialyse ($28,4 \mu\text{g}$ Protein, $0,13 \text{ U}$ AloDH, $0,16 \text{ U}$ StrDH) sowie (**I - III**) die gleichen chromatographisch OpDHs wie in Abb. 11 (I: $0,7 \mu\text{g}$ Protein, $0,54 \text{ U}$ AloDH, $0,59 \text{ U}$ StrDH, II: $1,7 \mu\text{g}$ Protein, $1,10 \text{ U}$ AloDH, $1,32 \text{ U}$ StrDH, III: $0,6 \mu\text{g}$ Protein, $0,44 \text{ U}$ AloDH, $0,51 \text{ U}$ StrDH). In einem Teil des Gels wurden mit Coomassie-Brilliantblau R-350 Proteine detektiert, während der Rest einer AloDH- bzw. StrDH-spezifischen Aktivitätsfärbung unterzogen wurde (45 min mit 20 mM meso-Alanopin bzw. D-Strombin in der Reaktionslösung). Kontrollfärbungen ohne Opin (nicht dargestellt) ergaben kein Signal.

Erst der flachere pH-Gradient der IPG-Fokussierungen erlaubte eine stärkere Differenzierung. Wie Abb. 13 (rechts) zeigt, konnten hier vor allem die ersten beiden Isoformen in mehrere, deutlich separierte Unterbanden aufgespalten werden. Die Alo/StrDH I umfaßte zwei Proteinformen mit isoelektrischen Punkten von $5,30$ und $5,24$ (Mittelwerte zweier Fokussierungen mit $3,5$ bzw. 5 h Fokussierungsdauer, 9000 bzw. 14000 Vh). Eine bei $\text{pH } 5,24$ fokus-

sierende Bande trat auch bei der Alo/StrDH II auf. Daneben fanden sich hier zwei weiter anodisch gelegene Banden (pI = 5,14 bzw. 5,06), die ihrerseits wiederum Doppelbandencharakter besaßen. Banden dieser isoelektrischen Punkte wurden auch bei der Alo/StrDH III detektiert. Während jene mit pI 5,06 die Hauptkomponente der Alo/StrDH III bildete, ließ sich die andere nur erahnen. Ebenfalls nur schwach erkennbar war ein drittes Signal, für das ein pI von 4,98 ermittelt wurde.

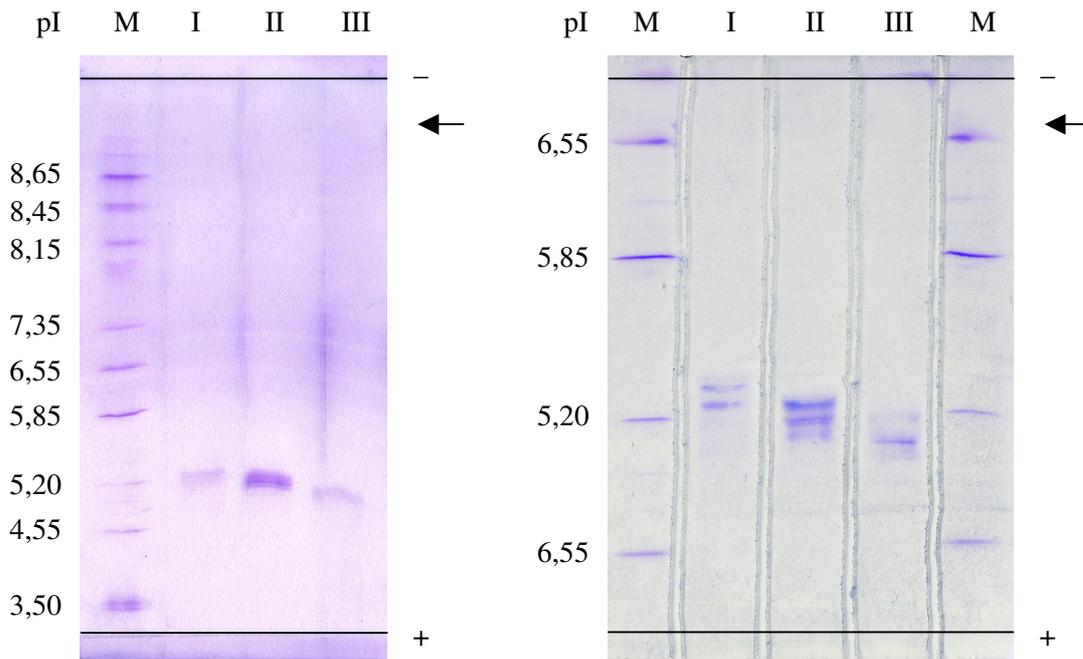


Abb. 13: Isoelektrische Fokussierung verschiedener Alo/StrDHs aus *C. gigas*

Die gereinigten Austernisozyme I bis III wie in Abb. 11 und Abb. 12 wurden auch durch isoelektrische Fokussierung in Trägerampholyt-Gradientengelen (pH 3,5 bis 9,5, links) sowie in immobilisierten pH-Gradienten (pH 4,0 bis 7,0, rechts) analysiert. Aufgetragen wurden bei der Trägerampholyt-IEF bzw. IPG-Fokussierung: (I) 0,5 bzw. 2,4 µg Protein, (II) 1,1 bzw. 2,8 µg Protein, (III) 0,4 bzw. 2,2 µg Protein. Als Marker dienten Standardproteine der angegebenen isoelektrischen Punkte. Der Pfeil markiert die Probenauftragsstelle (1 cm Abstand zur Kathode, beim Proteinstandard davon abweichend 7 cm). Die Fokussierungszeit betrug im Fall der IEF mit Trägerampholyten 90 min (ohne Vorfokussierung, Probenauftrag und Bandenschärfen), bei der IPG-Fokussierung 5 h. Proteine wurden mit Coomassie-Brilliantblau R-350 detektiert.

3.5 Bestimmung des Molekulargewichts verschiedener OpDHs

MALDI-Massenspektrometrie (2.5.9) lieferte für Alo/StrDHs aus *A. marina* und *C. gigas*, die wie unter 2.5.6.2 und 2.5.6.4 gereinigt wurden, Molekulargewichte von $45,1 \pm 0,1$ kd (Wattwurm) bzw. $44,3 \pm 0,1$ kd (Pazifische Auster). Größenunterschiede zwischen einzelnen Isoformen einer Art konnten nicht manifestiert werden. Allerdings traten in den Spektren der Austernisozyme I und II neben den dominierenden Monomeren auch stabile Dimere auf.

Gelfiltrationschromatographisch ergab sich für die OpDHs beider Arten eine etwas geringere Masse von nur 43 kd (2.5.6.1). Als Ausgangsmaterial dienten in diesem Fall Gewebemomogenate nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Dialyse. Es fanden sich keine Hinweise auf aktive Di- oder sonstige Oligomere. Das gleiche gilt für Extrakte aus *O. edulis* und *S. nudus*. Während die AloDHs und StrDHs der Europäischen Auster ebenfalls ein apparentes Molekulargewicht von 43 kd zeigten, betrug das der Spritzwurm-OpDHs rund 40 kd. Bei allen Arten wurde eine Coelution der verschiedenen OpDH-Aktivitäten beobachtet. Das AloDH-, StrDH- und im Fall von *S. nudus* auch das ODH-Aktivitätsmaximum differierten um maximal eine 5 ml-Fraktion, was einer Abweichung von 2 bis 3 kd entspricht.

SDS-elektrophoretisch schließlich resultierte für die Wattwurm-AloDHs ein Molekulargewicht von 43 ± 1 kd und für die Alo/StrDHs aus *C. gigas* eine Masse von 44 ± 1 kd (jeweils $n = 4$ Gele, vgl. 3.4 und 3.4.3).

3.6 Peptidsequenzierungen

Die N-terminale Edman-Sequenzierung (2.5.8.1) gereinigter OpDHs aus *A. marina* und *C. gigas* (AloDH I und II aus *A. marina* sowie Alo/StrDH I bis III aus *C. gigas*, vgl. 3.4 und 3.4.3) lieferte, obwohl die Intensität der verwendeten OpDH-Banden nach Färbung mit Coomassie-Brilliantblau R-350 auf eine ausreichende Proteinmenge hindeutete und Vorsichtsmaßnahmen ergriffen wurden, um eine artifizielle Blockade des N-Terminus zu vermeiden, nur sehr geringe Signalstärken. Entsprechend wurde nur wenig, teils unsichere Sequenzinformation gewonnen. Vor allem für die Austern-Alo/StrDHs II und III resultierten keine zuverlässigen Sequenzen.

Am I	D	[S (R)]	D	I	T	(T)	-	L	(L)	I
Am II	(D)	[DGS]	D	I	T	(T)	(E)	L	(L)	I
Cg I	-	[LT]	[EK]	N	K	[LV]	K	V	-	[VA]
Cg II	-	(L)	[VE]	-	-	-	-	-	-	-
Cg III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Abb. 14: N-Terminus verschiedener Alo/StrDHs aus *A. marina* und *C. gigas*

Wie unter 2.5.6.2 bzw. 2.5.6.4 (ohne CHT-Chromatographie) gereinigte Wattwurm-AloDHs (Am I und II) sowie Alo/StrDHs der Pazifischen Auster (Cg I bis III) wurden nach Alkylierung und SDS-Elektrophorese auf PVDF geblottet und einer Proteinsequenzierung nach Edman unterzogen. Die ersten zehn N-terminalen Aminosäuren der verschiedenen Enzyme konnten nur partiell ermittelt werden. - = vorhandene, aber nicht identifizierbare Aminosäure, (X) = vermutlich Aminosäure X, [XYZ] = Aminosäure X, Y oder Z

Wie aus Abb. 14 hervorgeht, stimmten die beiden ionenchromatographisch separierten AloDHs des Wattwurms offenbar in ihren ersten zehn N-terminalen Aminosäuren überein. Sie unterschieden sich jedoch deutlich von denen des ersten *Crassostrea*-Isozyms. Die mutmaßlichen Aminosäuren zwei und drei der *Crassostrea*-Alo/StrDH II korrelierten mit denen, die an diesen Positionen in der Alo/StrDH I vermutet wurden.

Um trotz des geringen Erfolgs des Edman-Abbaus ausreichende Sequenzinformationen zur Konstruktion von Primern für die Amplifikation partieller OpDH-Gene zu erlangen und der Frage nachzugehen, ob die chromatographisch separierbaren Alo/StrDHs des Wattwurms bzw. der Pazifischen Auster in ihrer Aminosäuresequenz oder nur durch etwaige posttranslationale Modifikationen bzw. unterschiedliche Faltung differieren, wurden zusätzlich tryptische Spaltpeptide durch Tandemmassenspektrometrie sequenziert (2.5.8.2). Zwecks Primerentwicklung wurden von Dr. Markus Piotrowski am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum zunächst nur Peptide der Wattwurm-AloDH I sowie der Austern-Alo/StrDH II analysiert. Ergänzend sequenzierte Dr. Sabine Metzger (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) später Spaltpeptide beider Wattwurm-AloDHs (Am I und II) sowie der drei *Crassostrea*-Isozyme (Cg I bis III). Während im Fall der AloDH I aus *A. marina* in Bochum und Düsseldorf Material der gleichen Präparation eingesetzt wurde, fanden Austern-OpDHs unterschiedlicher Chargen Verwendung. Die im BMFZ bearbeiteten Alo/StrDHs wurden anders als jene, die Dr. Markus Piotrowski zur Verfügung gestellt wurden, nach DEAE-Sephacel-Chromatographie zusätzlich über keramisches Hydroxyapatit gereinigt (2.5.6.4). Eine Sequenzierung von Peptiden der Wattwurm-StrDH (Abb. 7, Ib*) war nicht möglich, da das Enzym nach sukzessiver FG-DEAE-Chromatographie bei pH 7,5 und 8,5 (2.5.6.3) nicht in der erforderlichen Reinheit vorlag.

Die in Bochum und Düsseldorf für die AloDHs aus *A. marina* ermittelten Peptidsequenzen stimmen weitgehend überein (Tab. 3). Alle von Dr. Markus Piotrowski erhaltenen Sequenzen wurden durch Dr. Sabine Metzger unabhängig bestätigt. Nur am N-Terminus des Peptids 639,85_3+ (6) fand letztere Leucin statt Asparagin, während an Position 8 Asparagin anstelle von Aspartat auftrat. Das Peptid 715,27_2+ (3) konnte zwar gleich dreifach verifiziert werden, doch kam auch eine Variante mit N-terminalem Pyroglutamat (E*) vor. Sequenzunterschiede zwischen den beiden Wattwurm-AloDHs wurden nicht festgestellt. Die meisten Peptide traten bei beiden Enzymformen auf (violette Schriftfarbe in Tab. 3). Andere fanden sich nur bei der AloDH I (rote Schrift). Diese Probe wies im Vergleich zur AloDH II eine höhere Proteinkonzentration auf und lieferte daher stärkere Signale.

Tab. 3: Sequenzierung tryptischer Peptide der Wattwurm-AloDHs I und II mittels ESI-Q-TOF-MS

Die in Klammern gesetzten Angaben hinter den einzelnen Peptiden beschreiben deren Masse und Ladung und bezeichnen die Isoenzyme, bei denen sie identifiziert wurden. Peptide, die nur bei der AloDH I gefunden wurden, sind in **rot**, solche, die bei der AloDH I und II auftraten, in **violett** dargestellt. AloDH II-spezifische Peptide (blau) wurden nicht erhalten. Aminosäuren, die bei unabhängigen Mehrfachsequenzierungen differierten, sind grau unterlegt, nicht sicher identifizierte Aminosäuren eingeklammert. Alternativmöglichkeiten werden durch eckige Klammern und Schrägstriche angezeigt. Leucin und Isoleucin lassen sich massenspektrometrisch nicht unterscheiden und sind somit in den angegebenen Sequenzen beliebig gegeneinander austauschbar. Sternchen markieren modifizierte Aminosäuren (z. B. alkylierte Cysteine oder Pyroglutamat). Die Peptide 430,17_2+, 715,27_2+, 620,19_2+, 639,85_3+, 959,29_2+, 648,22_2+, 817,78_2+ und 927,25_2+ wurden am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhruniversität Bochum, die übrigen im BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sequenziert.

1	IEEFGR (375,74_2+, I+II)
2	VVLWSQK (430,17_2+, I) = VVLWSQK (430,30_2+, I)
3	QQLVGALLYGDPR (477,32_3+, I+II) = QQLVGALLYGDPR (715,47_2+, I+II) = (Q)(Q)LVGALLYGDPR (715,27_2+, I) ≈ E*QLVGALLYGDPR (706,96_2+, I)
4	WWNWDGR (510,29_2+, I)
5	EYLV DSTLSGR (620,19_2+, I) = EYLV DSTLSGR (620,38_2+, I+II)
6	LLIC*GGGDGAHAYAGIASSK (640,07_3+, I+II) ≈ (N)LIC*GGGNGAHAYA(G)(I)ASSK (639,85_3+, I) ≈ ...GAHAYA(G)IASSK (959,29_2+, I)
7	VLTLYSDEAER (648,22_2+, I) = VLTLYSDEAER (648,40_2+, I+II)
8	YGLTTIDQILGYD (736,45_2+, I+II)
9	[YI/IY]TEDIPFGLVVL R (817,78_2+, I) = YIT EDIPFGLVVL R (818,66_2+, I+II)
10	...TLVSFESLPWAC*R (927,25_2+, I) ≈ QC*TLVSFESLPWAC*R (927,54_2+, I+II)
11	...SDET(P)... (874,70_2+, I)

Auch diverse *Crassostrea*-Peptide wurden mehrfach unabhängig verifiziert. Dabei traten allerdings im Vergleich zu den Wattwurm-AloDHs mehr Unterschiede auf (Tab. 4). Beispielsweise folgten beim Peptid 417,77_2+ (3) auf Prolin und Phenylalanin die Aminosäuren Aspartat und Threonin, während das N-terminal um Glycin und Serin verlängerte Peptid 489,73_2+ (3) an diesen Stellen Glutamat und Serin aufwies. Beide Varianten fanden sich bei der Alo/StrDH II, wurden allerdings ausgehend von unterschiedlichen Austernpräparationen erhalten (II versus II* in Tab. 4). Zusätzlich trat bei allen drei Isoformen ein Alternativpeptid mit Hydroxylysin am N-Terminus auf (489,77_2+, ebenfalls unter 3). Die Peptide 577,26_2+ und 577,31_2+ (beide unter 6) unterschieden sich in den Positionen sieben und neun, wobei Threonin gegen Aspartat und Leucin gegen Valin ausgetauscht war. Auch von den Fragmenten 693,05_3+ (9), 731,35_2+ (11), 784,87_2+ (15) und 846,36_3+ (18) wurden Alternativvarianten sequenziert. Während manche Spaltpeptide ausschließlich bei der *Crassostrea* Alo/StrDH I nachgewiesen werden konnten (rote Schriftfarbe in Tab. 4), fanden sich viele andere nur im höher konzentrierten Verdau der Alo/StrDH II bzw. II* (blaue Schrift). Je ein

Tab. 4: ESI-Q-TOF-Sequenzierung tryptischer Peptide der Alo/StrDHs I bis III aus *C. gigas*

Die in Klammern gesetzten Angaben hinter den einzelnen Peptiden beschreiben deren Masse und Ladung und bezeichnen die Isoenzyme, bei denen sie identifiziert wurden. Peptide, die nur bei der Alo/StrDH I gefunden wurden, sind in **rot**, solche, die nur bei der Alo/StrDH II bzw. III auftraten in **blau** bzw. **grün** dargestellt. Die Mischfarben **violett** und **braun** charakterisieren Peptidsequenzen, die bei den Isoformen I und II bzw. bei I und III nachgewiesen wurden. Peptide, die bei allen drei chromatographisch separierten Enzymformen vorkamen sind in **schwarzer** Schrift wiedergegeben. Bei unabhängigen Mehrfachsequenzierungen differierende Aminosäuren sind grau unterlegt, nicht sicher identifizierte Reste eingeklammert. Alternativmöglichkeiten werden durch eckige Klammern und Schrägstriche angezeigt. Leucin und Isoleucin lassen sie sich massenspektrometrisch nicht unterscheiden und sind somit in den angegebenen Sequenzen beliebig gegeneinander austauschbar. Sternchen markieren modifizierte Aminosäuren (z. B. Hydroxylysin, alkyliertes Cystein oder oxidiertes Methionin). Die Alo/StrDH II* entstammte einer anderen Enzymreinigung als die mit I, II und III bezeichneten Isoformen. Die ihr zugehörigen Peptide wurden nicht im BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, sondern am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhruniversität Bochum sequenziert.

1	LIEFGR (367,73_2+, I-III)
2	SILHPQQLGSK (403,21_2+, II*)
3	PFDTVQK (417,77_2+, II) ≈ GSPFESVQK (489,73_2+, II*) ≈ K*PFDTVQK (489,77_2+, I-III)
4	LVQILGFK (459,27_2+, II*) = LVQILGFK (459,32_2+, I-III)
5	VSQQLFDV (468,27_2+, I)
6	WSSYDGTPLK (577,26_2+, II*) ≈ WSSYDGDVPK (577,31_2+, I-III)
7	...FESLPWAC*R (613,35_2+120, II)
8	VLTLFADEAER (632,31_2+, II*) = VLTLFADEAER (632,36_2+, I-III)
9	...LLVTMVNSD[SG/GS][SR/RS/DK] (693,05_3+, I+II) ≈ ...LLVTM*VNSD[SG/GS][SR/RS/DK] (698,38_3+, I)
10	EKPLFYQGVDEK (726,84_2+, II*) = EKPLFYQGVDEK (726,93_2+, II)
11	LLSGVSDEC*LALGK (731,35_2+, II*) ≈ LLSGVSDECLATAGK (731,41_2+, I+II) ≈ LLSGVSD...GK (807,45_2+, II)
12	LQQEYLVGSQLSGK (775,34_2+, II*)
13	QLQEYDPGSIQSGK (775,45_2+, I)
14	...QNYIAV...(K) (782,36_2+, II*) ≈ ELQNYIAVHLMK (486,99_2+, II)
15	YTAEDVPF(I)VVMK (784,87_2+, II*) = YTAEDVPFGIVVMK (784,90_2+, I) ≈ YTAEDVPF(I)VVM* (792,86_2+, II*) ≈ YTAEDVPFGIVVM*K (792,94_2+, II)
16	[VS/SV/GE/EG/DA/AD]GLAQIVTPFLDEVITWAQGK (791,41_3+, I)
17	TQENGQFVPDFSYR (843,97_2+, III)
18	EAASGADVIFIVV(P) (846,36_3+, II*) ≈ [TV/VT/AE/EA]ASQDVIFIVV (846,50_3+, I+III)

Peptid trat exklusiv bei der dritten (grün) bzw. bei der ersten und dritten (braun) Isoform auf. Darüber hinaus kamen zwei Sequenzen nur bei den Alo/StrDHs I und II (violett), andere bei allen drei Isoformen (schwarze Schrift) vor. Die beobachteten Sequenzunterschiede ließen sich nicht mit den drei chromatographisch separierbaren Enzymvarianten korrelieren, sondern

schiene eher von der jeweiligen Austercharge abzuhängen. Fast alle *Crassostrea*- und Wattwurm-Peptide konnten molekularbiologisch ermittelten OpDH-Sequenzen der jeweiligen Art zugeordnet werden (siehe 3.7, Abb. 16 und Abb. 17).

3.7 OpDH-Sequenzen aus *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* und *S. nudus*

Die massenspektrometrisch sequenzierten OpDH-Peptide aus Wattwurm und Pazifischer Auster (3.6) wurden genutzt, um degenerierte Primer zur partiellen Amplifikation der zugehörigen Gene zu konstruieren. PCRs mit entsprechenden Oligonukleotiden (2.6.5.1 und Tab. 8, S. 277) lieferten OpDH-Teilstücke nicht nur aus *A. marina* und *C. gigas*, sondern auch aus *S. nudus* und *O. edulis*. Während im Fall von Watt- und Spritzwurm jeweils ein rund 400 bp umfassendes Fragment erhalten wurde, ergaben sich für die Austern *C. gigas* und *O. edulis* interne OpDH-Abschnitte von etwa 700 bzw. 600 bp Länge (8.2). Ausgehend von den Sequenzen der Fragmente konnten art- und OpDH-spezifische Primer (8.1, Tab. 9 und Tab. 10) entwickelt werden, die nachfolgend auch die Amplifikation passender cDNA-Enden ermöglichen.

Weil die verwendete RACE-cDNA (2.6.4) gering konzentriert war und zudem die Bildung unspezifischer Amplifikate minimiert werden sollte, wurden verschachtelte RACE-PCRs durchgeführt, bei denen das verdünnte Produkt der Erst-PCR als Template einer zweiten Amplifikation diente (2.6.5.2). Die verschiedenen RACE-PCRs lieferten teils nur ein einzelnes spezifisches Produkt, teils mehrere elektrophoretisch separierbare Banden. Einige von diesen wurden auch bei Einzelprimertests mit nur einem Oligonukleotid im Reaktionsansatz erhalten und stellten somit offensichtlich Artefakte dar. Andere erschienen zunächst spezifisch, konnten jedoch durch Sequenzierung als Teilgene ribosomaler Proteine identifiziert werden. Zugleich wurden bei einer PCR häufig zwei und mehr OpDH-Fragmente unterschiedlicher Größe erhalten (Tab. 14 bis Tab. 17, S. 281 folgende). So ergab die 5'-RACE im Fall des Wattwurms dreierlei OpDH-Teilstücke mit Längen zwischen 300 und 450 bp. Bei den kleineren Fragmenten handelte es sich bis auf minimale Differenzen in einzelnen Nukleotidpositionen um 5'-terminal verkürzte Teilstücke der größeren. Dasselbe traf auf die 350 und 400 bp umfassenden 5'-Enden zu, die für *O. edulis* erhalten wurden. Die 3'-Wattwurm-RACE lieferte neben einem 2,2 kb-Zielamplifikat ein um 900 bp kürzeres Produkt, dem offenbar ein für das offene Leseraster essentielles Zwischenstück fehlte. Dagegen unterschieden sich zwei 3'-Enden des Spritzwurm (2,8 und 1,8 kb) fast ausschließlich im nicht codierenden Bereich. Aus der 5'-RACE von Spritzwurm-OpDHs und der 3'-RACE von OpDHs der Europäischen Auster resultierte nur jeweils ein 170 bp bzw. knapp 1 kb langer OpDH-Terminus.

Im Fall von *C. gigas* wurden mittels genspezifischer RACE-Primer, die gegen ein 658 bp umfassendes internes OpDH-Fragment (Int_Cg23, Abb. 15) gerichtet waren, zunächst 3'-Enden zweierlei Länge (1,4 versus 1,3 kb) erhalten. Basierend auf insgesamt fünf entsprechenden Amplifikaten ergab sich eine 1363 bp umfassende Konsensussequenz mit 39 uneindeutigen Positionen (3'-Contig_Cg29+30+31+42+43, Abb. 15). Sie stimmt im Überlappungsbereich 100%ig mit dem Ausgangsfragment Int_Cg23 überein. Von Int_Cg23 startende 5'-RACE-PCRs lieferten dagegen ausschließlich unspezifische, lediglich in der Primerregion zu dem internen Teilstück passende Amplifikate. Obwohl diverse Kombinationen gegen Int_Cg23 gerichteter 5'-RACE- und 5'-nested-RACE-Primer (Primer der UH23-Serie aus Tab. 9, S. 278) mit cDNA mehrerer Chargen unter verschiedensten PCR-Bedingungen getestet wurde, konnten nur cDNA-Abschnitte amplifiziert werden, die für ribosomale Proteine codieren.

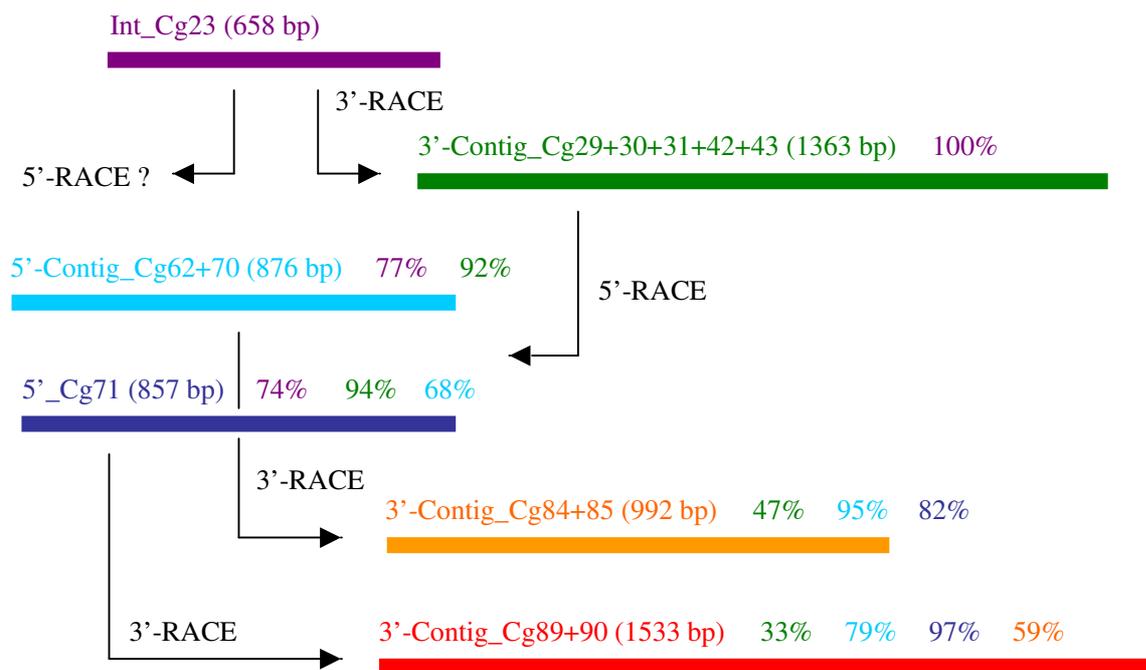


Abb. 15: 5'- und 3'-RLM-RACE von OpDHs aus *C. gigas*

Schematisch dargestellt sind neben dem durch PCR mit degenerierten Primern erhaltenen internen OpDH-Abschnitt Int_Cg23 alle 5'- und 3'-OpDH-Enden der Pazifischen Auster, die durch nested-RACE-PCRs mit unterschiedlichen Primerpaaren gewonnen werden konnte. Als Contig bezeichnete Termini repräsentieren die Konsensussequenz mehrerer ähnlicher Einzelfragmente (entsprechend der im Contignamen aufgeführten Ziffern, Tab. 15, S. 282). Das 3'-Contig_Cg29+30+31+42+43 umfaßt 39, das 5'-Contig_Cg62+70 28, das 3'-Contig_Cg84+85 42 und das 3'-Contig_Cg89+90 18 uneindeutige Nukleotidpositionen, an denen die zugrundeliegenden Einzelfragmente untereinander variierten. Die Länge aller Teilstücke (Angaben in Klammern) und ihrer Überlappungsregionen ist maßstabsgetreu wiedergegeben. Die Pfeile zeigen, gegen welche Ausgangssequenz die zur Amplifikation eines speziellen 5'- oder 3'-Endes verwendeten RACE-Primer gerichtet waren. Ausgehend von Int_Cg23 wurden keine spezifischen 5'-Amplifikate erhalten. Die farbcodierten Prozentangaben bezeichnen die Sequenzübereinstimmung des zugehörigen Fragments mit dem Teilstück der entsprechenden Farbe (bezogen auf die Überlappungsregion).

Alternative 5'-RACE-PCRs mit gegen das 3'-Contig_Cg29+30+31+42+43 gerichteten Primern waren dagegen erfolgreich. Sie lieferten zwei verschiedene, untereinander zu 68 % übereinstimmende 5'-Enden (5'-Contig_Cg62+70 und 5'_Cg71, Abb. 15). Obwohl sie ausgehend von der gleichen cDNA wie das 3'-Contig erhalten wurden, zeigten die beiden 5'-Enden allerdings nur 92 bzw. 94 % Sequenzidentität mit dem überlappenden Abschnitt des 3'-Contigs. Mit dem OpDH-Teilstück Int_Cg23 stimmten sie sogar nur zu 77 bzw. 74 % überein (Angabe bezogen auf den Überlappungsbereich). Besser zu den 5'-Termini passende 3'-Enden (3'-Contig_Cg84+85 und 3'-Contig_Cg89+90, Abb. 15) konnten erst durch 3'-RACE-PCRs mit gegen die 5'-Sequenzen gerichteten Primern gewonnen werden. In den Überlappungsbereichen von 5'- und zugehörigen 3'-Enden fanden sich Sequenzübereinstimmungen von 95 bzw. 97 %. Dabei wichen die beiden neuen 3'-Termini untereinander und vom ursprünglichen 3'_Contig_Cg29+30+31+42+43 deutlich ab (um 40 bis 70 %, Abb. 15).

Durch Kombination der OpDH-Fragmente aus den PCRs mit degenerierten Primern und aus den RACE-PCRs ergaben sich für *A. marina* (Abb. 16), *O. edulis* (Abb. 32, S. 291) und *S. nudus* (Abb. 33, S. 293) je eine vollständige, für *C. gigas* zwei komplette sowie eine partielle OpDH-Sequenz (Abb. 29 bis Abb. 31, S. 286 folgende). Durchgehende 5'/3'-Amplifikationen und zugehörige Sequenzierungen (2.6.5.3) zeigten, daß die ermittelten Sequenzen tatsächlich zusammenhängende Polynukleotide repräsentieren. Mit Hilfe von Minus-RT-Kontrollen (2.6.5.2) konnte zugleich sichergestellt werden, daß cDNA und nicht genomische DNA aus den zur cDNA-Synthese verwendeten RNA-Präparationen amplifiziert wurde. Zusätzliche Sequenzinformationen resultierten aus der Amplifikation der offenen Leseraster zwecks nachfolgender Expression in *E. coli* (2.6.5.3). Auf diese Weise konnten alle OpDHs durch mindestens zwei unabhängige PCRs verifiziert werden. Dabei ließ sich eine gewisse Sequenzvariabilität beobachten. Sie korrelierte nicht immer mit der Verwendung von cDNA aus unterschiedlichen RNA-Präparationen und damit unterschiedlichen Einzeltieren. Als natürliche Variabilität berücksichtigt wurden (abgesehen von einigen Positionen des partiellen *Crassostrea*-Isozyms) nur solche Nukleotid- und gegebenenfalls Aminosäureaustausche, die wenigstens zweimal unabhängig (bei verschiedenen PCRs) auftraten. Solche Positionen sind in den Sequenzen (Abb. 29 bis Abb. 33, S. 286 folgende) grau unterlegt dargestellt. Die entsprechende Alternativbase ist über der Sequenz, die Austauschaminosäure gegebenenfalls darunter angegeben. Nähere Informationen zu den berücksichtigten Einzelsequenzen und ihrer Abhängigkeit können Tab. 14 bis Tab. 17 des Anhangs (S. 281 folgende) entnommen werden.

Im Fall des Wattwurms wurde nur eine geringe Sequenzvariabilität festgestellt. Einzelne Nukleotidaustausche gegenüber der mRNA-Sequenz aus Abb. 16 traten nicht mehrfach unab-

Ergebnisse

TGGTAGCCAC	CGTACGCTGA	CTGAGCACTG	ACACACGGAC	TGCACGGACT	GAGCAGTGTC	60										
TTTGTACGCC	TATTGCTGCA	CTGCTTCTGA	CACAGTGGCT	AGCTACTACG	TGTCTTACAT	120										
AGCACTGGGC	GCAGGGTACG	GGACTGAAAG	GAATCGTGTG	CAAGATCCAG	GTTGCGACCA	180										
TAACACTAGC	CTAAAAAGCG	ATCTACGTTA	GTGTCTACCA	AGGCCGCTGG	GTGGCGCCAT	240										
				M		1										
GGGTGACTCC	GATATCACGA	CCCGCTTGCT	GATCTGTGGC	GGCGGCAACG	GGGCGCATGC	300										
G D S	D I T T	R <u>L L</u>	<u>I C G G G</u>	<u>N G</u>	<u>A H A</u>	21										
		<u>N</u>		<u>D</u>												
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>D[S(R)]D</td> <td>I T (T)</td> <td>- L (L)</td> <td>I</td> <td>Edman-Abbau Am I</td> </tr> <tr> <td>(D)[DGS]D</td> <td>I T (T)</td> <td>(E) L (L)</td> <td>I</td> <td>Edman-Abbau Am II</td> </tr> </table>							D[S(R)]D	I T (T)	- L (L)	I	Edman-Abbau Am I	(D)[DGS]D	I T (T)	(E) L (L)	I	Edman-Abbau Am II
D[S(R)]D	I T (T)	- L (L)	I	Edman-Abbau Am I												
(D)[DGS]D	I T (T)	(E) L (L)	I	Edman-Abbau Am II												
GTACGCCGGC	ATCGCTTCTT	CCAAGAAGAA	CGTGGAGGTG	CGCGTTCTGA	CGCTGTACTC	360										
<u>Y A G</u>	<u>I A S S</u>	<u>K</u>	K N	V E V	R <u>V L T L Y S</u>	41										
CGACGAGGCC	GAGAGATGGA	CCAATGCCAT	GGAGAACCAC	GACTTCGTCTG	TGAATTTCTGA	420										
<u>D E A E R</u>	W T	N A M	E N H	D F V V	N F D	61										
CTGCGGTGGC	AAACACAACG	GGGAAATACG	GGCCAAGCCC	TCCATGGTGA	GCAAAGACCC	480										
C G G	K H N G	E I R	A K P	S M V S	K D P	81										
GGCTGAGGTG	GCGCTAGGCT	GTAACGTCAT	CGTTATCGTG	GTGCTGCTT	TCGCCCATGA	540										
A E V	A L G C	N V I	V I V	V P A F	A H E	101										
GCAGTACCTC	CGCGCCCTGG	AGCCGTACAT	CCAGCCCGGC	ACCATCATCG	TCGGCATGCC	600										
Q Y L	R A L E	P Y I	Q P G	T I I V	G M P	121										
GGGCAAGCG	GGCTTTGAGT	TCGCCTGCTG	GGGGATCCTG	GGCGCCAAGG	GCAAGCAGTG	660										
G Q A	G F E F	A C W	G I L	G A K G	K <u>Q C</u>	141										
CACGCTGGTC	AGCTTTGAGA	GTCTCCCTTG	GGCGTGTCTG	ATCGAGGAGT	TCGGGCGGAC	720										
<u>T L V S F E S</u>	<u>L P W A C R</u>	<u>I E E F</u>	<u>G R T</u>			161										
GGCGGAGGTG	AAGGGTACCA	AGCAGCAGCT	GGTCGGGGCC	CTCCTATACG	GGGACCCCCG	780										
A E V	K G T K	<u>Q Q L V G A L L Y G</u>	<u>D P R</u>			181										
		<u>E*</u>				4x										
CCCCGTGCGG	GAGCCCTCCG	CCGTGCTGCA	GGAGACCCTG	GGGACGCACC	CCGTACTCCA	840										
P V R	E P S A	V L Q	E T L	G T H P	V L H	201										
CATCCACGGC	CACCTGCTGG	GGATGACCCT	GATGGGGGTC	AACGCCTACA	TCCACCCGGC	900										
I H G	H L L G	M T L	M G V	N A Y I	H P A	221										
CATCCTGTAC	GGCCGCTGGT	GGAAGTGGGA	CGGCCGCCCC	GTGGCCGAGC	CCCCGCTCTT	960										
I L Y	G R <u>W W</u>	<u>N W D</u>	<u>G R P</u>	V A E P	P L F	241										
CTACCACGGC	ATGGACGAGT	TCACGGCCGA	CACCCTGACG	GCAATGGGGG	ACGAGGTGAT	1020										
Y H G	M D E F	T A D	T L T	A M G D	E V M	261										
GGCCATCGCG	GCGACGCTGT	CCAAGCACCC	CGCCGGGCCC	GACTTCTCCA	ACGTGTGCCA	1080										
A I A	A T L S	K H P	A G P	D F S N	V C H	281										
CGTCTTCGAC	TGGTACAAGC	GCTGCTACTC	GGATGAGATG	TCCGACACGT	CCTGCCTGCT	1140										
V F D	W Y K R	C Y S	D E M	S D T S	C L L	301										
CAAGGCCATC	CGCTCCAACA	AGGCCTACAT	CGGGCTGACC	CACCCGTGTC	GCCCCGCCGA	1200										
K A I	R S N K	A Y I	G L T	H P C R	P A E	321										
GGCCGCTGGC	GACAACAACG	GGGGCTGCAA	CTGGGAGCCT	AACTTCGGCT	ACCGCTACAT	1260										
A A G	D N N G	G C N	W E P	N F G Y	R <u>Y I</u>	341										

CACGGAGGAC	ATCCCCTTCG	GACTCGTGGT	GCTGTGCGGC	GTGGCCCAGA	TCATCGGCGT	1320
<u>T E D</u>	<u>I P F G</u>	<u>L V V</u>	<u>L C</u>	G	V A Q I I G V	361
			<u>R</u>			
GGCCAGCCT	CATATGGACA	AGGTGGTGCT	CTGGAGCCAG	AAGGTCTCCG	GCAAGGAATA	1380
A T P	H M D K	<u>V V L</u>	<u>W S Q</u>	<u>K</u>	V S G K <u>E Y</u>	381
CCTCGTGGAC	TCTACCCTCT	CCGGTCGCGA	CATGCCAGAC	ACGAGAAGTC	CTCAGAAATA	1440
<u>L V D</u>	<u>S T L S</u>	<u>G R</u>	D	M P D	T R S P Q K <u>Y</u>	401
CGGCCTGACA	ACCATTGACC	AAATCCTGGG	ATACGACTAA	AGTGTAATG	GGTACATATA	1500
<u>G L T</u>	<u>T I D Q</u>	<u>I L G</u>	<u>Y D</u>	*		413
AGCTTATATA	TATATGTGTG	TGTATATATA	TATACATACC	TGCTATATGT	TTATATATGT	1560
TTATACTGCA	CCGAACCTGT	TTAGATGACT	CTAAGCGAAT	ATCCGCCATT	TATTTAAAAA	1620
GAAATGGGAT	AGACCGTTTA	TGAGCTTATC	TCAAAATTAA	AAAAAGGAAA	ATGTATTCCT	1680
TCCTTCACAT	GAATGTCGGT	ACAATACAAG	GGATCTGGAA	GGGGTGGTGG	ATTGCGACAC	1740
GCGGCAGTGG	CAGCCAAATT	CCGACACCGA	AACAGTTTCA	CACTTGTTTC	TTGAAAATCC	1800
GGCAGCGACA	CCGTTATGAG	CAGAATCGAC	AGGAGACACT	GCAAATTTAT	TACAATTTAC	1860
ACTGGCCACT	GGACCTCCCT	TCCAGAGACC	CCTGATGCAG	ATAAGTTAAT	AAGTGGTCTT	1920
TAATAGTCTT	TAACTATTTA	GTGTCATGTG	ATAACGCTAG	CTTGACGCCC	AAGACGAAAG	1980
TAATATACAG	AATGCATAGC	ATATACGGTG	GCTCCCTACA	GTGAGATAAG	TAGGAECTGC	2040
GATTCACCTT	TTTTGCCAAA	GGTTTTTCGAT	ATGGTTGAAA	ACTACGCACT	TCTTCAGTAT	2100
CCGTGAATTT	GTATAAATGA	ATGTGAGACC	ATCGTACATT	TTGTTTTATT	TCGCACAATT	2160
CTTTCGAGTC	TCGCTGATGT	TCTGGCATGA	TCTACATCAT	TGCCGTGATA	GCACGTGTGT	2220
ATAAACCCGC	ACGATATAAC	GCAAGTCGCA	AGCTGTAAAT	ATCCTGCATA	ACTCTCTTGC	2280
CATAAGTGAC	AGATGATAAA	GAGTCAATTG	AAGTGGATTA	CAAGGATATT	AATTAGATCT	2340
CAGCTGGCCG	TTATTAGATA	TGCTTTGAGT	TGTGGTGTGT	CTTCCCGTAT	GAACATTTTT	2400
AGATCCTATA	AATACTGTTT	CCTTGCCATT	TTGCCAGTAG	TGTTGCTAAT	AGGGTGATTA	2460
GGTTATTTTT	AGATTACTGT	GGTTGATACA	TAATGGTGTG	TACATAAATC	ATACATGCTA	2520
AGTTATACTA	ATTATGTGTT	TTACCATTAA	TAAGTATTAA	TTAAGTTTAC	GCGTGTGGC	2580
TCAAGTTGTG	TCCCGATATG	TTGGATTATG	TTAAAGGTGG	TCAAAAAGGT	CGCAGCACAT	2640
GAATAAGAAC	ATGAACAAGA	AAAGATCTCG	TATGATCGCA	TACCGTAGTC	ACTAGCTTAA	2700
ACGTTCCGGC	GCTTTACTTT	TCAGTGGTTC	AGGTGATTCT	TCAAACGGGC	GCTTAATTGC	2760
AGGCATATGC	GGTTTCATGT	ACTGAACTTC	ATTGACCGTA	AGATTGCATA	ACGCCTTTCG	2820
CGCTGTTACC	CGGTGATAGT	A				2841

Abb. 16: mRNA einer ALoDH aus *A. marina*

Unterhalb der Nukleotidsequenz (AJ810167, diese Arbeit), die ein 1242 bp umfassendes offenes Leseraster umfaßt, ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (CAH1 7650) im Einbuchstabencode angegeben. * markiert das Stopcodon, die punktierte Linie ein mögliches Polyadenylierungssignal. Die Sequenz wurde ausgehend von unabhängigen PCRs mehrfach verifiziert. Die farbig hervorgehobenen Aminosäuren kennzeichnen die Lage der massenspektrometrisch sequenzierten ALoDH-Peptide aus Tab. 3. Entsprechend dem dort verwendeten Farbcode sind solche Aminosäuren, die sich nur in Spaltpeptiden der ALoDH I fanden, rot, solche, die in tryptischen Peptiden der ALoDHs I und II auftraten, violett dargestellt. Durch zwei, drei bzw. vier Peptide abgedeckte Sequenzabschnitte sind zusätzlich unterstrichen, doppelt unterstrichen bzw. mit dem Index „4x“ versehen. Aminosäuren, in denen die abgeleitete Sequenz und eines oder mehrerer Peptide differieren, sind grau unterlegt dargestellt. Die jeweilige Alternativaminoäure ist unter der Sequenz angegeben. Der Kasten zeigt die durch Edman-Abbau ermittelten N-Termini der ALoDHs I und II, wobei (X) = vermutlich Aminosäure X, [XYZ] = Aminosäure X, Y oder Z.

hängig auf. Die Sequenz umfaßt 2841 nt mit einem an Position 239 startenden offenen Leseraster von 1242 nt und einem möglichen Polyadenylierungssignal (ATTTAA) an den Nukleotidpositionen 1656 bis 1661. Das abgeleitete, aus 413 Aminosäuren bestehende Protein besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 45,2 kd sowie einen theoretischen pI von 5,61. Sein

um die ersten beiden Aminosäuren (Methionin und Glycin) verkürzter N-Terminus stimmt weitgehend mit den ersten zehn N-terminalen Aminosäuren der AloDHs I und II gemäß Edman-Sequenzierung überein (3.6 und Kasten in Abb. 16). Dort, wo der Edman-Abbau kein eindeutiges Signal lieferte, entspricht eine der möglichen Alternativamino­säuren jener der abgeleiteten Proteinsequenz. Eine Differenz besteht nur an einer Position, an der im N-Terminus der AloDH II Glutamat, in der abgeleiteten Proteinsequenz jedoch Arginin vermutet wurde, während sich für die AloDH I kein auswertbares Signal ergab.

Auch die ESI-Q-TOF-Peptide der Wattwurm-AloDHs (Tab. 3) korrelieren gut mit der Nukleotidsequenz. Mit Ausnahme des Peptids 874,70_2+ (11) finden sie sich alle innerhalb der abgeleiteten OpDH-Sequenz wieder (farbig hervorgehobene Aminosäuren in Abb. 16) und stimmen fast 100%ig mit dieser überein. Nur am C-Terminus der Peptide 817,78_2+ und 818,66_2+ (beide unter 9) beobachteten M. Piotrowski und S. Metzger unabhängig voneinander ein Arginin, während sich molekularbiologisch für diese Position (Aminosäure 353 des abgeleiteten Proteins) eindeutig ein Cystein ergab. Die Aminosäuren 169 bis 181 der abgeleiteten OpDH entsprechen denen der Peptide 477,32_3+, 715,47_2+ und 715,27_2+, nicht der Peptidvariante 706,96_2+ (alle unter 3), bei der N-terminal Pyroglutamat anstelle von Glutamin auftrat. Während bei den Peptiden 640,07_3+ und 639,85_3+ (beide 6) an erster und achter Position Leucin kombiniert mit Aspartat bzw. jeweils Asparagin nachgewiesen wurde, finden sich an den entsprechenden Stellen der abgeleiteten Proteinsequenz (Aminosäuren 10 und 17) Leucin und Asparagin.

Bei den verschiedenen, offenbar in einzelnen Austern coexistierenden *Crassostrea*-OpDHs (Cg-Alo/StrDH1, Cg-AloDH2 und Cg-Alo/StrDH3_{part}) wurde eine größere Sequenzvariabilität als bei der Wattwurm-AloDH festgestellt. Die Nukleotidsequenzen, die einer Isoform zugeschrieben wurden (Cg-Alo/StrDH1: 5'_Cg62, 5'_Cg70, 5'/3'_{part}_Cg80, 3'_Cg84, 3'_Cg85, 5'/3'_Cg101, 5'/3'_Cg103 und ORF_Cg105; Cg-AloDH2: 5'_Cg71, 3'_Cg89, 3'_Cg90, 5'/3'_Cg102, 5'/3'_Cg104, ORF_Cg106 und ORF_Cg107; Cg-Alo/StrDH3_{part}: Int_Cg23, 3'_Cg29, 3'_Cg30, 3'_Cg31, 3'_Cg42, 3'_Cg43 und 5'/3'_Cg109_{part}, vgl. Abb. 15 und Tab. 15, S. 282), weichen untereinander zum Teil in einer ganzen Reihe von Positionen ab. So konnten innerhalb der 1504 nt langen mRNA für *Crassostrea*-Alo/StrDH1 (Abb. 29, S. 286) acht natürlich variierende Nukleotide identifiziert werden. Die Hälfte davon liegt im Bereich des offenen Leserasters (1227 nt, Positionen 108 bis 1334). Allerdings tangieren nur zwei der Nukleotidaustausche die Aminosäuresequenz (I-152-V und S-212-P). Auch im codierenden mRNA-Abschnitt der *Crassostrea*-AloDH2 (Gesamtlänge 1958 nt, ORF zwischen Positionen 114 und 1340, Abb. 30, S. 288) wurden acht Nukleotidaustausche mehrfach veri-

fiziert, von denen vier die Aminosäuresequenz beeinflussen (E-288-D, F-354-Y, V-358-L, S-386-A). Bei der 1845 nt langen partiellen mRNA für *Crassostrea*-Alo/StrDH3 (Abb. 31, S. 290) schließlich fanden sich 63 variable Nukleotidpositionen (einige davon nicht mehrfach belegt). Die meisten davon liegen in der 3'-untranslatierten Region, während nur neun die codierende Sequenz (inklusive Stopcodon bis Position 1166) betreffen. Wiederum vier der Nukleotidaustausche sind mit einer Aminosäureänderung verbunden, ein fünfter verursacht eine Leserasterunterbrechung.

Das in Abb. 17 dargestellte Alignment der verschiedenen Aminosäuresequenzen zeigt, daß in acht von zehn Fällen die Alternativaminosäure, die für eine Sequenz nachgewiesen werden konnte (unterhalb der Alinierung angegeben, variabler Rest grau unterlegt), mit der äquivalenten Aminosäure mindestens einer anderen *Crassostrea*-OpDHs übereinstimmt. Zum Beispiel findet sich Isoleucin, das als Alternative zu Valin-152 in der Cg-Alo/StrDH1 detektiert wurde, auch in Position 152 der Cg-AloDH2 und in Position 134 der Cg-Alo/StrDH3_{part}.

Die mRNA-Sequenzen aller drei *Crassostrea*-OpDHs weisen im 3'-untranslatierten Bereich ein oder mehrere mögliche Polyadenylierungssignale auf (Cg-Alo/StrDH1: 1444 bis 1449, Cg-AloDH2: 1422 bis 1427 bzw. 1796 bis 1801, Cg-Alo/StrDH3_{part}: 1610 bis 1615, 1637 bis 1642 bzw. 1736 bis 1741). Ihr Vergleich ergibt auf Nukleotidebene paarweise Sequenzidentitäten zwischen 50 und 67 % (Cg-Alo/StrDH1 versus Cg-AloDH2 67 %, Cg-Alo/StrDH1 versus Cg-Alo/StrDH3_{part} 63 %, Cg-AloDH2 versus Cg-Alo/StrDH3_{part} 50 %), während die Aminosäureübereinstimmung bei etwa 80 % liegt (Cg-Alo/StrDH1 versus Cg-AloDH2 bzw. Cg-Alo/StrDH3_{part} jeweils 80 %, Cg-AloDH2 versus Cg-Alo/StrDH3_{part} 77 %). Das Alignment aus Abb. 17 zeigt, daß der unvollständigen *Crassostrea*-Alo/StrDH3 vermutlich 18 N-terminale Reste fehlen. Bei den beiden anderen Austern-Sequenzen stimmen diese bis auf die zweite Aminosäure (Serin bei Cg-Alo/StrDH1 versus Aspartat bei Cg-AloDH2) überein. Allerdings lassen sich die abgeleiteten N-Termini nicht mit den Sequenzinformationen aus der N-terminalen Sequenzierung der chromatographisch separierten Austern-Alo/StrDHs I und II in Einklang bringen (Kasten in Abb. 17).

Während die partielle Sequenz Cg-Alo/StrDH3 für 387 Aminosäuren eines Molekulargewichts von 43,2 kd codiert, umfassen die beiden anderen *Crassostrea*-OpDHs je 408 Aminosäuren einer Masse von 45,3 kd (Cg-Alo/StrDH1) bzw. 45,4 kd (Cg-AloDH2). Der theoretische pI der Cg-Alo/StrDH1 liegt bei 5,76, jener der Cg-AloDH2 bei 6,06. Bei der Cg-Alo/StrDH3 könnte es sich gemäß dem theoretischen pI der partiellen Sequenz (6,29) um ein geringfügig alkalischeres Enzym handeln.

Abb. 17: Sequenzvergleich verschiedener OpDHs aus *C. gigas*

Dargestellt ist eine Alinierung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen Cg-Alo/StrDH1 (Cg1, AJ810713), Cg-AloDH2 (Cg2, AJ879695) und Cg-Alo/StrDH3_{part} (Cg3, AM392360) (alle diese Arbeit). Aminosäuren, die in allen drei Sequenzen übereinstimmen, sind mit (*) gekennzeichnet. Dagegen markieren (:) und (.) konservierte bzw. semi-konservierte Positionen, an denen die drei OpDHs Reste einer Gonnet-PAM250-Gruppe mit positivem Score $> 0,5$ bzw. $\leq 0,5$ aufweisen. Reste, für die mindestens zweimal unabhängig eine Alternativaminosäure nachgewiesen wurde, sind grau unterlegt und die zugehörigen Austauschaminosäuren an der entsprechenden Position unterhalb des Alignments angegeben.

Der Kasten enthält die durch Edman-Abbau für die chromatographisch separierten Austern-Alo/StrDHs I und II gewonnenen Sequenzinformationen. Dabei sind Aminosäuren, die nicht eindeutig bestimmt werden konnten, wiederum grau markiert, mögliche Alternativen oberhalb oder unterhalb davon aufgelistet.

Die über dem Alignment aufgeführten Sequenzfragmente entsprechen ESI-Q-TOF-Peptiden der *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III. Wie in Tab. 4 sind Peptide, die nur im tryptischen Verdau der Alo/StrDH I identifiziert werden konnten, in rot, solche, die ausschließlich bei der zweiten Isoform gefunden wurden, in blau und solche, die nur bei der Alo/StrDH III auftraten, in grün wiedergegeben. Die Mischfarben violett und braun charakterisieren Peptide, die bei den Alo/StrDHs I und II bzw. beim zweiten und dritten Isoenzym nachgewiesen wurden. Schwarz dargestellte Peptidsequenzen wurden bei allen drei Enzymformen detektiert. Auch den römischen Ziffern hinter den einzelnen Peptiden kann entnommen werden, bei welchen Isoformen sie gefunden wurden. II und II* bezeichnen unterschiedliche Chargen der Alo/StrDH II.

Die Positionierung der mit Fragezeichen markierten Peptidsequenzen erscheint unsicher. Peptidaminosäuren, die sich an der äquivalenten Position keiner abgeleiteten OpDH wiederfinden, sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Umgekehrt sind in den abgeleiteten Sequenzen solche Reste unterstrichen, die zwar durch ein oder mehrere ESI-Q-TOF-Peptide abgedeckt werden, sich jedoch von der entsprechenden Aminosäure aller Peptide unterscheiden.

Die ESI-Q-TOF-Peptide chromatographisch separierter *Crassostrea*-Alo/StrDHs (Tab. 4) mit Ausnahme des Peptids 468,27_2+ (5) konnten mittels bestmöglicher lokaler Alignments (Lalign) speziellen Sequenzregionen der abgeleiteten OpDHs zugeordnet werden. Wo sich dies bei visueller Inspektion des Alignments unmittelbar aufdrängte, wurde manuell eine Lücke eingeführt. Lediglich die Positionierung der Peptide 403,21_2+, 417,77_2+, 489,73_2+, 489,77_2+ und 775,45_2+ (2, 3 und 13 aus Tab. 4) erscheint angesichts ihrer nur geringen Ähnlichkeit mit den abgeleiteten OpDH-Sequenzen fraglich. In Abb. 17 sind die verschiedenen Peptidsequenzen oberhalb des jeweils zugehörigen OpDH-Abschnitts aufgeführt. Bei welchen Alo/StrDH-Isoformen (Cg-Alo/StrDH I bis III) ein Peptid nachgewiesen wurde, ergibt sich aus der Farbe seiner Darstellung (Farbcode wie in Tab. 4), kann aber auch den hinter der Sequenz angegebenen römischen Ziffern entnommen werden, wobei II und II* unterschiedliche Präparationen der Alo/StrDH II bezeichnen. Peptidaminosäuren, die sich an der mutmaßlich äquivalenten Position keiner der abgeleiteten OpDH-Sequenzen wiederfinden, sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Umgekehrt sind in den abgeleiteten Sequenzen solche Reste unterstrichen, die durch ein oder mehrere ESI-Q-TOF-Peptide abgedeckt werden, sich jedoch von der entsprechenden Aminosäure aller dieser Peptide unterscheiden.

Schon oberflächliche Betrachtung läßt eine Vielzahl unterstrichener Aminosäuren erkennen, was starke Abweichungen zwischen den abgeleiteten OpDHs und den Peptidsequenzen anzeigt. Beispielsweise werden die Aminosäuren Lysin-79, Valin-81, Prolin-82, Valin-84 und

Tyrosin-86 der Cg-Alo/StrDH1 weder durch das bei den *Crassostrea*-Alo/StrDHs I und III nachgewiesene Peptid 846,50_3+ (EAASQDVIFIVV) noch durch das ähnliche Alo/StrDH II-Peptid 846,36_3+ (EAASGADVIFIVVP) bestätigt. Auch die Cg-AloDH2 differiert in sechs Positionen von beiden Peptidsequenzen. Während mit Asparagin-85 und Phenylalanin-89 weitere abweichende Reste hinzukommen, entspricht das Alanin in Position 84 der Cg-AloDH2 dem Alanin-6 des Peptids 846,36_3+. Zwischen diesem Peptid und der Cg-Alo/StrDH3_{part}, die sich nur in drei Aminosäuren (Valin-63, Histidin-67 und Tyrosin-68 der Cg-Alo/StrDH3_{part}) unterscheiden, besteht die größte Ähnlichkeit. Aspartat-7 aus dem Peptid 846,36_3+ findet sich allerdings nicht in der Sequenz Cg-Alo/StrDH3_{part}, sondern in der Cg-Alo/StrDH1 wieder.

Auch andere Beispiele belegen, daß eine Zuordnung der chromatographisch separierbaren *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III bzw. ihrer Spaltpeptide zu den einzelnen, molekularbiologisch ermittelten OpDH-Sequenzen nicht möglich ist. Obwohl die Peptide 632,31_2+ (Alo/StrDH II*) und 632,36_2+ (Alo/StrDH I bis III) komplett übereinstimmten (beide VLTLFADEAER), weisen alle abgeleiteten OpDHs im äquivalenten Sequenzabschnitt abgesehen von anderen Unterschieden anstelle des Phenylalanins ein Tyrosin auf. Wie schon unter 3.6 erwähnt, differierten außerdem manche Spaltpeptide der Alo/StrDH II bzw. II* in Abhängigkeit von der jeweiligen Enzymreinigung und damit Austercharge. So unterschieden sich die Peptide 784,87_2+ (YTAEDVPFIVVMK, Alo/StrDH II*) und 792,94_2+ (YTAEDVPFGIVVM_{ox}K, Alo/StrDH II) außer im Oxidationszustand ihres Methionins durch Insertion eines Glycins beim Peptid 792,94_2+. Dieses Glycin tritt auch in allen abgeleiteten OpDH-Sequenzen (Position 337 bzw. 319) auf. Beim Peptid 731,35_2+ (LLSGVSDEC_{alk}LALGK, Alo/StrDH II*) waren Threonin und Alanin aus dem Peptid 731,41_2+ (LLSGVSDECLATAGK, Alo/StrDH I und II) gegen Leucin ausgetauscht (und das Cystein alkyliert). Keine dieser Peptidvarianten stimmte völlig mit den abgeleiteten Sequenzen (Positionen 248 folgende bei Cg-Alo/StrDH1 und Cg-AloDH2 bzw. 230 folgende bei Cg-Alo/StrDH3_{part}) überein.

Die für *O. edulis* ermittelte mRNA-Sequenz (Abb. 32, S. 291) umfaßt 1598 nt mit einem für 405 Aminosäuren codierenden offenen Leseraster zwischen den Positionen 121 und 1338. Im Bereich der Basen 1537 bis 1542 findet sich ein mögliches Polyadenylierungssignal. Von 15 mehrfach verifizierten Alternativnukleotiden liegen zehn innerhalb der codierenden Sequenz, zwei bedingen einen Aminosäureaustausch (H-34-R und A-228-T). Das abgeleitete Protein besitzt eine Masse von 44,7 kd und einen theoretischen pI von 5,60.

Im Fall des Spritzwurms wurde eine 2026 nt lange mRNA mit einem potentiellen Polyadenylierungssignal zwischen den Positionen 1815 und 1820 sequenziert (Abb. 33, S. 293). Sie weist ein im Vergleich zur *Ostrea*-OpDH etwas kürzeres offenes Leseraster von nur 1197 nt auf (Positionen 58 bis 1254), innerhalb dessen elf variable Positionen nachgewiesen werden konnten. Zwei der Nukleotidmodifikationen sind mit einem Aminosäureaustausch (Glycin-25 gegen Aspartat bzw. Asparagin-51 gegen Threonin) verbunden. Die abgeleitete OpDH besteht aus 398 Aminosäuren eines Gesamtmolekulargewichts von 43,7 kd, für die sich ein theoretischer pI von 6,12 berechnen läßt.

3.8 Heterologe Expression von OpDHs in *E. coli*

3.8.1 Expressionsanalysen

Um zu überprüfen, ob die mRNAs aus 3.7 tatsächlich für OpDHs der erwarteten Aminosäurespezifität (vgl. 3.1) codieren, wurden ihre offenen Leseraster so in den Vektor pET24d(+) (Novagen, Darmstadt) kloniert, daß die zugehörigen Proteine mit C-terminalem Histidin-Tag im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) exprimiert werden konnten (2.6.7 und 2.6.11). Die Anzucht der rekombinanten Stämme erfolgte jeweils in 1 l LB-Medium mit Kanamycin. Zu Kontrollzwecken diente ein Stamm mit pET24d(+) ohne OpDH-Insert. Alle Kulturen wurden bei einer OD_{600} von $0,69 \pm 0,09$ mit IPTG induziert, anschließend 19 h bei 18°C inkubiert und geerntet. Wie der obere Teil der Abb. 18 zeigt, wurden in allen Fällen ähnlich große Bakterienpellets einer durchschnittlichen Masse von $6,0 \pm 1,2$ g erhalten. Zudem konnten durch Aufschluß in nativem Puffer vergleichbare Mengen löslichen Proteins gewonnen werden ($31,5 \pm 3,6$ mg·g⁻¹ Bakterien). Größeren Schwankungen unterlag lediglich die unter nativen Bedingungen unlösliche Proteinfraction (durchschnittlich $11,9 \pm 5,6$ mg·g⁻¹ Bakterien), die in den einzelnen Kulturen zwischen 15 und 38 % des jeweiligen Gesamtproteins lieferte. Ein besonders hoher Anteil unlöslichen Proteins trat bei dem für die OpDH aus *O. edulis* codierenden Stamm auf ($20,1$ mg·g⁻¹ Bakterien unlösliches versus $33,1$ mg·g⁻¹ Bakterien lösliches Protein). Dagegen entstand in der Kontrollkultur und bei der Expression des Spritzwurm-Enzyms am wenigsten unlösliches Protein (nur 5,5 bzw. 6,7 mg·g⁻¹ Bakterien).

Pyruvatreduktase-Aktivitätsmessungen in entsalzten Bakterienextrakten zeigten, daß mit Ausnahme der Kontrolle in allen Kulturen funktionsfähige OpDHs exprimiert wurden. Im Kontrollhomogenat konnte lediglich geringe LDH-Aktivität detektiert werden, die auch in den übrigen Fällen auftrat. Daß bei den OpDH-Messungen wegen der unterschiedlich guten Wasserlöslichkeit der verschiedenen Aminosäuren und deren differierender Konzentration in

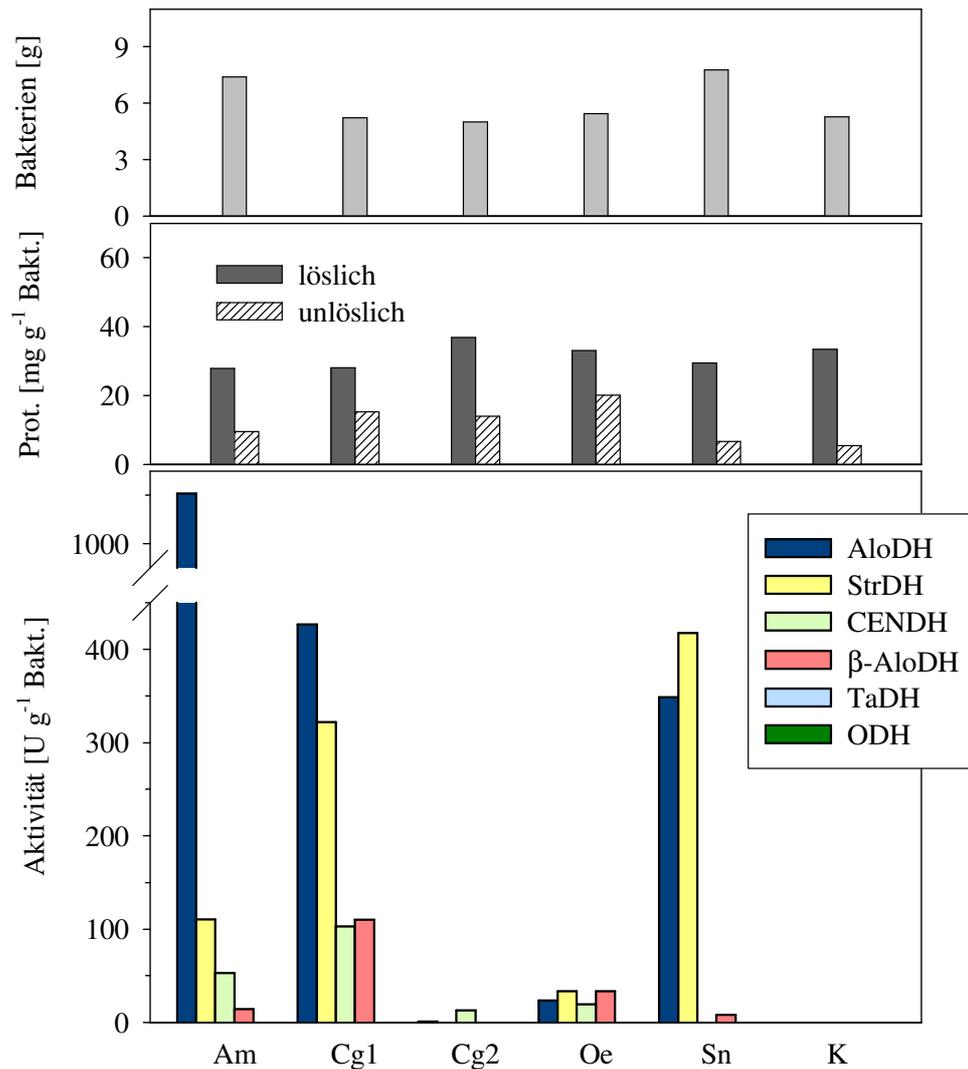


Abb. 18: Expression rekombinanter OpDHs in *E. coli* BL21(DE3)

Die heterologe Expression von OpDHs aus *A. marina* (Am), *C. gigas* (Cg1 und Cg2), *O. edulis* (Oe) und *S. nudus* (Sn) (vgl. die mRNAs aus 3.7) erfolgte in 1 l-LB-Kulturen mit Kanamycin. Als Kontrolle (K) diente ein BL21(DE3)-Stamm, der statt eines pET24d(+)-OpDH-LE6xH-Konstruktes insertfreien Vektor enthielt. Die zunächst bei 37°C angezogenen Kulturen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,69 ± 0,09 mit 400 µM IPTG induziert, anschließend 19 h bei 18°C inkubiert und geerntet. Dem oberen Teil der Abbildung kann die jeweilige Bakterienausbeute [g] entnommen werden. Darunter ist die Masse löslichen bzw. unlöslichen Gesamtproteins [mg·g⁻¹ Bakterien] angegeben, die aus den Bakterien isoliert werden konnte. Die unterste Graphik schließlich veranschaulicht die OpDH-Aktivitäten [U·g⁻¹ Bakterien], die mit 200 mM Glycin (StrDH), 200 mM L-Alanin (AloDH), 100 mM L-Norvalin (CENDH), 200 mM β-Alanin (β-AloDH), 100 mM Taurin (TaDH) bzw. 5,5 mM L-Arginin (ODH) als Aminosäuresubstrat in der löslichen Proteinfraction gemessen wurden (Testbedingungen vgl. 2.5.1). Alle Aktivitäten und Proteinmassen repräsentieren die Mittelwerte von Doppelbestimmungen mit weniger als 10 % Abweichung.

Invertebratengewebe wie dem Hautmuskel des Wattwurms (Grieshaber und Kreutzer, 1986) keine einheitliche Aminosäurekonzentration eingesetzt wurde (200 mM L-Alanin, Glycin bzw. β-Alanin versus nur 100 mM L-Norvalin oder Taurin und 5,5 mM L-Arginin, 2.5.1), schränkte die Vergleichbarkeit der gemessenen Aktivitäten offenbar nur wenig ein (4.1.5.3).

Bei der Expression der Wattwurm-OpDH wurden AloDH- und StrDH-Aktivitäten von $1103 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien bzw. $111 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien erzielt. Mit geringeren Raten setzte das rekombinante Enzym auch L-Norvalin ($53 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien) und β -Alanin ($14 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien) um. Dagegen fanden sich nur geringste TaDH- und ODH-Aktivitäten ($< 0,2 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien). Taurin und L-Arginin wurden auch von den OpDHs der übrigen Arten nicht bzw. nur in minimalem Umfang verwendet. Die Alo/StrDH1 der Pazifischen Auster zeigte wie die Wattwurm-OpDH die höchste Reaktionsgeschwindigkeit mit L-Alanin ($427 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien), setzte jedoch Glycin, L-Norvalin und β -Alanin im Vergleich besser um. So wurde mit Glycin eine lediglich um den Faktor 1,3 niedrigere OpDH-Aktivität als mit L-Alanin gemessen ($322 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien), während die beiden anderen Aminosäuresubstrate immerhin noch ein Viertel der AloDH-Aktivität ergaben. Im Fall der *Crassostrea*-AloDH2 konnten nur äußerst geringe OpDH-Aktivitäten detektiert werden. Neben AloDH- und StrDH-Aktivitäten von lediglich $0,9$ bzw. $0,3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien (in Abb. 18 nicht aufzulösen) dominierte im entsprechenden Bakterienextrakt die L-Norvalin-abhängige Opinbildung ($13 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien). Die geringste Aminosäurespezifität zeigte die rekombinante Alo/StrDH aus *O. edulis*. Sie nutzte die Aminosäuren Glycin, L-Alanin, L-Norvalin und β -Alanin alle mit etwa gleicher, wenn auch niedriger Effizienz (OpDH-Aktivitäten jeweils kleiner $34 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien). Bei der Expression von Spritzwurm-Alo/StrDH schließlich traten wieder hohe AloDH- und StrDH-Aktivitäten auf ($349 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien und $417 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ Bakterien). Dieses Enzym setzte β -Alanin und L-Norvalin mehr als 50- bzw. fast 700mal langsamer als Glycin um.

Durch native Disk-Elektrophorese mit anschließender Formazanfärbung (2.5.7.1) konnte gezeigt werden, daß die rekombinanten OpDHs nicht nur die Synthese von Opinen, sondern auch die oxidative Hydrolyse von Alanopin und Strombin katalysieren. Abgesehen vom Homogenat der Expressionskultur für Wattwurm-AloDH, das nur eine schwache AloDH- (R_f -Wert = $0,57$), jedoch keine StrDH-Bande lieferte, ergaben die Extrakte aller Expressionskulturen eine Bande mit beiden Opinoxidaseaktivitäten (R_f -Werte = $0,46$ [Cg-Alo/StrDH1], $0,44$ [Cg-AloDH2] sowie $0,50$ [Oe-StrDH und Sn-Alo/StrDH], Abb. 19). Das *Crassostrea*-Alo/StrDH1-Homogenat ließ zusätzlich eine Reihe schwacher AloDH-Banden mit R_f -Werten zwischen $0,38$ und $0,49$ erahnen. Daneben trat bei verschiedenen Homogenaten einschließlich dem der Kontrollkultur eine unspezifische, auch mit opinfreier Färbelösung detektierbare Bande ($R_f = 0,28$) auf. Im Fall der Alo/StrDH-LE6xH des Spritzwurms wurde ergänzend eine Formazanfärbung mit Octopin durchgeführt Sie ergab jedoch kein spezifisches Signal (nicht gezeigt).



Abb. 19: Native PAGE zur heterologen Expression von OpDHs in BL21(DE3)

Aufgetragen wurden Aliquots der löslichen Proteinfraction aus den Expressionskulturen wie in Abb. 18. Sie enthielten durchschnittlich $22 \pm 7 \mu\text{g}$ Gesamtprotein sowie zwischen 0,02 und 0,16 U Alanopin- bzw. Strombinsyntheseaktivität. Nur von der oxidationsempfindlichen Wattwurm-AloDH-LE6xH (Am) wurde mehr appliziert (1,12 U AloDH). Im Fall der *Crassostrea*-AloDH2 (Cg2) konnten lediglich 0,0006 U AloDH und 0,0002 U StrDH aufgetragen werden. Das Homogenat der Kontrollkultur (K) zeigte keine OpDH-Aktivitäten. Die OpDHs wurden durch spezifische Aktivitätsfärbung in Gegenwart von 20 mM meso-Alanopin bzw. D-Strombin detektiert. Die Reaktionslösung für die Kontrollfärbung enthielt kein Opin. Gefärbt wurde jeweils 5 h im Dunkeln.

Die OpDH-Expression in den verschiedenen BL21(DE3)-Kulturen wurde auch durch SDS-Elektrophorese und nachfolgendes Blotting analysiert (Abb. 20). Dabei wurden die Proben jeweils zweimal in gleicher Reihenfolge auf das Gel aufgetragen, so daß nach der Elektrophorese eine Gelhälfte einer Proteinfärbung unterzogen, die andere geblottet und zum immunologischen Nachweis von Proteinen mit Histidin-Tag (OpDHs-LE6xH) genutzt werden konnte (2.5.7.4). Homogenisierte Aliquots uninduzierter Expressionskulturen (A) wurden unverdünnt appliziert. Das jeweils gleiche, maximale Auftragsvolumen enthielt durchschnittlich $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g}$ lösliches Gesamtprotein. Die Auftragsvolumina der löslichen (B) und unlöslichen (C) Proteinfraction induzierter Kulturen (entsprechend 1,8 bis 2,0 μg bzw. 0,4 bis 1,7 μg Protein) wurden unter Berücksichtigung der Gesamtvolumina der verschiedenen Homogenate auf das Frischgewicht der Bakterienpellets normiert, so daß die relative Intensität der OpDH-Banden die relative Menge der aus den einzelnen 1 l-Kulturen isolierten löslichen bzw. unter nativen Pufferbedingungen unlöslichen OpDHs widerspiegelt.

Wie Abb. 20 zeigt, konnte in Extrakten aus uninduzierten Bakterien kein Protein mit Histidin-Tag nachgewiesen werden. Dagegen fanden sich in allen Homogenaten induzierter Kulturen außer denen der Kontrollkultur Proteine eines Molekulargewichts von etwa 45 kd, die einen solchen Anhang aufwiesen und damit offensichtlich rekombinante OpDHs repräsentierten. Die OpDHs lagen in der unlöslichen Proteinfraction meist in höherer Konzentration

vor als in der löslichen. Während die lösliche Proteinfraktion neben der Ziel-OpDH stets noch eine Vielzahl anderer Proteine umfaßte, so daß die OpDH-Bande im Coomassie-gefärbten Gel teils kaum zu erkennen war, dominierten die rekombinanten OpDHs unter den unlöslichen Proteinen. Allerdings traten besonders bei der Expression von Wattwurm-AloDH und *Crassostrea*-Alo/StrDH1 in der unlöslichen Proteinfraktion auch zahlreiche höhermolekulare OpDH-Aggregate auf. Vor allem in den Homogenaten der *Crassostrea*-Alo/StrDH1-Kultur wurden außerdem Histidin-markierte Proteine kleiner 45 kd detektiert.

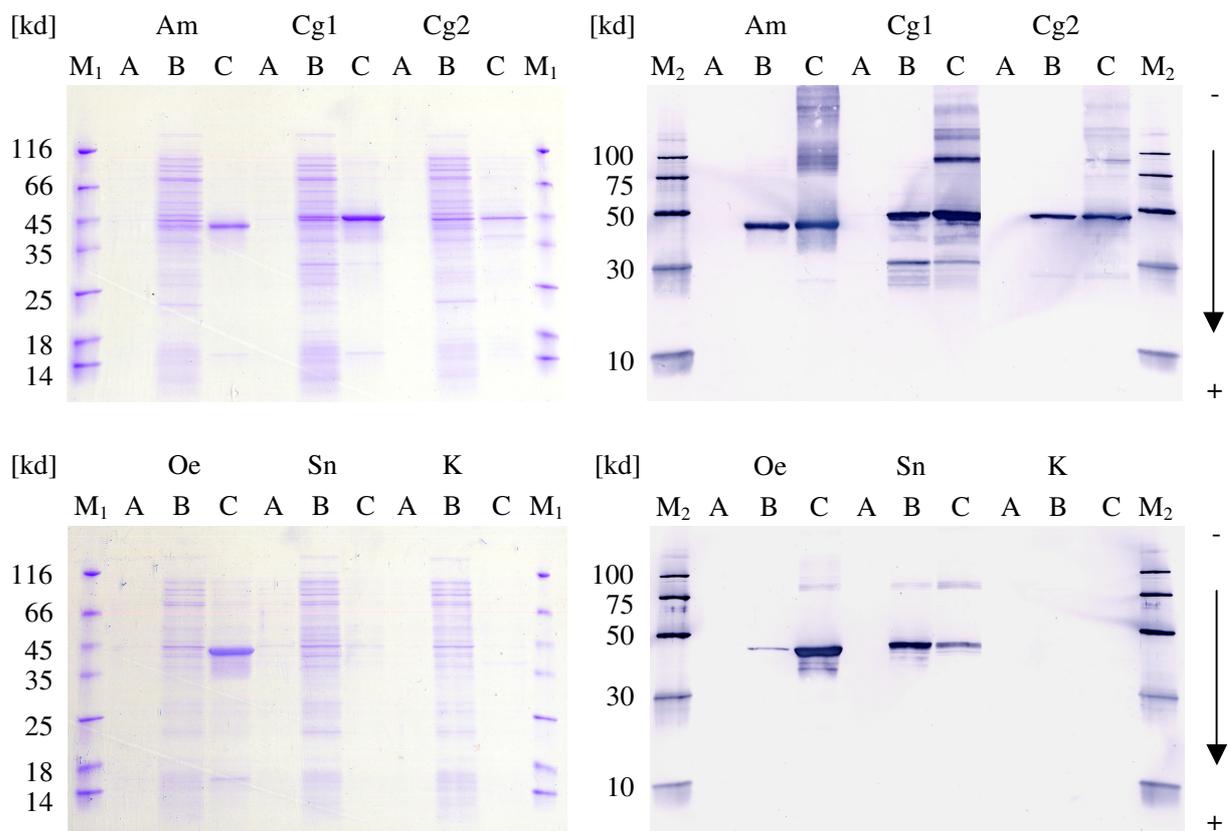


Abb. 20: SDS-PAGE und Western-Blots zu den Expressionsversuchen

Analysiert wurden der lösliche Proteinanteil uninduzierter (A) sowie die lösliche (B) und unlösliche Proteinfraktion (C) induzierter BL21(DE3)-Expressionskulturen wie in Abb. 18. Alle Proben wurden zweimal auf dasselbe Gel aufgetragen, so daß nach der Elektrophorese eine Gelhälfte (**links**) einer Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau R-350 unterzogen, die andere (**rechts**) geblottet und zum immunologischen Nachweis von Proteinen mit Histidin-Tag genutzt werden konnte. Von allen Proben uninduzierter Kulturen wurde das gleiche, maximale Volumen aufgetragen. Es enthielt durchschnittlich $0,3 \pm 0,1$ μg lösliches Gesamtprotein. Die Auftragsvolumina der übrigen Homogenate wurden auf das Frischgewicht der Bakterienpellets normiert, so daß die relative Intensität der OpDH-Banden die relative Menge der in den einzelnen 1l-Kulturen gebildeten OpDHs widerspiegelt und zugleich abgeschätzt werden kann, welcher Anteil der OpDHs jeweils in löslicher bzw. unter nativen Pufferbedingungen unlöslicher Form vorlag. Aus induzierten Expressionskulturen wurden so zwischen 1,8 und 2,0 μg lösliches Protein bzw. zwischen 0,4 und 1,7 μg mit Harnstoff solubilisiertes Protein appliziert. Als Größenstandard dienten Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14 und 116 kd (**M₁**) bzw. Referenzproteine mit Hexa-Histidin-Tag (15 bis 100 kd, **M₂**), die sich nach Blotting auf PVDF immunologisch erfassen ließen. Alle Proben wurden einer reduzierenden Probenvorbereitung ohne Iodacetamid unterzogen.

Das Expressionsniveau der rekombinanten Wattwurm-AloDH und der *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH lag offenbar über dem der anderen Enzyme. Zugleich wurde deutlich mehr lösliche Wattwurm-OpDH und in nativem Puffer solubilisierbare *Crassostrea*-Alo/StrDH1 als lösliche *Ostrea*-Alo/StrDH gebildet. Die Bandenintensitäten belegen übereinstimmend mit den Mengen löslichen und unlöslichen Gesamtproteins aus den verschiedenen Kulturen (Abb. 18, Mitte), daß bei der Expression von *Ostrea*-Alo/StrDH-LE6xH ein besonders hoher Enzymanteil, im Fall des Spritzwurmenzyms dagegen verhältnismäßig wenig OpDH präzipitierte.

3.8.2 Reinigung heterolog exprimierter OpDHs

Heterolog in *E. coli* exprimierte OpDHs aus Watt- und Spritzwurm sowie Pazifischer und Europäischer Auster wurden durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration via Sephadex G100 gereinigt (2.5.6.5). Die 1 l-Bakterienkulturen, die als Ausgangsmaterial für die Reinigung dienten, wurden wie jene aus den Expressionsversuchen unter 3.8 angezogen, geerntet und aufgeschlossen. Allerdings wurden die Bakterien (durchschnittlich $6,8 \pm 1,5$ g) hier nicht in Homogenisationsmedium (100 mM Imidazol/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0), sondern im Startpuffer der Affinitätschromatographie (Lysepuffer = 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, bei der Reinigung der Watt- und Spritzwurm-Enzyme zusätzlich 20 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0) aufgearbeitet. Dieser enthielt als Antioxidans allenfalls 2-Mercaptoethanol, das Ni-NTA-Matrizes anders als DTT in Konzentrationen bis zu 20 mM nicht schädigt (Herstellerangaben, Qiagen, Hilden). Die erzielten OpDH-Ausbeuten sind deshalb nicht unmittelbar mit denen der Versuchsreihe zur OpDH-Expression (3.8) vergleichbar. So fand sich bei der Expression von Wattwurm-AloDH-LE6xH in den mit Lysepuffer aufgeschlossenen Bakterien statt des in Gegenwart von 5 mM DTT üblichen AloDH : StrDH-Verhältnisses von 10 : 1 (Abb. 18) nur rund viermal mehr AloDH- als StrDH-Aktivität. Erst durch Überführen der Probe in DTT-haltigen Gelfiltrationspuffer (50 mM Kaliumphosphat, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) wurde ein Aktivitätsverhältnis von 7 : 1 (AloDH : StrDH) erreicht. Zugleich wurden um das dreifache bzw. doppelte höhere AloDH- und StrDH-Gesamtaktivitäten als im Rohextrakt nachgewiesen.

Während sich in allen übrigen Rohextrakten trotz eventueller partieller Enzyminaktivierung infolge unzureichenden Oxidationsschutzes mehr als 1000 U der jeweils dominierenden OpDH-Aktivität fanden, wurden bei der Reinigung von Alo/StrDH-LE6xH aus *O. edulis* nur 133 U AloDH und 300 U StrDH detektiert. Auf eine Reinigung der *Crassostrea*-AloDH2

wurde verzichtet, weil das dafür vorgesehene Homogenat weniger als 30 U AloDH- und noch weniger StrDH-Aktivität enthielt.

Abb. 21 zeigt exemplarisch die chromatographische Reinigung von Wattwurm-AloDH-LE6xH über Ni-NTA Superflow. Auf die mit Lysepuffer voräquilibrierte Säule wurden 32 ml Bakterienhomogenat appliziert, die 272 mg lösliches Gesamtprotein enthielten. Während der größte Anteil dieses Proteins unter den gewählten Bedingungen nicht mit dem Säulenmaterial interagiert und folglich unmittelbar von der Säule wusch (während der ersten 40 ml überwiegend $E_{280} > 3$), wurde die OpDH fast vollständig gebunden. Sie eluierte erst im Verlauf eines linearen Imidazolgradienten bei Konzentrationen zwischen 56 und 112 mM Imidazol (Elutionsvolumen zwischen 212 und 236 ml). Die Fraktionen maximaler AloDH- und StrDH-Aktivität wurden vereinigt, eingengt, in Gelfiltrationspuffer überführt und durch Chromatographie über Sephadex G100 nachgereinigt (Chromatogramm nicht gezeigt). Das konzentrierte Endprodukt schließlich umfaßte 3 mg AloDH-LE6xH einer spezifischen AloDH- und StrDH-Aktivität von 940 bzw. 83 U·mg⁻¹ Protein (Aktivitätsverhältnis 11 : 1, Tab. 5). Die Enzympräparation erschien auf silbergefärbten SDS-Gelen homogen (Abb. 22).

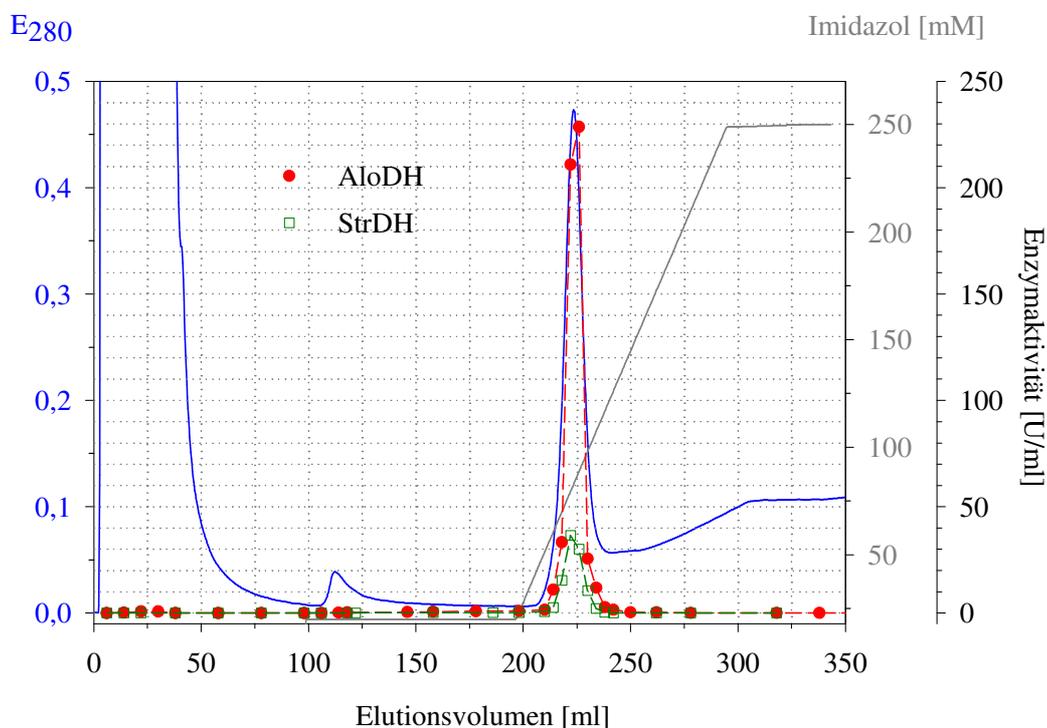


Abb. 21: Ni-NTA-Chromatographie heterolog exprimierter Wattwurm-AloDH-LE6xH

Die Säule (1 cm x 10,5 cm Ni-NTA Superflow) wurde mit einem Puffersystem aus 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 20 mM 2-Mercaptoethanol und 10 bis 250 mM Imidazol, pH 8,0 betrieben. Aufgetragen wurde das Homogenat einer 1 l-Expressionskultur (8,9 g Bakterien). Fast die gesamte rekombinante OpDH wurde unter den gewählten Startbedingungen (10 mM Imidazol im Laufmittel) an das Säulenmaterial gebunden und eluierte erst im Verlauf eines linearen Imidazolgradienten bei Konzentrationen zwischen 56 und 112 mM Imidazol.

Tab. 5: Reinigung heterolog exprimierter OpDHs

Alle Angaben beziehen sich auf das Endprodukt einer OpDH-LE6xH-Reinigung durch Ni-NTA-Chromatographie und Gelfiltration (Am-AloDH = Wattwurm-AloDH, Cg-Alo/StrDH1 = Alo/StrDH1 aus *C. gigas*, Oe-StrDH = StrDH aus *O. edulis* und Sn-Alo/StrDH = Spritzwurm-Alo/StrDH, vgl. die mRNAs aus 3.7 und 8.2). Als Ausgangsmaterial der Reinigung diente stets das Homogenat einer 1 l-Expressionskultur wie unter 2.6.11. Neben der Masse homogenen Proteins [mg], das aus der jeweiligen Kultur isoliert werden konnte, sind die spezifischen AloDH- und StrDH-Aktivitäten des gereinigten Enzyms [U·mg⁻¹ Gesamtprotein], die zugehörigen Gesamtaktivitäten [U] und das Verhältnis aus AloDH- und StrDH-Aktivität aufgeführt. Alle Aktivitäten und Proteinmassen stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen mit weniger als 10 % Abweichung dar. Zusätzlich ist die gelfiltrationschromatographisch ermittelte Masse der einzelnen OpDHs ihrem theoretischen Molekulargewicht (ohne Fusionstag) gegenübergestellt.

	AS	Aktivität [U]	AloDH / StrDH	Protein [mg]	spez. Akt. [U·mg ⁻¹]	MW [kd]	
						theor.	exp.
Am-AloDH	Ala	3195	11 : 1	3	940	45,2	41
	Gly	283			83		
Cg-Alo/StrDH1	Ala	539	3 : 1	2	241	45,3	43
	Gly	190			85		
Oe-StrDH	Ala	95	1 : 2	1	140	44,7	41
	Gly	181			266		
Sn-Alo/StrDH	Ala	453	1 : 1	1	498	43,7	40
	Gly	609			669		

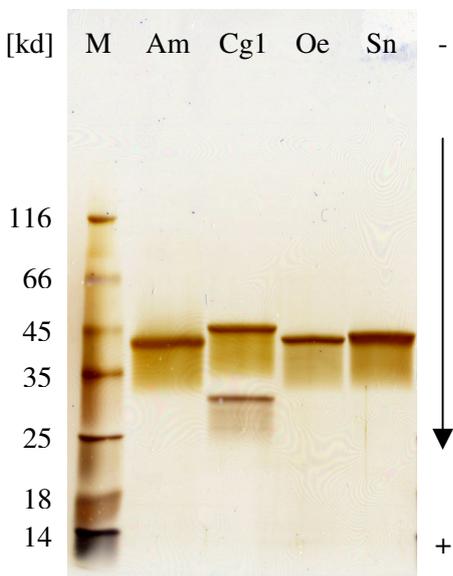


Abb. 22: SDS-PAGE rekombinanter Alo/StrDHs nach Reinigung über Ni-NTA u. Sephadex G100

Aufgetragen wurden rund 1 µg gereinigte OpDH-LE6xH aus *A. marina* (Am), *C. gigas* (Cg1), *O. edulis* (Oe) bzw. *S. nudus* (Sn) sowie ein Marker (M) mit Proteinen zwischen 14 und 116 kd. Alle Proben wurden einer reduzierenden Probenvorbereitung ohne Iodacetamid (85°C) unterzogen. Proteine wurden durch Silberfärbung detektiert.

Auch von den übrigen rekombinanten OpDHs konnten durch affinitäts- und gelfiltrationschromatographische Reinigung jeweils 1 bis 2 µg isoliert werden (Tab. 5). Während die gereinigten Alo/StrDH-LE6xHs aus *O. edulis* und *S. nudus* in silbergefärbten SDS-Gelen ebenso rein erschienen wie das Wattwurmenzym (erhalten wurde je eine 42 kd-Bande), fand sich im Fall der rekombinanten *Crassostrea*-Alo/StrDH1 neben einem 45 kd-Protein eine

schwächere Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 29 kd (Abb. 22). Durch Blotting und nachfolgende Immunodetektion konnte nachgewiesen werden, daß dieses 29 kd-Protein einen Histidin-Tag umfaßte, es sich also offenbar um ein C-terminales Abbauprodukt der Austern-OpDH handelte. Die gereinigten *Crassostrea*-, *Ostrea*- und *Sipunculus*-Enzyme zeigten mit ihren präferierten Aminosäuresubstraten jeweils eine geringere spezifische Aktivität als die Wattwurm-AloDH-LE6xH mit L-Alanin (Tab. 5). So wurden bei der *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH nur 241 U·mg⁻¹ Protein AloDH- und dreimal weniger StrDH-Aktivität gemessen, im Fall der rekombinanten *Ostrea*-OpDH AloDH- und StrDH-Aktivitäten von lediglich 140 bzw. 266 U·mg⁻¹ erzielt (Aktivitätsverhältnis ≈ 1 : 2). Das isolierte Spritzwurm-Enzym schließlich besaß 498 U·mg⁻¹ AloDH- und 669 U·mg⁻¹ StrDH-Aktivität (Verhältnis AloDH : StrDH = 1 : 1,3).

Für die verschiedenen rekombinanten OpDHs wurden Gelfiltrationschromatographisch Massen zwischen 40 und 43 kd ermittelt, die das jeweilige theoretische Molekulargewicht unterschritten (Tab. 5). Die Alo/StrDH-LE6xH aus *S. nudus*, die das geringste theoretische Molekulargewicht besitzt, erschien auch in der Gelfiltrationschromatographie am kleinsten.

3.9 Primär- und Sekundärstrukturvergleich ausgewählter OpDHs

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs aus *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* und *S. nudus* (3.7 und 8.2) stimmen untereinander und mit fast allen anderen in öffentlichen Sequenzdatenbanken erfaßten OpDHs höherer Invertebraten (am 24.10.05 verfügbare Komplettssequenzen) in mehr als 40 % ihrer rund 405 Aminosäuren überein (Tab. 6). Sie weichen nur von der ODH aus *Pseudocardium sachalinensis* (BAD81062) stärker ab. Die ODH dieser Muschel und die Wattwurm-AloDH etwa besitzen bloß 33 % gleiche Aminosäuren. Eine noch geringere Ähnlichkeit besteht zur 359 Aminosäuren umfassenden CENDH aus dem Bodenbakterium *Arthrobacter spec.* (BAA08145). Mit diesem Enzym teilen die genannten Alo/StrDHs nicht mehr als 18 % (*Ostrea*-StrDH) bis 23 % (AloDH2 aus *C. gigas*) ihrer Reste. Die beiden Alo/StrDHs (Alo/StrDH1 und AloDH2) aus *C. gigas* weisen 80 % Aminosäureübereinstimmung auf und differieren damit stärker als die ODHs der Kammuscheln *Pecten maximus* und *Mizuhopecten yessoensis* (CAC36305 und BAB92087; 95 % gleiche Reste) bzw. der Cephalopoden *Loligo vulgaris*, *Loligo opalescens* und *Sepia officinalis* (CAC36301, CAC20642 und CAC36306; > 89 % identische Aminosäuren).

Abb. 23 zeigt ein Sequenzalignment ausgewählter Invertebraten-OpDHs, in das auch die CENDH aus *Arthrobacter spec.* einbezogen wurde. Berücksichtigt wurden alle zu obigem Stichtag komplett in Datenbanken verfügbaren OpDH-Sequenzen höherer Invertebraten mit

Tab. 6: Prozentuale Sequenzidentität ausgewählter OpDHs

Verglichen wurden die in der vorliegenden Arbeit sequenzierten ALo/StrDHs aus *A. marina* (Am), *C. gigas* (Cg1 und Cg2), *O. edulis* (Oe), *S. nudus* (Sn), eine mögliche ALoDH aus der Schnecke *Fusitriton oregonensis* (Fo, BAE00002), TaDHs aus dem Sandwurm *Arabella iricolor* (Ai, BAB86769) und dem Seeohr *Haliotis discus hannai* (Hdh, BAB92088), ODHs aus den Muscheln *Mizuhopecten yessoensis* (My, BAB92087), *Pecten maximus* (Pm, CAC36305) und *Pseudocardium sachalinensis* (Ps, BAD81062) und den Kopffüßern *Loligo opalescens* (Lo, CAC20642), *Loligo vulgaris* (Lv, CAC36301) und *Sepia officinalis* (So, CAC36306) sowie die CENDH aus dem Bakterium *Arthrobacter spec.* (As, BAA08145). Die Zahlen geben die prozentuale Aminosäureübereinstimmung in globalen Alignments jeweils zweier Sequenzen an.

	Am	Cg1	Cg2	Oe	Sn	Fo	Ai	Hdh	My	Pm	Ps	Lo	Lv	So
Cg1	44													
Cg2	42	80												
Oe	44	61	58											
Sn	50	47	44	46										
Fo	45	55	53	52	46									
Ai	49	46	43	45	48	45								
Hdh	44	54	51	52	47	61	46							
My	46	49	48	49	42	47	47	49						
Pm	46	48	46	48	42	47	47	49	95					
Ps	33	38	36	41	35	37	40	40	37	38				
Lo	42	52	50	47	43	51	42	52	48	48	39			
Lv	43	53	50	49	44	50	42	52	48	48	40	93		
So	42	52	49	47	42	51	40	51	49	49	38	90	89	
As	20	22	23	18	21	20	16	22	16	15	15	15	14	15

Ausnahme der ODHs aus *M. yessoensis* und *L. opalescens*, die wegen ihrer großen Ähnlichkeit zu den ODHs aus *P. maximus* bzw. *L. vulgaris* keinen zusätzlichen Informationsgewinn erwarten ließen. Abgesehen von Abweichungen im Bereich der Termini umfaßt das Alignment diverse Lücken, die überwiegend auf die bakterielle CENDH zurückzuführen sind. Darüber hinaus verursachten nur die TaDH des Seeohrs, *Haliotis discus hannai* (BAB92088), und die ALoDH des Wattwurms interne Lücken von mehr als zwei Aminosäuren Länge (*Hali-chondria*-TaDH, K-63 bis G-65 und Wattwurm-AloDH, P-316 bis R-318 sowie G-328 bis N-331). Die Insertionen, welche die *Arenicola*-AloDH von allen übrigen Invertebraten-OpDHs unterscheiden, liegen in einem Sequenzabschnitt, der bei der CENDH fehlt.

Das Alignment umfaßt 28 Aminosäuren, die in allen Sequenzen übereinstimmen (*), sowie 45 konservierte (:) und 26 semi-konservierte (.) Positionen, an denen die Reste sämtlicher Sequenzen einander (vereinfacht ausgedrückt) in ihrer Größe und Hydropathie bzw. in einer

dieser Eigenschaften ähneln. In einer Alinierung ohne die bakterielle CENDH (nicht gezeigt) erhöhte sich die Zahl gleicher, konservierter und semi-konservierter Reste auf 61, 69 und 22.

In allen alinierten OpDHs inklusive der bakteriellen CENDH tritt nahe des N-Terminus das charakteristische GXGXX(G/A)-Motiv klassischer FADH₂- und NAD(P)H-abhängiger Dehydrogenasen auf (Rossmann et al., 1974 und Wierenga et al., 1985). Es erscheint hier als GXGN(G/A)(G/A)-Motiv und wird unmittelbar von einem konservierten Histidin gefolgt. Bei den Invertebraten-OpDHs vereinfacht sich die Sequenzfolge zu GGGN(G/A)A, wobei außer im Fall der TaDH des Sandwurms, *Arabella iricolor* (BAB86769), an vorletzter Stelle stets ein Glycin zu finden ist. Durchgehend konserviert sind ferner das Histidin an Position 202 sowie Arginin-292 und Aspartat-297 (CENDH-Nummerierung, in Abb. 23 rot hervorgehoben und durch Pfeile markiert), die nach Vermutungen von Britton et al. (1998a) und Janßen (2000) eine für die Pyruvatbindung und den Reaktionsmechanismus der OpDHs essentielle katalytische Triade bilden. Von drei weiteren Aminosäuren, die Britton und Mitarbeiter (1998a), für katalytisch bedeutsam hielten (in Abb. 23 ebenfalls rot dargestellt), sind zwei (Tyrosin-293 und Glutamat-296 nach CENDH-Nummerierung) ebenso in allen Sequenzen konserviert, während die dritte (Asparagin-198 der CENDH) bei allen Invertebraten-OpDHs außer denen der Anneliden und Sipunculiden fehlt.

Neben den vermutlich zur katalytischen Triade gehörenden Resten sind auch die Histidine in den CENDH-Positionen 17 und 88, zwei weitere Argininreste (R-39 und R-143) sowie ein zusätzliches Aspartat (D-320) in allen OpDHs des Alignments zu finden. Ansonsten handelt es sich bei den durchgehend konservierten Aminosäuren überwiegend um Glycin oder Prolin. An Position 142 (CENDH-Nummerierung) fällt ein konserviertes Cystein auf.

Basierend auf Strukturdaten von Britton et al. (1998a) sind α -helikale Abschnitte und β -Faltblätter der CENDH aus *Arthrobacter spec.* in Abb. 23 grau bzw. schwarz unterlegt dargestellt. Analog wurden bei den Invertebraten-OpDHs Sekundärstrukturelemente kenntlich gemacht, die mit Hilfe des PredictProtein-Servers (PROFsec, vgl. 2.7.1) vorhergesagt wurden. Das Sequenzalignment spiegelt eine hohe Konservierung der Sekundärstrukturen wieder. Schließt man von der Grenze zwischen der N- und C-terminalen Domäne der CENDH (senkrechte Linie im Alignment) auf die Domänengrenze der Invertebraten-OpDHs, so wird deren N-terminalen Domäne offenbar wie die Nukleotidbindungsdomäne der CENDH durch α -Helices und β -Faltblätter geprägt, während in der C-terminalen Domäne praktisch ausschließlich α -Helices vorkommen (vgl. Britton et al., 1998a). Besonders stark konserviert erscheinen die β -Faltblätter β_1 , β_2 , β_6 , β_7 , β_8 und β_{10} sowie die α -Helices α_1 bis α_5 , und α_7 bis α_{11} der CENDH, die mit geringen, vor allem ihre Länge betreffenden Abweichungen auch bei allen

Ergebnisse

	β_1	α_1	β_2	α_2		
Am_AloDH	----MGSDSI	TRLLICGGGNGAHAY	A G XGXXG AGIASSKKNVE	VRVLTLYS	SDEAERWTNAMENHDF	56
Cg_AloDH1	-----MSGKLV	VLTTCGGGNGAHCL	AGLASVRPDIES	SRVLTMYA	DEAERWAANLDSG-F	52
Cg_AloDH2	-----MDGKLV	VLTTCGGGNGAHCL	AGLSAMRPKIES	SRVLTLYS	SDEAERWAVELDSG-L	52
Oe_StrDH	----MGTEDR	TKVLICGGGNGAHCL	AGLSASNPE	THVLTTLF	FADEAERWTKVLSNDL	55
Sn_StrDH	-----M	VVALICGGGNGAHVM	AGTAASYPGQE	VRVMTLFA	DEAERWSNALKDHDY	50
Fo_AloDH	-----MADKL	TVCVCGGGNGAHAM	AGLAAHPGT	EARVLT	TLFQDEAPRWANIMKEENF	53
Ai-TaDH	-----M	VLTICGGGNAHTL	AGIASNPME	VRVLTLYA	DEAERWIKSMETNDF	50
Hdh-TaDH	-----MTKKI	TVLVCGGGNGAHVT	AGLAASRDDI	ETRVLT	TFADAERWTNIMKENDL	53
Pm_ODH	-----M	TVKVCVCGGGNGAHTL	SGLAASRDGVE	VRVLT	TLFADEAERWTKALGADEL	51
Ps_ODH	---MSRSLEK	SNITIFGGGNGAHVL	SGLSSDVVNANVT	VVDTF	FQDEAERWTKAMAANGF	57
Lv_ODH	MAHQEKPPV	LIKLLICGGGNGAHVL	TGLASSRHNVK	VNVLSL	FADEAERWRKTLGDNHF	60
So_ODH	MAHQEKPPV	LINLLVCGGGNGAHVL	TGLASSRHNVK	VNVLSL	FADEAERWRNTLGDNHF	60
As_CENDH	-----MIES	KTYAVLGLGNGGHAF	AAYLALKG	---	QSVLAWDIDAQRIKEIQDRGAI	49
		* * * . . *	: . :	:	: : * *	

	β_3	β_4	β_5	β_6	α_3		
Am_AloDH	VVNFD	CGGK---	HNGEIRAKPS-	MVSKDPAEVALGCN	VIVIVV	VPFAFAHEQYLRALPEYIQ	112
Cg_AloDH1	IITVH	NDDG---	SIKSIKTKPS-	LVTKDPKAVPGVDY	IFIVV	VPFAFAHAMYFEAIAPYID	108
Cg_AloDH2	LITVR	NDDG---	SKSLIKTKPS-	MVTKDPQKAVPGANY	IFFVV	VPFAFAHAQYLEAIAPYIE	108
Oe_StrDH	TVTIV	KNDG---	GSEEEKSKPT-	LITKNPKEAVTGAE	IIFLI	VPFAFAHEQYFREISPFIG	111
Sn_StrDH	NITFY	SGGK---	ESHRCTNKPK-	MVTKNPAEAVPGCD	IIAFV	VPFAFAHRQYFEAIEPYIK	106
Fo_AloDH	TIQQN	KPKD---	SVVHIKAKPA-	LVTKDAQAVPGAN	IIIFV	VPFAFAHAQYFKAIEPYVY	109
Ai-TaDH	TTIKY	ATGK---	DPVHLKTKPK-	LVTKNPEQATGAD	IIVIT	VPFAFAHAQYLTALKPHVK	106
Hdh-TaDH	RITV	DEGDIKSGESVDFKVKLN-	CITKDP	SKAVPGAD	VIIFT	VPFAFAHQSYLEAIEPYIQ	112
Pm_ODH	TVIVN	EKDG---	TQTEVKSRPK-	VITKDEIAISGADV	VIL	VPFAFAHEGYFQAMAPYVQ	107
Ps_ODH	TVKYG	NGKD---	LVQAPGKPKFT	VTKEVQKVEKAD	VVIL	CMPAFLHEMVLTSVAPYVP	113
Lv_ODH	VVNF	REKDG---	SSQIITSRPN-	MITNDPSKAVPGCN	LIIF	VPFAFAHEGYFRAIAPYLE	116
So_ODH	VVNF	REKDG---	TNKIITSRPN-	MITNDPSRAVPGCN	LVIF	VPFAFAHEGYFRAIAPYLE	116
As_CENDH	IAEG	PG---	LAGTAHPD-	LLTSDIGLAVKAD	ADVILIV	VPFAIHASIAANIASYIS	100
		:	: : :	:	: : : * * :	: . . :	

	β_7	2	α_4	β_8	β_9	β_{10}	
Am_AloDH	PGTII	VGM	QAGFEFAC	WILGAK-GKQ	CTLV	SFESLPWACRIEEFGRTAEVKGTKQOL	171
Cg_AloDH1	DNTVI	VGLPG	QAGFEFECV	NLLGDK-AKR	CTMVT	FESLPWACRLVEFGKNVEILGFKDTL	167
Cg_AloDH2	GNTVI	VGLPS	HAGFEFECAD	LLGEK-ANACT	IVAFESLPFVCRLIEFGKNVEILGFKDTL		167
Oe_StrDH	DNTLI	VGLPG	QAGFEFQCL	HMLGEK-AKH	CTIM	STESLPWACRILEFGRLVQILGFKETL	170
Sn_StrDH	PGVV	VGLPG	QPGFEFAVR	GILGEK-AKQ	CTIL	SYESLPWACRIIEFGRTAEVLGVKKHM	165
Fo_AloDH	PNTAI	I	GLPG	QPGFEFQCFD	VLKDK-ARQ	CAILSYESLPWACRILEFGKLVILGAKDSL	168
Ai-TaDH	PGTV	V	VGFPG	QPGFDFEIM	KIWGDL-AKQ	CTVMNFVSLPWACRIKEFGKSVEVLATKDMM	165
Hdh-TaDH	PNTI	I	VGM	QPGFEFQ	VFDVLKDK-AKQ	CVIMSFESLPWACRIAEFGKFVQILMVKVN	171
Pm_ODH	DSALI	VGLPS	QAGFEFQCR	DILGDK-AAAV	SMMSF	ETLPWACRIKEFGKVEVLGKTSVL	166
Ps_ODH	ETCPI	VGLPG	QPGFEYQAL	FHLRGN-GKK	GSVMSI	ETLPWACRIAKYQGEVDVIGKECI	172
Lv_ODH	PNTVI	VGLPS	QPGFQ	FQCCDLLGQ-GRT	SAIVS	FESLPWACRIGTFGREVQVLGPKDTL	175
So_ODH	PNTVI	VGLPS	QPGFQ	FQCCDLLGQ-GRT	SAIVS	FESLPWACRIGTFGREVQVLGPKDTL	175
As_CENDH	EGQL	IILN	PGAT	GGALEFRKILRENGAPE	VTIGETSS	MFTCRSERPG-QVTVNAIKGAM	159
	:	:	* . . *	.	:	: : : * * *	* . : *

	β_{11}	α_5	β_{12}	3	α_6				
Am_AloDH	VGALL	YGD-PRPVRE-PSAVLQETL	GTHPVLH	HIHGHLLG	MTLMGVN	YIHPAILYGRWWN	229		
Cg_AloDH1	GASLL	KGKECNLTKP-I	IETTQYILGEKPKVR	HRVQNYIAITL	MAK-SIV	HPPIMYGKWSQ	225		
Cg_AloDH2	GASTL	KGKRCNVTQS-V	LELPQYIFGDRPKV	RRVQNYIITIL	MAK-FIV	HPSLMYGKWSQ	225		
Oe_StrDH	GASKL	QGSISNLKQS-P	FESVQVKVLGPKPV	LR	IQNYIAVNLMAK-SII	HPPIMYGKWSA	228		
Sn_StrDH	IGAM	QLGH-PQP	PTD-ANVMAQNLL	GEPKLETR	GH	LVAMTLMA	TNAI	HPSILWAKWHE	223
Fo_AloDH	MGSE	IKGK-SQLKPD-	PAKTLQAMLGEHP	VLKMAHNYLEPYL	MTK-SIV	HPPIMYGRWKD	225		
Ai-TaDH	FGSV	RNGT-VAPKMD-	PTAMIQCGLGPL	RL	EC	SGHLGMSIMA	VN	GMLHPSIMYNRWHD	223
Hdh-TaDH	MGCL	IRGQ-SKPSYD-	PMEAVQRMGKAP	ILTQANNY	TEPIL	ATK-SII	HPPIMYGRWKD	228	
Pm_ODH	AASL	IKGT--AKTVD-	PLSTLQMLHGAEP	VFRLAKHF	LEML	IMS	Y-SFV	HPAILFGRWGS	222
Ps_ODH	YFSS	VDQSSGYV	GAGLVQLIQTLL	GAKPVLKREEN	IIKYTF	LYR-PTV	HPPIMYAKWKN	231	
Lv_ODH	ACAI	IMRG-CRPLFP-	ILKTIQYVIGKEPKL	MTMA	ANYLSINLL	AD-AVV	HPPMYGTWKD	232	
So_ODH	ACAI	IMRG-CKTLFP-	ILPTIQYIIGKEPKL	TLA	ANYLSINLL	AD-SVV	HPPMYGTWKD	232	
As_CENDH	DFACL	PAA----	KAG---	WALEQIGSVLP	QYAVEN	VLHTSLTN	VNAV	HPLPTLLNAAR	212
	.	:	:	.	*	:	:	:	:

		α_7	45	6						
Am_AloDH	W-DGRPVAEPP	LFYHG	MDEFTADT	LTAMGDEVMAIAATLSKH	PAGPDFSNVCHVFDWYKR 288					
Cg_AloDH1	W-DGKPLSEKPL	LFYQGLDER	QAEELLSGV	SDECVATAKAI	EKKVPGGLDMSDVIHVFDWYLN 284					
Cg_AloDH2	W-DGRPLSEKPL	LFYQGLDKR	QAEELLSGV	SDECVATAKAI	EKMVPGGLDMSDVIHVFDWYLN 284					
Oe_StrDH	FNEAAPLKEKPL	LFYQGVDEK	QASLLSSVS	NECIAIGKAI	EKQIPGIDMSEVIHILDWFLT 288					
Sn_StrDH	N-D-EPVASQPL	LFYQGADDL	AAATLSGLS	SDDVIAIAK	GIKAKRPDADMSTVVIHICDWDYKR 281					
Fo_AloDH	W-DGQPMAEKPL	LFYQGLDEF	GAGSLSTVS	DEVLDTARA	ITKQKPELDLPHVEHLLLEWYRQ 284					
Ai-TaDH	W-DGKPVDAAP	LFYHGLSQ	AGADLLSD	VSNETIAIA	AKKVMERQGVLDLSNVIHMHPYYIG 282					
Hdh-TaDH	W-DGKPIEEKPL	LFYQGLDEE	QARYLGGI	SELVATAKA	IAAQKPEVDLSGVLHLIDWYLR 287					
Pm_ODH	W-DGKPVPEAPL	LFYQGLDQ	ATADMLT	ACSNECKDV	ANAIMAACCPGNLSDVKDIYQWYLE 281					
Ps_ODH	W-DGKPLDAAP	LFYQGADEE	AVKYL	DGATNEMIKI	ADFLQTKYPMDFSGISSMQDCF IG 290					
Lv_ODH	W-DGKPVAEKPL	LFYQGLNEF	SANLLDK	VSSSELVQ	TAVIHKYPMDDMKDVIHLFDWYKL 291					
So_ODH	W-DGQPVAEKPL	LFYQGLNEF	SADLLDK	VSTELVHTA	QAIQQKYPEDMDKDIHLFDWYKL 291					
As_CENDH	CESGTPFQ---	YLEGITP	SVGSLAEK	VDAERIAIA	IAKAFDLNVP-----SVCEWYKE 261					
	.	*	:	.*	:	.	.	:	:	
		α_8	7		8					
Am_AloDH	CYSDEMSDT	ISCLLKAI	RSNKAYIGL	THPCRPAEA	AAGDNNGGCNWEPNFGYRYIT	EDIPFG 348				
Cg_AloDH1	YYSDQITDK	SNLMMAM	RNKAYDGL	VH---PMKE	IEPGK---YVPDFTYRYMA	EDVPEG 337				
Cg_AloDH2	YYGEQISDK	SNLMTAM	RNKAYDGL	DQ---PMKE	IEPGK---YVPDFTYRYS	EDVPMG 337				
Oe_StrDH	YYADQITDK	SNLMTTM	QNKAYDGL	LH---PMKQ	VDDGGQ---FVPDFSYRYTA	EDVDFG 341				
Sn_StrDH	VYKGDIGDE	TNLTTIL	QTNNGYK	GLKH---PME	PAGDGL---FKVNYNYR	YLTEDI				
Fo_AloDH	DYRETVKDP	TSLLTAM	RNTAYNGL	VH---PMK	DAGNGK---WVPDFGYR	YLAEDI				
Ai-TaDH	AYPDDISDK	SSTLYTC	INTNAGF	KGLTH---P	CTKTADGK---FVPDFTGR	YFGE				
Hdh-TaDH	DHKPYIKDT	TSLTLV	LQTDAYD	GLVH---	PMKETEDGK---FVPDFRYR	YLTEDV				
Pm_ODH	YYHEDIQDD	HDLYHAI	TNKS	YKGLVH---	PVKAVDGG---VAPDFGN	RYLTEDI				
Ps_ODH	EYPEQIKDK	STLLSCL	KNQAYD	GLVH---	PMKKTDDGK---FVPDFKYR	YLMEDV				
Lv_ODH	NYKESIKDM	SNLRLAM	KTCTAYD	GLVH---	PMKETPDKM---FVPDFTYR	YMTEDI				
So_ODH	NYKESIQDM	SNLQAM	MKTC	SAYDGMVH---	PMKETPDGK---FMPDFNYR	YMTEDI				
As_CENDH	SYGQSP---	ATIYEAV	QGNPAYR	GIAG-----	PINLNTRYFF	EDVSTG 301				
	:	:	:	::	*	:	**	**	::	*
							↑	↑		
	α_9	α_{10}		α_{11}						
Am_AloDH	LVVLCGVAQII	GVATPHMDK	VVLWSQK	VSGKEYLV	DSTLSGRDMPDTRSPQKYGLTTIDQ 408					
Cg_AloDH1	IVPMKGIAEL	AGVSTPYL	DEVITWC	QKLNKEFL	VGNKLTGKDLKDTRAPQKYGYNKLED 397					
Cg_AloDH2	IVPMKGIAEL	AGVSTPFL	DEVITWC	QSKLNKEFL	VGNKLTGKDLKDTRAPQKYGYNKLED 397					
Oe_StrDH	LVVLCGIGQL	AGVDPVM	DEIITWA	QKLNQEYL	VGSELGKDLKTRAPQRFQFKTLQ 401					
Sn_StrDH	LAVIRGIGEL	VGNTPTI	DKVITWC	QDKMGREF	LKDGKFKVGDLEKARCPQHYGLHSLDE 394					
Fo_AloDH	LVVTKGLALL	AGVPTPET	DRVLAWC	QDKLGKEF	IVGSELKGDMTSSRAPQAYGFKSLDD 397					
Ai-TaDH	LAVTRGIAEI	AGCPTPN	IDKII	EWAQKLM	GKEYLVGGKFTGKDISATRAPQRYGFNTLDS 395					
Hdh-TaDH	LVVTKGLAQI	AGVPTPYH	DEVIAWC	QKQLGKEI	IVGDELKDKDIGSTRCPQRYGINTMDA 400					
Pm_ODH	MIVFKGVAIA	AGVAIP	SNDKLIM	WAQEKI	GKEYLVGALGKDVATTRCPQRYGFNTLDA 393					
Ps_ODH	LLIIKQIAEM	AGVATPI	IDEIIL	WAQTKL	DAEYLDKDKLCFVDRKHGRIPMAFGIKTLEE 403					
Lv_ODH	MVVFRGIAEL	AGVPTPAM	DETITW	GQKILG	KEVLVNGKLTGKDMNLTRAPQRFHFHSLFD 404					
So_ODH	MVVFRGIAQL	EGVPTPAM	DETITW	GQKILG	KEFLVDGELKGDMMNTRAPQRFHFHNSLFD 404					
As_CENDH	LVPLSELGRA	VNVPTPLI	DAVLDLI	SSLI	DTDFRKEG--RTLEKLGLSGLTAAGIRSAVE 359					
	:	::	.	*	*	:	.	.	:	.

Am_AloDH	ILGYD-----	413
Cg_AloDH1	LFTGSEFVT	408
Cg_AloDH2	LFSGNLNSFR	408
Oe_StrDH	LFDV-----	405
Sn_StrDH	IIGD-----	398
Fo_AloDH	LMALM-----	402
Ai-TaDH	IL-----	397
Hdh-TaDH	LVNIM-----	405
Pm_ODH	ILTGKK-----	399
Ps_ODH	FVNYCK-----	409
Lv_ODH	LVNLR-----	409
So_ODH	LVNLR-----	409
As_CENDH	-----	

Abb. 23: Vergleich ausgewählter OpDHs
 Dargestellt ist ein Aminosäurealignment er im Rahmen dieser Arbeit sequenzieren Alo/StrDHs aus *A. marina* (Am-AloDH), *C. gigas* (Cg-AloDH1 und Cg-AloDH2), *O. edulis* (Oe-StrDH) und *S. nudus* (Sn-StrDH), einer als AloDH annotierten OpDH aus *F. oregonensis* (Fo-AloDH, BAE00002), je einer TaDH aus *A. iricolor* (Ai-TaDH, BAB86769) und *H. discus hannai* (Hdh-TaDH, BAB92088), jeweils einer ODH aus *P. maximus* (Pm-ODH, CAC36305), *P. sachalinensis* (Ps-ODH, BAD81062), *L. vulgaris* (Lv-ODH, CAC36301) und *S. officinalis* (So-ODH, CAC36306) sowie der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (AS CENDH, BAA08145). Aminosäuren, die in allen dreizehn Se-

quenzen übereinstimmen, sind durch (*) gekennzeichnet. (:) und (.) markieren konservierte bzw. semi-konservierte Positionen, an denen die verschiedenen OpDHs Reste einer Gonnet-PAM250-Gruppe mit positivem Score $> 0,5$ bzw. $\leq 0,5$ aufweisen. Grau unterlegte Bereiche charakterisieren α -Helices, schwarz unterlegte Sequenzabschnitte β -Faltblätter. Während die Sekundärstrukturelemente der CENDH auf Strukturdaten von Britton et al. (1998a) basieren, wurden die der übrigen Enzyme mit Hilfe des PredictProtein-Servers (PROFsec) vorhergesagt. Die Numerierung der α -Helices und β -Faltblätter entspricht jener der CENDH-Sekundärstrukturelemente. Die senkrechte, schwarze Linie markiert die Domänengrenze dieses Enzyms.

Das Motiv **GXGXX(G/A)** tritt bei klassischen FADH₂- und NAD(P)H-abhängigen Dehydrogenasen auf (Wierenga et al., 1985). Die rot hervorgehobenen Reste Histidin-202, Arginin-292 und Aspartat-297 sowie Asparagin-198, Tyrosin-293 und Glutamat-296 (CENDH-Nummerierung) bilden nach Britton et al. (1998a) und Janßen (2000) wahrscheinlich eine für den Reaktionsmechanismus der OpDHs essentielle **katalytische Triade** bzw. sind mit dieser assoziiert. In den mit den Ziffern 1 bis 8 gekennzeichneten Positionen vermuteten dieselben Autoren Reste, welche die Aminosäurespezifität der Enzyme determinieren könnten. Sie postulierten, daß dort bei OpDHs mit hydrophobem Aminosäuresubstrat (z. B. bei Alo/StrDHs oder der CENDH) unpolare Reste konserviert sind, während OpDHs, die bevorzugt basische Aminosäuren umsetzen (z. B. ODHs) an diesen Stellen negativ geladene oder hydrophile Reste aufweisen. Die OpDH-Reste an den entsprechenden Alignmentpositionen wurden daher in Abhängigkeit von ihrer Hydrophatie in unterschiedlichen Farben dargestellt (bei neutralem pH **positiv** geladene Reste blau, **negativ** geladene violett, **polare** Aminosäuren grün, **unpolare** gelb-orange). Das gleiche Farbschema fand auch an den Positionen Verwendung, die bei Differenzanalysen der aktuellen Arbeit dadurch auffielen, daß hier alle Alo/StrDHs anders konserviert sind als die verschiedenen ODHs.

Invertebraten-OpDHs vorhergesagt wurden. Dagegen wurden die CENDH-Faltblätter β_3 , β_4 , β_9 und β_{11} nicht in allen Invertebraten-Sequenzen postuliert bzw. umfaßten gemäß der Vorhersage zum Teil nur zwei bis drei Aminosäuren. β_5 erkannte das Sekundärstrukturvorhersage-Programm in keiner Invertebraten-OpDH. Statt dessen fand es C-terminal anschließend einheitlich einen α -helikalen Sequenzabschnitt. Auch im Bereich des CENDH-Faltblattes β_{12} und der Helix α_6 ergaben die Sekundärstrukturvorhersagen kein einheitliches Bild. Dafür wurde jedoch angrenzend an eine durch Unterstreichung gekennzeichnete Loopregion der CENDH, für die Britton et al. (1998a) eine katalytische Funktion vermuteten, bei allen Invertebraten-OpDHs eine α -Helix vorausgesagt. Im C-terminalen Bereich der Invertebraten-Enzyme schließlich wurden vereinzelt kurze α -helikale oder gestreckte Abschnitte postuliert, die in der CENDH keine Entsprechung finden.

Um innerhalb der verschiedenen OpDHs Reste zu identifizieren, die an der Aminosäurebindung beteiligt sein oder auf sonstige Weise die Aminosäurepräferenz der Pyruvatoxidoreduktasen determinieren könnten, wurden die nach ihrer Substratspezifität geordneten Invertebraten-OpDHs (vgl. Farbcode in Abb. 23) manuell und unterstützt durch den AMAS-Server der Universität Oxford (Livingstone und Barton, 1993) gruppenweise verglichen. Da an spezifitätsrelevanten Positionen von OpDHs, die bevorzugt hydrophobe Aminosäuren umsetzen (z. B. von Alo/StrDHs und der bakteriellen CENDH), unpolare Reste zu vermuten sind, während bei den auf basische Aminosäuren spezialisierten ODHs negativ geladene oder polare Reste an der Substratbindung beteiligt sein könnten (vgl. Britton et al., 1998a und Janßen,

2000), fokussierten die Differenzanalysen vor allem auf Polaritätsunterschiede zwischen den einzelnen OpDHs. Tatsächlich konnten einige Merkmale identifiziert werden, die allen verglichenen Alo/StrDHs unabhängig von ihrer Herkunft aus Anneliden, Mollusken oder Sipunculiden gemeinsam sind, sie jedoch von den Mollusken-ODHs unterscheiden. Beispielsweise findet sich bei allen untersuchten AloDHs und StrDHs, aber auch bei den TaDHs aus *A. iricolor* und *H. discus hannai* sowie bei der CENDH aus *Arthrobacter spec.* an Position 20 des Alignments (CENDH-Nummerierung) ein Alanin (in Abb. 23 gelb-orange hervorgehoben), während die ODHs dort einen polaren Rest (Serin oder Threonin, in Abb. 23 grün dargestellt) aufweisen. In Position 82 ist bei den Alo/StrDHs (außer der angeblichen AloDH aus *F. oregonensis*, vgl. Abb. 23) sowie bei der bakteriellen CENDH ein hydrophober Rest (Valin oder Isoleucin) konserviert, wohingegen TaDHs und ODHs hier eine hydrophile Aminosäure (Cystein oder Threonin) besitzen. Ansonsten wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Alo/StrDHs, TaDHs und ODHs erkannt. Allerdings fanden sich diverse Hinweise auf eine Sonderstellung der Wattwurm-AloDH, die sich nicht nur durch die oben erwähnten Insertionen von den übrigen Alo/StrDHs unterscheidet. Ihre Andersartigkeit manifestiert sich zum Beispiel auch darin, daß sie abweichend von allen anderen Alo/StrDHs und der TaDH des Sandwurms an Position 30 (Wattwurm-Nummerierung) kein Prolin, sondern ein Lysin aufweist.

3.10 Phylogenie der OpDHs

Bei den OpDHs höherer Invertebraten handelt es sich, wie ihre große Sequenzähnlichkeit belegt (3.9), um homologe Enzyme. Ihre verwandtschaftlichen Beziehungen untereinander wurden durch Neighbor-Net-Analyse untersucht (2.7.4). Dabei wurde neben den Invertebraten-OpDHs aus dem Alignment in Abb. 23 eine mutmaßliche AloDH aus *S. nudus* (Primaßin, 2005; CAJ43559, Datenbankeintrag noch vertraulich) einbezogen. Das erhaltene Netzdiagramm (Abb. 24) zeigt, daß die OpDHs der Polychaeten *A. marina* und *A. iricolor* sowie des Sipunculiden *S. nudus* untereinander näher verwandt sind als mit den verschiedenen Mollusken-OpDHs. Allerdings verbindet ein recht starkes Signal (in Abb. 24 rot markiert) die Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs mit der ODH aus der Pilgermuschel, *P. maximus*, die dadurch etwas aus der Gruppe der übrigen Mollusken-OpDHs herausfällt. Nur ein schwächerer Split (in Abb. 24 gelb-orange hervorgehoben) gruppiert die *Pecten*-ODH unmittelbar mit Gastropoden- und Cephalopoden-OpDHs sowie der ODH aus der Muschel *P. sachalinensis*.

Die OpDHs der Schnecken und Kopffüßer bilden ebenso wie die beiden Alo/StrDHs aus der Auster *C. gigas* jeweils klar von den übrigen Enzymen separierte Verwandtschaftsgrup-

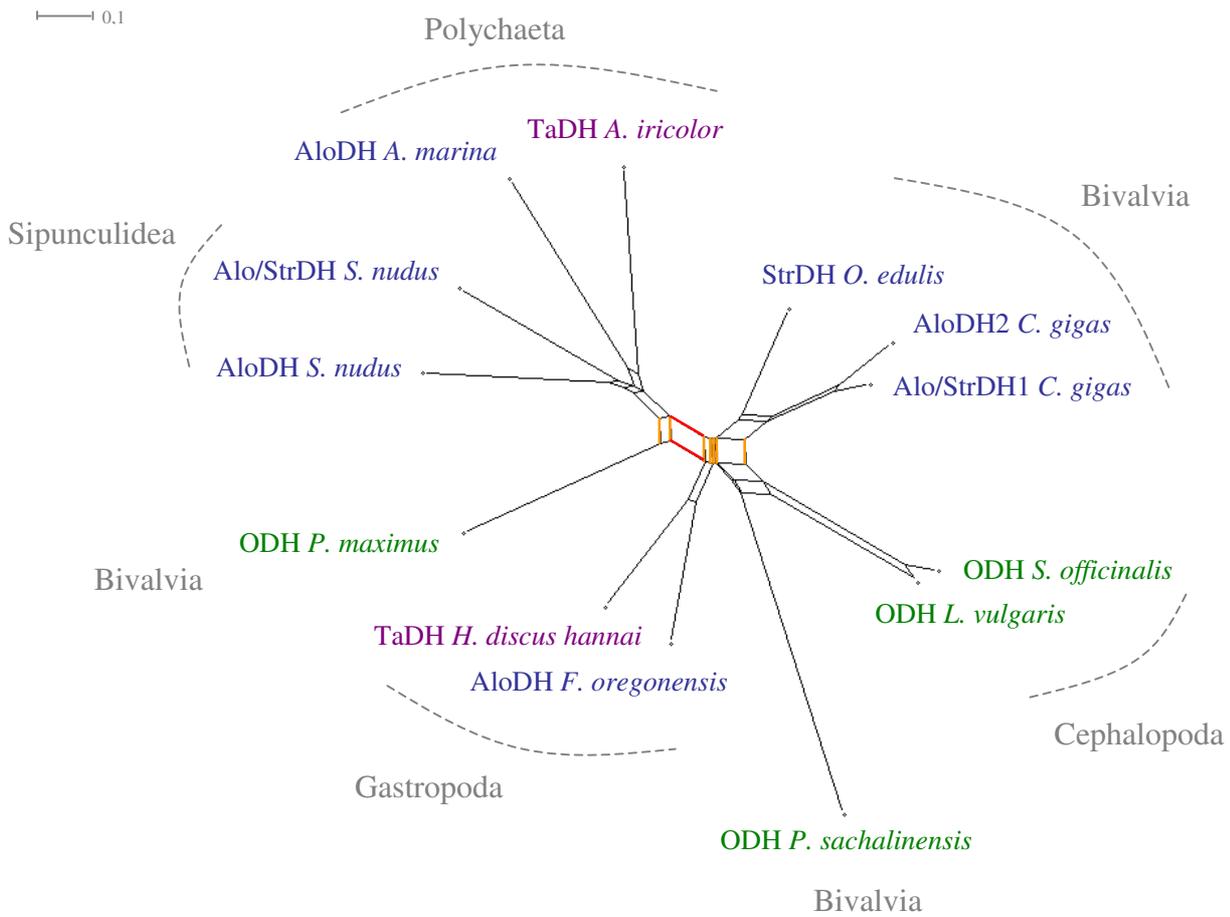


Abb. 24: Neighbor-Net-Analyse ausgewählter Invertebraten-OpDHs

Dargestellt ist ein auf LogDet-Distanzen basierender Neighbor-Net-Graph der Invertebraten-OpDHs aus Abb. 23, in den zusätzlich eine Spritzwurm-AloDH (AloDH *S. nudus*, CAJ43559, Datenbankeintrag noch vertraulich) einbezogen wurde. Die Distanzberechnung erfolgte ausgehend von den Aminosäuresequenzen der OpDHs. Splits (Signale, die einzelne Sequenzgruppen von allen übrigen Sequenzen separieren) erscheinen im Graphen als parallele Linien. Deren Länge stellt ein Maß für die Unterstützung des jeweiligen Splits dar. Der Split, der die ODH aus *P. maximus* zu den OpDHs der Polychaeten und Sipunculiden stellt, ist rot hervorgehoben, das damit unvereinbare Signal, das die *Pecten*-ODH mit den OpDHs der Gastropoden und Cephalopoden sowie der ODH aus der Muschel *P. sachalinensis* gruppiert, dagegen gelb-orange markiert. Wie in Abb. 23 sind AloDHs und StrDHs in blauer, ODHs in grüner und TaDHs in violetter Schriftfarbe wiedergegeben.

pen. Unsicher erscheint allerdings, in welcher Reihenfolge die zu den Cephalopoden-ODHs bzw. zur StrDH aus *O. edulis* führenden Entwicklungslinien von jener der *Crassostrea*-OpDHs abzweigen. Die ODH aus *P. sachalinensis* schließlich ist durch eine lange Kante von allen übrigen Mollusken-OpDHs inklusive der möglicherweise am nächsten verwandten Cephalopoden-ODHs getrennt, differiert also recht stark von ihnen.

Wurden in dem Aminosäurealignment, das dem Netz aus Abb. 24 zugrunde liegt, die einzelnen Aminosäuren nachträglich durch die Codons der zugehörigen codierenden Sequenzen ersetzt (siehe 2.7.4) und das resultierende Nukleotidalignment zur Distanzberechnung genutzt, so ergab sich eine sehr ähnliche Topologie (nicht dargestellt). Obwohl dabei insgesamt mehr

widersprüchliche Signale auftraten, wurden in diesem Fall die OpDHs der beiden Austernarten durch einen klaren Split von den übrigen Sequenzen abgegrenzt. Vor allem dann, wenn zusätzlich invariante Alignmentpositionen ausgeschlossen wurden, fand sich zudem ein deutlicheres Signal für eine Gruppierung der ODH aus *P. sachalinensis* mit den Kopffüßer-Enzymen.

Ausgehend von den im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs aus *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* und *S. nudus* konnten durch BLASTp- und PSI-BLAST-Datenbanksuchen (am 24.10.05, vgl. 2.7.3) auch Nicht-Invertebraten-Sequenzen mit signifikanter Ähnlichkeit zu den OpDHs höherer Invertebraten identifiziert werden. Ein um diese Sequenzen erweitertes phylogenetisches Netz ist in Abb. 25 dargestellt. Es umfaßt neben den ausgewählten Invertebraten-OpDHs aus Abb. 24 bakterielle Proteine, die in den entsprechenden Datenbankeinträgen als Opindehydrogenasen oder Opinsynthesen bezeichnet sind, verschiedene Bakterienproteine anderer bzw. unbekannter Funktion sowie ein hypothetisches Protein aus dem Schlauchpilz *Magnaporthe grisea*. Bei den meisten dieser Proteine (Identifikationsnummern vgl. Bildunterschrift zu Abb. 24), auch denen, die im Datenbankeintrag nicht ausdrücklich als putativ oder hypothetisch bezeichnet sind, handelt es sich um vorhergesagte Proteine, deren mögliche Funktion nur anhand von Sequenzvergleichen abgeleitet und nicht durch proteinbiochemische Arbeiten manifestiert wurde. Pflanzliche oder archaebakterielle Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit zu den OpDHs höherer Invertebraten konnten nicht nachgewiesen werden. Von Sequenzen mit mehr als 90 % Übereinstimmung wurde nur jeweils eine in das Netz einbezogen. Weggelassen wurden auch hypothetische Proteine aus *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* (YP_300701 und YP_252672) und *Bradyrhizobium japonicum* (NP_772726). Während erstere neben ähnlichen Enzymen aus *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* keinen zusätzlichen Informationsgewinn zu liefern vermochten, blieb das hypothetische Protein blr6086 aus *B. japonicum* unberücksichtigt, weil es deutlich weniger Aminosäuren als die übrigen bakteriellen Sequenzen umfaßt (nur 315 statt durchschnittlich 371 ± 15 Reste) und daher Alinierungsprobleme verursachte.

Die im Netz blau hervorgehobenen Sequenzen (außer der AloDH aus *S. nudus*, die noch nicht in öffentlichen Sequenzdatenbanken verfügbar ist) wurden durch nicht-iterativen Protein-BLAST bzw. in der ersten Runde von PSI-BLAST-Suchen erhalten. Abgesehen von wenigen Ausnahmen (OCS-Proteine aus *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium vitis* sowie Proteine aus *Nocardia farcinica*, *Silicibacter pomeroyi* und *Burkholderia cepacia*), bei denen dieser Wert geringfügig unterschritten wurde, stimmte jede dieser Sequenzen in einem mehr als 300 Aminosäuren umfassenden BLAST-Alignment zu mindestens 25 % mit einer

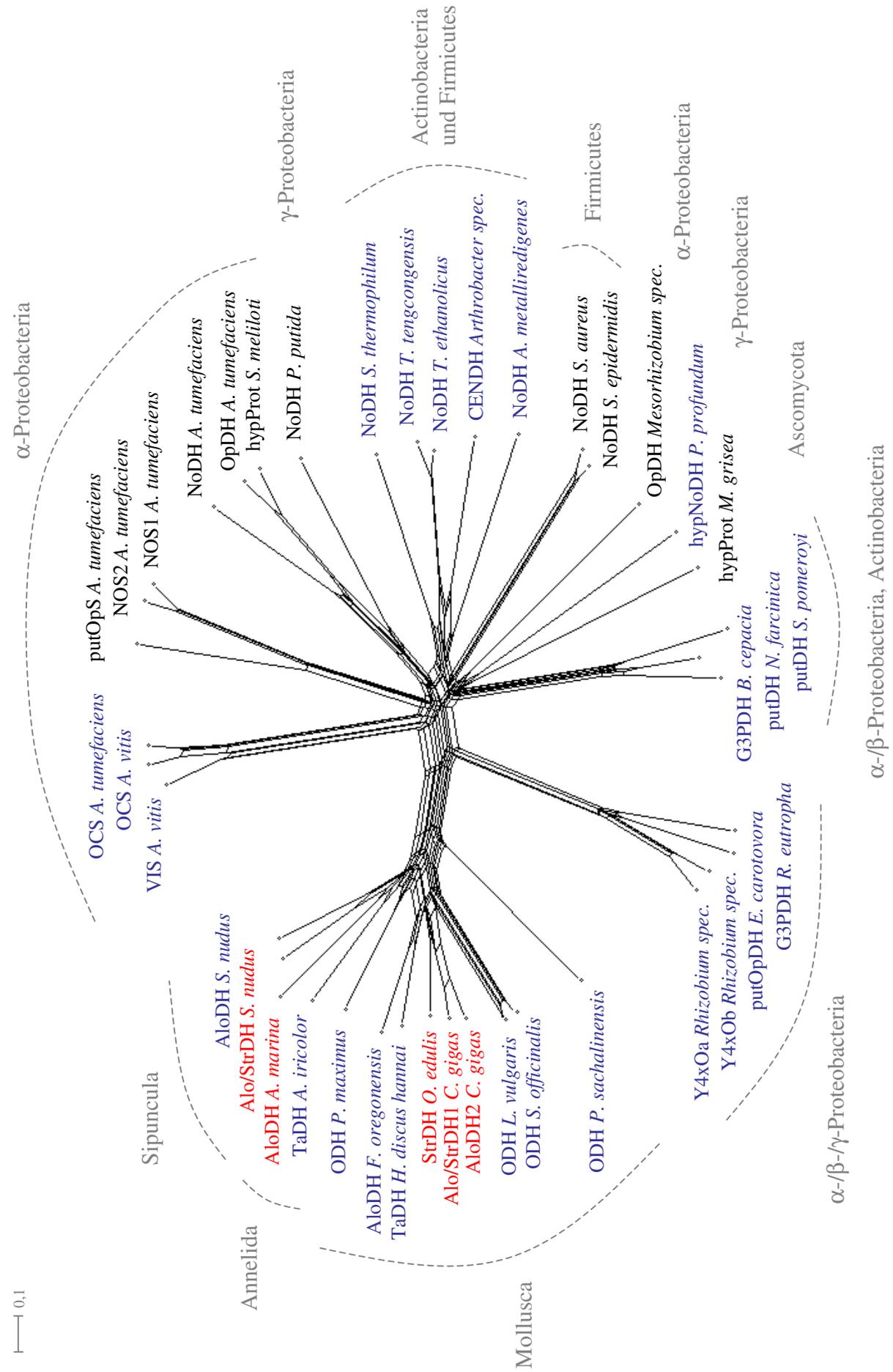


Abb. 25: Neighbor-Net-Diagramm ausgewählter Invertebraten-OpDHs und verwandter Proteine

Neben den OpDHs höherer Invertebraten aus dem Netz in Abb. 24 wurden folgende Sequenzen berücksichtigt (Angaben im Uhrzeigersinn): eine Vitopinsynthase (VIS, Q04554) und eine Octopin-/Lysopinsynthase (OCS, P94210) aus *Agrobacterium vitis* S4 bzw. Tm4, eine Octopinsynthase (OCS, P0A394), eine mögliche Opinsynthase (putOpS, AAC25914), zwei verschiedene Nopalinsynthesen (NOS1 und NOS2, CAA52 223 bzw. CAB44644), eine Octopin-/Nopalindehydrogenase (NoDH, NP_536135) und eine Opin-/Octopindehydrogenase (OpDH, NP_535789) aus verschiedenen *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen, das hypothetische Protein SMb20286 (hypProt, NP_436816) aus *Sinorhizobium meliloti*, ein Protein der Octopin-/Nopalindehydrogenasefamilie (NoDH, NP_746563) aus *Pseudomonas putida*, je eine Octopin-/Nopalindehydrogenase (NoDH) aus *Symbiobacterium thermophilum* (YP_074086), *Thermoanaerobacter tengcongensis* (NP_622575) und *Thermoanaerobacter ethanolicus* (ZP_00779301), die Carboxyethylnorvalindehydrogenase (CENDH, BAA08145) aus *Arthrobacter spec.*, eine Octopin-/Nopalindehydrogenase (NoDH, ZP_00800155) aus *Alkaliphilus metalliredigenes*, Proteine der Octopin-/Nopalindehydrogenasefamilie (NoDH) aus *Staphylococcus aureus* (YP_187100) und *Staphylococcus epidermidis* (YP_189443), eine Opindehydrogenase (OpDH, EAN06648) aus *Mesorhizobium spec.*, eine hypothetische Octopin-/Nopalindehydrogenase (hypNoDH, CAG22643) aus *Photobacterium profundum*, das hypothetische Protein MG10362.4 (hypProt, XP_366142) aus *Magnaporthe grisea*, mögliche Dehydrogenasen (putDH) aus *Silicibacter pomeroyi* (AAV94753) und *Nocardia farcinica* (YP_118256), eine angebliche Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH, ZP_00217591) aus *Burkholderia cepacia*, eine eventuelle Ketopantoat-Reduktase bzw. NAD⁺-abhängige Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (G3PDH, YP_297885) aus *Ralstonia eutropha*, eine mögliche Opindehydrogenase (putOpDH, CAG77009) aus *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* sowie zweierlei Proteine Y4xO (Y4xOa und Y4xOb, AAB91938 bzw. AAQ87281) aus *Rhizobium spec.* Die Sequenzen wurden durch BLASTp- oder PSI-BLAST-Suchen ausgehend von den im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs aus *A. marina*, *S. nudus*, *C. gigas* und *O. edulis* (im Netz rot hervorgehoben) identifiziert. Proteine, die durch einfachen Protein-BLAST oder in der ersten Iterationsrunde einer PSI-BLAST-Suche erhalten wurden, sind ebenso wie die noch nicht in öffentlichen Sequenzdatenbanken verfügbare AloDH aus *S. nudus* in blauer Schriftfarbe dargestellt. Die aus den Datenbankeinträgen übernommenen Proteinannotationen basieren zum Teil nur auf Vorhersagen, die anhand von Sequenzvergleichen getroffen wurden. Das Netz wurde ausgehend von den LogDet-Distanzen der verschiedenen Proteine berechnet.

der Ausgangssequenzen überein. Alle anderen Proteine bis auf die Nopalinsynthesen (NOS1 und NOS2) und eine mutmaßliche Opinsynthase (putOpS) aus *A. tumefaciens* wurden in der zweiten, letztere erst in der dritten Iterationsrunde eines PSI-BLASTs erfaßt. Dabei verkleinerten sich die Erwartungswerte der neu erhaltenen Treffer beim jeweils nachfolgenden Iterationsschritt extrem, um erst bei der übernächsten Iteration wieder anzuwachsen, ohne jedoch den ursprünglichen Erwartungswert zu übersteigen (z. B. E-Werte für das Protein Y4xOb aus *A. tumefaciens* bei einem am 24.10.05 ausgehend von der AloDH aus *A. marina* durchgeführten PSI-BLAST: $2 \cdot 10^{-19}$ in der ersten, $2 \cdot 10^{-125}$ in der zweiten und $8 \cdot 10^{-101}$ in der dritten Iterationsrunde). Zusätzliche BLASTp- und PSI-BLAST-Suchen, bei denen vorherige Datenbanktreffer als Ausgangssequenz dienten, lieferten wieder die gleichen, schon zuvor identifizierten Sequenzen. Insbesondere wurden ausgehend von der Nopalinsynthase 1 (NOS1) aus *A. tumefaciens* schon in der zweiten PSI-BLAST-Iterationsrunde Invertebraten-OpDHs gefunden.

Das Netzdiagramm aus Abb. 25 läßt im wesentlichen drei Cluster erkennen. Der erste umfaßt die Invertebraten-OpDHs, die durch einen deutlichen Split von den bakteriellen Pro-

teinen sowie dem hypothetischen Protein aus *M. grisea* separiert sind. Die Topologie des erweiterten Neighbor-Netzes spiegelt weitgehend die gleichen Beziehungen zwischen den einzelnen Invertebraten-OpDHs wieder wie das auf Invertebraten-OpDHs beschränkte Netz (Abb. 24). Insbesondere ist auch hier die ODH aus *P. maximus* zwischen den übrigen Mollusken-OpDHs und den OpDHs der Anneliden und Sipunculiden zu finden. Noch deutlicher als in Abb. 24 wird die Sonderstellung der ODH aus *P. sachalinensis*. Sie ähnelt den bakteriellen Sequenzen offenbar mehr als die übrigen Invertebraten-Enzyme.

Zweierlei plasmidcodierte Proteine Y4xO aus dem α -Proteobakterium *Rhizobium spec.* (Y4xOa und Y4xOb), deren Funktion bisher nicht bekannt ist, bilden zusammen mit einer mutmaßlichen OpDH aus dem γ -Proteobakterium *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* und einer möglichen Ketopantoat-Reduktase bzw. NAD^+ -abhängigen Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase aus dem β -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* (G3PDH, chromosomal-codiert) eine weitere, klar gegenüber den restlichen Sequenzen abgegrenzte Gruppe. Sie entsprechen denjenigen Bakterienproteinen aus öffentlichen Datenbanken mit der größten Sequenzähnlichkeit zu den OpDHs höherer Invertebraten. Dennoch ist der Split, der diese Gruppe von den Invertebraten-OpDHs separiert, länger als jener, der sie von den anderen bakteriellen Sequenzen und dem Pilzprotein (vom dritten Cluster des Netzes) trennt.

Mit dem Ziel, neben den in das Netz aus Abb. 25 einbezogenen Homologen auch entferntere Verwandte der Mollusken-Anneliden-OpDHs zu identifizieren, die keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu den tierischen Enzymen mehr erkennen lassen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit dreidimensionale Proteinstrukturvergleiche durchgeführt. VAST-Suchen in der Proteinstrukturdatenbank MMDB (2.7.5) lieferten als nächste Strukturnachbarn der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (1bg6, Britton et al., 1998a), neben einer Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* (1LJ8), diversen Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen (1WPQ, 1N1E, 1TXG, 1Z82) und einer Ketopantoat-Reduktase (1KS9) unter anderem zwei UDP-Glucose-Dehydrogenasen (203J, 1DLJ), mehrere 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenasen (2I9P, 2CVZ) sowie eine Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase (1PGJ) und eine Ketolsäure-Reduktoisomerase (1YRL). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen diesen Enzymen und der CENDH beschränkt sich gemäß VAST-Ausgabe nicht auf den N-terminalen Molekülabschnitt, sondern erstreckt sich auch auf Teile der katalytischen CENDH-Domäne, wo sie allerdings durchweg weniger signifikant und ausgedehnt ist als im Bereich der N-terminalen Nukleotidbindungsdomäne. Während letztere eine schier unerschöpfliche Fülle verschiedener Strukturnachbarn besitzt, lieferte die C-terminale Proteindomäne, sofern sie statt des Gesamtzyms als Ausgangspunkt der VAST-Suche diente, keinen einzigen signifikanten Treffer.

4 Diskussion

In den Geweben mariner Invertebraten findet sich eine bemerkenswerte Vielfalt terminaler Pyruvatoxidoreduktasen. Außer L- und D-LDHs treten, häufig auch nebeneinander innerhalb ein und desselben Gewebes, Opindehydrogenasen unterschiedlicher Substratspezifität auf, von denen vielfach mehrere Isoformen coexistieren (Gäde und Grieshaber, 1986; Grieshaber et al., 1994; Kanno et al., 1996a; Manchenko et al., 1998). Diese Mannigfaltigkeit terminaler glykolytischer Enzyme, die in Sauerstoffmangelsituationen für einen ausgeglichenen cytosolischen Redoxzustand und damit für die Aufrechterhaltung des glykolytischen Fluxes sorgen, zieht schon seit längerem das Interesse verschiedener Forschungsgruppen auf sich. Es wurde viel spekuliert, welcher Selektionsdruck die Entwicklung der Invertebraten-Opindehydrogenasen begünstigt haben könnte (Bowlus und Somero, 1979; Fields und Quinn, 1981; Dando et al., 1981; Fields, 1983; Livingstone et al., 1983; Livingstone, 1983; Grieshaber und Kreutzer, 1986). Dennoch blieb ihre Evolution bis heute rätselhaft. Auch die molekularen Grundlagen ihrer Aminosäurespezifität sind unbekannt.

Bisher wurden neben einigen Tauropindehydrogenasen fast ausschließlich Mollusken-Opindehydrogenasen sequenziert. Neue Einblicke in die Struktur und Phylogenie der alternativen Pyruvatoxidoreduktasen versprach die Analyse von Invertebraten-Opindehydrogenasen anderer Aminosäurepräferenz und Stammeszugehörigkeit. Auf sie fokussierte die vorliegende Arbeit. Ergänzt durch proteinbiochemische, vor allem auf den Vergleich von Isozymen ausgerichtete Untersuchungen, wurden Alanopin- und Strombindehydrogenasen aus dem Wattwurm, *Arenicola marina*, dem Spritzwurm, *Sipunculus nudus*, sowie den Austern *Crasostrea gigas* und *Ostrea edulis* sequenziert, heterolog in *E. coli* exprimiert und mit Einträgen aus öffentlichen Sequenzdatenbanken verglichen.

4.1 Pyruvatoxidoreduktasen der untersuchten Arten

4.1.1 Pyruvatreduktase-Aktivitäten und ihre physiologische Bedeutung

Wattwurm, Spritzwurm, Pazifische und Europäische Auster – die Arten, mit deren Opindehydrogenasen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, sind alle an das Leben in intertidalem Habitat angepaßt. *A. marina* und *S. nudus* kommen beide in sandigen Böden der Gezeitenzone vor, unterscheiden sich aber dadurch, daß nur ersterer in festen Wohnröhren lebt, während letzterer keinen permanenten Bau anlegt (Krüger, 1971; Pörtner, 1982). Auch die Ernährungsweise der beiden Arten differiert. Der Wattwurm nimmt über einen Einsturztrichter, der einen

Schenkel seiner U-förmigen Wohnröhre bildet, Sand auf, verwertet Mikroorganismen und meiofaunische Bestandteile und scheidet die unverdaulichen Überreste unter Bildung charakteristischer Kothäufchen wieder aus (Krüger, 1971; Zebe und Schiedek, 1996). *S. nudus*, der seine Nahrung ebenfalls aus Sand extrahiert, frißt dagegen vermutlich nur während des Grabens im Sediment (Pörtner, 1982). Bedingt durch ihre Grabtätigkeit, egal ob sie der Nahrungsaufnahme, dem Anlegen neuer Wohnbauten oder der Flucht vor Freßfeinden dient, können beide Arten einer starken Beanspruchung der arbeitenden Skelettmuskulatur und damit verbundenem Sauerstoffmangel ausgesetzt sein. Zudem kommt, wenn das Watt während der Ebbe trocken fällt, der Atemwasserstrom durch die Wohnröhre des Wattwurms zum Erliegen, was mit einem raschen Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im Wohnröhrenwasser verbunden ist (Zebe und Schiedek, 1996). *S. nudus*, der in seinen temporären Bauten über eine Atemhöhle mit dem Oberflächenwasser in Verbindung steht, behält seine Atemperistaltik nach Beobachtungen von Pörtner (1982) zwar auch bei Niedrigwasser bei, unterliegt aber ebenfalls einer tidenabhängigen Sauerstoffminderversorgung. Sie korreliert anders als aktivitätsbedingte Hypoxie mit einer Reduktion der Stoffwechselrate und einem niedrigen glykolytischen Durchsatz (Grieshaber et al., 1994).

Auch die sessilen Austern *C. gigas* und *O. edulis* können in ihrem natürlichen Lebensraum gezeitenabhängigen Sauerstoffmangel erfahren. Beide siedeln bevorzugt auf festem, felsigem Untergrund oder auf Miesmuschelbänken in intertidalen und flachen subtidalen Habitaten (Kilias, 2000; Diederich et al., 2005). Fallen die Austern während der Ebbe trocken, schließen sie zum Schutz vor Austrocknung und Fraßfeinden ihre Schalen, was vermutlich zu einer schnellen Sauerstoffverarmung ihrer Gewebe und Körperflüssigkeiten führt (Moon und Pritchard, 1970; Michaelidis et al., 2005; Dunphy und Jeffs, 2006). Austern verfügen daher wie Watt- und Spritzwürmer über Mechanismen, die ihnen das Überleben temporären Sauerstoffmangels ermöglichen (David et al., 2005; Michaelidis et al., 2005; Schöttler et al., 1984a; Zebe und Schiedek, 1996; Pörtner et al., 1984b). Dazu gehört unter anderem der Besitz von OpDHs, die während einer Hypoxie bzw. in der anschließenden Erholungsphase genutzt werden können (Fields et al., 1980; Fields und Hochachka, 1981; Eberlee et al., 1983; Siegmund und Grieshaber, 1985; Grieshaber und Kreutzer, 1986; Kreutzer et al., 1989).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Hautmuskelschlauchextrakten des Wattwurms gemessenen AloDH- und StrDH-Aktivitäten von $56,4 \pm 12,3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$ bzw. $6,9 \pm 1,9 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$ (3.1; Abb. 2, S. 50) entsprechen den Werten, die Siegmund (1986) unter ähnlichen Testbedingungen ermittelte ($55,4 \pm 14,5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$ AloDH- und $6,1 \pm 1,3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$ StrDH-Aktivität). Übereinstimmend mit dessen Ergebnissen fand sich in Wattwurm-Homogenaten weder

ODH- noch TaDH-Aktivität. Ersteres erscheint erwartungsgemäß, da ODHs mit L-Argininphosphat assoziiert zu sein pflegen (Grieshaber und Kreutzer, 1986), dieses jedoch im Hautmuskelschlauch von *A. marina* durch Taurocyaminphosphat ersetzt ist (Pörtner et al., 1979). Auch die sehr geringe β -AloDH-Aktivität des Gewebes ($0,4 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$) besitzt vermutlich keine physiologische Bedeutung. Eine solche konnte aber zumindest unter experimentellen Bedingungen für die AloDH- und StrDH-Aktivitäten des Wattwurms nachgewiesen werden. So erhöhte sich im Hautmuskelschlauch von Wattwürmern, die von Kreutzer und Mitarbeitern (1989) bis zur Erschöpfung zum Graben im Sediment gezwungen wurden, der Alanopingehalt von durchschnittlich $0,13 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ in Kontrolltieren auf $8,13 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$, während die Strombinkonzentration von $0,78 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ auf $2,39 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ anstieg. 24-stündige Inkubation in stickstoffäquilibriertem Seewasser bewirkte dagegen eine Akkumulation von nur $0,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ Alanopin und $5,6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ Strombin. Wie bereits in der Einleitung erläutert, führt funktionsbedingter Sauerstoffmangel zur Produktion der N-(Carboxyethyl)-Aminosäure, deren zugehörige OpDH im Gewebe die höchste Aktivität aufweist. Unter biotopbedingter Hypoxie wird jedoch vornehmlich das Opin gebildet, dessen korrespondierende Aminosäure in der höchsten Konzentration vorkommt (Siegmund, 1986; Grieshaber und Kreutzer, 1986; Kreutzer et al., 1989). Das ist im Hautmuskelschlauch des Wattwurms Glycin (bei Tieren, die in normoxischem Seewasser gehältert wurden, durchschnittlich $161 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ Glycin versus nur $27 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ D-/L-Alanin und weniger als $0,1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ L-Arginin, Kreutzer et al., 1989). Die relativ niedrige Alaninkonzentration des Gewebes kann sich allerdings unter Hypoxie durch reduktive Transaminierung von Aspartat und zusätzliche Alaninbildung über einen noch unidentifizierten Stoffwechselweg annähernd verdoppeln (Felbeck, 1980; Felbeck und Grieshaber, 1980; Siegmund, 1986; Kreutzer et al., 1989). Das erklärt möglicherweise, weshalb sich in der Muskulatur von *A. marina* hohe AloDH-Aktivität entwickeln konnte (siehe 4.3.3).

Anders als beim Wattwurm findet sich im Hautmuskelschlauch von *S. nudus* gleichbleibend wenig Alanin (stets $< 8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$; Pörtner et al., 1984b). Zugleich wurde in den Spritzwurmhomogenaten der aktuellen Arbeit nur eine geringe AloDH-Aktivität von etwa $9 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ gemessen (3.1). Daher scheint es nicht verwunderlich, daß Alanopin bei dieser Art weder unter biotop-, noch unter funktionsbedingter Hypoxie in nennenswertem Umfang akkumuliert (maximal $0,2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ nach Pörtner et al., 1984b). Weil im Hautmuskelschlauch des Spritzwurms wie beim Wattwurm Glycin die dominierende Aminosäure bildet (knapp $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$; Pörtner et al., 1984b), synthetisiert der Sipunculide, obwohl die StrDH-

Aktivität in seiner Muskulatur noch hinter der ALODH-Aktivität zurückbleibt (Abb. 2, S. 50; Pörtner et al., 1984b; Kreutzer, 1987), bei Sauerstoffmangel im Habitat bevorzugt Strombin (während 24-stündiger Hypoxie rund $7 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FG; Pörtner et al., 1984b). Bei aktivitätsbedingter Hypoxie akkumuliert vor allem Octopin (während 45-minütigen Grabens etwa $7 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FG; Pörtner et al., 1984b). Verantwortlich dafür sind eine hohe spezifische ODH-Aktivität von mehr als $200 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ FG (Abb. 2, S. 50; Pörtner et al., 1984b; Kreutzer, 1987) sowie eine L-Argininkonzentration, die zwar unter Normoxie ähnlich niedrig ist wie die Alaninkonzentration des Gewebes, sich jedoch unter Hypoxie durch den Abbau von L-Argininphosphat verdoppeln oder sogar verdreifachen kann (Pörtner et al., 1984b).

In den Spritzwurmhomogenaten der vorliegenden Arbeit wurden zwei- bis fünffach geringere spezifische OpDH-Aktivitäten gemessen (3.1) als von Pörtner et al. (1984b) angegeben. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß diese Autoren bei ihren Aktivitätsbestimmungen höhere Pyruvatkonzentration einsetzten (10 mM statt in der vorliegenden Arbeit nach Fields und Hochachka (1981) sowie Siegmund et al. (1985) für alle Arten einheitlich 3 mM). Das ermittelte Verhältnis aus ALODH-, StrDH- und ODH-Aktivität von 3 : 1 : 57 stimmt aber etwa mit dem von Pörtner et al. (1984b) beobachteten Aktivitätsverhältnis (5 : 1 : 48) überein. Obwohl bei den Messungen in Anpassung an die entsprechenden K_m -Werte verschiedener Invertebraten-OpDHs (Livingstone et al., 1983; Gäde und Grieshaber, 1986) nur 5,5 bzw. 5 mM L-Arginin, jedoch 200 mM L-Alanin bzw. Glycin eingesetzt wurden (2.5.1 und Pörtner et al., 1984b), dominierte die ODH-Aktivität deutlich gegenüber den anderen OpDH-Aktivitäten, was nach Kreutzer (1987) weniger auf eine höhere Konzentration der Spritzwurm-ODHs als auf deren besondere Leistungsfähigkeit zurückzuführen gewesen sein dürfte. Livingstone und Mitarbeiter (1983 und 1990) postulierten, daß ODHs sich generell durch höhere maximale Umsatzraten als andere Invertebraten-OpDHs auszeichnen und daher vor allem bei besonders aktiven Arten vorkommen, während sie bei Austern (vgl. 3.1) und den meisten anderen sessilen Arten fehlen.

Tatsächlich überschritt die ODH-Aktivität im Hautmuskelschlauch des Spritzwurms nicht nur die übrigen OpDH-Aktivitäten dieses Gewebes, sondern auch die ALODH- und StrDH-Aktivitäten im Hautmuskelschlauch von *A. marina* sowie in den Adduktoren von *C. gigas* und *O. edulis* um Vielfache ihrer selbst (Abb. 2, S. 50). Besonders niedrige ALODH- und StrDH-Aktivitäten fanden sich im Adduktormuskel der Europäischen Auster. Das könnte damit zusammenhängen, daß diese Austernart im natürlichen Habitat häufiger als *C. gigas* unterhalb der Niedrigwasserlinie siedelt und somit weniger auf Anpassungsmechanismen zum Überdauern temporären Sauerstoffmangels angewiesen ist (Dunphy und Jeffs, 2006). Es fragt

sich allerdings, inwiefern eine solche Argumentation für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zuchtaustern greift.

Die durchschnittlichen ALoDH- und StrDH-Aktivitäten der untersuchten *Crassostrea*-Addukturen ($41,7 \pm 6,8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ und $49,0 \pm 5,8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$) entsprachen etwa denen, die Fields und Hochachka (1981) sowie Livingstone und Mitarbeiter (1983) ermittelten (50 bis $64 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$). Übereinstimmend mit Sato et al. (1993a) fand sich nur geringe β -AloDH- ($7 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$) und fast keine TaDH-Aktivität ($\leq 0,1 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$). Letzteres erscheint insofern bemerkenswert, als Taurin die am höchsten konzentrierte Aminosäure im Adduktor von *C. gigas* bildet (Kanno et al., 1998, ohne Konzentrationsangabe; Alanin- und Glycingehalt im Adduktor von *C. gigas* bzw. *C. angulata* nach Michaelidis et al. (2005) und Kreutzer et al. (1989) etwa $12 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ bzw. $50 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$). Möglicherweise hängt die Aminosäurespezifität der OpDHs einer Art nicht allein von der Gewebekonzentration der einzelnen Aminosäuren, sondern auch davon ab, wie starken umweltabhängigen Fluktuationen diese unterworfen sind bzw. wie zuverlässig die verschiedenen Aminosäuren unter hypoxischen Bedingungen verfügbar sind (Kan-no et al., 1998).

Nach Eberlee et al. (1983), die in der Erholungsphase nach 96-stündiger Stickstoffexposition im Adduktor der Amerikanischen Auster, *C. virginica*, eine Alanopin- und Strombinzunahme um bis zu $4 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$ nachwiesen, nutzen Austern ihre alternativen Pyruvatoxidoreduktasen vor allem während des Wiederauffüllens ihrer Energiespeicher im Anschluß an eine Phase reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit. NADH-abhängige LDHs sind dagegen weder für den anaeroben Stoffwechsel der Pazifischen oder Europäischen Auster, noch für *A. marina* oder *S. nudus* von wirklicher Bedeutung (Pörtner et al., 1984b; Siegmund, 1986; Kreutzer et al., 1989), was die höchstens minimalen LDH-Aktivitäten ($\leq 0,1 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FG}$) in den Gewebehomogenaten der vorliegenden Arbeit bestätigten (vgl. auch Zammit und Newsholme, 1976; Livingstone et al., 1983; Pörtner et al., 1984b; Siegmund et al., 1985; Sato et al., 1993a).

4.1.2 Oxidationsempfindlichkeit der Wattwurm-OpDHs

Die OpDHs des Wattwurms erwiesen sich übereinstimmend mit Beobachtungen von Reitze (1983) als instabil. In Rohextrakten und gereinigten Enzymlösungen traten zeitabhängige Aktivitätsverluste auf, denen mit DTT entgegengewirkt werden konnte (3.3). Sie resultierten somit offensichtlich aus einer starken Oxidationsempfindlichkeit der Enzyme und waren, obwohl *A. marina* bekanntermaßen über eine hohe proteolytische Kapazität verfügt (Krüger, 1971; Zebe und Schiedek, 1996), nicht auf eine OpDH-Degradation durch Proteasen aus

dem Magen-Darm-Trakt des Polychaeten zurückzuführen. Versuche mit verschiedenen Proteaseinhibitoren zeigten, daß Proteasen die OpDH-Aktivität bei ausreichender Kühlung nur geringfügig beeinflussen (3.3).

Die Oxidationsempfindlichkeit vieler cytosolischer Proteine basiert darauf, daß ihre in der Regel in Sulfhydrylform vorliegenden Cysteinreste, sobald die strukturelle Integrität der Zellen zerstört wird und sie mit Luftsauerstoff in Berührung kommen, durch sukzessive Ein-Elektronenübergänge in zunehmend oxidiertere Molekülspezies überführt werden können (Little und O'Brien, 1969; Mason und Rao, 1990; Park und Bauerle, 1999). Dabei entstehen zunächst hochreaktive Thiylradikale (RS·) und Sulfensäuregruppen (RSOH), die mit einem in der Nähe befindlichen Rest gleicher Art spontan intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zu bilden vermögen (Little und O'Brien, 1969; Mason und Rao, 1990; Stadtman, 1993; Park und Bauerle, 1999). Da sich Disulfide wie die meisten anderen Oxidationsstufen mit DTT oder anderen Reduktionsmitteln reduzieren lassen, ist die Oxidation von Cysteinen in der Regel reversibel (Little und O'Brien, 1969; Park und Bauerle, 1999). In Wattwurmhomogenaten, die ihre AloDH- und StrDH-Aktivität im Verlauf mehrerer Tage fast vollständig verloren hatten, wurden durch Zugabe von 5 mM DTT immerhin 88 bzw. 45 % der Ursprungsaktivitäten wiederhergestellt (3.3). Einige der denaturierten OpDH-Moleküle nahmen vermutlich nach der DTT-Zugabe, obwohl ihre Cysteinreste in die Sulfhydrylform rücküberführt wurden, nicht wieder ihre native Faltung, sondern eine artifizielle Konformation ein. Ähnliches beobachteten Zettlmeissl et al. (1984) bei Renaturierungsexperimenten mit Guanidiniumhydrochlorid-behandelten ODH-Isozymen aus *Pecten jacobaeus*. Sie erzielten maximal 70 % korrekt gefaltete Enzymproteine, während die übrigen 30 % des eingesetzten Materials inaktive Monomere oder Aggregate bildete. Außerdem könnten die denaturierten Wattwurm-OpDHs einer stärkeren proteolytischen Degradation unterlegen haben als die bei den Versuchen mit Proteaseinhibitoren eingesetzten Enzyme mit ausreichendem Oxidationsschutz (vgl. Teschner et al., 1987 sowie Kaufmann, 1997).

In allen Wattwurmhomogenaten überschritt der zeitabhängige AloDH-Verlust den der StrDH-Aktivität (zum Beispiel nach siebentägiger Lagerung nur noch 22 % der anfänglichen AloDH-, aber noch 41 % der ursprünglichen StrDH-Aktivität). Andererseits ließ sich die AloDH-Aktivität wie gerade erwähnt mit DTT zu einem größeren Teil wiederherstellen. Das könnte darauf hindeuten, daß für die beiden Aktivitäten mehrere Enzymproteine differierender Aminosäurepräferenz verantwortlich sind (siehe auch 3.4.2 und 4.1.4.1), die sich in ihrer Oxidationsempfindlichkeit und ihrem Renaturierungspotential unterscheiden. Außerdem

könnte sich die Fähigkeit einzelner OpDHs, L-Alanin bzw. Glycin umzusetzen, durch oxidationsbedingte Konformationsänderungen bzw. Rückfaltungsartefakte verändert haben.

Eine Abhängigkeit des ALoDH : StrDH-Aktivitätsverhältnisses vom Redoxstatus der Enzymlösung wurde auch bei der Reinigung heterolog exprimierter Wattwurm-ALoDH-LE6xH beobachtet (3.8.2), wo sie eindeutig nicht auf die Existenz unterschiedlicher Enzymproteine zurückzuführen war. Wegen der Reduktionsempfindlichkeit der verwendeten Nickel-NTA-Säule mußte hier zunächst auf eine Enzymstabilisierung durch DTT verzichtet werden. Alternativ kamen 20 mM 2-Mercaptoethanol zum Einsatz (gemäß Herstellerangaben maximal mit der Säulenmatrix kompatible Konzentration). Dieses Monothiol ist ein schlechteres Reduktionsmittel als DTT, das ein geringeres Potential zur Reduktion von Disulfiden besitzt und vielfach gemischte Disulfide mit Proteinen bildet (Cleland, 1964; Gilbert, 1990; Negishi und Ozawa, 2000). Zumindest in der gewählten Konzentration konnte es den Oxidationsschutz heterolog exprimierter Wattwurm-ALoDH-LE6xH nicht gewährleisten. So fand sich in einem Bakterienlysats mit 2-Mercaptoethanol ein im Vergleich zu DTT-haltigen Homogenaten deutlich niedrigeres ALoDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis (4 : 1 statt 10 : 1). Beim späteren Überführen des Enzyms in DTT-haltigen Gelfiltrationspuffer vervielfachten sich die Gesamtaktivitäten, während sich gleichzeitig das Aktivitätsverhältnis zugunsten der ALoDH-Aktivität verschob (3.8.2). Partiiell oxidierte Wattwurm-ALoDH-LE6xH setzte somit vor allem L-Alanin weniger effizient um als das vollständig reduzierte Enzym, während die Reaktion mit Glycin weniger beeinträchtigt war. Dafür könnten sterische Gründe verantwortlich sein. Teiloxidierte ALoDH-LE6xH besitzt möglicherweise eine Konformation, die den Zugang zur Bindungstasche speziell für das im Vergleich zu Glycin größere Alanin erschwert. Außerdem könnten an der Bindung von Alanin zusätzliche, vielleicht besonders leicht oxidierbare Cysteinreste beteiligt sein.

In der ODH aus der Pilgermuschel, *Pecten maximus*, wurden bis zu drei leicht zugängliche Thiolgruppen detektiert, von denen sich jedoch nur eine als bedeutsam für die katalytische Aktivität des Enzyms erwies (Olomucki et al., 1972 und 1975; Thomé-Beau und Olomucki, 1973; Sheikh und Katiyar, 1993; Müller, 2007). Sequenzalinierungen von Janßen (2000) und Kan-no et al. (2005a) offenbarten zwei bei scheinbar allen tierischen OpDHs konservierte Cysteine. Das Alignment aus Abb. 23 (S. 95), in das neben neueren Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten ALo/StrDHs und die Untereinheit der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (BAA08145) einbezogen wurden, zeigt jedoch, daß das erste der beiden konservierten Cysteine (CENDH-Position 10) in der ODH aus *Pseudocardium sachalinensis* (BAD81062) durch Phenylalanin ersetzt

ist. Nur das zweite (CENDH-Position 142) kommt in allen OpDHs aus Abb. 23 (S. 95) vor (vgl. auch Müller, 2007). Gemäß Strukturdaten von Britton et al. (1998a) ist dieses Cystein innerhalb der hufeisenförmigen CENDH-Untereinheit (Abb. 26, S. 165) zentral positioniert. Der zur Nukleotidbindungsdomäne gehörende Rest findet sich quasi am Eingang zur Bindungstasche, was seine mögliche funktionelle Bedeutung unterstreicht.

Es fragt sich, weshalb die OpDHs aus *A. marina* sich als deutlich oxidationsempfindlicher als beispielsweise die Alo/StrDHs der Pazifischen Auster oder die ODH aus *P. maximus* erwiesen (3.3 und Müller, 2007). Vergleicht man die in der vorliegenden Arbeit sequenzierte Wattwurm-AloDH mit den übrigen Invertebraten-OpDHs aus Abb. 23 (S. 95), so zeigt sich, daß sie im Unterschied zu diesen zwölf statt nur sechs (StrDH aus *O. edulis*) bis maximal neun (ODH aus *P. sachalinensis*) Cysteinreste umfaßt (Positionen 13, 62, 88, 130, 141, 153, 280, 289, 299, 317, 330 und 353). Diese Zahl ist als solche allerdings nicht unbedingt aussagekräftig, da die Oxidierbarkeit der zugehörigen Sulfhydrylgruppen davon abhängt, wie stark sie exponiert sind. Entscheidend ist außerdem die Lage der Cysteine relativ zueinander. Sie kann gegebenenfalls Disulfidbrückenbildungen und eine damit verbundene Enzymdenaturierung bzw. Aktivitätsverluste durch Proteinaggregationen begünstigen.

Identifiziert man innerhalb der Wattwurm-AloDH die Cysteinreste, die mit keinem Cystein einer anderen Invertebraten-OpDHs aus der Alinierung in Abb. 23 (S. 95) korrespondieren (Alignment-Positionen 62, 280, 289, 299, 317, 330 und 353 gemäß Wattwurm-Numerierung), so fällt auf, daß sie sich in einem nur 74 Aminosäuren umfassenden Abschnitt der

C-terminalen Enzymdomäne häufen. Besonders die Cysteine 317 und 330 der Wattwurm-AloDH könnten die besondere Oxidationsempfindlichkeit des Enzyms verursachen. Dafür spricht ihre Nähe zu den vermutlich katalytischen Resten Arginin-339 und Aspartat-244 (Wattwurm-Numerierung, vgl. 3.9 und 4.2.2) in der linearen Sequenz. Geht man von einer strukturellen Ähnlichkeit zwischen den OpDHs höherer Invertebraten und der Untereinheit der bakteriellen CENDH aus (3.10 und 4.3.2), so läßt sich zudem spekulieren (anhand der räumlichen Lage der im Alignment angrenzenden CENDH-Reste 285 und 286, vgl. Abb. 23, S. 95 und Abb. 26, S. 165), daß die beiden Cysteine im dreidimensional gefalteten Protein gegenüber vom konservierten Cystein (CENDH-Position 142 bzw. Wattwurm-Position 153) am distalen Ende der C-terminalen Proteindomäne positioniert sein könnten. Sofern die Cysteine 317 und 330 nicht untereinander reagieren, wäre in diesem Fall eine Disulfidbrückenbildung mit dem konservierten Cystein denkbar. Sie könnte den Zugang zur Bindungstasche entscheidend beeinträchtigen.

Unabhängig davon, welche Cysteine tatsächlich für die besondere Oxidationsanfälligkeit der Wattwurm-AloDH bzw. seiner OpDHs im allgemeinen verantwortlich sind, war es bei allen Arbeiten mit den Pyruvatoxidoreduktasen dieser Art unverzichtbar, für einen ausreichenden Oxidationsschutz zu sorgen. Da gelöstes DTT unter Bildung eines cyclischen Disulfids leicht selbst oxidiert wird und daher nur eine geringe Halbwertszeit besitzt (Cleland, 1964; Stevens et al., 1983), mußten ausreichende Konzentrationen des Reduktionsmittels verwendet (5 mM statt nur 2 mM), alle Puffer und Lösungen möglichst frisch hergestellt und Enzymlösungen rasch weiterverarbeitet bzw. zur längerfristigen Lagerung mit Glycerin und zusätzlichem DTT eingefroren werden. Tetrazoliumsalze wie das bei den spezifischen Aktivitätsfärbungen eingesetzte Nitroblautetrazoliumchlorid (2.5.7.1) werden allerdings durch DTT nicht-enzymatisch reduziert (Michal et al., 1983), weshalb es nur bedingt möglich war, das Antioxidans bei nativen Disk-Elektrophoresen und isoelektrischen Fokussierungen einzusetzen.

Die Oxidationsempfindlichkeit der Wattwurm-OpDHs erschwerte daher insbesondere ihre elektrophoretische Analyse. Nach nativen Disk-Elektrophoresen und isoelektrischen Fokussierungen ließen sich die OpDHs aus *A. marina* häufig selbst dann, wenn diese unter N₂-Atmosphäre durchgeführt wurden, nicht oder nur eingeschränkt durch spezifische Aktivitätsfärbung detektieren (2.5.7.1, 3.2, 3.4.1 und 3.4.2). Die Nachweisgrenze für Wattwurm-AloDHs auf nativen Disk-Gelen lag fast eine Zehnerpotenz höher als die für Alo/StrDHs aus *C. gigas* ($\geq 0,3$ U versus $< 0,05$ U Alanopinsyntheseaktivität, vgl. Abb. 6, S. 58 und Abb. 8, S. 62 versus Abb. 3, S. 52). Isoelektrische Fokussierungen in immobilisierten pH-Gradienten (2.5.7.3) lieferten gar keine verwertbaren Ergebnisse. Abgesehen davon, daß möglicherweise auch vollständig reduzierte Wattwurm-OpDHs den Abbau von Opinen unter den gewählten Färbebedingungen weniger effizient als die Alo/StrDHs aus der Pazifischen Auster katalysiert hätten, wurde die Detektion der Enzyme offenbar dadurch beeinträchtigt, daß sie während der Wanderung im elektrischen Feld oder während des anschließenden Waschens und Färbens partiell oxidiert und damit inaktiviert wurden. Eine oxidationsabhängige Aufspaltung einzelner Banden in mehrere distinkte Signale könnte die Nachweisgrenze vor allem bei isoelektrischen Fokussierungen in rehydratisierten Immobilizingelen zusätzlich erhöht haben (Altland und Rossmann, 1985; Altland et al., 1988). Solche Gele weisen infolge des vorangehenden Trocknens eine intrinsische oxidierende Aktivität auf (Altland und Rossmann, 1985), was erklärt, weshalb oxidationsbedingten Aktivitätsverlusten speziell bei den IPG-Fokussierungen nicht wirkungsvoll mit einer N₂-Atmosphäre entgegengewirkt werden konnte. Auch die für Trägerampholyt-Fokussierungen und Disk-Elektrophoresen verwendeten Polyacrylamidgele

(2.5.7.1 und 2.5.7.3) besaßen möglicherweise oxidierende Eigenschaften. Besonders die ungewaschenen Disk-Gele könnten freie Radikale bzw. Reste der zu ihrer Polymerisation verwendeten Radikalbildner (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin und Ammoniumperoxodisulfat) enthalten und daher die Bildung von Thiylradikalen begünstigt haben (Westermeier, 1990).

Auf SDS-Gelen ergaben Wattwurm-AloDHs nach normaler, reduzierender Probenvorbereitung übereinstimmend mit anderen Proteinen hohen Cysteingehalts (Lane, 1978) breite, diffuse Banden (Abb. 5, S. 57). Nur wenn eine Oxidation von Thiolen im Verlauf der elektrophoretischen Trennung durch vorherige Alkylierung mit Iodacetamid verhindert wurde (Lane, 1978), resultierten scharfe Banden. Zugleich erhöhte sich, wie nach Lane (1978) für cysteinreiche Proteine zu erwarten, das apparente Molekulargewicht der Wattwurm-AloDHs.

4.1.3 Reinigung von AloDHs und StrDHs aus *A. marina* und *C. gigas*

Die Reinigung von Wattwurm-OpDHs wurde außer durch deren Oxidationsempfindlichkeit (4.1.2) auch dadurch erschwert, daß Wattwurmextrakte die verwendeten chromatographischen Säulen selbst nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung (optimiert 45 bis 75 % Sättigung statt 35 bis 55 % nach Siegmund et al., 1985) extrem verschmutzten. Daher wurde im ersten chromatographischen Schritt abweichend von Siegmund et al. (1985), die einen schwachen Anionenaustauscher (DEAE-Sephacel) einsetzten, eine hydrophobe Interaktionschromatographie über Phenyl Sepharose 6 durchgeführt (2.5.6.2 und 3.4.1). Der Probenauftrag erfolgte in Gegenwart von 0,8 M Ammoniumsulfat, so daß auf eine zeitaufwendige und verlustreiche Dialyse bzw. anderweitiges Entsalzen des gefällten Materials verzichtet werden konnte. Geschwindigkeit bildet bekanntlich einen Schlüsselparameter für die erfolgreiche Reinigung instabiler Proteine (Kaufmann, 1997). Außerdem konnte die HIC-Säule einem harschen Reinigungsprotokoll unterzogen werden, das unter anderem Waschschrte mit 1 M NaOH und 30 % Isopropanol umfaßte. Damit ließ sich insbesondere eine fest bindende, grüne Komponente von der Säule waschen, bei der es sich vermutlich um den Pigmentfarbstoff Arenicochrom handelte (van Duijn et al., 1951; van Duijn, 1952a und 1952b; Morimoto et al., 1970).

Die HIC führte allerdings selbst nach Optimierung (Ligand, Ligandendichte, Art und Konzentration des verwendeten Salzes, Zusätze zum Eluenten, vgl. Queiroz et al. (2001); Vorversuche nicht dargestellt) zu erheblichen Aktivitätsverlusten (Tab. 1, S. 55). Durch sie gingen annähernd die Hälfte der AloDH- und rund 70 % der StrDH-Aktivität aus dem Sediment nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung verloren. Aktivitätseinbußen von bis zu 50 % bei einzelnen Reinigungsschritten sind nach Deutscher (1990) nichts Ungewöhnliches.

Sie treten speziell bei chromatographischen Methoden auf, bei denen Proteine an eine Matrix binden, betreffen dagegen seltener Verteilungschromatographien (Deutscher, 1990). Möglicherweise wurden die Wattwurm-OpDHs so fest an die Phenyl-Sepharose-Matrix gebunden, daß sie sich durch 10 % Isopropanol mit 5 mM DTT nicht vollständig von der Säule waschen ließen (vgl. Queiroz et al., 2001). Alternativ könnten OpDHs denaturiert worden sein. Durch Vorexperimente (nicht dargestellt) konnte ausgeschlossen werden, daß dies durch das Isopropanol in der Elutionslösung oder deren niedrige Ionenstärke bewirkt wurde. Die Enzyme könnten jedoch durch die Interaktion mit dem Säulenmaterial geschädigt worden sein (Queiroz et al., 2001; Regnier, 1987). So kann es nach Regnier (1987) zu Faltungsänderungen und damit einhergehenden Aktivitätsverlusten kommen, wenn die konkurrierenden hydrophoben Kräfte einer HIC-Matrix diejenigen überschreiten, welche die Proteinstruktur aufrechterhalten. Auf Konformationsänderungen während der HIC deutet im Chromatogramm aus Abb. 4A (S. 54) das leichte Tailing speziell des AloDH-Peaks hin. Diese Peakinhomogenität könnte durch partiell denaturierte Enzymproteine verursacht worden sein, deren externe Hydrophobizität und damit Retentionszeit die der nativen OpDHs übertraf (vgl. Regnier, 1987).

Interessanterweise überschritt der relative StrDH-Verlust durch die HIC regelmäßig den der AloDH-Aktivität, weshalb sich das Verhältnis aus AloDH- und StrDH-Aktivität bei diesem Reinigungsschritt annähernd verdoppelte (Tab. 1, S. 55 und 3.4.1). Das ursprüngliche Aktivitätsverhältnis konnte während der weiteren Reinigung auch durch Rücküberführen in physiologischere Puffersysteme nicht wiederhergestellt werden. Eine Oxidation von Wattwurm-OpDHs kommt als Ursache nicht in Frage, da sie einen gegenläufigen Effekt erwarten ließe (4.1.2). Die HIC könnte aber irreversible Konformationsänderungen induziert haben, die sich auf die Aminosäurespezifität einer oder mehrerer Wattwurm-OpDHs auswirkten. Alternativ könnte die Abnahme des Aktivitätsverhältnisses durch die natürliche Existenz von Wattwurm-OpDHs differierender Aminosäurespezifität und deren unterschiedliche Wiederfindungsrate bei der HIC zu erklären sein. Hinweise darauf, daß im Hautmuskelschlauch von *A. marina* Alo/StrDHs mit L-Alaninpräferenz und solche, die Glycin als Substrat bevorzugen, coexistieren, lieferten schließlich auch die unter 3.4.2 beschriebenen ionenchromatographischen Untersuchungen.

Indem die vereinigten Fraktionen maximaler AloDH-Aktivität aus der HIC zur nachfolgenden Chromatographie via Mono Q (2.5.6.2 und 3.4.1) nicht konzentriert und umgepuffert, sondern nur mit Startpuffer verdünnt wurden, konnten unnötige Enzymverluste vermieden und weitere Zeit eingespart werden. Bei der Anionenaustauschchromatographie wurde eine Basislinientrennung zweier Aktivitätspeaks mit jeweils dominierender AloDH- und geringer

StrDH-Aktivität erzielt (Abb. 4B, S. 54). Unabhängige Enzymreinigungen lieferten stets ein ähnliches Größenverhältnis der beiden Aktivitätsmaxima (erster Gipfel etwa dreimal höher als der zweite). Die erste Enzymform (Mono Q I) erschien allerdings oxidationsempfindlicher als die zweite (Mono Q II). Jedenfalls nahm der erste Peak bei zeitlich verzögerten Mono Q-Läufen (nicht dargestellt) im Verhältnis stärker ab. Das könnte erklären, weshalb die erste Enzymvariante (auch nach zusätzlicher Reinigung über Sephadex G100) stets ein etwas niedrigeres AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis aufwies als die zweite (18 : 1 bei Mono Q I versus 20 : 1 bei Mono Q II; 13 : 1 bei Sephadex I_{konz} versus 14 : 1 bei Sephadex II_{konz}, Tab. 1, S. 55). Schließlich wird die AloDH-Aktivität des Wattwurms gemäß 3.3 und 4.1.2 stärker durch oxidative Einflüsse beeinträchtigt als seine StrDH-Aktivität. Zu den Schwankungen der relativen Reaktionsraten im HIC-Eluat, in den Isozympräparationen nach Mono Q-Chromatographie sowie in den Endprodukten nach Gelfiltration trugen vermutlich neben Variationen im Redoxstatus der Enzymlösungen auch die wechselnden Pufferbedingungen bei.

Siegmund et al. (1985) konnten durch Anionenaustauschchromatographie und anschließende Gelfiltration keine OpDH-Varianten aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* trennen und fanden keine Hinweise auf die Existenz von Wattwurm-OpDHs differierender Aminosäurepräferenz. Der Diplomarbeit von Reitze (1983), auf der Teile der Veröffentlichung von Siegmund und Mitarbeitern beruhen, ist allerdings zu entnehmen, daß von diesen Autoren nur in den Endprodukten der OpDH-Reinigung AloDH- und StrDH-Aktivitäten gemessen wurden, wohingegen in deren Verlauf ausschließlich der Enzymumsatz mit L-Alanin quantifiziert wurde. Mögliche Schwankungen der relativen AloDH- und StrDH-Aktivitäten konnten somit nicht erfaßt werden. Die spezifischen AloDH- und StrDH-Aktivitäten der Enzympräparation von Siegmund et al. (1985) überschritten mit Werten von 278 bzw. 30 U·mg⁻¹ Gesamtprotein die spezifischen Aktivitäten der in der vorliegenden Arbeit isolierten AloDHs (148 bzw. 118 U·mg⁻¹ AloDH- und 11 bzw. 9 U·mg⁻¹ StrDH-Aktivität in Sephadex I_{konz} bzw. Sephadex II_{konz}, Tab. 1, S. 55). Allerdings verwendeten Siegmund et al. (1985) für ihre Aktivitätsmessungen ein anderes Puffersystem, so daß die Werte nur bedingt miteinander verglichen werden können. Den Autoren gelang nur eine partielle Alo/StrDH-Reinigung. Auch im Rahmen der aktuellen Arbeit wurden trotz Kombination dreier chromatographischer Methoden mit unterschiedlichen Trennprinzipien keine homogenen Enzyme erhalten. SDS-Elektrophoresen zeigten, daß besonders die erste Enzymform (Sephadex I_{konz}), mit erheblichen Mengen mindestens zweier anderer Proteine kontaminiert war (Abb. 5, S. 57). Die Vielzahl feiner Kontaminationsbande auf dem Gel in Abb. 5 resultierte aber auch daraus, daß hier sehr große Proteinmengen von 4 bzw. 2 µg je Spur appliziert wurden. Bei SDS-Elektrophoresen mit ge-

ringerem Probenauftrag (nicht dargestellt), erschienen die Isozympräparationen deutlich homogener. Der erzielte Reinheitsgrad reichte aus, um für nachfolgende Peptidsequenzierungen einheitliche Proteinbanden aus einem SDS-Gel auszuschneiden.

Die vorstehend diskutierte Reinigung von Wattwurm-AloDHs wurde durch partielle Enzymreinigungen über Fractogel EMD DEAE ergänzt (2.5.6.3 und 3.4.2). Die Anionenaustauschchromatographien sollten vor allem die mögliche Koexistenz von AloDHs und StrDHs im Hautmuskelschlauch von *A. marina* (siehe S. 108 und S. 113) erhellen. Fractogel EMD DEAE ist laut Herstellerangaben chemikalienresistenter und damit besser regenerierbar als das von Siegmund et al. (1985) genutzte DEAE-Sephadex und zeichnet sich als Tentakelionenaustauscher, bei dem die geladenen Gruppen abweichend von herkömmlichen Matrices an flexiblen Polymerketten verankert sind, durch eine andere Selektivität aus. Schließlich können mit Hilfe der Tentakel auch Proteinladungen erreicht werden, die für die rigiden Liganden konventioneller Ionenaustauscher sterischen unzugänglich sind (Müller, 1990; Kaufmann, 1997). Außerdem wurde das von Siegmund et al. (1985) verwendete Puffersystem aus 50 mM Imidazol/HCl pH 7,2 mit 2 mM EDTA, 50 mM 2-Mercaptoethanol und bis zu 250 mM KCl durch 20 bis 75 mM Kaliumphosphat pH 7,5 mit 5 mM DTT ersetzt. Proteine, die bei niedriger Ionenstärke an den Ionenaustauscher banden, wurden statt mittels eines linearen KCl-Gradienten durch kontinuierlich steigende Phosphatkonzentrationen und damit wegen der antichaotropen Eigenschaften dieser Puffersubstanz besonders schonend eluiert (Kaufmann, 1997). Im Unterschied zu nur einem Aktivitätspeak bei der Trennung von Siegmund et al. (1985) gelang es auf diese Weise, mindestens vier Alo/StrDH-Formen zu separieren (Abb. 7A, S. 60). Während sich im Durchfluß des chromatographischen Laufs dreimal weniger AloDH- als StrDH-Aktivität fand (Abb. 7A, Peak Ia*), eluierten im Verlauf des Phosphatgradienten drei Enzymvarianten, die L-Alanin 10- bis 16-fach besser als Glycin umsetzten (Abb. 7A, Peaks IIa*, IIIa* und IVa*). Damit übertraf die Selektivität der FG-DEAE-Chromatographie sogar jene der zuvor beschriebenen Mono Q-Läufe, bei denen nur zwei AloDHs (Abb. 4B, S. 54, I und II) getrennt wurden. Vermutlich eluierten die Isoenzyme AloDH-IIIa* und AloDH-IVa* aus dem FG-DEAE-Lauf (Abb. 7A, S. 60) bei der Chromatographie über Mono Q gemeinsam und entsprechen somit beide dem zweiten Peak (Mono Q II) des Chromatogramms in Abb. 4B (S. 54).

Die Durchflußfraktionen aus dem FG-DEAE-Lauf bei pH 7,5 (Abb. 7A, S. 60, Ia*) wurden bei gleicher Anfangsionenstärke, jedoch einem um eine Einheit höheren pH rechromatographiert (Abb. 7B, S. 60). Um bei pH 8,5 eine ausreichende Pufferwirkung sicherzustellen, kam dabei statt eines Phosphatpuffers ein Puffersystem aus 20 mM Tris/HCl mit 5 mM DTT

und bis zu 400 mM NaCl zum Einsatz. Unter den geänderten Pufferbedingungen wurden alle OpDHs an das Säulenmaterial gebunden. Sie eluierten mit steigender NaCl-Konzentration in zwei Peaks. Der dominierende erste Peak (Abb. 7B, S. 60, Ib*) repräsentierte offenbar eine oder mehrere StrDHs, die neben Glycin mit geringerer Effizienz auch L-Alanin umzusetzen vermochten (dreimal weniger ALoDH- als StrDH-Aktivität). Nur der kleinere, zweite Peak mit einem ALoDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis von 14 : 1 (Abb. 7B, Iib*) entsprach augenscheinlich ALoDHs, die bei der ersten Chromatographie aufgrund eines Überschreitens der Säulenkapazität nicht gebunden wurden. Ob es sich bei diesen ALoDHs ausschließlich um solche handelte, die bei adäquater Säulenbeladung mit dem Peak Ia* des ersten chromatographischen Laufs (Abb. 7A, S. 60) eluiert wären oder ob bei der Rechromatographie abweichend vom FG-DEAE-Lauf bei pH 7,5 wegen des steilen NaCl-Gradienten (innerhalb von 800 ml von 0 auf 400 mM NaCl statt von 20 auf 75 mM Phosphat) nicht zwischen verschiedenen ALoDH-Varianten differenziert werden konnte, erscheint unklar. Die Salzkonzentration, bei welcher die ALoDHs (Abb. 7B, Iib*) von der Säule wuschen (124 mM NaCl), entsprach aber ungefähr jener, mit der Siegmund und Mitarbeiter (1985) bei pH 7,2 Wattwurm-OpDHs von DEAE-Sephacel eluierten (120 mM KCl). Diese Autoren reinigten offenbar ein Gemisch diverser Wattwurm-ALoDHs, ohne den zwischenzeitlichen Verlust einer oder mehrerer StrDHs zu bemerken, auf deren Existenz im Hautmuskelschlauch von *A. marina* erstmals die vorliegenden Arbeiten hinwiesen.

Die Reinigung von ALo/StrDHs aus den Addukturen Pazifischer Austern (2.5.6.4 und 3.4.3) erfolgte in Anlehnung an Fields und Hochachka (1981). Bei der Gelfiltration im ersten chromatographischen Schritt wurde jedoch Sephadex-G100 statt Sephadex-G200 eingesetzt. Es besitzt gemäß Herstellerangaben (Amersham Biosciences) einen etwas engeren Fraktionierungsbereich (für globuläre Proteine 4 – 150 kd statt 5 – 600 kd), ermöglichte aber ähnlich hohe Reinigungserfolge (Reinigungsfaktor sieben bis acht versus neun bei Fields und Hochachka; vgl. Tab. 2, S. 63). Obwohl die Enzymlösung durch die Gelfiltration extrem verdünnt wurde und sich das Einengen und Umpuffern vor der nachfolgenden Anionenaustauschchromatographie dementsprechend langwierig gestaltete (3.4.3), enthielten die konzentrierten Gelfiltrationsfraktionen maximaler OpDH-Aktivität noch 73 bzw. 76 % der applizierten ALoDH- und StrDH-Aktivität (Tab. 2, S. 63). Das unterstreicht speziell vor dem Hintergrund der schlechten HIC-Wiederfindungsraten bei der OpDH-Reinigung aus *A. marina* (siehe S. 112 und Tab. 1, S. 55) den enzymeschonenden Charakter der Verteilungschromatographie (Deutscher, 1990; Regnier, 1987).

Der von Fields und Hochachka (1981) verwendete Anionenaustauscher (DEAE-Sephadex-A50) wurde durch eine DEAE-Sephacel-Säule ersetzt. Sie wurde statt mit 5 bis 50 mM Natriumphosphat, 14 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,5 (Fields und Hochachka, 1981) mit einem Puffersystem höherer Maximalkonzentration betrieben. Die bei niedriger Ionenstärke vollständig bindenden Alo/StrDHs wurden mittels eines linearen Gradienten von 20 auf 75 mM Kaliumphosphat eluiert. Auf diese Weise konnten, abweichend von der Chromatographie nach Fields und Hochachka (1981), die nur einen Aktivitätspeak erzielten, drei Isoenzyme (DEAE I bis III) mit AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnissen von jeweils etwa 1 : 1 separiert werden (Abb. 9, S. 64). Sie eluierten gut reproduzierbar bei etwa 48, 52 bzw. 59 mM Phosphat, weshalb vermutet werden könnte, daß bei der Anionenaustauschchromatographie von Fields und Hochachka zwei Enzymvarianten auf der Säule verblieben. Dagegen spricht jedoch der geringe AloDH-Verlust bei deren DEAE-Chromatographie (< 39 %). Vielleicht verfügten die von Fields und Hochachka präparierten Austern über eine andere Isozymausstattung als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere. Außerdem könnten die unterschiedlichen Austauschermatrizes (mit Epichlorhydrin quervernetztes Dextran im Fall von DEAE-Sephadex-G50, Cellulose im Fall von DEAE-Sephacel, Herstellerangaben, Amersham Biosciences) zu einem differierenden Retentionsverhalten beigetragen haben. Die wahrscheinlichste Erklärung für die frühere Elution von Austern-OpDHs bei der Anionenaustauschchromatographie von Fields und Hochachka (1981) besteht jedoch darin, daß die beiden ihre Säule überluden (vgl. Meyer, 2004). Sie applizierten pro Milliliter Bettvolumen rund siebenmal mehr Gesamtprotein als bei dem DEAE-Lauf der vorliegenden Arbeit aufgetragen wurde (59 mg Protein auf 14 ml DEAE-Sephadex-A50 versus 68 mg Protein auf 133 ml DEAE-Sephacel). Das Überschreiten der Säulenkapazität und ein daraus resultierender Selektivitätsverlust könnten zugleich erklären, weshalb die Autoren keine Isozymtrennung erzielten, obwohl sie einen im Vergleich zur DEAE-Chromatographie der vorliegenden Arbeit flacheren Phosphatgradienten verwendeten (45 mM Phosphatzunahme innerhalb von 14 Säulenvolumen statt 55 mM innerhalb von sieben Säulenvolumen).

Bei der abschließenden Hydroxyapatitchromatographie wurde anstelle herkömmlichen kristallinen Hydroxyapatits (Tiselius, 1956) keramisches Hydroxyapatit eingesetzt, das sich vor allem durch eine größere Stabilität und damit eine verbesserte Reproduzierbarkeit einzelner Läufe auszeichnet (Kawasaki et al., 1986; Kato et al., 1987). Um abweichend von Fields und Hochachka (1981), bei deren Hydroxyapatitchromatographie die Austern-Alo/StrDHs mit dem Durchfluß eluierten, ein Binden der OpDHs zu erreichen, wurde die Phosphatkonzentration des Startpuffers (pH 6,8) auf 2 mM erniedrigt (statt 50 mM nach Fields und Hochachka,

1981). Da bei einer so geringen Pufferkapazität und Ionenstärke schon geringfügige Kontaminationen das Retentionsverhalten von Proteinen deutlich verändern können, erhöhte sich damit die Gefahr von Artefakten. Als solcher ist vermutlich zu bewerten, daß das zweite Isozym bei einer was geringeren Phosphatkonzentration als die beiden anderen Enzymvarianten eluierte (bei 11 bis 12 mM statt bei 12 bis 14 mM Phosphat). Ansonsten wurden jedoch gut reproduzierbare und für alle Isoformen ähnliche Chromatogramme erhalten (vgl. Abb. 10, S. 65).

Bei der Reinigung von Austern-Alo/StrDHs blieb anders als bei den Arbeiten mit Wattwurm-OpDHs stets ein konstantes AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis von 0,8 bis 0,9 erhalten. Das spricht für die Stabilität der Austernenzyme und deutet zugleich darauf hin, daß keine Isoform mit deutlicher Substratpräferenz für L-Alanin bzw. Glycin abgetrennt wurde. Hohe Gesamtreinigungsfaktoren von mehr als 300 (Tab. 2, S. 63) belegen zudem die Effizienz des Reinigungsprotokolls. Für die verschiedenen Austern-Isozyme wurden AloDH- und StrDH-Aktivitäten zwischen 663 und 860 U·mg⁻¹ (Tab. 2) erzielt, die sehr gut mit der spezifischen AloDH-Aktivität der Enzympräparation von Fields und Hochachka (691 U·mg⁻¹) übereinstimmten, die OpDH-Aktivitäten der gereinigten Wattwurm-AloDHs (≤ 148 U·mg⁻¹ AloDH- und ≤ 11 U·mg⁻¹ StrDH-Aktivität) jedoch um ein Vielfaches übertrafen. Letzteres resultierte vermutlich weniger aus einer (unter den gewählten Meßbedingungen, vgl. 2.5.1) größeren katalytische Effizienz der Austernenzyme als vielmehr daraus, daß nur sie in SDS-elektrophoretisch reiner Form vorlagen (Abb. 11, S. 66 versus Abb. 5, S. 57)⁴. Im Vergleich zu der von Fields und Hochachka (1981) beschriebenen OpDH-Reinigung aus *C. gigas* lieferte jene der vorliegenden Arbeit eine etwas geringere Enzymausbeute (6 % statt 19 % der anfänglichen AloDH-Aktivität). Das erscheint als unmittelbare Folge der erreichten Isozymtrennung, die schon deshalb, weil abschließend drei Hydroxyapatitchromatographien statt einer durchgeführt werden mußten, zu zusätzlichen Enzymverlusten geführt haben dürfte.

4.1.4 Proteinbiochemische Isozymanalyse

Wie schon in der Einleitung ausgeführt können in den Geweben mariner Invertebraten sowohl OpDHs unterschiedlicher Aminosäurespezifität als auch mehrere OpDH-Varianten gleicher Substratpräferenz coexistieren (Siebenaller, 1979; Beaumont et al., 1980; Monneuse-

⁴ Beim Vergleich der beiden Gele ist zu beachten, daß bei der denaturierenden Elektrophorese gereinigter Austern-Alo/StrDHs (Abb. 11) zwar bis zu zehnmal weniger Protein je Spur appliziert wurde als auf dem SDS-Gel zur Reinigung von Wattwurm-AloDHs (Abb. 5), die Austernenzyme jedoch statt durch konventionelle Coomassiefärbung durch eine 10- bis 100-fach sensitivere Silberfärbung (Michov, 1996) detektiert wurden.

Doublet et al., 1980; Dando et al., 1981; Baldwin und England, 1982; Grieshaber und Kreuzer, 1986; Kanno et al., 1996a). Enzym polymorphismen und eine hohe individuelle Variabilität der OpDHs scheinen die Regel zu bilden. Bei einigen Arten wurden gewebsspezifische Isozyme mit differierenden kinetischen Eigenschaften nachgewiesen (Storey, 1977b; Storey und Storey, 1979; Plaxton und Storey, 1982). Bei anderen fanden sich sogar innerhalb eines Gewebes Isozyme, die offenbar durch unterschiedliche Genloci codiert werden (Manchenko et al., 1998). Allerdings müssen elektrophoretisch oder chromatographisch separierbare OpDH-Varianten nicht zwangsläufig genetischen Ursprungs sein. Sie können auch aus natürlichen posttranslationalen Modifikationen, artifiziellen Faltungsänderungen oder anderen in-vitro-Transformationen etwa bei der Homogenisation von Gewebe oder nachfolgenden Reinigungsschritten resultieren. Während bei einigen Arten die Existenz codominanter, polymorpher Genloci anhand von Phänotypenhäufigkeiten und Allelenfrequenzen statistisch abgesichert wurde (Siebenaller, 1979; Beaumont et al., 1980; Walsh, 1981; Baldwin und England, 1982), blieb die molekulare Basis der beobachteten OpDH-Formen in vielen anderen Fällen ungeklärt (Dando et al., 1981; Zettlmeissl et al., 1984; Sato et al., 1991; Kanno et al., 1996a; Kanno et al., 1996b). Auf die molekularen Unterschiede zwischen multiplen OpDHs einzelner Arten richtete sich daher ein Augenmerk der vorliegenden Arbeit. Die bereits unter 4.1.3 diskutierten chromatographischen Analysen, native und denaturierende Elektrophoresen (2.5.7.1 und 2.5.7.2), isoelektrische Fokussierungen (2.5.7.3), MALDI-Massenspektroskopie (2.5.9) und Peptidsequenzierungen (2.5.8) sollten in Kombination mit molekularbiologischen Arbeiten neue Erkenntnisse zur OpDH-Ausstattung und -Variabilität vor allem bei *A. marina* und *C. gigas* liefern. Es sollte geklärt werden, ob diese Arten proteinbiochemisch unterscheidbare Alo/StrDHs exprimieren, die genetisch determinierte Varianten und damit „echte“ Isoenzyme im Sinne der IUPAC-Empfehlungen von 1976 (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978) darstellen.

4.1.4.1 AloDHs und StrDHs im Hautmuskelschlauch des Wattwurms

Wie unter 4.1.3 diskutiert lieferten Anionenaustauschchromatographien über Fractogel-DEAE Hinweise auf die Existenz von drei oder mehr Alo/StrDH-Varianten (AloDHs) und wenigstens einer Str/AloDH (StrDH) aus *A. marina* (Abb. 7, S. 60). Da als Ausgangsmaterial der Chromatographien ein Hautmuskelschlauchextrakt aus 250 Wattwürmern diente (3.4.2), ist unklar, inwieweit die verschiedenen Enzymformen in Einzeltieren coexistierten. Daß bei dem FG-DEAE-Lauf aus Abb. 7A (S. 60, pH 7,5) bei einer Gesamtwiederfindungsrate von 70 % rund 40 % der applizierten StrDH-Aktivität mit dem Durchfluß eluierten (Abb. 7A,

S. 60, Ia*), der gemäß Rechromatographie bei pH 8,5 nur vernachlässigbar wenig OpDHs mit dominierender ALoDH-Aktivität umfaßte (Abb. 7B, S. 60), deutet aber darauf hin, daß mehr als 50 % der StrDH-Aktivität aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* (40 % von 70 % = 57 %) auf StrDHs zurückzuführen sein könnten (vorausgesetzt die Denaturierungsprozesse, die zum Verlust von etwa 30 % der aufgetragenen Aktivität führten, betrafen alle OpDHs gleichermaßen). Es scheint weitgehend ausgeschlossen, daß die Enzympeaks mit dominierender StrDH-Aktivität aus den FG-DEAE-Chromatographien (Abb. 7, S. 60) lediglich eine oder mehrere artifizielle Proteinspezies repräsentierten, die aus der partiellen Oxidation von ALoDHs hervorgingen. Sie müßten ansonsten, wie die ALoDH : StrDH-Aktivitätsverhältnisse in unchromatographierten Hautmuskelschlauchextrakten (maximal 9 : 1) und den verschiedenen ALoDH-Präparationen (FG-DEAE IIa* bis IVa*; zehn- bis sechzehnmal mehr ALoDH- als StrDH-Aktivität; Abb. 7A, S. 60) belegen, bereits bei der Homogenisation entstanden sein.

Obwohl für Formazanfärbungen (2.5.7.1) hochreine Opine zur Verfügung standen (2.2) und verschiedene Substratkonzentrationen getestet wurden (10, 20, 30, 50 mM meso-Alanin bzw. D-Strombin), erwies es sich als schwierig, die oxidationsempfindlichen OpDHs aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* nach nativer PAGE oder IEF durch spezifische Aktivitätsfärbung zu erfassen (4.1.2). In Gelspuren mit unchromatographierten Wattwurmextrakten niedriger spezifischer OpDH-Aktivität konnten auch nach langen Färbezeiten keine spezifischen ALoDH- oder StrDH-Banden nachgewiesen werden. Statt dessen wurden bis zu fünf Formazanbanden detektiert, die ähnlich intensiv auch bei Kontrollfärbungen ohne Opin auftraten (Abb. 6, S. 58). Eine solche substratunabhängige Formazanbildung wird nach Racker (1955) als „Nothing Dehydrogenase“-Reaktion bezeichnet. Sie bildet ein häufiges Phänomen bei der Detektion von Dehydrogenase-Aktivitäten mittels der Tetrazoliumtechnik (Venugopal und Adiga, 1980 oder Van Noorden et al., 1985).

Angeichts ihrer Intensität zum Beispiel auf dem Gel aus Abb. 6 (S. 58) scheint im vorliegenden Fall ausgeschlossen, daß die unspezifischen Formazanbanden durch NAD⁺-abhängige Dehydrogenasen mit gebundenen (während der elektrophoretischen Trennung nicht abdissoziierenden) endogenen Substraten produziert wurden. Schließlich wäre eine solche Enzymreaktion mangels Substratnachschub rasch zum Erliegen gekommen und hätte somit wohl nur schwache Signale ergeben. Die artifiziellen Banden könnten jedoch durch NAD⁺-abhängige Diaphorasen hervorgerufen worden sein (Venugopal und Adiga, 1980; Michal et al., 1983). Unter diesem Sammelbegriff für Enzyme, die in vitro Reduktionsreaktionen mit künstlichen Elektronenakzeptoren katalysieren (Kuonen et al., 1988), werden in der Swiss-Prot-Enzymnomenklaturdatenbank (<http://us.expasy.org/enzyme/>) unter anderem Dihydrolipoyl-

dehydrogenasen (EC 1.8.1.4, treten zum Beispiel als Bestandteil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes auf), NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktasen (EC 1.6.5.2) und Cytochrom-C-Oxidoreduktasen (EC 1.6.5.2) geführt. Vielleicht wurden die unspezifischen Banden übereinstimmend damit, daß Formazanfärbungen nach Michal et al. (1983) durch Phospholipide und Membranfragmente gestört werden können, durch Atmungskettenproteine des Anneliden verursacht.

Alternativ könnten die „Nothing-Dehydrogenase“-Banden (oder einige von ihnen) aus der nicht-enzymatischen Reduktion von Phenazinmetasulfat und nachfolgend Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) durch proteingebundene Sulfhydrylgruppen hervorgegangen sein (Venugopal und Adiga, 1980; Van Noorden, 1984; Van Noorden, 1985). Da mindestens eine OpDH aus dem Hautmuskelschlauch des Wattwurms über frei zugängliche Thiolgruppen verfügt (4.1.2), ist damit sogar vorstellbar, daß die auf nativen Disk-Gelen detektierten Banden mit R_f -Werten zwischen 0,27 und 0,41 (Angabe bezogen auf Abb. 6, S. 58) trotz ihres Auftretens bei Kontrollfärbungen Alo/StrDHs repräsentierten. Die mit opinhaltiger Reaktionslösung erzielten Signale wären in diesem Fall als Summe einer Opinoxidation und einer unspezifischen, sulfhydrylabhängigen NBT-Reduktion zu interpretieren. Dagegen spricht allerdings, daß zumindest die vier unspezifischen Banden der geringsten elektrophoretischen Mobilität aus dem Gel in Abb. 6 ($R_f = 0,27; 0,29; 0,34$ und $0,35$; von ihnen wurden auf dem Gel in Abb. 8 [S. 62] nur die drei intensivsten erfaßt; eine eindeutige Zuordnung der Banden aus Abb. 6 und Abb. 8 ergibt sich trotz leicht differierender R_f -Werte aus den relativen Bandenabständen) in der Kontrolle etwa gleich intensiv erschienen wie nach AloDH- bzw. StrDH-spezifischer Aktivitätsfärbung. Sie könnten somit allenfalls durch inaktive Enzymformen wie nicht funktionelle OpDH-Aggregate oder denaturierte OpDH-Monomere verursacht worden sein.

Abweichend von den übrigen unspezifischen Formazanbanden erschien die der höchsten elektrophoretischen Mobilität aus dem Gel in Abb. 6 (S. 58, $R_f = 0,41$) auf einigen Gelen nach StrDH-Färbung deutlich intensiver als nach gleich langer Inkubation in Gegenwart von Alonopin bzw. in opinfreier Reaktionslösung (nicht dargestellt). Manchmal trat die Bande in der Kontrollfärbung ohne Opin gar nicht auf. Sie repräsentierte somit möglicherweise eine instabile Wattwurm-StrDH mit exponierten Sulfhydrylgruppen (siehe vorausgehende Diskussion). Darauf deutete vor allem die native Disk-PAGE zu den FG-DEAE-Chromatographien hin (Abb. 8, S. 62). Hier wurden in Spuren mit Aliquots aus dem Durchfluß eines FG-DEAE-Laufs bei pH 7,5 (Abb. 7A, S. 60, Ia*) bzw. aus dem „StrDH-Peak“ der zugehörigen Rechromatographie bei pH 8,5 (Abb. 7B, S. 60, Ib*) neben unspezifischen Banden (R_f -Werte zwi-

schen 0,36 und 0,42) drei ALo/StrDH-Banden ($R_f = 0,44$; 0,46 und 0,48) detektiert, die offenbar Enzymen mit höherer Strombin- als Alanopinoxidase-Aktivität entsprachen. Das impliziert, daß die „StrDH-Peaks“ aus den FG-DEAE-Chromatographien (Abb. 7A, 1a* und Abb. 7B, 1b*, S. 60) möglicherweise jeweils mehrere aktive StrDH-Varianten umfaßten. Die intensivste der drei StrDH-Banden ($R_f = 0,46$) stimmte gemäß eines Vergleichs der R_f -Werte und relativen Bandenabstände wahrscheinlich mit der oben postulierten StrDH aus dem Gel in Abb. 6 (S. 58, $R_f = 0,41$) überein. Die beiden anderen StrDH-Formen wurden dort vermutlich aus Konzentrationsgründen nicht detektiert.

Alle drei StrDH-Spezies ($R_f = 0,44$; 0,46 und 0,48; Abb. 8, S. 62) wiesen bei nativen Disk-Elektrophoresen eine deutlich geringere Mobilität auf als die durch sukzessive Reinigung via Phenyl Sepharose, Mono Q und Sephadex G100 bzw. durch FG-DEAE-Chromatographie separierten ALoDHs (R_f -Werte zwischen 0,53 und 0,60; Abb. 6, S. 58 und Abb. 8, S. 62). Das korreliert mit dem differierenden Elutionsverhalten von ALoDHs und StrDHs bei den Anionenaustauschchromatographien (Abb. 7, 60) und läßt sich gut damit vereinbaren, daß die vereinten ALoDHs aus der FG-DEAE-Chromatographie bei pH 7,5 (Abb. 7A, II-IVa*) in Trägerampholytgradienten-Gelen bei einem mittleren pI von 5,26 fokussierten, während die StrDHs aus den vereinigten Durchflußfraktionen des gleichen Laufs (Abb. 7A, Ia*) bzw. dem „StrDH-Peak“ der Rechromatographie bei höherem pH (Abb. 7B, Ib*) alkalischere pIs von bis zu 6,12 aufwiesen (ohne Abbildung, 3.4.2). Da weder gelfiltrationschromatographische noch massenspektrometrische Analysen Hinweise auf signifikante Molekulargewichtsunterschiede zwischen einzelnen Wattwurm-OpDHs lieferten (3.5), differierten die verschiedenen OpDHs offenbar primär in ihrer Ladung. Es handelte sich bei den beschriebenen StrDHs also wohl nicht um Aggregationsprodukte monomerer Wattwurm-ALoDHs.

Von den beiden ALoDH-Varianten, die durch Mono Q-Chromatographie separiert wurden (Abb. 4B, S. 54, Mono Q I und II), bewegte sich diejenige, die bei höherer Salzkonzentration von der Säule wusch und somit beim pH des verwendeten Laufpuffers (pH 7,0) vermutlich mehr negative Oberflächenladungen aufwies (Mono Q II), bei Elektrophoresen im alkalischen Gel-Puffer-System nach Davis (1964) erwartungsgemäß rascher (Abb. 6, S. 58). Zumindest die konzentrierten Endprodukte Sephadex I_{konz} und Sephadex II_{konz} (Abb. 4C, S. 54 und Tab. 1, S. 55) ergaben jedoch kein einheitliches Signal. Vielmehr ließ sich eine mutmaßlich artifizielle Aufspaltung der ALoDH-Hauptbanden in mehrere nah benachbarte Unterbanden beobachten (R_f -Werte bei Sephadex I_{konz} zwischen 0,53 und 0,56, bei Sephadex II_{konz} zwischen 0,55 und 0,57; in Abb. 6, S. 58 nicht aufzulösen; vgl. 3.4). Im Fall der Probe Sephadex II_{konz} traten zusätzlich Enzymformen mit elektrophoretischen Mobilitäten zwischen de-

nen der dominierenden ALoDHs und denen der oben beschriebenen StrDHs auf ($R_f = 0,45$; $0,46$; $0,48$ und $0,49$; Abb. 6, S. 58). Diese entstanden, wie ihre im Vergleich zu den ALoDHs aus Sephadex I_{konz} deutlich geringeren Wanderungsgeschwindigkeiten in der nativen PAGE belegen, mutmaßlich erst nach der Anionenaustauschchromatographie über Mono Q (vgl. allerdings Kopaciewicz, 1983 und Regnier, 1987). Es handelte sich bei ihnen augenscheinlich um artifizielle Enzymvarianten, die vielleicht während des Konzentrierens im Anschluß an die Gelfiltrationschromatographie (Abb. 4C, S. 54) oder sogar erst während der Elektrophorese durch Faltungsänderungen, Oxidations- oder Aggregationsprozesse aus den dominierenden ALoDHs der Enzympräparation (R_f -Werte zwischen $0,55$ und $0,57$) hervorgingen. Daraus, daß die meisten der weniger mobilen ALoDH-Spezies (alle außer der mit $R_f = 0,49$) im Unterschied zu ihren mutmaßlichen Ursprungsenzymen auch durch StrDH-spezifische Formazanfärbung detektiert werden konnten, folgt, daß die entsprechenden Enzymmodifikationen sich unmittelbar auf die Substratspezifität der OpDHs auswirkten.

Um molekulare Besonderheiten der verschiedenen Wattwurm-ALoDHs aufzudecken und festzustellen, ob ihre Heterogenität durch Sequenzunterschiede oder Proteinmodifikationen wie die Phosphorylierung, Acetylierung oder Desamidierung spezieller Aminosäurereste determiniert wurde, sind tryptische Peptide aus den ALoDH-Präparationen Sephadex I_{konz} und Sephadex II_{konz} (Tab. 1, S. 55; trotz ihrer offensichtlichen Inhomogenität vereinfachend als Wattwurm-ALoDHs I und II bezeichnet) mittels Tandem-Massenspektrometrie sequenziert worden (2.5.8.2 und 3.6). Diese Methode wurde gegenüber einem bloßen Vergleich massenspektrometrischer Peptidmuster bevorzugt, weil die Intensität eines Peptidsignals im Massenspektrum von vielen Faktoren beeinflusst wird, was die Aussagekraft sogenannter Peptid-Fingerprints reduziert (Shevchenko et al., 1996; Roepstorff, 1997; Steen und Mann, 2004). So kann die Signalstärke verschiedener Peptide in Abhängigkeit von der Effizienz des proteolytischen Verdauens, dem Erfolg der anschließenden Gelelution, der Peptidlöslichkeit und der Ionisierungseffizienz trotz eigentlich gleicher Konzentration um mehrere Größenordnungen differieren. Gerade modifizierte Peptide ionisieren häufig weniger gut als ihre nicht-modifizierten Pendanten. Im Extremfall können einzelne Peptide im Spektrum sogar völlig fehlen, ohne daß sich daraus eindeutige Schlußfolgerungen ziehen ließen (Mann und Jensen, 2003; Steen und Mann, 2004). Die Gefahr, aufgrund derartiger Signalstärkeschwankungen zu Fehlschlüssen zu gelangen, ist bei massenspektrometrischen Peptidsequenzierungen geringer als beim einfachen „Peptid-Mapping“. Sofern Proteinmodifikationen durch sequenzierte Peptide abgedeckt werden, lassen sich in der Regel zweifelsfreie Aussagen hinsichtlich ihrer Art und Position treffen (Steen und Mann, 2004). Einzelne Aminosäureaustausche zwischen Enzymvarianten

können, sofern nicht gerade Leucin gegen Isoleucin substituiert wurde (massenspektrometrisch nicht unterscheidbar), eindeutig identifiziert werden.

Für die Zuverlässigkeit der Tandem-MS-Sequenzierungen in Bochum und Düsseldorf (2.5.8.2) spricht die große Übereinstimmung zwischen den Peptidsequenzen, die in den beiden Sequenzierlabors ausgehend von der gleichen ALoDH I-Präparation, ansonsten jedoch völlig unabhängig ermittelt wurden (Tab. 3, S. 71). Die Qualität der Sequenzdaten wird außerdem dadurch unterstrichen, daß die in Tab. 3 angegebenen Sequenzfragmente fast ausnahmslos komplette, vom N- bis zum C-Terminus sequenzierte Spaltpeptide repräsentieren. Das zeigt, daß Tandem-MS-Spektren ausreichend hohen Informationsgehalts mit kompatiblen Einzelsignalen erzielt wurden (Steen und Mann, 2004). Wie angesichts der hohen Spezifität von Trypsin zu erwarten (Olsen et al., 2004), wiesen bis auf das Peptid 736,45_2+ (8), das offenbar dem C-Terminus des Gesamtproteins entsprach (siehe Abb. 16, S. 77), sämtliche vollständig sequenzierten Peptide einem C-terminalen Arginin- oder Lysinrest auf und folgten im Ausgangsprotein offenbar auch auf eine dieser basischen Aminosäuren (vgl. ebenfalls Abb. 16).

Das Auftreten von Pyroglutamat (E*) statt Glutamin (Q) am N-Terminus des Peptids 706,96_2+ (versus 477,32_3+, 715,47,2+ und 715,27_2+; in Tab. 3, S. 71 alle unter 3) läßt sich dadurch erklären, daß N-terminale Glutaminreste durch Cyclisierung mit ihrer eigenen terminalen Aminogruppe leicht zu diesem modifizierten Rest desamidieren werden können (Melville, 1935; Wright, 1991). Da das Peptid 706,96_2+ (3) gemäß Edman-Sequenzierung nicht dem N-Terminus der zugehörigen Wattwurm-AloDH entsprach (Abb. 14, S. 69), kann die nicht-enzymatische Cyclisierung im vorliegenden Fall allerdings erst während bzw. nach dem tryptischen Verdau des Enzymproteins erfolgt sein. Auch der Austausch von Asparagin (N) an neunter Position des Peptids 639,85_3+ gegen Aspartat (D) im Peptid 640,07_3+ (in Tab. 3, S. 71 beide unter 6) resultierte augenscheinlich aus einer Desamidierungsreaktion. Die pH-, Temperatur- und Ionenstärke-abhängige Desamidierung von Asparagin- und Glutaminresten zu Aspartat bzw. Glutamat (Scotchler und Robinson, 1974) bildet einen häufigen Proteinreinigungsartefakt (McKerrow und Robinson, 1971; Wright, 1991), kommt aber auch in vivo vor, wo sie abgesehen von ungewünschten Effekten zu Lasten der Proteinstabilität möglicherweise regulatorische Funktionen erfüllt (Wright, 1991; Reissner und Aswad, 2003). Die Desamidierungsrate einzelner Asparagin- oder Glutaminreste wird dabei sowohl von unmittelbaren Sequenznachbarn als auch von übergeordneten Strukturmerkmalen beeinflusst. Asparagin, das im allgemeinen rascher als Glutamin desamidiert, zeichnet sich vor allem an Positionen, an denen in der Primärsequenz Glycin, Serin oder Alanin folgen, durch besondere

Labilität aus (Wright, 1991; Reissner und Aswad, 2003). Daß Asparagin im Peptid 639,85_3+ (6) einem Glycin vorausging, spricht somit für eine erhöhte Desamidierungswahrscheinlichkeit dieses Restes und macht den Nachweis einer aspartathaltigen Variante (640,07_3+, 6) besonders plausibel. Unverständlich erscheint dagegen die Sequenzdifferenz am N-Terminus der beiden Peptide. Während Dr. Sabine Metzger dort beim Peptid 640,07_3+ (6) Leucin bzw. Isoleucin detektierte, ging Dr. Markus Piotrowski unter Vorbehalt von einem Asparagin am N-terminalen Ende des Peptids 639,85_3+ (6) aus. Da beide Peptidvarianten aus dem Verdau der gleichen ALoDH-Präparation stammten, liegt es nahe, hier einen Sequenzierfehler zu vermuten.

Unterschiede zwischen den Wattwurm-AloDHs I und II (den Enzympräparationen Sephadex I_{konz} und Sephadex II_{konz}) konnten nicht nachgewiesen werden. Innerhalb der durch entsprechende Peptidsequenzen abgedeckten Proteinabschnitte differierten die beiden ALoDHs weder in ihrer Aminosäuresequenz noch in ihren posttranslationalen Modifikationen (Tab. 3, S. 71). Alle sequenzierten Peptidvarianten traten als Spaltpeptide der ALoDH I, einige zusätzlich auch als ALoDH II-Derivate auf. Daraus, daß manche ALoDH I-Peptide im Verdau der ALoDH II nicht detektiert wurden, folgt aber nicht zwangsläufig, daß sie dort nicht vorkamen. Dies könnte vielmehr auf die geringere Konzentration der ALoDH II-Präparation und eine dadurch erschwerte Detektion der Peptide im Massenspektrum zurückzuführen sein. Vielleicht resultierte das differierende chromatographische und elektrophoretische Verhalten der Wattwurm-AloDHs I und II allein aus konformationsbedingten Unterschieden ihrer Oberflächenladung. Alternativ könnte nach Mann und Jensen (2003) für manche ALoDH I-Peptide (2, 4, und 11 in Tab. 3, S. 71) gerade deshalb kein ALoDH II-Pendant gefunden worden sein, weil die entsprechenden ALoDH II-Abschnitte Modifikationen aufwiesen und sich die zugehörigen Spaltpeptide daher durch eine geringere Ionisierungseffizienz auszeichneten (siehe S. 123). Möglicherweise wurden selektiv nur besonders konservierte Sequenzabschnitte ohne Aminosäureaustausche oder sekundäre Modifikationen bei beiden ALoDH-Präparationen erfaßt und entsprechende Unterschiede daher nicht detektiert. Auch eine Kontamination der gereinigten ALoDH I mit ALoDH II läßt sich nicht ausschließen. So könnte das oben angesprochene Peptid 640,07_3+ (6, mit Aspartat an achter Position) eine eigentlich ALoDH II-spezifische Variante bilden, die in der ALoDH I-Präparation nur deshalb mit dem asparaginhaltigen Alternativpeptid (Asparagin an achter Position) coexistierte, weil das fragliche Asparagin bei einem Teil der ALoDH I-Moleküle nachträglich (nach der chromatographischen Trennung der ALoDHs I und II, Abb. 4B, S. 54) desamidiert wurde.

Die massenspektrometrischen Peptidsequenzierungen konnten die Frage nach den molekularen Unterschieden zwischen den chromatographisch separierten Wattwurm-AloDHs I und II somit nicht klären. Dies hätte vermutlich eine komplette Sequenzabdeckung erfordert, die bei der de novo-Sequenzierung von Proteinen jedoch in der Regel nur mit großem Aufwand (Analyse von Spaltpeptide, die mit unterschiedlichen Proteasen generiert wurden) zu erreichen ist (Steen und Mann, 2004). Ausgehend von den tryptischen AloDH I- und AloDH II-Peptiden der vorliegenden Arbeit ließ sich selbst unter Zuhilfenahme der abgeleiteten Wattwurm-AloDH aus Abb. 16 (S. 77) nur eine Sequenzüberspannung von knapp 30 % erzielen (Abb. 16). Eine vollständige Charakterisierung der Enzymproteine im Hinblick auf mögliche posttranslationale Modifikationen hätte als „substantielles Forschungsprojekt“ (Mann und Jensen, 2003) den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt.

Auch die N-terminale Proteinsequenzierung nach Edman lieferte keine Hinweise auf Unterschiede zwischen den Wattwurm-AloDHs I und II (2.5.8.1 und 3.6). Obwohl mit modernen Sequenziergeräten durchschnittliche Sequenzlängen von 30 bis 40 Aminosäuren erreicht werden können (Lottspeich, 1998) und angesichts der Bandenintensität auf den Coomassiegefärbten Blotmembranen von einer zur Direktsequenzierung nach Matsudaira (1987) und Bauw et al. (1987) ausreichenden Proteinmenge auszugehen war (Speicher, 1989), wurden dabei allerdings nur so geringe Signalstärken erzielt, daß selbst die ersten zehn Aminosäuren nicht alle zweifelsfrei ermittelt werden konnten. Das deutet darauf hin, daß der N-Terminus der Enzyme partiell acetyliert oder sonstwie modifiziert und seine Aminogruppe daher nicht für die Kupplungsreaktion mit Phenylisothiocyanat zugänglich war (Lottspeich, 1998; Steen und Mann, 2004). Eine N-terminale Blockierung kann trotz Vorsichtsmaßnahmen wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit praktiziert wurden (2.5.7.2 und 2.5.7.4; Speicher, 1989) als Artefakt während der Reinigung bzw. Elektrophorese und nachfolgenden Färbung eines Proteins entstehen (Lottspeich, 1998), bildet aber auch eine der häufigsten natürlichen Modifikationen eukaryotischer Proteine (Polevoda und Sherman, 2000). Da sie nach Driessen et al. (1985) bei rund 85 % der Eukaryotenproteine auftritt, erscheint eine in vivo-Acetylierung der Wattwurm-AloDHs nicht unwahrscheinlich. Daraus, daß die Edman-Degradation überhaupt auswertbare Ergebnisse lieferte, läßt sich aber schließen, daß der Acetylierungsgrad der Enzymvarianten (variiert nach Polevoda und Sherman (2000) sequenzabhängig) unter 100 % lag.

So wie sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine strukturellen Unterschiede zwischen den AloDH-Varianten I und II aus *A. marina* nachweisen ließen, stellten Monneuse-

Doublet et al. (1980) beim Vergleich zweier ionenchromatographisch und elektrophoretisch separierbarer ODHs aus Pilgermuscheladduktoren weder Größenunterschiede noch differierende kinetische bzw. immunologische Eigenschaften oder signifikante Abweichungen in der Aminosäurezusammensetzung fest. Die beiden *Pecten*-ODHs fokussierten aber auch unter denaturierenden Bedingungen bei unterschiedlichem pH ($pI = 5,85$ bzw. $5,78$), was zeigt, daß ihre Ladungsdifferenz nicht auf bloßen Konformationsunterschieden basierte. Daher und weil es ihnen nicht gelang, die beiden Enzymvarianten durch Desamidierung, proteolytischen Verdau oder Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen ineinander zu überführen, vermuteten die Autoren, daß die beiden ODH-Formen keine artifiziellen Proteinspezies, sondern in vivo existierende Enzymvarianten repräsentierten. Das scheint durch die Arbeit von Müller (2007) bestätigt zu werden, der kürzlich elektrophoretisch separierbare *Pecten*-ODHs nachweisen konnte, die sich in einzelnen Aminosäureresten unterscheiden.

Nur geringfügig in ihrer Sequenz oder ihren sekundären Modifikationen differierende OpDH-Varianten stellen somit keine auf *A. marina* beschränkte Ausnahmeerscheinung dar. Es liegt nahe, zu spekulieren, daß es sich bei den in der vorliegenden Arbeit separierten Wattwurm-AloDHs (AloDH I und II, AloDH IIa* bis IVa* und nur elektrophoretisch detektierte Subvarianten) um epigenetisch variierende bzw. in vitro entstandene Enzymformen oder wie wahrscheinlich auch bei den einander stark ähnelnden ODH-Spezies aus *P. maximus* (vgl. Müller, 2007) um Allozyme des gleichen genetischen Locus handelte. Die in ihrem ionenchromatographischen und elektrophoretischen Laufverhalten und damit vermutlich auch strukturell deutlich von den AloDHs abweichenden StrDHs aus *A. marina* repräsentierten dagegen möglicherweise Isozyme eines anderen Genortes. Diese Hypothese wird besonders dadurch gestützt, daß im Hautmuskelschlauch eines einzelnen Wattwurms molekularbiologisch die Coexpression einer AloDH und einer StrDH mit nur 53 % Aminosäuresequenz-Übereinstimmung nachgewiesen werden konnte (3.7 und jüngste Ergebnisse von Schäfer, siehe 4.1.5), deren theoretische pIs ($5,61$ bzw. $6,25$) gut mit den pH-Werten korrelieren, bei denen die in der vorliegenden Arbeit ionenchromatographisch separierten Wattwurm-AloDHs und StrDHs fokussierten (AloDHs durchschnittlich bei $pH = 5,26$; StrDHs bei alkalischeren pH-Werten von bis zu $6,12$; vgl. 3.4.2 und S. 122).

4.1.4.2 Alo/StrDHs im Adduktor der Pazifischen Auster

Anders als die OpDHs des Wattwurms konnten die der Pazifischen Auster, *C. gigas*, auch durch native Disk-Elektrophorese ungereinigter Gewebehomogenate und anschließende spezifische Aktivitätsfärbung analysiert werden. Die Elektrophorese von Adduktorhomogenaten

einzelner Austern lieferte in Anlehnung an Beaumont et al. (1980), Dando et al. (1981) und Manchenko et al. (1998) exemplarische Informationen zur Isozymausstattung der in der aktuellen Arbeit verwendeten Tiere (3.2). Dabei fanden sich abweichend von Fields und Hochachka (1981), die in Homogenaten einzelner *Crassostrea*-Adduktoren jeweils nur eine StrDH-Bande nachwiesen (und auf eine AloDH-spezifische Aktivitätsfärbung verzichteten), pro Muskel mehrere Enzymvarianten mit AloDH- und zumeist auch StrDH-Aktivität (Abb. 3, S. 52). Wieso Fields und Hochachka stets nur eine Enzymform detektieren konnten, scheint unsicher, könnte jedoch mit einer zu geringen OpDH-Konzentration in ihren Einzeltierhomogenaten zu erklären sein. Bei elektrophoretischer Analyse gereinigten und damit zugleich höher konzentrierten Enzymproteins (ohne Isozymtrennung aus 30 bis 60 Austernadduktoren erhalten, siehe 4.1.3) beobachteten die gleichen Autoren neben einer sich rasch entwickelnden Hauptbande drei schwächere StrDH-Banden, die sie auf die genetische Variabilität der Austern-OpDHs zurückführten.

Manchenko und Mitarbeiter (1998) verwendeten bei ihren Isozymanalysen mit Einzeltierhomogenaten aus *C. gigas* zwar eine Detektionsmethode, die anders als die unter 2.5.7.1 beschriebenen Formazanfärbungen nicht auf der OpDH-katalysierten Oxidation von Opinen basiert, sondern sich der entgegengesetzten Reaktionsrichtung (Opinsynthese) bedient, kamen jedoch zu ähnlichen Ergebnissen wie die aktuelle Arbeit. Die Autoren schlossen anhand der differierenden Isozymmuster, die sie mit AloDH- bzw. StrDH-spezifischer Reaktionslösung erhielten, auf die Expression je eines polymorphen Alo/StrDH- und AloDH-Locus im Adduktor Pazifischer Austern (vgl. Einleitung). Diese Hypothese wird durch das parallele Auftreten von Alo/StrDHs und AloDHs ohne nachweisbare StrDH-Aktivität in fünf von zwölf Adduktorhomogenaten der vorliegenden Arbeit (in Abb. 3, S. 52 nur exemplarisch dargestellt) gestützt, sofern man das Fehlen AloDH-spezifischer Banden in den übrigen Homogenaten darauf zurückführt, daß aus Konzentrationsgründen nicht alle reinen AloDHs (ergaben generell nur relativ schwache Signale) detektiert wurden. Möglicherweise konnten letztere nur bei bezüglich dieses Merkmals homozygoten Austern nachgewiesen werden, in deren Adduktor einzelne AloDHs im Fall codominanter Allelexpression höher konzentriert vorlagen als bei heterozygoten Individuen. Auch Manchenko et al. (1998) beobachteten eine im Vergleich zu den *Crassostrea*-Alo/StrDHs mindestens zweimal geringere Intensität AloDH-spezifischer Banden und stellten übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit fest, daß die Austern-AloDHs unter alkalischen Elektrophoresebedingungen langsamer als die meisten Alo/StrDH-Varianten in Richtung Anode wanderten. Die AloDH-spezifische(n) Isoform(en) aus den in Abb. 3 (S. 52) erfaßten Austernadduktoren Cg1 und Cg2 ($R_f = 0,49$) besaß(en) allerdings die gleiche

elektrophoretische Mobilität wie eine Alo/StrDH der Auster Cg3, von der sie allein aufgrund ihrer anderen Substratspezifität zu unterscheiden war(en). Eine derartige Comigration mehrerer Proteine stellt bei eindimensionalen Elektrophoresen keine Seltenheit dar (Steen und Mann, 2004).

Abweichend von Manchenko und Mitarbeitern (1998), die jeweils ein oder zwei Alo/StrDH- sowie maximal zwei AloDH-spezifische Enzymbanden je Austernadduktor nachwiesen, in ihrer Veröffentlichung allerdings kein Originalgel, sondern lediglich eine schematische Zeichnung präsentierten, traten bei der elektrophoretischen Analyse von Einzeltierhomogenaten im Rahmen der aktuellen Arbeit simultan bis zu fünf verschiedene OpDH-Banden (darunter viererlei Alo/StrDHs) auf (Cg1, Abb. 3, S. 52). Sofern man wie Manchenko et al. (1998) davon ausgeht, daß alle Enzymvarianten auf zwei codominant exprimierte Genloci diploider Austern zurückzuführen waren, deutet das auf sekundär modifizierte Enzymformen natürlichen oder artifiziellen Ursprungs hin (vgl. 4.1.4.1; Beaumont et al., 1980; Winberg et al., 1983; Gianazza, 1995; Mann und Jensen, 2003). Obwohl vor allem an der Westküste Nordamerikas zunehmend mehr triploide Austern produziert werden, die sich angesichts ihres stark reduzierten Reproduktionspotentials vor allem während der Laichzeit besser vermarkten lassen als diploide Tiere, handelte es sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pazifischen Austern aus Yerseke (Niederlande) um herkömmliche, diploide Zuchtaustern (Nell, 2002; persönliche Mitteilungen Kopek B. V., Yerseke, Niederlande). Die hohe Zahl elektrophoretisch separierbarer Enzymvarianten resultierte somit nicht aus einer Polyploidie der untersuchten Muscheln.

Mit Ausnahme der Variante höchster elektrophoretischer Mobilität aus dem Austernadduktor Cg1 ($R_f = 0,60$) traten alle in Einzeltierhomogenaten nachgewiesenen Alo/StrDHs (Abb. 3, S. 52) bzw. zumindest Alo/StrDHs des gleichen elektrophoretischen Migrationsverhaltens auch im Zentrifugat nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Dialyse auf, das bei der Reinigung von Austern-OpDHs ausgehend von 90 Addukturen derselben Austerncharge erhalten wurde (Abb. 12, S. 67; R_f -Werte hier bei gleichen relativen Bandenabständen um 0,08 bis 0,09 kleiner als auf dem Gel aus Abb. 3). Spezifische AloDHs konnten in diesem Zentrifugat vermutlich aufgrund ihrer Comigration mit Alo/StrDHs (siehe S. 128) nicht detektiert werden. Auch im Verlauf der chromatographischen Reinigung fanden sich keine Hinweise auf Alanin-spezifische *Crassostrea*-OpDHs (3.4.3 und 4.1.3). Reine AloDHs trugen offenbar nur in so geringem Umfang zur Gesamt-AloDH-Aktivität der verwendeten Austernaddukturen bei, daß sie sich chromatographisch nicht erfassen ließen bzw. sich durch ihre Coelution mit Alo/StrDHs (mutmaßlich denen, die bei der Anionenaustauschchromatographie über

DEAE-Sephacel bereits bei Elutionsvolumina zwischen 250 und 415 ml von der Säule wuschen, Abb. 9, S. 64) das AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis kaum veränderte. Das entspricht den Angaben von Manchenko et al. (1998), welche die OpDH-Aktivität im Adduktor Pazifischer Austern ebenfalls vor allem auf Alo/StrDHs zurückführten, im Hepatopankreas, im Mantel und in den Kiemen von *C. gigas* jedoch ausschließlich AloDHs nachwiesen. Die von den Autoren postulierten OpDH-Loci werden somit gewebspezifisch exprimiert. Möglicherweise fungieren die *Crassostrea*-Alo/StrDHs in vivo als Opinsynthase, die AloDHs der Art dagegen ähnlich wie die bei Cephalopoden beschriebenen H-Typ-ODHs (Storey, 1977b; Storey und Storey, 1979; Plaxton und Storey, 1982) vornehmlich als Opinoxidase.

Isoelektrische Fokussierungen der gereinigten *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III (entsprechend CHT I_{konz} bis CHT III_{konz}, Tab. 2, S. 63) zeigten, daß diese zwar alle sehr ähnliche, jedoch entsprechend der Reihenfolge ihrer Elution bei der Anionenaustauschchromatographie (Abb. 9, S. 64) zunehmend saurere pIs besaßen (Abb. 13, S. 68). Diese Tendenz fand sich, obwohl die Mittelwerte aus mehreren Trägerampholyt-IEFs nicht signifikant differierten (Cg-Alo/StrDH I = $5,30 \pm 0,09$, Cg-Alo/StrDH II = $5,22 \pm 0,08$ und Cg-Alo/StrDH III = $5,15 \pm 0,03$; n = 3), auf allen Einzelgelen (Abb. 13, links). Die geringen Standardabweichungen, die trotz Variation der Fokussierungszeit (90 bzw. 120 min) erzielt wurden, sprechen für die Zuverlässigkeit der ermittelten pIs und belegen, daß ausreichend lange fokussiert wurde. Die Werte konnten zudem durch Fokussierungen in immobilisierten pH-Gradienten (isoelektrische Hybrid-Fokussierungen, vgl. Terminologie von Altland und Rossmann, 1985) bestätigt werden.

Hybridfokussierungen in Trägerampholyt-haltigen IPG-Gelen (2.5.7.3) sind, da sie von den Vorteilen beider Methoden profitieren, sowohl Trägerampholyt- als auch normalen IPG-Fokussierungen überlegen. Einerseits wird durch die Immobiline ein stabiler pH-Gradient erzielt, andererseits durch die Trägerampholyte die durchschnittliche Konduktivität gegenüber reinen IPG-Gelen erhöht, was kürzere Fokussierungszeiten ermöglicht und damit das Risiko artifizierlicher Proteinmodifikationen senkt. Da Trägerampholyte die Löslichkeit von Proteinen fördern, können auf Hybrid-Gelen zudem größere Probenmengen appliziert werden (Altland und Rossmann, 1985). Die IPG-Fokussierungen (Hybridfokussierungen) der vorliegenden Arbeit (Abb. 13, S. 68, rechts) zeigten deutlicher als native PAGEs (Abb. 12, S. 67) oder Trägerampholyt-IEFs (Abb. 13, links), daß die gereinigten *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III, obwohl sie auf silbergefärbten SDS-Gelen jeweils nur eine einzelne Proteinbande ergaben (Abb. 11, S. 66), keine homogenen Enzympräparationen bildeten, sondern mit jeweils einer oder mehreren anderen Isoformen kontaminiert waren.

Die drei etwa gleich großen Alo/StrDH-Varianten (3.5), die angesichts einer sehr guten Reproduzierbarkeit der Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephacel (Abb. 9, S. 64) durchaus in vivo coexistieren könnten, wurden offenbar bei ihrer Reinigung nicht vollständig separiert, können aber möglicherweise auch ineinander überführt werden. So ließ gereinigte *Crassostrea*-Alo/StrDH I auf Coomassie-gefärbten nativen Gelen neben der dominierenden Hauptbande ($R_f = 0,43$) lediglich eine schwache zusätzliche Bande ($R_f = 0,45$) erkennen, die augenscheinlich der zweiten Isoform (Cg-Alo/StrDH II) entsprach (Abb. 12, S. 67). Bei IPG-Fokussierung derselben Probe traten jedoch zwei etwa gleich intensive Proteinbanden mit isoelektrischen Punkten von 5,30 und 5,24 auf (Abb. 13, S. 68, rechts). Das deutet darauf hin, daß infolge der unphysiologischen Fokussierungsbedingungen Alo/StrDH I-Moleküle ($pI = 5,30$) zu *Crassostrea*-Alo/StrDH II ($pI = 5,24$) mutierten (vgl. die durch Trägerampholyt-IEF ermittelten pI s, S. 130 und Garfin, 1990). Die pI -Differenz zwischen den beiden Enzymvarianten könnte beispielsweise auf die Desamidierung eines einzelnen Asparagin- oder Glutaminrests zurückzuführen sein, durch die der pI eines Proteins nach Dice und Goldberg (1975) in der Regel um 0,1 bis 0,2 pH-Einheiten erniedrigt wird.

Ähnlich kann im Fall der zweiten Enzympräparation (Cg-Alo/StrDH II) argumentiert werden. Sie erschien auf nativen Disk-Gelen weitgehend homogen (Abb. 12, S. 67). Bei ihrer IPG-Fokussierung (Abb. 13, S. 68, rechts) trat aber neben der auch bei der Alo/StrDH I detektierten Enzymspezies mit pI 5,24, die offenbar der Hauptbande aus der nativen Disk-PAGE ($R_f = 0,45$) und damit der eigentlichen *Crassostrea*-Alo/StrDH II entsprach, eine ebenso stark konzentrierte Alo/StrDH-Variante mit einem um 0,1 pH-Einheit saureren pI (5,14) auf. Diese stimmte vermutlich mit der *Crassostrea*-Alo/StrDH III ($R_f = 0,46$; Abb. 12, S. 67) überein (vgl. die relativen Bandenabstände auf nativen Gelen und den pI der Austern-Alo/StrDH III gemäß Trägerampholyt-IEF, S. 130) und entstand als Komponente der zweiten Isozympräparation möglicherweise größtenteils erst während der IPG-Fokussierungen aus der alkalischen OpDH-Variante ($pI = 5,24$). Das gilt auch für eine weitere, geringer konzentrierte Proteinspezies mit nochmals um 0,08 pH-Einheiten niedrigerem pI (5,06), die bei IPG-Fokussierungen außer in Spuren mit Cg-Alo/StrDH II auch als Hauptbande der dritten Isozympräparation (Cg-Alo/StrDH III) auftrat. Sofern die vorstehend diskutierte Bandenzuordnung zutrifft, wurde die in der nativen PAGE dominierende Alo/StrDH III-Form (Abb. 12, S. 67, $R_f = 0,46$; $pI = 5,14$) während der IPG-Fokussierungen fast vollständig zu jener mit einem pI von 5,06 umgesetzt und erschien daher selbst auf entsprechenden Gelen nur als schwache Nebenbande (Abb. 13, S. 68, rechts). Auch eine zusätzliche *Crassostrea*-Alo/StrDH III-Abart mit

einem pI von 4,98, die durch Desamidierung zweier Reste aus der ursprünglichen Enzymspezies (pI = 5,14) hervorgegangen sein könnte, ergab lediglich ein äußerst schwaches Signal.

Alternativ läßt sich das durch IPG-Fokussierung der *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III erzielte Bandenmuster (Abb. 13, S. 68, rechts) so interpretieren, daß die Isoformen mit einem pI von 5,30 und 5,06 der eigentlichen Cg-Alo/StrDH I bzw. III entsprachen (gleich den auf nativen Disk-Gelen dominierenden Proteinbanden mit R_f -Werten von 0,43 und 0,46, Abb. 12, S. 67) und die beiden Cg-Alo/StrDH II-Subformen mit pI 5,24 und 5,14 weder chromatographisch noch durch native Disk-PAGE separiert werden konnten, so daß sich ihre Koexistenz erst bei der hochauflösenden Fokussierung in einem flachen pH-Gradienten (pH 4,0 bis 7,0) manifestierte. In diesem Fall müßten die verschiedenen *Crassostrea*-Alo/StrDHs nicht zwingend ineinander überführbar sein. Die unerwartet starke Intensität der pI 5,24-Bande in Spuren mit gereinigter *Crassostrea*-Alo/StrDH I, die nur bei einer einzelnen Fokussierung beobachtet wurde, könnte einen Artefakt der Coomassiefärbung bilden. Allerdings ist wenig einsichtig, weshalb die Enzymvarianten mit einem pI von 5,30 und 5,24 (Cg-Alo/StrDH I und II) sich durch native Disk-Elektrophorese hätten trennen lassen sollen (Abb. 12, S. 67, $R_f = 0,43$ und $0,45$), wenn dies für die Cg-Alo/StrDH II-Subspezies mit pI 5,24 bzw. 5,14 (Werte gemäß IPG-Fokussierungen) nicht möglich war (laut Alternativhypothese bei der nativen PAGE aus Abb. 12 beide $R_f = 0,45$). Der Erklärungsansatz, nach dem die *Crassostrea*-Alo/StrDH II erst während der IPG-Fokussierungen in mehrere Subvarianten aufgespalten wurde, erscheint insofern schlüssiger. Auch die Beobachtung, daß einige der bei den IPG-Fokussierungen erzielten Signale Doppelbandencharakter besaßen (3.4.3), deutet auf mögliche IEF-Artefakte hin (Garfin, 1990).

Molekulare Unterschiede zwischen den chromatographisch separierbaren, jedoch weder in ihren isoelektrischen Punkten noch in ihrem Molekulargewicht wesentlich differierenden *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III (3.5 und vorstehende Diskussion) sollten, da eine Proteindegradation nach Edman an den offensichtlich (fast) vollständig blockierten N-Termini vor allem der zweiten und dritten Isoform scheiterte (3.6 und Diskussion unter 4.1.4.1), wie im Fall der Wattwurm-AloDHs durch massenspektrometrische Peptidsequenzierungen (2.5.8.2) erfaßt werden. Peptidvarianten, die offenbar demselben Sequenzabschnitt zuzuordnen waren, sich aber durch einzelne Aminosäureaustausche, Insertionen bzw. Deletionen oder sekundäre Modifikationen unterschieden, traten jedoch nicht isozymspezifisch im tryptischen Verdau gereinigter *Crassostrea*-Alo/StrDH I, II bzw. III auf, sondern konnten in der Regel parallel im selben Ansatz bzw. bei der Analyse von *Crassostrea*-Alo/StrDH II aus zwei unabhängigen Enzymreinigungen (Cg-Alo/StrDH II versus Cg-Alo/StrDH II*) nachgewiesen werden

(Tab. 4, S. 72). Die Unterschiede zwischen den Peptiden waren somit nicht auf deren Zugehörigkeit zu einer der chromatographisch separierbaren Enzymformen zurückzuführen, sondern reflektierten offenbar die individuelle Isozymvariabilität der verwendeten Austern. Einige der sekundär modifizierten Peptide repräsentierten möglicherweise artifizielle Varianten, die gegebenenfalls erst bei der Probenvorbereitung für die Tandem-MS entstanden.

Das gilt zum Beispiel für das Peptid 489,77₂₊ (Tab. 4, S. 72, 3) aus dem tryptischen Verdau aller drei Austern-Isozyme (Cg-Alo/StrDH I bis III). Es stimmte bis auf ein zusätzliches Hydroxylysin (K*) am N-Terminus mit dem um eine Aminosäure kürzeren Alo/StrDH II-Peptid 417,77₂₊ (3) überein, das offenbar aus Enzymmolekülen mit unmodifiziertem Lysin und damit einer zusätzlichen tryptischen Spaltstelle hervorging. Obwohl Hydroxylysin zum Beispiel in Kollagenen als natürliche Aminosäure vorkommt (Hamilton und Anderson, 1955; Myllyharju, 2005), könnte es im Fall des Peptids 489,77₂₊ (3) als Artefakt des tryptischen Verdau unter alkalischen Reaktionsbedingungen (2.5.8.2) entstanden sein. Die bei mehreren Peptiden nachgewiesene Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid (Tab. 4, S. 72, 9 und 15) stellt ebenfalls eine häufige nicht-enzymatische Aminosäuremodifikation dar, die sowohl in vivo als auch während der Reinigung von Proteinen auftreten kann (Brot und Weißbach, 1983; Hollemeyer et al., 2002). Modifizierte Cysteine wurden deshalb detektiert (zum Beispiel in den Peptiden 613,35₂₊ und 731,35₂₊, Tab. 4, S. 72, 7 und 11), weil die für Tandem-MS-Sequenzierungen verwendeten Enzymproteine, um einer Bildung inter- und intramolekularer Disulfidbrücken entgegenzuwirken und damit die Interpretation der Spektren zu erleichtern, mit Iodacetamid alkyliert wurden (2.5.8.2 und 2.5.7.2). Das nicht-alkylierte Cystein im Peptid 731,41₂₊ (Tab. 4, S. 72, 11) stellt insofern keine relevante Abweichung vom äquivalenten Peptid 731,35₂₊ (11) mit modifiziertem Cystein dar, sondern deutet lediglich auf suboptimale Alkylierungsbedingungen hin.

Bei der Sequenzierung von *Crassostrea*-Alo/StrDH-Peptiden wurde insgesamt eine größere Variabilität als bei den AloDHs aus *A. marina* beobachtet. So wird ein Drittel der erfaßten Sequenzabschnitte aus *C. gigas* durch zwei oder mehr Alternativpeptide abgedeckt, während sich im Fall der Wattwurm-AloDHs für weniger als ein Fünftel der sequenzierten Teilstücke mehrere Sequenzvarianten fanden (vgl. Tab. 3, S. 71 und Tab. 4, S. 72). Das wird allerdings dadurch relativiert, daß tryptische Peptide aus drei verschiedenen, zum Teil aus unabhängigen Enzymreinigungen stammenden Austern-Alo/StrDHs, jedoch nur zwei verschiedene AloDH-Präparationen aus dem Hautmuskelschlauch von Wattwürmern analysiert wurden. Gleichwohl maskierte die offensichtlich hohe individuelle Variabilität der *Crassostrea*-Alo/StrDHs möglicherweise die für das chromatographische und elektrophoretische

Verhalten einzelner Isoformen relevanten Unterschiede bzw. erschwerte die Interpretation solcher Abweichungen wie sie zwischen den Peptiden 846,36_3+ und 846,50_3+ (Tab. 4, S. 72, 18) festgestellt wurden.

Diese Alternativpeptide bilden die einzigen, die ausschließlich im Verdau unterschiedlicher Austernisozyme (nur bei Cg-Alo/StrDH II* bzw. nur bei Cg-Alo/StrDH I und III) nachgewiesen wurden. Allerdings konnten der C-Terminus der ersten und der N-Terminus der zweiten Variante nicht sicher bestimmt werden. Außerdem wiesen beide Peptide, obwohl sie gemäß Vergleich mit abgeleiteten *Crassostrea*-OpDHs (Abb. 17, S. 81) nicht dem C-Terminus der Enzyme entsprachen, keinen C-terminalen Lysin- oder Argininrest auf, wie dies für tryptische Spaltprodukte zu erwarten wäre (Olsen et al., 2004). Nur das Auftreten des Peptids 846,50_3+ (18) läßt sich damit erklären, daß im zugehörigen Ausgangsprotein an die Sequenzfolge Isoleucin-Valin-Valin (IVV) möglicherweise wie im Peptid 846,36_3+ (18) ein Prolinrest (P) anschloß, so daß die C-terminal des zweiten Valins gelegene Peptidbindung besonders labil war (Steen und Mann, 2004; Olsen et al., 2004). Mit dem Peptid 846,36_3+ (18), das nur im Verdau der Cg-Alo/StrDH II* detektiert wurde, war nicht zu rechnen, da die Spaltung einer C-terminal von Prolin gelegenen Peptidbindung energetisch wenig begünstigt ist (Steen und Mann, 2004). Es handelte sich offenbar um das seltene Produkt einer Trypsin-unabhängigen, artifiziellen Degradation, die erst nach dem eigentlichen Verdau des Ausgangsproteins erfolgte (Olsen et al., 2004). Es scheint daher wenig sinnvoll, gerade an den Peptiden 846,36_3+ und 846,50_3+ (beide 18) mögliche molekulare Unterschiede (Substitution von Glycin und Alanin an den Positionen fünf und sechs des Peptids 846,36_3+ gegen Glutamin im Peptid 846,50_3+) zwischen den chromatographisch separierbaren Alo/StrDHs aus *C. gigas* festzumachen. Um solche zuverlässig aufzudecken, hätte es wie bereits unter 4.1.4.1 diskutiert einer vollständigen Sequenzabdeckung der verschiedenen Austernenzyme bedurft.

Zugleich stellt sich die Frage, inwiefern die bei Disk-Elektrophoresen oder IEFs beobachtete Inhomogenität der einzelnen Isozympräparationen (siehe S. 130 folgende) die Ergebnisse der vergleichenden Peptidsequenzierungen verfälscht haben könnte. Da sich die massenspektrometrische Signalintensität trotz proteinabhängiger Schwankungen proportional zur Analytkonzentration verhält (Steen und Mann, 2004) und bevorzugt die in den verschiedenen Alo/StrDH-Fingerprints dominierenden Peptide sequenziert wurden, dürften geringe Verunreinigungen der verschiedenen Enzymspezies mit anderen Alo/StrDHs (vgl. native Disk-PAGE aus Abb. 12, S. 67) den Isozymvergleich nicht beeinträchtigt haben. Sofern einzelne Austern-Alo/StrDHs tatsächlich wie oben diskutiert ineinander überführbar sind, könnte die

Detektion molekularer Unterschiede zwischen den chromatographisch separierbaren Varianten jedoch dadurch erschwert oder gänzlich verhindert worden sein, daß bei der Probenvorbereitung für die Tandem-Massenspektrometrie einzelne Enzymformen in beträchtlichem Umfang in andere umgewandelt wurden.

4.1.4.3 OpDHs aus *O. edulis* und *S. nudus*

Wie bei Pazifischen Austern konnten auch in den Adduktoren Europäischer Austern durch native Disk-Elektrophorese nebeneinander reine AloDHs und kombinierte Alo/StrDHs nachgewiesen werden (Abb. 3, S. 52). Im Unterschied zu den OpDHs aus *C. gigas*, die Alanopin und Strombin unter den gewählten Färbebedingungen gleich gut umsetzten, erwiesen sich die Alo/StrDHs aus *O. edulis* als schlechtere Strombin- denn Alanopinoxidasen. Messungen der Opinsyntheseraten in den zugehörigen Adduktorhomogenaten lieferten jedoch AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnisse von etwa 1 : 1 (Ergebnisse nicht dargestellt, vgl. aber 3.1), was darauf hindeutet, daß wenigstens einige der Enzymformen in umgekehrter Reaktionsrichtung Glycin ebenso effizient oder sogar besser als L-Alanin umzusetzen vermochten. Letzteres steht in Einklang mit Isozymelektrophoresen von Dando und Mitarbeitern (1981), bei denen eine auf der Opinbildungsreaktion beruhende Färbemethode zum Einsatz kam. Diese Autoren detektierten in Einzeltierhomogenaten aus *O. edulis* neben AloDHs, die mit glycinhaltiger Reaktionslösung nur äußerste schwache Banden ergaben, Alo/StrDHs mit Glycinpräferenz und postulierten, daß die *Ostrea*-OpDHs differierender Aminosäurespezifität durch zwei unabhängige Genloci codiert werden. Während der polymorphe (Alo)StrDH-Locus nach Dando et al. (1981) vor allem im Adduktor der Austern codominant exprimiert wird, tritt das Enzym des angeblich monomorphen AloDH-Locus auch in anderen Geweben wie der Mitteldarmdrüse auf, wo es möglicherweise hauptsächlich als Opinoxidase fungiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zwar tatsächlich nur eine alanopinspezifische Enzymvariante je Einzeladduktor nachgewiesen (Abb. 3, S. 52), doch trat bei der Auster Oe3 eine AloDH anderer elektrophoretischer Mobilität ($R_f = 0,38$) auf als bei den Austern Oe1 und Oe2 (jeweils $R_f = 0,40$). Das widerspricht, sofern diese AloDHs sich nicht allein durch sekundäre Proteinmodifikationen unterschieden, sondern genetisch determinierte Varianten repräsentierten, der von Dando et al. (1981) postulierten Monomorphie des AloDH-Locus von *O. edulis*.

Die elektrophoretische Analyse von Hautmuskelschlauchextrakten aus vier Spritzwürmern lieferte keine Hinweise auf eine individuelle OpDH-Variabilität dieser Art (Abb. 3, S. 52). In allen Einzeltierhomogenaten wurden zwei bis drei ODH-Varianten nachgewiesen, deren relative Laufweite in der nativen PAGE etwa mit jener der von Kreuzer (1987) be-

schriebenen Spritzwurm-ODHs übereinstimmte ($R_f = 0,42, 0,43$ und $0,46$ versus $R_f = 0,48, 0,51$ und $0,54$ nach Kreutzer, 1987). Allerdings differierten die relativen Bandenintensitäten. Während bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Spritzwurm-Extrakten die beiden ODH-Banden größerer elektrophoretischer Mobilität ($R_f = 0,43$ und $0,46$) gegenüber einer nur schwachen Bande geringerer Laufweite ($R_f = 0,42$) dominierten, verhielt es sich bei dem von Kreutzer (1987) untersuchten Gewebe umgekehrt (Bande mit $R_f = 0,54$ am wenigsten intensiv). Das könnte damit zusammenhängen, daß Kreutzer Sipunculi aus einem anderen Habitat (aus Morgat statt wie in der vorliegenden Arbeit aus Loquémeau, beides Bretagne, Frankreich) verwendete. Da sich möglicherweise wenigstens eine der detektierten ODH-Varianten von einer der anderen Enzymformen ableitete, könnten die Schwankungen der relativen Bandenintensitäten aber auch durch einen differierenden Modifikationsgrad der OpDHs zu erklären sein.

Abweichend von Kreutzer (1987; vgl. auch Grieshaber und Kreutzer, 1986) wurde bei den Isozymelektrophoresen der aktuellen Arbeit zudem eine Spritzwurm-Alo/StrDH nur geringfügig größerer elektrophoretischer Mobilität ($R_f = 0,47$) als die ODH der höchsten Wanderungsgeschwindigkeit ($R_f = 0,46$) detektiert, die sich kaum von dieser unterscheiden ließ und daher auch auf eine ODH mit geringer Alo/StrDH-Aktivität hätte schließen lassen können. Eine Enzymvariante ähnlicher relativer Laufweite ($R_f = 0,59$) wie die von Kreutzer (1987) beschriebene Alo/StrDH mit einem R_f -Wert von $0,60$ ließ sich unabhängig davon, ob die verwendete Reaktionslösung 20 oder 50 mM Alanopin bzw. Strombin enthielt (10 mM bei Kreutzer, 1987), selbst nach 18-stündiger Färbedauer nur erahnen. Die Hypothese, daß die AloDH- und StrDH-Aktivität aus dem Hautmuskelschlauch von *S. nudus* größtenteils auf ein anderes Enzymprotein zurückzuführen ist als seine ODH-Aktivität (Kreutzer, 1987), ließ sich somit nicht eindeutig bestätigen. Die Unterschiede zwischen den vorliegenden Ergebnissen und den Befunden von Kreutzer (1987) werden allerdings dadurch relativiert, daß diese Autorin bei chromatographischen Analysen von Spritzwurm-OpDHs, im Rahmen derer Opinsyntheseaktivitäten gemessen und nicht wie bei den Elektrophoresen Opinoxidaseaktivitäten detektiert wurden, ebenfalls keine strikte Trennungen zwischen den ODHs und Alo/StrDHs der Art beobachtete. So setzten drei von Kreutzer (1987) durch DEAE-Chromatographie separierte ODHs aus *S. nudus* neben L-Arginin mit geringerer Effizienz jeweils auch L-Alanin und Glycin um (ODH : AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis im dominierenden ODH-Peak = 100 : 10 : 1), während zwei Alo/StrDHs des Sipunculiden auch geringe Octopinsyntheseaktivität zeigten (ODH : AloDH : StrDH-Aktivität der Haupt-Alo/StrDH = 1 : 4 : 4).

4.1.5 Amplifikation, Klonierung und heterologe Expression von Alo/StrDHs aus *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* und *S. nudus*

Wie unter 4.1.4 diskutiert erlauben es proteinbiochemische Isozymanalysen häufig nicht, zwischen natürlicher und artifizieller Proteinvariabilität zu unterscheiden. Sie lassen vielfach Raum für mehrere alternative Deutungen. OpDH-Aktivitäten, die weder elektrophoretisch noch durch Kombination verschiedener chromatographischer Techniken separiert werden können (3.4 bis 3.4.3), sind zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das gleiche Enzymprotein zurückzuführen, könnten jedoch auch durch mehrere, einander physikochemisch stark ähnelnde Enzymproteine differierender Substratspezifität verursacht werden. Zuverlässige Informationen zur OpDH-Ausstattung einer Art (zu genetisch differierenden und sekundär modifizierten OpDHs) lassen sich letztlich nur durch Kombination proteinbiochemischer und molekularbiologischer Daten gewinnen. Die Kenntnis vollständiger Nukleotid- und abgeleiteter Aminosäuresequenzen ist außerdem für ein molekulares Verständnis der OpDH-Funktion sowie für Analysen der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den OpDHs verschiedener Arten unverzichtbar. Daher wurden einige massenspektrometrisch sequenzierte OpDH-Peptide (Tab. 3, S. 71 und Tab. 4, S. 72) genutzt, um degenerierte Primer zur partiellen Amplifikation von OpDH-codierenden Genen speziell aus *A. marina* und *C. gigas*, aber auch aus *S. nudus* und *O. edulis* zu konstruieren. PCRs mit diesen Oligonukleotiden und anschließende RACE lieferten die vollständigen Sequenzen diverser OpDH-mRNAs, die durch 5'/3'-Amplifikationen verifiziert und deren offene Leseraster heterolog in *E. coli* exprimiert wurden (3.7 und 3.8).

4.1.5.1 Zuverlässigkeit der ermittelten Alo/StrDH-Sequenzen

Durch sequenzüberspannende 5'/3'-Amplifikationen, bei denen aus DNase I-behandelter mRNA gewonnene cDNA (2.6.4) als Template diente und darüber hinaus sogenannte Minus-RT-Kontrollen durchgeführt wurden (2.6.5.3), konnte sichergestellt werden, daß mit Ausnahme des partiellen StrDH-Gens aus *A. marina* (AM392361, Abb. 28, S. 285; siehe 4.1.5.2) alle unter 3.7 und 8.2 angegebenen Nukleotidsequenzen (AJ810167, AJ810713, AJ879665, AM392360, AJ810168 und AJ810166) zusammenhängende cDNAs (mRNAs) und nicht etwa Chimären aus Teilstücken mehrerer cDNA-Varianten oder genomische DNA repräsentieren (3.7). Die ermittelten OpDH-Sequenzen sind somit intronfrei und entsprechen Enzymen, die in vivo transkribiert werden.

Sie dürften sich zudem durch weitgehende, wenn nicht völlige Fehlerfreiheit auszeichnen. Schließlich kam bei allen 5'/3'- und ORF-Amplifikationen eine über Korrekturleseakti-

vität verfügende DNA-Polymerase niedriger Fehlerrate (unter optimalen Pufferbedingungen $4,3 \cdot 10^{-7}$ Mutationen je Basenpaar und Duplikation, vgl. Herstellerangaben und Cline et al., 1996) zum Einsatz (2.6.5.3). Außerdem wurden alle Gesamtsequenzen (5'/3'-Amplifikate) durch mindestens zwei, aus unabhängigen PCRs resultierende Klone verifiziert (Empfehlungen von Frohman et al., 1988 und Mülhardt, 2002). Abweichungen von den doppelt verifizierten OpDH-Sequenzen (3.7 und 8.2) wurden nur dann als mutmaßlich natürliche Sequenzvariabilität berücksichtigt, wenn sie in wenigstens zwei unabhängigen PCRs nachgewiesen wurden. Etwaige cDNA-Synthesefehler wurden zwar nur teilweise ausgeschlossen, indem bei wiederholten 5'/3'-Amplifikationen cDNA unterschiedlicher Chargen eingesetzt wurde, dürften aber trotz der vergleichsweise hohen Fehlerraten von Reversen Transkriptasen wie der in der vorliegenden Arbeit verwendeten SuperScript II RNase H⁻ RT (Invitrogen; vgl. Roberts et al., 1988 und 1989) auch in den übrigen Fällen vernachlässigbar sein, da einzelne mRNA-Moleküle bei cDNA-Synthesen nur einmal reproduziert werden. Es erscheint daher äußerst unwahrscheinlich, daß aus mehreren von der gleichen cDNA ausgehenden, ansonsten jedoch unabhängigen PCRs Klone resultierten, die den gleichen cDNA-Artefakt widerspiegeln.

Die Qualität der ermittelten mRNA-Sequenzen aus *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* und *S. nudus* kommt auch darin zum Ausdruck, daß mit Ausnahme der 5'-terminal unvollständigen *Crassostrea*-Alo/StrDH3 alle ein durch Start- und Stopcodon begrenztes offenes Leserahmen umfassen, das übereinstimmend mit der Größe der in öffentlichen Sequenzdatenbanken verfügbarer OpDHs anderer höherer Invertebraten (AB081841, AB218692, AB085184, AJ278691, AJ250884, AB085183, AJ237916, AB197036, AJ250885 sowie neuerdings AB278571 und AB278572) für jeweils rund 400 Aminosäuren codiert. Das ORF-begrenzende Startcodon entspricht dabei jeweils dem am weitesten 5'-terminal gelegenen ATG. Dieses bildet nach Kozak (1989), sofern es in eine geeignete Sequenzumgebung eingebettet ist, den regulären Translationsstartpunkt. Als optimaler Kontext für eine erfolgreiche Translationsinitiation gilt die Konsensussequenz (GCCA/GCCAUGG, Kozak, 1986 und 1991). Elemente davon finden sich in unmittelbarer Umgebung des mutmaßlichen Startcodons aller in dieser Arbeit sequenzierten mRNAs. Während die Wattwurm-AloDH sich nur in einer einzigen Position von der Kozak-Sequenz unterscheidet, weichen die übrigen OpDHs in bis zu fünf Nukleotiden (Spritzwurm-Alo/StrDH) davon ab. Die entscheidenden Basen (Adenin oder Guanin in Position -3 sowie Guanin in Position +4, Numerierung relativ zum Adenin des Startcodons, das als +1 gezählt wird, vgl. Kozak 1986 und 1991) sind außer bei der *Crassostrea*-Alo/StrDH1 in allen Sequenzen konserviert. Das deutet darauf hin, daß diese funktionelle Enzyme repräsentieren, die in vivo nicht nur transkribiert (siehe S. 137), sondern auch translatiert werden.

Trotz des nicht vorhandenen Guanosins im Anschluß an das vermutliche Startcodon der *Crassostrea-Alo/StrDH1* ist selbst deren erfolgreiche Translation nicht ausgeschlossen, da das Fehlen dieses Nukleotids zum Beispiel durch stromabwärts gelegene Sekundärstrukturelemente kompensiert werden könnte (Kozak, 1991). Die innerhalb der *Crassostrea-Alo/StrDH1* nächstfolgenden ATGs (Position 148 bis 150 und 213 bis 215) kommen dagegen nicht als alternatives Startcodon einer funktionellen OpDH in Frage, da ihre Nutzung mit einer Leserasterverschiebung und einem baldigen Kettenabbruch verbunden wäre bzw. dem resultierenden Protein der für die Cofaktorbindung erforderliche N-Terminus (vgl. 4.2.2) fehlen würde.

Im Vergleich zu den OpDH-codierenden mRNAs aus Sequenzdatenbanken (oben aufgeführte Sequenzen [ohne AB278571 und AB278572] plus TaDH aus *Halichondria japonica*, AB191687) zeichnen sich die in der vorliegenden Arbeit sequenzierten OpDHs durch überdurchschnittlich lange 5'- und 3'-untranslatierte Regionen aus (mittlere 5'-UTR-Länge 128 ± 67 bp [n = 5] versus bei Datenbank-OpDHs 77 ± 19 bp [n = 9]; mittlere 3'-UTR-Länge 654 ± 425 bp [n = 6] versus bei Datenbank-OpDHs 202 ± 152 bp [n = 9]; Unterschiede gemäß Zweistichproben-t-Test signifikant). Das ist um so bemerkenswerter, als die durch 5'- bzw. 3'-RLM-RACE ermittelten cDNA-Enden wegen der Einschränkungen, die sich aus den Anforderungen an einen guten PCR-Primer ergeben, bei den 5'/3'-Amplifikation nicht vollständig erfaßt wurden und die unter 3.7 und 8.2 angegebenen Sequenzen, auf die sich vorstehende Angaben beziehen, daher entsprechend verkürzt sind. Insbesondere im Fall der Wattwurmsequenz ergaben sich mit 238 dem Startcodon vorausgehenden sowie 1361 an das ORF anschließenden Nukleotiden extrem lange UTRs, was abgesehen von möglichen art- und genspezifischen Unterschieden die Qualität der zur cDNA-Synthese verwendeten RNA und den Erfolg der verwendeten RACE-Methode (RLM-RACE nach Maruyama und Sugano, 1994 sowie Volloch et al., 1994; 2.6.5.2) unterstreicht. Das Verfahren ist Standard-5'-RACE-PCRs (vgl. Frohman et al., 1988) wie sie beispielsweise von Janßen (2000) oder Kimura et al. (2005) zur Amplifikation von OpDH-Sequenzen genutzt wurden, offensichtlich überlegen. Indem die G-Kappe von mRNA-Molekülen durch ein RNA-Oligonukleotid substituiert und damit nur mRNAs mit intaktem 5'-Ende bereits vor der reversen Transkription um eine definierte Sequenz verlängert werden, entfallen bei dieser RLM-RACE-Variante Probleme, die ansonsten aus der 5'-terminalen Degradation von mRNAs oder dem vorzeitigen Abbruch der RT-Reaktion resultieren können. Erststrang-cDNAs mit Oligonukleotid-Kappe am einen und einem um ein spezielles Oligonukleotid verlängerten Oligo(dT)-Schwanz (vgl. GeneRacer Oligo(dT)-Primer, Überschrift zu Tab. 10, S. 278) am anderen Ende sind mit hoher Wahr-

scheinlichkeit vollständig, so daß die Amplifikation degradiertes cDNA-Enden weitgehend vermieden werden kann (Volloch et al., 1994; Maruyama und Sugano, 1994).

Daß keine der unter 3.7 und 8.2 angegebenen OpDH-Sequenzen aus Watt- und Spritzwurm sowie Pazifischer und Europäischer Auster einen Poly(A)-Schwanz aufweist, obwohl ein solcher bei tierischen mRNAs fast ubiquitär verbreitet ist und nicht nur deren Transport ins Cytoplasma, sondern auch deren Stabilität und Translatierbarkeit beeinflusst (Wahle und Keller, 1992; Edwalds-Gilbert et al., 1997), ist darauf zurückzuführen, daß diese Sequenzen 5'/3'-Amplifikaten mit verkürzten Termini entsprechen (siehe S. 139). Die ursprünglichen, aus den RACE-PCRs resultierenden 3'-Enden besaßen alle wenigstens einen kurzen Poly(A)-Schwanz sowie mit Ausnahme zweier 3'-RACE-Amplifikate aus *S. nudus* (3'-Sp39 und 3'-Sp53, vgl. Tab. 17, S. 284) stromaufwärts in einem Abstand von 16 bis 27 Nukleotiden ein Konsensus-Polyadenylierungssignal (AAUAAA oder AUUAAA; Wahle und Keller, 1992; Edwalds-Gilbert et al., 1997). Die Zahl der aufeinanderfolgenden Adenosinnukleotide überschritt allerdings zum Teil die der Thymidinmoleküle im GeneRacer-Oligo(dT)-Primer (18) nicht oder nur unwesentlich. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei der RACE bevorzugt cDNAs mit kürzerer Poly(dT)-Folge zwischen OpDH-spezifischer Sequenz und dem über den GeneRacer-Oligo(dT)-Primer eingeführten Ankeroligonukleotid amplifiziert wurden. Die Polyadenylierungssignale im erwarteten Abstand zur mutmaßlichen Polyadenylierungsstelle (Wahle und Keller, 1992; Edwalds-Gilbert et al., 1997) deuten jedenfalls darauf hin, daß die entsprechenden Oligo(A)-Abschnitte nicht aus einer Fehlhybridisierung des GeneRacer-Oligo(dT)-Primers in einem adenosinreichen, jedoch nicht zu einem längeren Poly(A)-Schwanz gehörenden Sequenzabschnitt resultierten.

Zusätzlich zu den weit terminal gelegenen Polyadenylierungssignalen, die bei den 5'/3'-Amplifikationen nicht erfaßt wurden, wiesen alle mRNAs ein oder mehrere zusätzliche Polyadenylierungssignale auf, von denen die im 3'-untranslatierten Bereich gelegenen in Abb. 16 (S. 77) und Abb. 29 bis Abb. 33 (S. 286 folgende) markiert sind. Alternative Polyadenylierungsstellen, deren intrinsische Stärke vermutlich durch Sequenzelemente unterhalb und oberhalb des Polyadenylierungssignals determiniert wird, treten nach Wahle und Keller (1992) sowie Edwalds-Gilbert et al. (1997) bei vielen eukaryotischen Transkriptionseinheiten auf. Welcher 3'-Terminus zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildet wird, hängt möglicherweise vom Entwicklungszustand der Zelle oder von Umwelteinflüssen ab (Edwalds-Gilbert et al., 1997). Sofern mRNAs mit differierenden 3'-Enden unterschiedlich stabil oder verschieden gut translatierbar sind, könnte sich der Gebrauch alternativer Polyadenylierungsstellen auf die Menge des pro Primärtranskript gebildeten Proteins auswirken (Edwalds-Gilbert et al., 1997).

Die besondere Zuverlässigkeit der OpDH-Sequenz aus *A. marina* (AJ810167) wird abgesehen davon, daß die Nukleotidsequenz durch zwei 100%ig übereinstimmende 5'/3'-Klone (5'/3'-Am78 und 5'/3'-Am100, Tab. 14, S. 281) abgedeckt wurde, auch durch Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den durch Edman-Degradation bzw. Tandem-Massenspektrometrie gewonnenen Sequenzinformationen belegt (Abb. 16, S. 77). Die mutmaßlich identischen N-Termini der chromatographisch separierten ALoDHs I und II (Abb. 4, S. 54) stimmten, wenn man das unsichere Glutamat an siebter Position der ALoDH II vernachlässigt, offenbar vollständig mit dem um zwei Aminosäuren verkürzten N-Terminus des abgeleiteten Proteins überein. Das Fehlen eines N-terminalen Methionins bei den proteinbiochemisch analysierten ALoDH-Varianten scheint angesichts des Glycins an zweiter Position der abgeleiteten ALoDH durchaus plausibel. Schließlich bildet die enzymatische Abspaltung dieses Restes nach Polevoda und Sherman (2000) eine der häufigsten Modifikationen eukaryotischer Proteine, die vermutlich speziell dann auftritt, wenn die nächstfolgende Aminosäure einen Rotationsradius von weniger als 1,29 Å besitzt (Sherman et al., 1985; Moerschell et al., 1990). Da das endständige Methionin bereits vor der Fertigstellung der wachsenden Polypeptidkette und damit auch vor einer möglichen posttranslationalen Prozessierung wie der Acetylierung des N-Terminus abgespalten zu werden pflegt (Polevoda und Sherman, 2000), steht dies nicht im Widerspruch zu der unter 4.1.4.1 diskutierten Hypothese, daß ein Teil der zur Edman-Sequenzierung verwendeten ALoDH I bzw. II-Moleküle N-terminal blockiert war. Wieso das in der abgeleiteten ALoDH auf das terminale Methionin folgende Glycin in den Edman-Sequenzen ebenfalls fehlt, kann allerdings nur spekuliert werden. Möglicherweise wurde der Rest bei den Edman-Sequenzierungen nur deshalb nicht erfaßt, weil das zugehörige Signal im Sequenzierlabor (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Münster) fälschlich (obwohl ein Glycin-freier Blotpuffer verwendet wurde, 2.5.7.4) auf eine Probenkontamination mit Glycin aus dem Blotpuffer zurückgeführt wurde (vgl. Lottspeich, 1998).

Mit Ausnahme des unvollständig sequenzierten und daher möglicherweise fehlerbehafteten Peptids 874,0_2+ (vgl. Steen und Mann, 2004) konnten auch alle massenspektrometrisch sequenzierten ALoDH-Peptide (Tab. 3, S. 71) eindeutig äquivalenten Sequenzabschnitten der abgeleiteten Wattwurm-ALoDH zugeordnet werden und stimmten bis auf wenige Abweichungen, die sich fast alle durch Desamidierungsreaktionen (Spaltpeptide 639,85_3+ und 706,96_2+) bzw. einen mutmaßlichen Peptidsequenzierungsfehler (Asparagin am N-Terminus des Peptids 639,85_3+) erklären lassen (4.1.4.1), vollständig mit dieser überein (Abb. 16, S. 77). Nur der Argininrest, der sich am C-Terminus der tryptischen Peptide 817,78_2+ und

818,66_2+ (Tab. 3, S. 71, 9) fand, während das abgeleitete Enzym an äquivalenter Position (Aminosäure 353) ein Cystein aufweist, steht in tatsächlichem Widerspruch zu der molekularbiologisch erhaltenen Sequenz. Da letztere durch Klone aus vier unabhängigen PCRs verifiziert wurde, bei denen dreierlei cDNA-Chargen aus zwei RNA-Präparationen und damit zwei verschiedenen Einzeltieren zum Einsatz kamen (3'-Am60, 3'-Am68, 5'/3'-Am78, ORF-Am91 und 5'/3'-Am100, Tab. 14, S. 281), zugleich aber auch die beiden Peptidsequenzen doppelt verifiziert wurden (ausgehend von der gleichen Enzympräparation, ansonsten jedoch unabhängig in zwei verschiedenen Sequenzierlabors, siehe 2.5.8.2) ist davon auszugehen, daß beide Varianten (Arginin versus Cystein) korrekt sind. Sie spiegeln offenbar eine natürliche, auf einer Punktmutation beruhende Variabilität der Wattwurm-AloDH(s) wieder (Substitution von Thymidin-295 der abgeleiteten AloDH gegen Cytidin bewirkt einen Austausch von Cystein-353 gegen Arginin).

4.1.5.2 Multiple Transkripte und Enzym polymorphismen

Besonders in den untranslatierten Regionen OpDH-codierender mRNAs wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine recht große Variabilität festgestellt, die sich nicht nur in einzelnen Nukleotidaustauschen, sondern zum Teil auch darin manifestierte, daß bei den RACE-PCRs mehrere spezifische Produkte differierender Länge erhalten wurden (3.7). Einige von ihnen (zum Beispiel die durch Deletion verkürzten 3'-RACE-Produkte 3'-Am61 und 3'-Am69 aus *A. marina*; Tab. 14, S. 281) bildeten wahrscheinlich Artefakte. Andere entsprachen möglicherweise multiplen Transkripten, die durch Verwendung alternativer Transkriptionsstartpunkte (verschieden lange 5'-RACE-Produkte aus *O. edulis* und *A. marina*, Tab. 14, S. 281 und Tab. 16, S. 283; Volloch et al., 1994; Smale, 1997) bzw. alternativer Polyadenylierungsstellen (1,3 bzw. 1,4 kb lange 3'-Enden aus der RACE mit einem gegen das interne *Crassostrea*-OpDH-Fragment Int-Cg23 gerichteten Primer; Abb. 15, S. 74; Tab. 15, S. 282; 4.1.5.1) oder durch Transkription verschiedener Allele eines oder mehrerer Genloci (2,7 bzw. 1,8 kb umfassende 3'-Termini aus den RACE-PCRs mit Spritzwurm-cDNA; Tab. 17, S. 284) entstanden. Darauf, daß verschiedene OpDH-Allele erfaßt wurden, ist offenbar auch die natürliche Variabilität (4.1.5.1) zurückzuführen, die innerhalb des offenen Leserasters etwa der OpDH aus *O. edulis* (AJ810168, Abb. 32, S. 291) nachgewiesen wurde (3.7). Interessant erscheint dabei besonders das Verhältnis aus synonymen und nicht-synonymen Nukleotidsubstitutionen. Es betrug im Fall der *Ostrea*-OpDH ähnlich wie bei der aus *S. nudus* (AJ810166, Abb. 33, S. 293) 8 : 2 (bei letzterer 9 : 2). Eine solche Dominanz synonymen und damit in der Regel selektiv neutraler Nukleotidaustausche gilt als typisches Merkmal funktioneller Gene

(Kimura, 1977; Jukes, 1978; Li et al., 1981; Balakirev und Ayala, 2003) und bedeutet insofern einen weiteren Hinweis auf die mutmaßliche Funktionalität der entsprechenden OpDHs (siehe 4.1.5.1).

Im Fall des Wattwurms wurde zusätzlich zu der scheinbar wenig variablen AloDH aus Abb. 16 (S. 77; AJ810167), von der sich möglicherweise die beiden chromatographisch definierten AloDH-Varianten I und II ableiteten (siehe 4.1.5.1 und 4.1.5.3), das partielle Gen einer zweiten Wattwurm-OpDH nachgewiesen (Ergebnisse unter 3.7 nicht dargestellt). So lieferte eine PCR mit Universalprimern zur partiellen Amplifikation von Invertebraten-OpDHs (ODH-9F und ODH-11R; Kimura et al., 2005; vgl. Überschrift zu Tab. 14, S. 281) ein etwa 300 bp umfassendes OpDH-Fragment (Int-Am13 = AM392361, Tab. 14, S. 281 und Abb. 28, S. 285), das mit der Wattwurm-AloDH, obwohl es ausgehend von der gleichen Einzeltier-DNA wie deren internes Teilstück Int-Am16 (Tab. 14, S. 281) amplifiziert wurde, in lediglich 58 % der Nukleotide und 47 % der Aminosäuren übereinstimmte (Angaben bezogen auf den Überlappungsbereich der Sequenzen). Die naheliegende Vermutung, das zugehörige Gesamtgen könnte für eine der Wattwurm-StrDHs codieren, deren Existenz aufgrund der proteinbiochemischen Befunde der vorliegenden Arbeit postuliert wurde (3.4.2, 4.1.3, 4.1.4.1), konnte inzwischen von Schäfer (2007) bestätigt werden. Er ermittelte ausgehend vom OpDH-Fragment Int-Am13 (AM392361) die vollständige mRNA-Sequenz einer Str/AloDH (AM418448, Datenbankeintrag noch vertraulich) mit 53 % Aminosäuresequenzübereinstimmung zur im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Wattwurm-AloDH (siehe auch S. 127). Die AloDH- und StrDH-Aktivität aus dem Hautmuskelschlauch des Anneliden ist somit auf mindestens zwei genetisch unterscheidbare OpDHs differierender Aminosäurepräferenz zurückzuführen, die möglicherweise durch unterschiedliche Genloci (einen Alo/StrDH- und einen Str/AloDH-Locus) codiert werden.

Die Amplifikation von OpDHs aus *C. gigas* erwies sich wegen des parallelen Auftretens mehrerer deutlich differierender Enzymformen als besonders schwierig. Wie in Abb. 15 (S. 74) veranschaulicht, lieferte die RACE-PCR mit genspezifischen Primern, die gegen ein spezielles Sequenzfragment gerichtet waren, in manchen Fällen kein passendes cDNA-Ende, sondern den Terminus eines anderen, im cDNA-Pool möglicherweise höher konzentrierten Isozyms mit ähnlicher Primerbindungsstelle (3.7). Auch die Konsensussequenzen der 5'- oder 3'-Enden, die einer „Isoform“ zugeordnet wurden, umfassen noch eine ganze Reihe uneindeutiger Positionen (vgl. Bildunterschrift zu Abb. 15, S. 74; Varianten hier in der Regel nicht doppelt verifiziert) und stimmen mit dem mutmaßlich zugehörigen entgegengesetzten cDNA-

Ende im Überlappungsbereich zum Teil nur zu 95 % bzw. 97 % überein (5'-Contig_Cg62+70 und 3'-Contig_Cg84+85 bzw. 5'-Cg71 und 3'-Contig_Cg89+90; Abb. 15, S. 74). Offenbar wurden in den einzelnen Contigs jeweils mehrere Allele assembliert, deren Zusammengehörigkeit sich allein aus ihrer im Vergleich zu den übrigen Enzymvarianten größeren Ähnlichkeit ergab. Bezeichnenderweise resultierten gerade die weniger gut überlappenden 5'- und 3'-Termini aus RACE-PCRs mit cDNA aus Austern unterschiedlicher Herkunft, während die in ihrem Überlappungsbereich vollständig übereinstimmenden Teilsequenzen Int-Cg23 und 3'-Contig_Cg29+30+31+42+43 (Abb. 15, S. 74) aus Einzeltieren gleicher Bezugsquelle (Kopek B. V., Yerseke, Niederlande) und daher vermutlich ähnlicherer Allelausstattung hervorgingen. Entsprechend wichtig erschien gerade im Fall von *C. gigas* das Überprüfen der postulierten Sequenzzusammengehörigkeiten durch 5'/3'-Amplifikationen (4.1.5.1).

Ein passendes 5'-Ende zur partiellen *Crassostrea*-Alo/StrDH3 (AM392360, Abb. 31, S. 290) wurde trotz zahlreicher 5'-RACE- und 5'-nested-RACE-Versuche mit cDNA unterschiedlicher Herkunft, diversen Primern und variablen PCR-Bedingungen nicht erzielt (3.7). Fehler bei der Herstellung RLM-RACE-fähiger cDNA (2.6.4) oder ein zu geringer Transkriptionslevel des gesuchten Isozyms lassen sich aufgrund der erfolgreichen RACE-PCRs, aus denen die 5'- und 3'-Termini der beiden anderen *Crassostrea*-Alo/StrDHs (Alo/StrDH1 und AloDH2, AJ810713 und AJ879695, Abb. 29 und Abb. 30, S. 286 folgende) und die Amplifikate des 3'-Contigs_Cg29+30+31+42+43 (Abb. 15, S. 74 und Tab. 15, S. 282) hervorgingen, aber auch angesichts ribosomaler Fehlamplifikate mit dem erwarteten GeneRacer-Oligonukleotid-Abschnitt am 5'-Terminus (2.6.5.2 und Tab. 9, S. 278) als Ursache ausschließen. Möglicherweise erschwerten ein hoher GC-Gehalt oder andere Merkmale des gesuchten 5'-Terminus seine Amplifikation. Eine andere Erklärung für das Scheitern der entsprechenden 5'-RACEs könnte darin bestehen, daß zunächst ungeeignete Primer eingesetzt wurden und später die RACE-cDNA, die das 3'-Ende der Alo/StrDH3 (3'-Contig_Cg29+30+ 31+42+43, Abb. 15, S. 74) lieferte, verbraucht war, so daß auf cDNA aus Austern einer anderen Charge zurückgegriffen werden mußte. Vielleicht verfügten diese Tiere nicht über die entsprechende Enzymvariante.

Alternativ könnte es sich bei der Alo/StrDH3 aus *C. gigas* um ein durch Genduplikation und nachfolgende Degeneration entstandenes Pseudogen handeln, dem der für einen funktionellen OpDH-N-Terminus codierende 5'-Bereich fehlt. Da viele mutmaßliche Pseudogene sich trotz ihrer Definition als funktionslos gewordene Genkopien bei entsprechenden Untersuchungen als transkriptions- und teilweise sogar translationsaktiv erwiesen (Balakirev und Ayala, 2003), schließt die Tatsache, daß die partielle *Crassostrea*-Alo/StrDH3 ausgehend von

cDNA amplifiziert wurde (2.6.5.3), sie sich also offenbar von einem Gen mit intakter Promotorregion ableitet, das im Adduktor der Herkunfts-auster exprimiert wurde, die Pseudogen-Hyothese nicht aus. Gleiches gilt für den Poly(A)-Schwanz und das etwa 20 Nukleotide vor der Polyadenylierungsstelle gelegene Konsensus-Polyadenylierungssignal der zugehörigen 3'-RACE-Amplifikate (3'-Cg29, 3'-Cg30, 3'-Cg31, 3'-Cg42 und 3'-Cg43, Tab. 15, S. 282), die als typische Attribute aktiver Transkripte gelten (vgl. 4.1.5.1 und Edwalds-Gilbert et al., 1997). Gerade eukaryotische Pseudogene zeichnen sich häufig durch einen erstaunlichen Konservierungsgrad aus und erwerben im Laufe der Zeit vielfach neue, von ihrer ursprünglichen Aufgabe abweichende Funktionen (Harrison und Gerstein, 2002; Balakirev und Ayala, 2003), weshalb sie auch als „Potogene“ (potentielle Gene) bezeichnet wurden (Brosius und Gould, 1992; Balakirev und Ayala, 2003). Das Auftreten eines OpDH-Pseudogens bei *C. gigas*, das noch viele Merkmale des ursprünglichen, aktiven Gens erkennen läßt, erscheint insofern nicht unwahrscheinlich.

Das Verhältnis zwischen synonymen und nicht-synonymen Polymorphismen wich nicht nur im Fall der partiellen Alo/StrDH3 (4 : 5), sondern auch bei den beiden gemäß Expressionsanalyse (3.8) katalytisch aktiven *Crassostrea*-Alo/StrDHs (Alo/StrDH1 und AloDH2, 2 : 2 bzw. 4 : 4) deutlich von dem Verhältnis ab, das Balakirev und Ayala (2003) als typisch für funktionelle Gene angaben (27 : 4). Es scheint somit ebenfalls nur bedingt zur Unterscheidung zwischen aktiven und funktionslosen OpDH-Transkripten geeignet. Abgesehen davon, daß die Relation im Fall der *Crassostrea*-Alo/StrDH3_{part} dadurch verzerrt worden sein könnte, daß die Sequenz im Unterschied zu den übrigen OpDHs nicht vollständig doppelt verifiziert wurde (3.7), ist bei der Interpretation eines solchen Verhältnisses generell Vorsicht geboten, weil eine hohe Zahl von Austauschpolymorphismen auch auf große Freiheitsgrade innerhalb eines Enzymproteins hindeuten kann. Im Fall der *Crassostrea*-Alo/StrDH3_{part} kommt allerdings hinzu, daß in Klonen aus zwei PCRs an Position 666 der partiellen Nukleotidsequenz anstelle eines Guanosins ein Thymin nachgewiesen wurde, das zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führt (Abb. 31, S. 290). Das stützt, sofern man von einem möglichen Artefakt der reversen Transkription absieht (S. 138), die These, daß die Alo/StrDH3_{part} der Pazifischen Auster ein echtes Pseudogen repräsentiert.

Außerdem treten nach Gaffney (1994) gerade bei marinen Muscheln häufig Nullallele auf. Hoare und Beaumont (1995) spekulierten, daß insbesondere der ODH-Locus von Bivalviern durch eine hohe Frequenz solcher, nicht für aktive Enzymproteine codierenden Allele charakterisiert sein könnte. Sie beobachteten ein gegenüber Kontrolltieren erhöhtes Wachstum ODH-nullheterozygoter Miesmuscheln und führten dies unter Annahme einer regulären

ODH-Überproduktion auf die energetischen Vorteile einer reduzierten Proteinbiosynthese zurück. Sofern auch Pazifische Austern im Normalfall mehr Alo/StrDHs exprimieren als speziell unter kontrollierten Zuchtbedingungen erforderlich, könnte die *Crassostrea*-Alo/StrDH3 sowohl als funktionelle Variante wie auch als Nullallel mit degeneriertem ORF vorkommen.

Unabhängig davon, ob sie funktionellen OpDHs, Nullallelen, Pseudogenen, oder OpDH-Homologen neuer Funktion entsprechen, wurden die partielle Alo/StrDH3 (5'/3'-Cg109) und die offenen Leseraster (ORF-Cg105 und ORF-Cg106) sowie 3'-Termini (3'-Cg84 und 3'-Cg85 sowie 3'-Cg89 und 3'-Cg90) der beiden anderen *Crassostrea*-mRNAs (Alo/StrDH1 und AloDH2) ausgehend von der gleichen, aus einem Einzeladduktor gewonnenen cDNA amplifiziert (Tab. 15, S. 282). Da es sich bei den verwendeten Austern um diploide Tiere handelte (S. 129), folgt daraus übereinstimmend mit den zymogrammbasierten Hypothesen von Manchenko et al. (1998), daß *C. gigas* über mindestens zwei, möglicherweise durch Genduplikation auseinander hervorgegangene OpDH-Loci verfügt (vgl. auch 4.1.4.2). Angesichts der recht starken Abweichungen zwischen den verschiedenen, auf Nukleotidebene nur zu 50 bis 67 % und auf Aminosäureebene zu 80 % übereinstimmenden *Crassostrea*-OpDHs (3.7), drängt sich sogar die Vermutung auf, die Austern-Alo/StrDHs 1 bis 3 (AJ810713, AJ879665 und AM392360) könnten alle drei unterschiedlichen Genorten zuzuordnen sein. Die vergleichsweise geringe, punktuelle Variabilität innerhalb der jeweiligen Sequenzassemblierungen (vgl. Tab. 15, S. 282 und Abb. 29 bis Abb. 31, S. 286 folgende) entspräche in diesem Fall der zwischen verschiedenen Allelen eines Locus. Daß solche Orthologe einander häufig stärker ähneln als die paralogen Allele verschiedener, durch Duplikation auseinander hervorgegangener Genorte (Orengo und Thornton, 2005), scheint insofern plausibel, als duplizierte Gene aufgrund der aus dem Duplikationsereignis resultierenden Redundanz zumindest in der frühen Phase ihrer Geschichte eine Phase verminderten Selektionsdrucks und damit beschleunigter Evolution zu durchlaufen pflegen (Lynch und Conery, 2000). Längerfristig wird in der Regel eine Kopie durch sukzessive Akkumulation degenerierender Mutationen defunktionalisiert. Seltener erwirbt eines der Duplikate eine neue Funktion oder es kommt zu einer Subfunktionalisierung, das heißt die beiden Genkopien übernehmen nach komplementärem Funktionsverlust unabhängige Teilfunktionen des ursprünglichen Gens (Lynch und Conery, 2000; Prince und Picket, 2002; Force et al., 1999). Aus allen drei Prozessen resultieren Genkopien, die unterschiedlichen Selektionsdrücken unterliegen, was ihre Divergenz weiter fördert (Prince und Picket, 2002).

Während sich die *Crassostrea*-Alo/StrDHs 1 und 2 (AJ810713 und AJ879695) gemäß Expressionsanalyse (3.8 und 4.1.5.3) in ihren katalytischen Eigenschaften unterscheiden, ist offen, inwieweit die nur punktuell voneinander abweichenden, vielleicht Allozymen eines einzelnen Genortes entsprechenden Enzymvarianten (vgl. Abb. 29 und Abb. 30, S. 286 folgende) ebenfalls funktionell differieren. Insbesondere ist unklar, ob die beobachteten OpDH-Polymorphismen überwiegend auf das Zusammenspiel zwischen Mutationsrate und zufälliger Fixierung selektiv äquivalenter Enzymvarianten zurückzuführen sind oder durch positive Selektion aufrechterhalten werden. Das entspricht letztlich der Kernfrage der klassischen Neutralismus-Selektionismus-Kontroverse (Kimura, 1968; King und Jukes, 1969, Kimura, 1991 versus Darwin, 1859; Mayr, 1963 und 1977). Aus heutiger Sicht unstrittig scheint, daß Arten ihr Adaptationspotential in der Regel bilden, bevor sie es brauchen. Während nur selten Mutationen auftreten, die mit einem unmittelbaren Selektionsvorteil verbunden sind, verhält sich die Mehrzahl der Mutationen entweder selektiv neutral in dem Sinne, daß sie die Proteinfunktion nicht entscheidend verändern (bzw. ein Protein tangieren, das die Fitneß der Art nicht beeinflußt), oder unterliegt negativer Selektion (Nei, 2005; Graur und Li, 2000). Neutrale Mutationen, die zufällig in einer Population fixiert werden, können sich allerdings unter Umständen zu einem späteren Zeitpunkt angesichts veränderter Umweltbedingungen als vorteilhaft erweisen und dann selektiert werden. Damit lassen sich auch die Annahmen von Johnson (1974) vereinbaren, der postulierte, Enzym polymorphismen könnten der metabolischen Kompensation wechselnder Umweltbedingungen dienen, indem sie einer Population bzw. einzelnen heterozygoten Individuen mehr Möglichkeiten geben, auf Temperaturschwankungen, Veränderungen des Nahrungsangebotes oder andere Umwelteinflüsse zu reagieren. Seine Thesen wurden exemplarisch durch Nevo und Mitarbeiter (1983) bestätigt, denen es am Beispiel mehrerer Genorte mariner Invertebraten gelang, eine positive Korrelation zwischen der Zahl der Allozyme in einer Population und der Umweltvariabilität in deren Habitat nachzuweisen (vgl. Nischen-Variations-Hypothese nach Powell, 1971 sowie McDonald und Ayala, 1974).

Die große Mannigfaltigkeit OpDH-codierender Nukleotidsequenzen aus *C. gigas* steht in Einklang zu der Enzymvariabilität, die sich bei den Isozymelektrophoresen, isoelektrischen Fokussierungen und massenspektrometrischen Peptidsequenzierungen manifestierte (4.1.4.2). Sie erschwerte die eindeutige Zuordnung der tryptischen Spaltpeptide chromatographisch separierter *Crassostrea*-Alo/StrDHs aus Tab. 4 (S. 72) zu speziellen Sequenzabschnitten der abgeleiteten Austernenzyme (3.7). Dennoch scheint von wenigen Ausnahmen abgesehen sicher, daß die Peptidsequenzen in Abb. 17 (S. 81) korrekt positioniert wurden. Schließlich entspre-

chen die mit Hilfe des Programms Lalign (2.7.2) erzielten Alinierungen trotz zum Teil geringer Signifikanz (E-Werte > 0,5), die sich schon aus der Kürze der Peptidsequenzen erklärt, der jeweils besten Alinierungsvariante, während zugleich bekannt ist, daß es sich bei den Peptiden um tryptische Spaltprodukte verschiedener *Crassostrea*-Alo/StrDHs handelte, eine Zuordnung (sofern alle OpDHs der Art homolog sind) also grundsätzlich möglich sein sollte. Nur in den als unsicher markierten Fällen differierte die Peptidsequenz so stark von allen abgeleiteten OpDH-Sequenzen (Abb. 17, S. 81), daß alternative Alignments nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnten. Die korrekte Ausrichtung mancher Spaltpeptide wird auch dadurch bestätigt, daß einzelne, von der äquivalenten Aminosäure einer abgeleiteten OpDHs abweichende Peptidaminosäuren sich an entsprechender Position einer anderen abgeleiteten *Crassostrea*-OpDH wiederfinden (vgl. zum Beispiel das N-terminale Glutamat des Peptids 846,36_3+ [EAASGADVIFIVVP], das in den Alo/StrDHs 1 und 2 durch einen Lysinrest ersetzt ist, jedoch dem Glutamat-61 der Alo/StrDH_{3part} entspricht). Eventuellen Zweifeln an der richtigen Positionierung des Peptids 784,90_2+ (YTAEDVPFGIVVMK) und damit auch der äquivalenten Spaltprodukte 784,87_2+, 792,86_2+ und 792,94_2+ (Tab. 4, S. 72, 15) steht entgegen, daß sich an der zum zugeordneten *Crassostrea*-Alo/StrDH-Abschnitt homologen Position der *Ostrea*-StrDH ebenfalls das Sequenzmotiv YTAECVPF und damit ein Beleg für die bei den abgeleiteten *Crassostrea*-Alo/StrDHs durch andere Reste ersetzten Aminosäuren Threonin (T) und Phenylalanin (F) an zweiter bzw. achter Position der Peptidsequenz findet.

Obwohl sie richtig zugeordnet wurden und sekundäre Peptidmodifikationen (vgl. 4.1.4.2) bei den Vergleichsanalysen ignoriert wurden, differierten fast alle Peptidsequenzen in mindestens einer Position von allen drei abgeleiteten *Crassostrea*-Alo/StrDHs (Abb. 17, S. 81). Angesichts der bereits diskutierten Zuverlässigkeit sowohl der Peptidsequenzen als auch der abgeleiteten Sequenzen (4.1.4.2 und 4.1.5.1) läßt sich ausschließen, daß diese Abweichungen aus Sequenzierfehlern resultierten. Selbst die *Crassostrea*-Alo/StrDH₃, deren einzelne Nukleotide nicht alle doppelt verifiziert wurden, umfaßt deutlich weniger unsichere Aminosäurereste (Isoleucin-211, Aspartat-269, Alanin-281 und Lysin-283; Abb. 31, S. 290) als Austauschpositionen gegenüber den verschiedenen Spaltpeptiden (Abb. 17, S. 81). Die massenspektrometrisch sequenzierten Peptide leiteten sich somit offensichtlich von anderen als den molekularbiologisch erfaßten Austern-Alo/StrDHs ab. Das wird zusätzlich dadurch unterstrichen, daß den Peptiden in der Alinierung aus Abb. 17, anders als für tryptische Spaltprodukte zu erwarten, häufig weder ein Arginin- noch ein Lysinrest vorausgeht, die chromatographisch separierten *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III sich also auch in ihren tryptischen Schnittstellen von den abgeleiteten Isozymen unterschieden. Da die jeweiligen Peptidsequenzen keiner der

abgeleiteten OpDHs mehr als den übrigen ähnelten, konnten die chromatographisch getrennten Alo/StrDHs I bis III nicht als mutmaßliche Allozyme eines durch die Alo/StrDH1, AloDH2 bzw. Alo/StrDH3_{part} (AJ810713, AJ879695 und AM392360) repräsentierten Genlocus identifiziert werden (vgl. S. 146). Es blieb offen, ob sie von einem anderen Genort abstammten oder die beträchtlichen Sequenzunterschiede zwischen den proteinbiochemisch und molekularbiologisch analysierten *Crassostrea*-OpDHs allein aus der Allozymvariabilität zwischen Austern unterschiedlicher Herkunft resultierten (vgl. auch 4.1.4.2 und 4.1.5.3).

4.1.5.3 Heterologe Expression und Reinigung rekombinanter OpDHs

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit vollständig sequenzierten mRNAs wurden mit natürlichem N-Terminus und einem zu ihrer leichteren chromatographischen Reinigung dienenden C-terminalen Fusionstag (LE6xH) in *E. coli* exprimiert (2.6.11 und 3.8.). Daß dabei stets ein ähnliches Bakterienfrischgewicht ($6,0 \pm 1,2$ g) erhalten und je Gramm Bakterien ähnlich viel lösliches Gesamtprotein ($31,5 \pm 3,6$ mg·g⁻¹ Bakterien) isoliert wurde (Abb. 18, S. 84), belegt die Vergleichbarkeit der einzelnen Expressionskulturen und deutet zugleich darauf hin, daß in allen Fällen ein ähnlich guter Zellaufschluß erzielt wurde. Nur die Masse des unter nativen Bedingungen unlöslichen Gesamtproteins schwankte deutlich (Abb. 18, S. 84). Bei den (scheinbar) unlöslichen Proteinen (5 mg·g⁻¹ Bakterien) aus der Kontrollkultur (Bakterienstamm mit OpDH-freiem pET-Vektor) handelte es sich vermutlich primär um Material aus zunächst nicht oder nur unvollständig aufgeschlossenen Zellen, das erst bei der zweiten Homogenisation in Gegenwart von Harnstoff freigesetzt wurde, ohne daß es dazu des denaturierenden Agens wirklich bedurft hätte. Die zum Teil weit größeren unlöslichen Proteinfractionen der übrigen Kulturen (bis zu 20 mg·g⁻¹ Bakterien, vgl. *Ostrea*-OpDH-LE6xH-Kultur) umfaßten dagegen gemäß SDS-PAGE und Blotting (Abb. 20, S. 87) fast ausschließlich Histidin-markierte Proteine. Das läßt sich gut damit vereinbaren, daß bei der heterologen Expression von Proteinen häufig unlösliche Aggregationsprodukte (Inclusion Bodies) gebildet werden, die typischerweise zu 80 bis 95 % aus dem jeweiligen Zielprotein bestehen (Baneyx und Mujacic, 2004). Bei den Banden höheren und niedrigeren Molekulargewichts, die neben den rekombinanten Proteinen der erwarteten Größe (etwa 45 kd) durch Penta-Histidin-spezifische Immunfärbung detektiert wurden (Abb. 20, S. 87), handelte es sich offenbar um Aggregations- bzw. C-terminale Abbauprodukte der OpDH-LE6xHs. Viele von ihnen wurden wegen der geringeren Sensitivität der Coomassiefärbung ausschließlich immunologisch nachgewiesen. Die wenigen unlöslichen Proteine meist geringer Größe, die umgekehrt mangels eines Histidin-Tags bloß durch Coomassiefärbung detektiert werden konnten (vgl. zum Beispiel die

Banden zwischen 14 und 18 kd in den Gelspuren Am-C oder Cg1-C aus Abb. 20, S. 87), entsprachen vermutlich überwiegend N-terminalen Degradationsprodukten der heterolog exprimierten OpDHs.

Die Bildung von Inclusion Bodies, in denen sich das Zielprotein zwar in relativ großer Reinheit, jedoch nicht-nativer Form ansammelt, stellt ein großes Problem der heterologen Proteinexpression in *E. coli* dar. Es resultiert vor allem aus der hohen Makromolekülkonzentration im Inneren von Zellen (bis zu 400 g/l nach Ellis und Minton, 2003) und deren dadurch bedingter Überfüllung („Macromolecular crowding“, Ellis, 2001). Infolgedessen bedeutet jede Proteinfaltung eine Herausforderung, die bei Polypeptiden mit mehr als 100 Aminosäuren nicht ohne Hilfe molekularer Chaperone und spezieller Faltungskatalysatoren bewältigt werden kann (Baneyx und Mujacic, 2004). Die zelluläre Umgebung, die Faltungsmaschinerie und die Kontrollpunkte für eine konformationsbezogene Qualitätsüberprüfung differieren jedoch bei Pro- und Eukaryoten beträchtlich, weshalb speziell eukaryotische Proteine bei ihrer Expression in *E. coli* häufig keine native Konformation erreichen, sondern einer proteolytischen Degradation zugeführt werden oder zu unlöslichen Aggregaten assoziieren (Baneyx, 1999; Baneyx und Mujacic, 2004). Sofern bei der heterologen Proteinexpression etwa durch den Einsatz starker Promotoren (in der vorliegenden Arbeit T7lac, 2.6.11) hohe Produkterträge erzielt werden, erhöht sich die Fehlfaltungswahrscheinlichkeit (unter anderem aufgrund einer Übersättigung der an der Proteinfaltung beteiligten Hilfsproteine) zusätzlich (Baneyx, 1999; Baneyx und Mujacic, 2004; man beachte, daß in der Spritzwurm-Kultur zwar vergleichsweise wenig rekombinantes Protein exprimiert, jedoch der größte relative Anteil löslichen Zielproteins erhalten wurde; Abb. 20, S. 87).

Um dem entgegenzuwirken, wurde die Inkubationstemperatur der Expressionskulturen in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an Janßen (2000) nach der Induktion auf 18°C erniedrigt (2.6.11). Auf diese Weise sollte nicht nur die Transkriptions- und Translationsrate der OpDH-LE6xHs begrenzt, sondern auch die Stärke hydrophober Wechselwirkungen reduziert werden, die wesentlich zu fehlerhaften Proteininteraktionen beitragen können (Baneyx, 1999; Baneyx und Mujacic, 2004). Trotzdem entsprach die (außer im Fall der Kontrolle) von rekombinanten OpDHs dominierte unlösliche Proteinfraktion bis zu 38 % des zellulären Gesamtproteins aus den einzelnen Expressionskulturen (vgl. *Ostrea*-Kultur, Abb. 18, S. 84), während nur mäßige Konzentrationen löslicher OpDHs erzielt wurden (Abb. 20, S. 87). Die Aggregationstendenz der verschiedenen OpDHs dürfte außer durch das jeweilige Expressionsniveau (Summe rekombinanten Enzyms aus der löslichen und unlöslichen Proteinfraktion) auch durch spezielle Eigenschaften der einzelnen Pyruvatoxidoreduktasen (zum

Beispiel ihre individuellen Faltungswege und dabei auftretenden Faltungsintermediate mit exponierten hydrophoben Molekülbereichen) determiniert worden sein (vgl. Müller, 2007).

Das unterschiedliche Expressionsniveau rekombinanter OpDHs (vgl. Signalstärken auf den immungefärbten Blots aus Abb. 20, S. 87) resultierte offenbar nicht aus einer differierenden Toxizität der akkumulierenden Enzyme oder ihrer Reaktionsprodukte für *E. coli*. Die OpDHs schränkten das Wachstum von BL21(DE3) nicht stärker ein als der insertfreie pET-24d(+)-Vektor (Abb. 18, S. 84; geringe Basalexpression des verwendeten Expressionssystems und toxische Wirkung selbst „leerer“ pET-Vektoren auf IPTG-induzierte BL21(DE3)-Zellen beachten; Studier et al., 1990; Dubendorff und Studier, 1991; Miroux und Walker, 1996). Die Effizienz, mit der die verschiedenen OpDHs in *E. coli* translatiert wurden, könnte aber durch die Zahl und Position der in den codierenden Sequenzen vorkommenden Arginincodons AGA und AGG beeinflusst worden sein, die wie die zugehörigen tRNAs bei *E. coli* äußerst selten auftreten und daher die bakterielle Expression eukaryotischer Proteine erschweren (Chen, 1994; Zahn, 1996; Baneyx, 1999). Obwohl augenscheinlich kein monokausaler Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der seltenen Codons und dem Expressionsniveau bestand, scheint es bezeichnend, daß die Wattwurm-AloDH nur zwei, die weniger stark exprimierte *Crassostrea*-AloDH2 jedoch neun der problematischen Arginincodons umfaßt. Die sequenzabhängige Faltungseffizienz der einzelnen Enzymproteine und eventuell erforderliche Proteinmodifikationen könnten sich, da sie über den Anteil fehlerhafter Translationsprodukte entscheiden, der einer proteolytischen Degradation zugeführt wird, ebenfalls auf die Menge rekombinanten Proteins in den verschiedenen Bakterienkulturen ausgewirkt haben.

Da die Proteinbiosynthese vom N- zum C-Terminus eines Proteins fortschreitet und die heterolog exprimierten OpDHs mit C-terminalem Histidin-Anhang kloniert wurden, folgt aus deren Detektion durch Tag-spezifische Immunfärbung (Abb. 20, S. 87), daß sie vollständig translatiert wurden. Darauf lassen auch Vergleiche des theoretischen Molekulargewichts der abgeleiteten OpDHs (zwischen 43,7 und 45,3 kd) mit der SDS-elektrophoretisch oder gefiltrationschromatographisch ermittelten Masse der heterolog exprimierten Enzyme (zwischen 40 und 45 kd) schließen (Tab. 5 und Abb. 22, beide S. 90). Die Differenzen von maximal 4 kd zwischen den theoretischen und experimentellen Werten sind offenbar in methodischen Ungenauigkeiten begründet (vgl. auch 3.5).

Überdies zeigten Aktivitätsmessungen in den Homogenaten der verschiedenen Expressionskulturen, daß alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit vollständig sequenzierten mRNAs funktionsfähige OpDHs repräsentieren (Abb. 18, S. 84). Quantifiziert wurden neben der of-

fenbar auf *E. coli*-Proteine zurückzuführenden LDH-Aktivität, die sich auch im Homogenat der Kontrollkultur fand, die Opinsyntheseaktivitäten (mit L-Alanin, Glycin, β -Alanin, Taurin und L-Arginin als Aminosäuresubstrat), deren physiologische Relevanz für Invertebraten bekannt ist (siehe Einleitung). Zusätzlich wurde die OpDH-Aktivität mit L-Norvalin (L-Aminovaleriansäure), dem bevorzugten Aminosäuresubstrat der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (Asano et al., 1989; Kato et al., 1996) bestimmt. Um die entsprechenden Aktivitäten unmittelbar vergleichen zu können, wurden bei den Messungen im Rahmen der Expressionsexperimente die gleichen Testbedingungen wie bei den Arbeiten mit natürlichen OpDHs verwendet (2.5.1). Daher variierte die eingesetzte Aminosäurekonzentration (je 200 mM L-Alanin, Glycin oder β -Alanin, jedoch nur 100 mM L-Norvalin bzw. Taurin sowie 5,5 mM L-Arginin). Abgesehen davon, daß die verschiedenen Aminosäuren unterschiedlich gut wasserlöslich sind, wurden bei der Konzentrationswahl typische Aminosäure- K_m -Werte tierischer OpDHs und die differierenden Aminosäurekonzentrationen in Invertebratengewebe wie dem Hautmuskelschlauch des Spritzwurms berücksichtigt (Livingstone et al., 1983; Gäde und Grieshaber, 1986; Grieshaber und Kreuzer, 1986). Die Vergleichbarkeit der mit verschiedenen Aminosäuresubstraten gemessenen OpDH-Aktivitäten wurde durch die Konzentrationsunterschiede offenbar nur wenig eingeschränkt. So lieferten Aktivitätsmessungen in Adduktor- und Hautmuskelschlauch-Homogenaten, bei denen statt der üblichen Aminosäurekonzentrationen 40 mM L-Arginin bzw. jeweils 100 mM der übrigen Aminosäuren eingesetzt wurden, sehr ähnliche relative OpDH-Aktivitäten wie die Tests unter Standardbedingungen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Sofern man sich bei der Nomenklatur von OpDHs an den jeweiligen Maximalaktivitäten orientiert, handelt es sich bei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Wattwurm-OpDH (Abb. 16, S. 77) eindeutig um eine AloDH (EC 1.5.1.17), die allerdings mit rund 10-fach geringerer Effizienz auch Glycin umzusetzen vermag (Abb. 18, S. 84; vgl. auch Feyen, 2006). Das scheint angesichts der großen strukturellen Ähnlichkeit von L-Alanin und Glycin wenig verwunderlich, ist aber insofern bemerkenswert, als durch die heterologe Expression eines einzelnen Enzymproteins, das beide OpDH-Aktivitäten aufweist, erstmals unzweifelhaft die Existenz einer kombinierten Alo/StrDH nachgewiesen werden konnte (vgl. S. 137). Die im Vergleich zur Umsatzrate mit L-Alanin geringere Effizienz, mit der das um eine Methylengruppe kleinere Glycin und das um zwei Methylengruppen größere L-Norvalin umgesetzt wurden (AloDH : StrDH : CENDH-Aktivitätsverhältnis = 21 : 2 : 1), zeigt zugleich, daß die Größe des Aminosäuresubstrats entscheidend für seine korrekte Ausrichtung in der Bindungstasche des Enzyms ist. Noch wichtiger erscheint die α -Stellung der Carboxyl-

gruppe. Jedenfalls wurde mit β -Alanin eine um das 76-fach geringere OpDH-Aktivität als mit L-Alanin gemessen. Mit Taurin, das sich von β -Alanin nur dadurch unterscheidet, daß die in β -Position befindliche Carboxylfunktion durch eine Sulfonsäuregruppe substituiert ist, konnte fast gar keine OpDH-Aktivität nachgewiesen werden. Gleiches gilt für das basische L-Arginin, das als größte der getesteten Aminosäuren von der Wattwurm-AloDH-LE6xH vermutlich aus sterischen Gründen, möglicherweise aber auch wegen seiner unter den Testbedingungen (pH 7,0) positiv geladenen Guanidiniumgruppe nicht in signifikantem Umfang umgesetzt wurde (3.8).

Eine Sulfonsäuregruppe in β -Stellung oder ein großer basischer Aminosäurerest standen auch der katalytischen Aktivität der übrigen in dieser Arbeit exprimierten OpDHs entgegen. Mit Taurin bzw. L-Arginin wurden stets so geringe OpDH-Aktivitäten gemessen (maximal $0,24 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ Bakterien; Volumenaktivitäten alle $< 0,1 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$), daß die Vermutung naheliegt, sie könnten durch unspezifischen NADH-Umsatz bzw. eine gewisse Ungenauigkeit bei der Subtraktion der bakteriellen LDH-Aktivität zustande gekommen sein (vgl. Livingstone et al., 1990). Während viele proteinbiochemische Arbeiten Hinweise auf kombinierte Alo/StrDHs, aber auch multifunktionelle Enzyme lieferten, die L-Alanin, Strombin und β -Alanin umzusetzen vermögen (Dando et al., 1981; Kreutzer, 1987; Kanno et al., 1996a; Manchenko et al., 1998), finden sich in der Literatur übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen kaum Beispiele für Invertebraten-OpDHs, die gleichzeitig AloDH- oder StrDH- und ODH-Aktivität besitzen. Abgesehen von diversen Seeanemonen-OpDHs breiter Substratspezifität (Ellington, 1979) setzen metazoische ODHs in der Regel ausschließlich Aminosäuren einer Kettenlänge von fünf bis sechs Kohlenstoffatomen um, die entweder mit einer terminalen Guanidiniumgruppe oder bei manchen ODHs alternativ mit einer endständigen Aminogruppe enden müssen, um als Substrat erkannt zu werden (Storey und Dando, 1982). Auch TaDHs sind in der Regel durch strikte Aminosäurespezifität charakterisiert (Gäde, 1986; Doumen und Ellington, 1987; Sato et al., 1991; Kan-no et al., 1996b; Kan-no et al., 1997 und 1998). Nur bei *Fusitriton oregonensis* konnte durch IEF und anschließende Aktivitätsfärbung eine mutmaßliche Str/TaDH identifiziert werden, die Strombin und Tauropin scheinbar gleich effizient umsetzt (Kanno et al., 1996a).

Das bei ausreichendem Oxidationsschutz für die Wattwurm-AloDH-LE6xH erzielte AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis von 10 : 1 (nach Reinigung 11 : 1, Tab. 5, S. 90) entspricht etwa dem bei den gereinigten AloDHs I und II aus dem Hautmuskelschlauch des Anneliden beobachteten Aktivitätsverhältnis von 13 : 1 bzw. 14 : 1 (Tab. 1, S. 55). Weil die-

ses Verhältnis sowohl bei den natürlichen Enzymproteinen als auch im Fall der rekombinanten OpDH erheblichen oxidationsabhängigen Schwankungen unterlag (4.1.2), ist dem geringen Unterschied zwischen den relativen OpDH-Aktivitäten der Wattwurm-AloDH-LE6xH und der natürlichen Varianten keine größere Bedeutung zuzumessen. Vielmehr unterstreicht die im Vergleich zu den übrigen heterolog exprimierten OpDHs auffällig starke Oxidationsempfindlichkeit der rekombinanten Wattwurm-AloDH deren Ähnlichkeit zu den natürlichen AloDHs der Art. Die Wattwurm-AloDH-LE6xH konnte wie die OpDHs aus Hautmuskelschlauch-Homogenaten von *A. marina* nur schlecht durch native PAGE und anschließende Formazanfärbung detektiert werden (Abb. 19, S. 86 und 4.1.2), zeichnete sich aber durch eine ähnliche elektrophoretische Mobilität wie die natürlichen Enzymproteine aus (R_f -Wert der gereinigten AloDH-LE6xH = 0,57 versus R_f -Werte der gereinigten AloDHs I und II = 0,57 bzw. 0,56; Abb. 19, S. 86 und Abb. 6, S. 58). Das stützt ebenso wie die ähnliche Masse der molekularbiologisch und proteinbiochemisch erfaßten Enzyme (theoretische Masse der abgeleiteten Wattwurm-AloDH = 45,2 kd; Molekulargewicht der chromatographisch separierten AloDHs I und II gemäß MALDI-MS = $45,1 \pm 0,1$ kd; vgl. 3.7 und 3.5) die vor allem durch die Sequenzvergleiche mit tryptischen AloDH I- bzw. AloDH II-Peptiden (Abb. 16, S. 77 und 4.1.4.1) begründete Hypothese, daß die in der vorliegenden Arbeit sequenzierte Wattwurm-AloDH weitestgehend mit den beiden durch Mono Q-Chromatographie separierten, untereinander möglicherweise nur durch sekundäre Proteinmodifikationen differierenden AloDH-Varianten aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* übereinstimmte.

Im Fall der *Crassostrea*-Alo/StrDH1 erwies es sich als schwieriger, eine Aussage, über das präferierte Aminosäuresubstrat zu treffen. In *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH-Homogenaten, die mit Standard-Homogenisationspuffer (100 mM Imidazol/HCl mit 2 mM EDTA und 5 mM DTT, pH 7,0) hergestellt wurden, fanden sich etwa gleich hohe Alanopin- und Strombinsyntheseaktivitäten (Aktivitätsverhältnis zwischen 0,9 : 1 und 1,3 : 1; vgl. Abb. 18, S. 84). Das korreliert gut mit den relativen AloDH- und StrDH-Aktivitäten der aus Adduktoren Pazifischer Austern gereinigten Alo/StrDHs I bis III (0,8 : 1 bzw. 0,9 : 1; Tab. 2, S. 63) und deutet wie das ähnliche Verhalten der Enzyme bei nativen Disk-Elektrophoresen (R_f -Wert der heterolog exprimierten *Crassostrea*-Alo/StrDH1 = 0,46; R_f -Werte der gereinigten *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III = 0,43, 0,45 bzw. 0,46; Abb. 19, S. 86 und Abb. 12, S. 67) darauf hin, daß es sich bei der *Crassostrea*-Alo/StrDH1 um ein Isozym des von Manchenko et al. (1998) postulierten Str/AloDH-Locus handeln könnte (vgl. 4.1.4.2 und 4.1.5.2). Dafür spricht auch die recht breite Aminosäurespezifität des rekombinanten Enzymproteins. So zeigte die heterolog exprimierte *Crassostrea*-Alo/StrDH1 neben AloDH- und StrDH- auch beträchtliche

CENDH- und β -AloDH-Aktivität (Aktivitätsverhältnis etwa 4 : 3 : 1 : 1; Abb. 18, S. 84) und setzte darüber hinaus L-Cystein, L-Serin, L-Valin und L-Threonin ebenfalls effizient um (nicht dargestellt). Ähnliches gilt für die Allozyme des Str/AloDH-Locus nach Manchenko et al. (1998), die sich durch ihre Fähigkeit, Glycin, L-Alanin, L-Serin, β -Alanin und möglicherweise weitere, nicht getestete Aminosäuresubstrate zu nutzen, deutlich von den L-Alanin-spezifischen Isozymen des von den gleichen Autoren beschriebenen AloDH-Locus unterschieden (4.1.4.2). Auch die von Fields und Hochachka (1981) gereinigten Austern-OpDH zeichneten sich durch eine breite Aminosäurespezifität aus (4.1.3; erwiesenermaßen katalytisch aktiv mit Glycin, L-Alanin, 3-Aminopropionat, L-2-Aminobutyrat, L-Norvalin, L-Serin und L-Valin). Sofern die von Fields et al. (1981) bzw. im Rahmen der vorliegenden Arbeit gereinigten *Crassostrea*-Alo/StrDHs und die *Crassostrea*-Alo/StrDH1 alle dem gleichen Genlocus zuzuordnen sind, erklären sich die unter 4.1.5.2 diskutierten Sequenzabweichungen zwischen den tryptischen Alo/StrDH-Peptiden aus Tab. 4 (S. 72) und der Alo/StrDH1 ebenso wie die Differenz zwischen dem theoretischen Molekulargewicht des abgeleiteten Enzymproteins (45,3 kd; Tab. 5, S. 90) und der Masse der *Crassostrea*-Alo/StrDHs I bis III ($44,3 \pm 0,1$ kd gemäß MALDI-MS, 3.5) dadurch, daß molekularbiologisch ein von den proteinbiochemisch analysierten Varianten abweichendes Allozym erfaßt wurde.

Im *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH-Homogenat auf Lysepufferbasis (50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0), das zur Reinigung des rekombinanten Enzymproteins via Nickel-NTA-Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie genutzt wurde (3.8.2), fand sich allerdings ebenso wie in der daraus resultierenden gereinigten Enzymlösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 2 mM EDTA, 5 mM DTT und 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) abweichend vom AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis der Standardhomogenate zwei- bis dreimal mehr Alanopin- als Strombinsyntheseaktivität (nicht dargestellt bzw. Tab. 5, S. 90). Durch mehrwöchige Lagerung der mit 50 % (v/v) Glycerin versetzten, gereinigten Austern-Alo/StrDH1 bei -20°C verschob sich das Aktivitätsverhältnis sogar noch weiter zugunsten der Alanopinsynthesereaktion (auf 4 : 1). Es liegt nahe, dies auf eine Konformationsänderung des rekombinanten Enzymproteins zurückzuführen und einen Bezug zu der durch den Blot in Abb. 20 (S. 87) sowie das SDS-Gel in Abb. 22 (S. 90) dokumentierten Instabilität der *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH herzustellen. So traten in der löslichen und unlöslichen Fraktion der *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH-Kultur deutlich mehr C-terminale OpDH-LE6xH-Fragmente als in den Homogenaten der übrigen Kulturen auf (Abb. 20, S. 87). Unter ihnen dominierte neben diversen kleineren Alo/StrDH1-LE6xH-Teilstücken eines mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kd, das entsprechend seiner Größe nicht nur die gesamte C-terminale,

sondern auch einen Teil der N-terminalen Enzymdomäne umfaßte (C-terminalen Abschnitt der *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH etwa ab Glutamat-146; vgl. Abb. 23, S. 95). C-terminale Degradationsprodukte dieser Größe fanden sich auch bei SDS-elektrophoretischer Analyse der gereinigten OpDH (Abb. 22, S. 90; zugehöriger Blot nicht dargestellt). Das zeigt, daß die *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH nicht nur innerhalb der Bakterienzellen oder bei deren Aufschluß, sondern auch nach ihrer Reinigung fragmentiert wurde. Schließlich können die OpDH-LE6xH-Teilstücke in der gereinigten Enzymlösung erst nach der Gelfiltrationschromatographie über Sephadex-G100 (2.5.6.5) entstanden sein, da sie ansonsten bei diesem Reinigungsschritt vom undegradierten Zielprotein (45 kd) separiert worden wären. Sofern man eine Kontamination des gereinigten Enzyms mit Proteasen ausschließt, ist von einem nicht-enzymatischen Degradationsprozeß auszugehen.

Wie bereits diskutiert (S. 150), wird bei der heterologen Expression eines Enzyms aufgrund von Translationsfehlern, Fehlfaltungsprozessen oder fehlenden eukaryotenspezifischen Proteinmodifikationen häufig nicht dessen native, meist relativ stabile Konformation erreicht. Das scheint auch auf die *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH-Expression in BL21(DE3) zuzutreffen. Da natürlich produzierte Alo/StrDHs der Pazifischen Auster sich offenbar durch einen hohen Acetylierungsgrad ihres N-Terminus auszeichnen (4.1.4.2), der ihre Stabilität beeinflussen und unter Umständen Voraussetzung für eine normale Proteinfunktion sein könnte (Polevoda und Sherman, 2000), läßt sich ein Zusammenhang zwischen der Degradationsanfälligkeit der in *E. coli* exprimierten *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH und der Tatsache vermuten, daß prokaryotische Proteine in der Regel nicht acetyliert werden (Driessen et al., 1985). Aus einer fehlenden N-terminalen Acetylierung resultierende oder sonstige Faltungsprobleme könnten dadurch verstärkt worden sein, daß unvollständig gefaltete Proteine einer erhöhten Desamidierungsgefahr unterliegen, die Desamidierung von Asparagin- oder Glutaminresten aber ihrerseits Proteine weiter zu destabilisieren und proteolytische Angriffe zu erleichtern pflegt (Wright, 1991). Das im Vergleich zu Standardhomogenaten höhere AloDH : StrDH-Aktivitätsverhältnis im *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH-Lysepuffer-Homogenat und den daraus gewonnen Enzymlösungen könnte durch eine erhöhte Desamidierungsrate des Enzymproteins im alkalischeren Lysepuffer (pH 8,0 statt pH 7,0; Wright, 1991) sowie eine entsprechend gesteigerte Denaturierungs- und Fragmentierungstendenz der rekombinanten OpDH zu erklären sein. Vermutlich spiegelten weder die Alanopin- und Strombinsyntheseraten (Verhältnis 3 : 1) noch die offensichtlich höhere Alanopin- als Strombinoxidaseaktivität der gereinigten *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH (Abb. 19, S. 86) die „normale“ Aminosäurepräferenz des nativen Enzyms wieder.

Die *Crassostrea*-AloDH2-LE6xH setzte L-Alanin auch in Standard-Homogenisationspuffer dreimal effizienter als Glycin um und zeigte die höchste OpDH-Aktivität ($13 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ Bakterien) überraschenderweise mit L-Norvalin (Abb. 18, S. 84). Nur weil diese Aminosäure vermutlich kein natürliches Substrat der Austern-OpDH bildet, wurde das Enzym trotzdem als AloDH bezeichnet. Mit jeweils weniger als $1 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ Bakterien blieben die Alanopin- und die Strombinsyntheseaktivität des *Crassostrea*-Alo/StrDH2-LE6xH-Homogenats jedoch weit hinter den entsprechenden Aktivitäten in der löslichen Proteinfraction der Alo/StrDH1-LE6xH-Kultur (427 bzw. $322 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ Bakterien) und allen anderen Bakterienhomogenaten außer dem der Kontrolle zurück. Ein Vergleich der Bandenintensitäten auf den immungefärbten Blots in Abb. 20 (S. 87) zeigt, daß dies nur partiell damit zu erklären ist, daß aus der *Crassostrea*-AloDH2-LE6xH-Kultur pro Gramm Bakterien weniger in nativem Puffer lösliches Enzym als aus den übrigen Kulturen isoliert wurde. Aus der Anzucht des für die AloDH2-LE6xH codierenden BL21(DE3)-Stamms resultierte zwar weniger lösliche OpDH-LE6xH als aus der *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH-Kultur. Die Menge löslicher *Crassostrea*-AloDH2-LE6xH überschritt jedoch die des rekombinanten Enzyms in der löslichen Fraktion der *Ostrea*-Kultur.

Die niedrigen Opinsyntheseaktivitäten der *Crassostrea*-AloDH2-LE6xH könnten auf Faltungsfehler oder andere Expressionsartefakte zurückzuführen sein (siehe S. 150). Vielleicht repräsentiert das Enzym keine funktionelle OpDH, sondern, wie unter 4.1.5.2 für die partielle Austern-Alo/StrDH3 diskutiert, das Produkt eines Nullallels oder Pseudogens, das zwar translatiert wird, seine ursprüngliche Funktion jedoch infolge degenerierender Mutationen weitgehend eingebüßt und möglicherweise neue Aufgaben erworben hat. Angesichts ihrer im Vergleich zu den *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH-Banden unerwartet hohen Signalstärke auf dem formazangefärbten Gel aus Abb. 19 (S. 86) läßt sich außerdem spekulieren, daß die *Crassostrea*-AloDH2 in vivo primär als Opinoxidase fungieren könnte. Vielleicht entspricht diese Austern-OpDH einem Isozym des von Manchenko und Mitarbeitern (1998) beschriebenen AloDH-Locus, der außer im Adduktor auch im Hepatopankreas, im Mantel und in den Kiemen Pazifischer Austern exprimiert wird (4.1.4.2). Die geringen Opinsyntheseaktivitäten der *Crassostrea*-AloDH2-LE6xH wären gut damit zu vereinbaren, daß die Isozyme des AloDH-Locus nach Manchenko et al. (1998) nur für einen geringen Teil der Alanopinsyntheseaktivität im Adduktor Pazifischer Austern verantwortlich sind. Der scheinbare Widerspruch zwischen der strikten L-Alanin-Spezifität der natürlichen AloDHs (Manchenko et al., 1998) und der geringen Strombinsyntheseaktivität der *Crassostrea*-AloDH2-LE6xH (L-Norvalin wurde von der Gruppe um Manchenko nicht als potentiell Aminosäuresubstrat getestet) könnte damit zu erklären sein, daß eine etwaige Strombinsyntheseaktivität der erstge-

nannten Enzyme unter der Nachweisgrenze der von Manchenko et al. (1998) verwendeten Färbemethode blieb.

Die *Ostrea*-StrDH-LE6xH zeigte unter allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit heterolog exprimierten Enzymen die geringste Aminosäurespezifität (Angabe bezogen auf die sechs standardmäßig getesteten Aminosäuren, siehe S. 151; AloDH : StrDH : CENDH : β -AloDH-Aktivitätsverhältnis = 1 : 2 : 1 : 2; Abb. 18, S. 84), erschien jedoch insgesamt wenig effizient. Die im Vergleich zur spezifischen AloDH-Aktivität der rekombinanten Wattwurm-OpDH fast vierfach niedrigere spezifische StrDH-Aktivität der gereinigten *Ostrea*-StrDH-LE6xH (Tab. 5, S. 90) belegt, daß die geringen Opinsyntheseaktivitäten in der löslichen Fraktion von *Ostrea*-StrDH-LE6xH-Kulturen (vgl. Abb. 18, S. 84) nicht allein daraus resultierten, daß aus ihnen besonders wenig lösliches Enzym isoliert wurde (Abb. 20, S. 87). Da sich in Adduktorhomogenaten Europäischer Austern ebenfalls nur vergleichsweise geringe OpDH-Aktivitäten fanden (Abb. 2, S. 50 und 4.1.1), spiegelte die mäßige katalytische Aktivität der gereinigten *Ostrea*-StrDH-LE6xH möglicherweise die tatsächliche Leistungsfähigkeit des nativen Enzyms (unter den gewählten Testbedingungen) wieder.

Anders als die rekombinante *Ostrea*-StrDH erwies sich die Spritzwurm-OpDH-LE6xH als weitgehend auf Glycin und L-Alanin (sowie die nicht standardmäßig getesteten Substrate L-Serin und L-Cystein, nicht dargestellt) spezialisiert (AloDH : StrDH : CENDH : β -AloDH : TaDH : ODH-Aktivitätsverhältnis = 545 : 652 : 1 : 13 : 0 : 0; Abb. 18, S. 84). Das deutet darauf hin, daß die ODH- bzw. die AloDH- und StrDH-Aktivität aus dem Hautmuskelschlauch von *S. nudus* (Abb. 2, S. 50) entgegen der wenig eindeutigen Resultate der Isozymelektrophoresen (Abb. 3, S. 52) tatsächlich wie von Grieshaber und Kreutzer (1986) postuliert (im wesentlichen) auf separate Enzymproteine zurückzuführen sein könnten (vgl. 4.1.4.3). Daß die genannten Autoren für ihre Alo/StrDH-Präparation ein AloDH : StrDH : ODH-Aktivitätsverhältnis von 4 : 4 : 1 ermittelten, während die rekombinante Spritzwurm-Alo/StrDH fast gar keine ODH-Aktivität zeigte (maximal $0,2 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ Bakterien, vgl. S. 158), ist vermutlich durch eine Kontamination des aus dem Hautmuskelschlauch des Sipunculiden isolierten Enzyms mit Spuren einer seiner ODHs zu erklären. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierte Spritzwurm-OpDH (Abb. 33, S. 293) könnte somit durchaus der von Grieshaber und Kreutzer (1986) gereinigten Alo/StrDH oder einem anderen Allozym des durch diese repräsentierten Genlocus entsprechen.

In diesem Zusammenhang ist zu betonen, daß aus dem Verhältnis der OpDH-Aktivitäten im Gewebe einer Art mit mehreren coexistierenden OpDHs keinerlei Rückschlüsse auf die

Spezifität der OpDH gezogen werden können, die bei PCR-Amplifikationen wie denen der vorliegenden Arbeit mit größerer Wahrscheinlichkeit vervielfältigt wird. Sofern bei der Amplifikation eines ersten OpDH-Teilstücks genomische DNA eingesetzt wird (vgl. 2.6.5.1 und 8.2), sind solche Überlegungen sowieso hinfällig. Welche von mehreren OpDHs kopiert wird, läßt sich aber auch dann, wenn als Ausgangsmaterial cDNA dient, nicht vorhersagen. Schließlich korreliert eine höhere OpDH-Aktivität nicht zwangsläufig mit einer höheren Gewebekonzentration der entsprechenden OpDH-codierenden mRNA. Außerdem wird der Amplifikationserfolg von der Sequenzübereinstimmung der einzelnen OpDHs mit den verwendeten PCR-Primern determiniert. Daß im Rahmen der vorliegenden Arbeit trotz der hohen ODH-Aktivität im Hautmuskelschlauch von *S. nudus* (Abb. 2, S. 50) eine Spritzwurm-Alo/StrDH amplifiziert wurde, könnte insofern damit zusammenhängen, daß bei ihrer partiellen Vervielfältigung Primer zum Einsatz kamen, die ausgehend von internen Peptidsequenzen der Wattwurm-AloDHs I und II konstruiert wurden (Tab. 17, S. 284). Allerdings lieferten auch spätere PCRs mit universellen OpDH-Primern (Kimura et al., 2005) keine partielle ODH, sondern das Fragment einer wenig aktiven Spritzwurm-AloDH (AM158253; Primaßin, 2005). Eine experimentelle Überprüfung der katalytischen Aktivität abgeleiteter OpDHs erscheint daher generell unverzichtbar. Datenbankannotationen wie jene der angeblichen AloDH aus *Fusitriton oregonensis* (BAE00002) oder der ODH aus *Pseudocardium sachalinensis* (= *Spisula sachalinensis*, BAD81062), die nicht auf experimentellen Ergebnissen basieren, sind zumindest dann anzuzweifeln, wenn die entsprechende Art wie in den genannten Fällen über mehr als eine OpDH verfügt (Sato et al., 1993a; Kan-no et al., 1996a).

Während die spezifische AloDH- und StrDH-Aktivität der gereinigten *Crassostrea*-Alo/StrDH1-LE6xH (241 bzw. 85 U·mg⁻¹ Protein) wohl aufgrund ihrer Instabilität (S. 155) deutlich hinter jener der mutmaßlich äquivalenten *Crassostrea*-Alo/StrDHs zurückblieb, die im Rahmen der aktuellen Arbeit bzw. von Fields und Hochachka (1981) gereinigt wurden (jeweils mehr als 300 bzw. rund 1000 U·g⁻¹ Protein AloDH- und etwa ebensoviel StrDH-Aktivität; Tab. 2, S. 63 und 4.1.3), übertrafen die spezifischen AloDH- und StrDH-Aktivitäten der gereinigten Wattwurm-AloDH-LE6xH (940 bzw. 83 U·g⁻¹ Protein) und der gereinigten Spritzwurm-Alo/StrDH-LE6xH (498 bzw. 669 U·g⁻¹ Protein) die Aktivitäten der gemäß 2.5.6.2 bzw. von Siegmund et al. (1985) und Grieshaber und Kreutzer (1986) aus Hautmuskelschläuchen der jeweiligen Art isolierten Alo/StrDHs (45 bzw. 30 U·g⁻¹ Protein bei der Wattwurm-AloDH I- und 36 bzw. 23 U·g⁻¹ Protein bei der Wattwurm-AloDH II-Präparation, Tab. 1, S. 55; 278 bzw. 30 U·g⁻¹ Protein bei der von Siegmund et al. (1985) gereinigten

Wattwurm-OpDH sowie 131 bzw. 138 U·g⁻¹ Protein im Fall der von Grieshaber und Kreutzer (1986) isolierten Alo/StrDH aus *S. nudus*, vgl. 4.1.3 und 4.1.4.3). Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß sich keine der natürlichen Enzympräparationen durch wirkliche Homogenität auszeichnete (4.1.3), und deutet zugleich auf eine korrekte Faltung der rekombinanten Watt- und Spritzwurm-OpDHs hin.

Die hohen spezifischen OpDH-Aktivitäten der gereinigten rekombinanten Enzymproteine (Tab. 5, S. 90) unterstreichen die besonderen Vorteile der heterologen Expression von Proteinen mit einem Fusionstag aus mehreren Histidinresten. Sie ermöglichte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die einfache und effiziente Reinigung von bis zu 3 mg hochreiner OpDH-LE6xH (Abb. 22, S. 90) pro Liter Bakterienkultur (2.5.6.5 und 3.8.2). Angesichts weitgehender Reinheit der Enzymlösungen bereits nach der anfänglichen Nickel-NTA-Affinitätschromatographie (exemplarisches Chromatogramm in Abb. 21, S. 89; Elektropherogramme nicht gezeigt) hätte zugunsten einer erhöhten Ausbeute je nach Verwendungszweck der rekombinanten OpDHs sogar auf den zweiten chromatographischen Reinigungsschritt (Gelfiltration) verzichtet werden können. Vergleicht man das mit den aufwendigen Protokollen zur Reinigung von OpDHs aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* oder aus dem Adduktor von *C. gigas* (2.5.6.2 und 2.5.6.4), mit deren Hilfe ausgehend von zahlreichen Tieren nur geringe Mengen teils nicht mal völlig homogenen Enzymproteins gewonnen wurden (3.4.1 und 3.4.3), so wird deutlich, weshalb die Verfügbarkeit leicht zu reinigender rekombinanter OpDHs unabdingbare Voraussetzung für strukturanalytische OpDH-Untersuchungen, den Einsatz von OpDHs zur Aminosäurequantifizierung in Hochdurchsatz-Screenings der pharmazeutischen Industrie (S. 13) und sonstige weiterführende Arbeiten ist, für die es großer Mengen reinen Enzymproteins bedarf (vgl. auch Janßen, 2000 und Müller, 2007). Als einziger Nachteil der Metallchelate-Affinitätschromatographie über Nickel-NTA (Porath et al., 1975; Hochuli et al., 1987; Schmitt et al., 1993), der sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor allem bei der Reinigung der rekombinanten Wattwurm-AloDH bemerkbar machte, erwies sich die DTT-Inkompatibilität dieser Affinitätsmatrix (4.1.2).

4.2 Vergleich ausgewählter OpDHs

4.2.1 Physikochemische und strukturelle Eigenschaften

Das theoretische Molekulargewicht der in dieser Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs aus *A. marina*, *S. nudus*, *C. gigas* und *O. edulis* (minimal 43,7 kd bei der Spritzwurm-Alo/StrDH, maximal 45,4 kd im Fall der *Crassostrea*-AloDH2, siehe 3.7) ähnelt dem der in öffentlichen

Sequenzdatenbanken verfügbaren Mollusken- und Anneliden-OpDHs (zwischen 43,2 kd und 45,9 kd, ODH aus *Pecten maximus* [CAC36305] versus ODH aus *Sepia officinalis* [CAC36306]). Dagegen unterliegt der pI der Invertebraten-OpDHs einer deutlich stärkeren Variabilität. Während die meisten sequenzierten Metazoen-OpDHs sich wie jene aus Watt- und Spritzwurm sowie Pazifischer und Europäischer Auster (3.7) durch einen theoretischen pI zwischen 5,35 (ODH aus *P. maximus*, CAC36305) und 6,23 (hypothetische AloDH aus *Fusitriton oregonensis*, BAE00002) auszeichnen und es sich bei der TaDH aus dem Sandwurm, *Arabella iricolor* (BAB86769), ebenso wie bei der möglichen Str/AloDH aus dem Blutkieferwurm, *Marphysa sanguinea* (BAF36491) um ein neutrales Protein handelt (theoretischer pI = 7,15 bzw. 6,75), weisen die ODHs der Kalmare *Loligo vulgaris* und *Loligo opalescens* (CAC36301 und CAC20642) alkalische pIs von 8,31 bzw. 8,52 auf. Das läßt sich gut damit vereinbaren, daß die Größe äquivalenter Aminosäuren in homologen Proteinen üblicherweise stärkeren Beschränkungen unterliegt als ihre Hydrophobizität oder Ladung (Taylor, 1986).

Von einer Verwandtschaft der neu sequenzierten Alo/StrDHs untereinander sowie zu den Mollusken- und Anneliden-OpDHs aus öffentlichen Datenbanken ist angesichts paarweiser Aminosäuresequenz-Übereinstimmungen von mindestens 33 % (Wattwurm-AloDH dieser Arbeit versus ODH aus *Pseudocardium sachalinensis*, BAD81062; Tab. 6, S. 92) zweifelsfrei auszugehen (4.3.1; Janßen, 2000; Kimura et al., 2005; Kan-no et al., 2005a und 2005b). Zugleich deuten Sequenzidentitäten von weniger als 50 % selbst zwischen Invertebraten-OpDHs gleicher oder ähnlicher Substratspezifität (etwa zwischen der Wattwurm-AloDH und der Alo/StrDH1 aus *C. gigas* oder zwischen den ODHs aus *P. maximus* und *L. vulgaris*, Tab. 6, S. 92) jedoch auf relativ große Freiheitsgrade der Enzymproteine hin (siehe auch S. 145). Die in Abb. 23 (S. 95) erfaßten Invertebraten-OpDHs ließen sogar in einer Alinierung ohne die bakterielle CENDH (nicht dargestellt) nur 61 identische Aminosäuren und 91 konservierte oder semi-konservierte Positionen (zu dieser Terminologie vgl. Bildunterschrift zu Abb. 23, S. 95) erkennen, was bedeutet, daß rund 62 % ihrer Reste hinsichtlich ihrer Größe und Hydrophobie keinen erkennbaren Einschränkungen unterliegen. Bezieht man die gemäß 3.10 und 4.3.2 ebenfalls homologe CENDH aus dem Bodenbakterium *Arthrobacter spec.* (Dairi und Asano, 1995; BAA08145) in die Betrachtungen ein, so erhöht sich dieser Wert sogar auf 75 %. Wie die geringe Zahl von Alinierungslücken, über die gesamte Sequenzlänge verteilte konservierte Sekundärstrukturelemente und die korrekte Ausrichtung mutmaßlich katalytischer bzw. an der Cofaktorbindung beteiligter Reste (siehe 4.2.2) in Abb. 23, (S. 95) belegen, resultiert diese mäßige Zahl konservierter OpDH-Positionen nicht aus Alinierungsfehlern. Zu berücksichtigen ist aber, daß nach Rost (1999) durchschnittlich die Hälfte eines Proteins aus

Loopregionen besteht, innerhalb derer Aminosäureaustausche, welche die physikochemischen Eigenschaften einer Seitenkette modifizieren, in der Regel ohne größere Auswirkungen bleiben.

Die unter den wenigen konservierten OpDH-Aminosäuren (Abb. 23, S. 95) dominierenden Prolin- (CENDH-Positionen 84, 109, 181, 203, 218 und 317) und Glycinreste (CENDH-Positionen 11, 13, 113, 148, 225, 282 und 301) besitzen wahrscheinlich überwiegend strukturelle Bedeutung. Schließlich nimmt Prolin aufgrund der konformativen Einschränkungen, die sich daraus ergeben, daß das α -Stickstoffatom dieser Iminosäure Teil eines starren Pyrrolidinrings ist (Barlow und Thornton, 1988; MacArthur und Thornton, 1991; Vanhoof et al., 1995), eine Sonderstellung unter den proteinogenen Aminosäuren ein. Glycin vermag Proteinketten aufgrund seiner geringen Größe besondere Flexibilität zu verleihen (Naor et al., 1996) und kann, da schon L-Alanin als nächst größere Aminosäure zehnmal mehr Raum einnimmt, vielfach nicht ohne radikale Veränderungen der Tertiärstruktur substituiert werden (Graur, 1985). Auch die konservierten aromatischen Reste (inklusive eines Histidins, vgl. Taylor, 1986) in den Alignmentpositionen 33, 98, 140, 222, 259, 263 und 280 (CENDH-Nummerierung) dürften aufgrund ihres hydrophoben Charakters und dem daraus resultierenden Bestreben, eine vom wäßrigen Umgebungsmedium abgeschirmte Position im Proteininneren einzunehmen, überwiegend faltungs- und stabilitätsrelevant sein (Gething und Sambrook, 1992). Dagegen könnten die möglicherweise an der Proteinoberfläche lokalisierten konservierten Reste (mutmaßlich) positiver oder negativer Ladung (CENDH-Positionen 17, 36, 39, 61, 143, 156, 202, 240, 292, 293, 296, 297, 320, 333 und 342; man beachte neben der Röntgenkristallstruktur der bakteriellen CENDH [Britton et al., 1998a], daß Histidin unter physiologischen Bedingungen unterschiedliche Ladungszustände einnehmen kann) an der Ligandenbindung und Katalyse beteiligt sein (vgl. 4.2.2 und Graur, 1985).

Größere Sequenzvariabilität, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Invertebraten-OpDHs und ihre bakteriellen Homologen beobachtet wurde (Tab. 6, S. 92; 3.10 und 4.3.2), stellt auch in anderen Enzymfamilien wie etwa der Superfamilie der NAD(P)H-abhängigen L-Laktat- und L-Malatdehydrogenasen (L-LDHs und L-MDHs) keine Seltenheit dar (Wilks et al., 1988; Madern, 2002; Golding und Dean, 1998, Orengo und Thornton, 2005). So stimmen die L-LDH aus *Bacillus stearothermophilus* (Barstow et al., 1986) und die L-MDH aus *Thermus flavus* (Nishiyama et al., 1986) in lediglich 19 % ihrer Reste überein, was insbesondere deshalb bemerkenswert ist, weil erstere durch Austausch einer einzigen Aminosäure (Glutamin-102 zu Arginin-102) von einem Enzymprotein mit klarer Pyruvatpräferenz in eine

katalytisch hoch aktive, oxalacetatspezifische MDH umgewandelt werden konnte (Wilks et al., 1988). Nach Orengo und Thornton (2005) wurden in manchen Proteinfamilien sogar Vertreter mit weniger als 5 % Sequenzidentität nachgewiesen. Dreidimensionale Proteinstrukturen sind dagegen aufgrund ihrer unmittelbaren funktionellen Bedeutung weit stärker konserviert (Golding und Dean, 1998; Wilson et al., 2000; Orengo und Thornton, 2005). Zumindest Proteine mit mehr als 28 % Sequenzidentität besitzen in der Regel eine sehr ähnliche Struktur (Rost, 1999), während größere, nicht vorhersagbare Strukturabweichungen erst bei Sequenzübereinstimmungen unter 20 % zu erwarten sind (Chothia und Lesk, 1986). Selbst in diesen Fällen ist jedoch noch von einer vergleichbaren Geometrie der aktiven Zentren auszugehen (Lesk und Chothia, 1980; Chothia und Lesk, 1986). Gerade Proteinpaare, deren prozentuale Ähnlichkeit wie die der OpDHs aus Abb. 23 (S. 95) die prozentuale Sequenzidentität übertrifft, zeichnen sich auch bei insgesamt geringerer Sequenzübereinstimmung meist durch eine vergleichbare Struktur aus (Rost, 1999).

Obwohl die homodimere CENDH aus *Arthrobacter spec.* in maximal 23 % ihrer Reste mit denen einer Invertebraten-OpDH übereinstimmt (*Crassostrea*-AloDH2; Tab. 6, S. 92), ist somit eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen ihrer Untereinheit und den monomeren OpDHs höherer Invertebraten einschließlich der im Rahmen der aktuellen Arbeit sequenzierten Enzyme wahrscheinlich. Das ist deshalb von besonderem Interesse, weil die CENDH wie bereits angesprochen die bisher einzige (D,L)-OpDH bildet, für die Strukturdaten (Auflösung 1,8 Å, 1bg6, Britton et al., 1998a) zur Verfügung stehen. Kristallisationsversuche zum Beispiel mit der ODH aus *P. maximus* erwiesen sich dagegen bislang als wenig erfolgreich. So zeigte Olo-mucki zwar bereits 1981 erste, scheinbar vielversprechende ODH-Kristalle, veröffentlichte jedoch nie ein zugehöriges Strukturmodell, was darauf hindeutet, daß es sich bei ihren Kristallen entweder um Artefakte handelte oder diese sich nicht für röntgenkristallographische Untersuchungen eigneten. Auch jüngste Kristallisationsversuche von Müller (2007), bei denen heterolog in *E. coli* exprimierte *Pecten*-ODH (Janßen, 2000) zum Einsatz kam, lieferten keine für eine Strukturaufklärung geeigneten Einkristalle.

Auf eine Strukturähnlichkeit zwischen den Invertebraten-OpDHs des Mollusken-Annelidentyps (Kan-no et al., 2005b; siehe 4.3.1) und den hufeisenförmigen CENDH-Monomeren (Abb. 26, S. 165) lassen auch Vergleiche zwischen der röntgenkristallographischen Sekundärstruktur des bakteriellen Enzyms (Britton et al., 1998a) und den mittels PROFsec (2.7.1) vorhergesagten Sekundärstrukturelementen der tierischen OpDHs schließen (Abb. 23, S. 95). Sekundärstrukturprognosen sind zwar nie 100%ig zuverlässig, konnten jedoch in den vergangenen Jahren vor allem dadurch entscheidend verbessert werden, daß als Eingabe für die

eigentliche Strukturvoraussage nicht Einzelsequenzen, sondern multiple Sequenzalinierungen homologer Proteine verwendet werden (Rost, 2001; Rost und Sander, 1993a und 1993b). Schließlich enthalten die aus solchen Alinierungen resultierenden positions-spezifischen Austauschprofile, die beschreiben, welche Aminosäuren gegen welche anderen Reste substituiert werden können, entscheidende Informationen über die Faltung einer Proteinfamilie und spiegeln auch nicht-lokale Effekte wieder, von denen nach Qian und Sejnowski (1988) ein signifikanter Teil der lokalen Sekundärstruktur eines Proteins abhängt. PROFsec erreicht auf diese Weise eine durchschnittliche Drei-Stadien-Vorhersagegenauigkeit (α -Helix-, β -Strang, Loop) von 77 %, wobei die Mitte von α -Helices und β -Strängen wie von fast allen Vorhersageprogrammen zuverlässiger erkannt wird als deren Enden (Rost, 2001).

Das zeigte auch eine zu Testzwecken durchgeführte PROFsec-Vorhersage für die CENDH aus *Arthrobacter spec.* (nicht dargestellt), die in 73 % der Reste mit der von Britton et al. (1998a) ermittelten Sekundärstruktur übereinstimmte. Insbesondere die Strukturelemente der CENDH, die offenbar auch bei allen Invertebraten-OpDHs konserviert sind (Abb. 23, S. 95), wurden abgesehen von kleineren Abweichungen in ihrer Ausdehnung korrekt vorhergesagt. Das erscheint bei einer profilbasierten neuronalen Netzwerk-Prognose nicht unerwartet und begründet die Annahme, daß sämtliche einheitlich für alle OpDHs des Anneliden- und Mollusken-Typs vorhergesagten Sekundärstrukturelemente richtig erkannt wurden. Auch die gute Korrelation des für die ODH aus *Pecten maximus* prognostizierten Helixanteils (35 %) mit dem experimentell für ODHs aus *Pecten jacobaeus* ermittelten Wert von etwa 33 % (Zettlmeissl et al., 1984) deutet auf eine hohe Zuverlässigkeit der PROFsec-Voraussagen für Invertebraten-OpDHs hin. Im Unterschied zu den als mögliche Alternative getesteten NPS@-Netzwerk-Sekundärstrukturvorhersagen (Combet et al., 2000) und den von Janßen (2000) genutzten Konsensus-Prognosen sagte das Programm die zur hochkonservierten $\beta\alpha\beta$ -Einheit der klassischen Rossmannfalte gehörige Helix α_1 (Abb. 23, S. 95 und 4.2.2) bei allen OpDHs korrekt voraus.

Entsprechend der PROFsec-Vorhersagen scheinen die Invertebraten-OpDHs sich ebenso wie die bakterielle CENDH in zwei strukturelle (und funktionelle) Domänen zu gliedern (3.9; Abb. 23, S. 95). Die N-terminale Nukleotidbindungsdomäne, die im Fall der CENDH die Reste 1 bis 195 einschließt und sich bei den Invertebraten-OpDHs vermutlich bis zu Resten zwischen Position 206 und 216 erstreckt (je nach OpDH), umfaßt sowohl α -Helices als auch β -Stränge. Letztere sind im Fall der CENDH in Form eines zentralen achtsträngigen (β_1 , β_2 , β_5 , β_6 , β_7 , β_8 , β_{11} und β_{12}) sowie eines kleineren viersträngigen β -Faltblatts (β_3 , β_4 , β_9 und β_{10}) mit jeweils teils paralleler und teils antiparalleler Ausrichtung der Einzelstränge organisiert

und werden von den insgesamt fünf α -Helices der Domäne flankiert (Abb. 26 und Britton et al., 1998a). Dagegen besteht die C-terminale (katalytische) Domäne der Enzyme offenbar ausschließlich aus α -Helices, die durch Schleifen unterschiedlicher Länge verbunden sind.

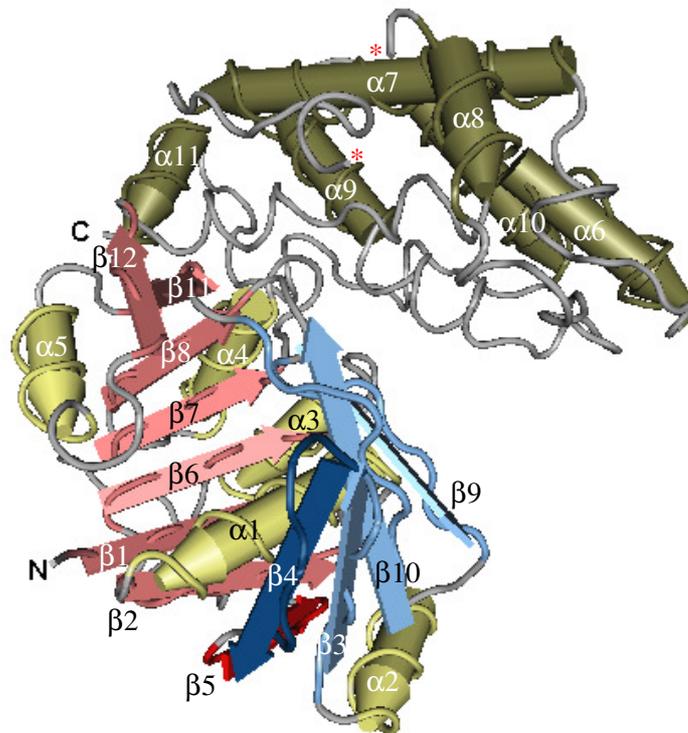


Abb. 26: Untereinheit der homodimeren CENDH aus *Arthrobacter spec.*

Das nach Koordinaten von Britton et al. (1998a; 1bg6) gezeichnete Monomer gliedert sich in zwei durch einen tiefen Spalt getrennte Domänen. Während die N-terminale Nukleotidbindungsdomäne (gelb) sowohl α -Helices (Pfeilzylinder) als auch β -Stränge (flache Pfeilquader) umfaßt, besitzt die C-terminale katalytische Domäne (grün) rein α -helikalen Charakter. Die β -Stränge, die ebenso wie die α -Helices vom N- zum C-Terminus durchnummeriert wurden, sind zu einem zentralen achtsträngigen (Rottöne) und einem kleineren viersträngigen (Blautöne) β -Faltblatt assoziiert. Dunkelrot bzw. dunkelblau hervorgehoben sind die β -Stränge, die bei den vermutlich ähnlich wie die bakterielle Enzymuntereinheit organisierten Invertebraten-OpDHs nicht vorhergesagt wurden. Die roten Sternchen markieren die Position der CENDH-Reste Tyrosin-259 und Prolin-267, die an einen Loopbereich (Lysin-260 bis Serin-266) angrenzen, der im Modell ebenso wie die drei N-terminalen Aminosäuren fehlt (nähere Informationen siehe Text).

Von den β -Strängen der Nukleotidbindungsdomäne sind mit β_1 , β_2 , β_6 , β_7 und β_8 , die bei allen untersuchten OpDHs höherer Invertebraten vorhergesagt wurden, diejenigen am stärksten konserviert, die in der CENDH aus *Arthrobacter spec.* zusammen mit β_5 als Teil des zentralen CENDH-Faltblatts eine sechssträngige parallele Faltblattstruktur mit Ähnlichkeit zur klassischen Rossmannfalte dinukleotidbindender Dehydrogenasen bilden (Abb. 23, S. 95; Abb. 26; Britton et al., 1998a und 4.2.2). Der zum sechssträngigen parallelen CENDH-Faltblatt gehörige Strang β_5 (in Abb. 26 dunkelrot hervorgehoben) scheint allerdings bei den

Invertebraten-OpDHs zu fehlen, was zusammen mit seiner randständigen Lage im zentralen CENDH-Faltblatt auf eine geringere funktionelle Bedeutung dieses Strukturelements hinweist. Von den β -Strängen des kleineren CENDH-Faltblatts sind offenbar nur β_{10} und, sofern man im Fall der OpDHs aus *F. oregonensis* (BAE00002) und *P. maximus* (CAC36305), bei denen dieser Strang nicht prognostiziert wurde, von Vorhersagefehlern ausgeht (vgl. Sequenzkonservierung im entsprechenden OpDH-Abschnitt, Abb. 23, S. 95 und Kimura et al., 2005), β_9 durchgehend konserviert. Vor allem der Strang β_4 (in Abb. 26, S. 165 dunkelblau hervorgehoben), der bei der CENDH am vom Domänenspalt abgewandten Rand des viersträngigen Faltblatts gelegen und damit nicht unmittelbar an der Substratbindung beteiligt ist (Britton et al., 1998a), wurde dagegen nur bei wenigen tierischen OpDHs als zwei bis maximal vier Reste langes und somit recht zweifelhaftes Strukturelement vorhergesagt. Das deutet wie die zugehörige Lücke in der Alinierung aus Abb. 23 (S. 95) und die unmittelbare Nachbarschaft zum bei den Invertebraten-OpDHs ebenfalls fehlenden Strang β_5 , darauf hin, daß die Invertebraten-OpDHs in diesem Molekülbereich grundlegend anders strukturiert sind als die CENDH-Untereinheit (gemäß PROFsec-Vorhersage tritt bei den OpDHs höherer Invertebraten anstelle der Stränge β_4 und β_5 eine zusätzliche α -Helix auf; Abb. 23, S. 95).

Da sämtliche α -Helices der CENDH bei den Invertebraten-OpDHs konserviert und die Lücken in der Alinierung aus Abb. 23 (S. 95) weitgehend auf Loopregionen der Enzyme beschränkt zu sein scheinen (vgl. S. 162, Pascarella und Argons, 1992 sowie Thompson et al., 1994), dürfte die Topologie ihrer katalytischen Domänen nur wenig differieren. Der vielleicht einzige größere Unterschied zwischen der katalytischen Domäne der CENDH und jener der tierischen OpDHs besteht darin, daß letztere im Bereich eines CENDH-Loops, der bei den Röntgenkristallstrukturanalysen von Britton et al. (1998) wohl aufgrund seiner besonderer Flexibilität nicht vollständig erfaßt werden konnte (die CENDH-Reste Lysin-260 bis Serin-266 fehlen im Strukturmodell der CENDH), eine α -helikale Struktur aufweisen (Abb. 23, S. 95 und Abb. 26, S. 165). Kurze α -Helices und β -Stränge ohne CENDH-Pendant, die nur für einige Invertebraten-OpDHs vorhergesagt wurden, stellen dagegen vermutlich Artefakte der Sekundärstrukturprognose dar und entsprechen in Wahrheit Schleifenregionen. Das ist auch hinsichtlich der bei manchen Invertebraten-OpDHs als α -Helix und bei anderen als β -Strang vorhergesagten Sequenzabschnitte nahe der Domänengrenze zu vermuten.

Obwohl die OpDHs höherer Invertebraten und die CENDH aus *Arthrobacter spec.* einander vermutlich in ihren Sekundärstrukturelementen und deren räumlicher Anordnung ähneln, differieren sie in ihrer Quartärstruktur. Scheinbar fehlen bei den monomeren Invertebraten-

Enzymen Äquivalente der hydrophoben Oberflächenreste, die im Fall der CENDH durch Dimerisierung vom umgebenden wäßrigen Medium abgeschirmt werden müssen (Asano et al., 1989; Dairi und Asano, 1995; Britton et al., 1998a). Bemerkenswert ist, daß die Untereinheiten nativer CENDH-Moleküle nach Britton et al. (1998a) ausschließlich über Reste der C-terminalen Domäne in Kontakt stehen und über eine deutlich polarere und weniger ausgedehnte Grenzfläche als die Monomere anderer dimerer Proteine verfügen. Die vergleichsweise geringe Interaktion der hufeisenförmigen Untereinheiten läßt ebenso wie ihre räumliche Anordnung im dimeren CENDH-Molekül (erinnert in Seitenansicht an eine „3“, Britton et al., 1998a) vermuten, daß die Monomere abgesehen von eventuellen Stabilitätsproblemen ebenfalls katalytisch aktiv sein könnten. Der evolutive Schritt von einem monomeren Vorläuferprotein zur dimeren CENDH oder von CENDH-ähnlichen dimeren OpDHs zu monomeren Enzymen wie den tierischen Pyruvatoxidoreduktasen scheint daher klein (vgl. 4.3.3).

4.2.2 Nukleotidbindestelle und katalytische Triade

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs verfügen wie die CENDH aus *Arthrobacter spec.* (Britton et al., 1998a), die von Janßen (2000) bzw. Kan-no et al. (1996b, 1998, 1999 und 2005a) untersuchten Invertebraten-ODHs und TaDHs und die übrigen Metazoen-OpDHs aus öffentlichen Sequenzdatenbanken über eine klassische dinukleotidbindende Rossmannfalte (Rossmann et al., 1974; Ohlsson et al., 1974). Das läßt sich zuverlässig prognostizieren, weil diese Pyruvatoxidoreduktasen alle dem Fingerprint entsprechend gefalteter Proteine (Ohlsson et al., 1974; Rossmann et al., 1975; Wierenga und Hol, 1983; Wierenga et al., 1985 und 1986 sowie Bellamacina, 1996) genügen.

Insbesondere findet sich bei allen OpDHs höherer Invertebraten und der CENDH aus *Arthrobacter spec.* in der Loopregion zwischen dem Strang β_1 und der Helix α_1 die glycinreiche Konsensussequenz GXGXXG/A (Abb. 23, S. 95). Der hohe Konservierungsgrad dieses Sequenzmotivs bei klassischen Dinukleotidbindungsdomänen, die den Cofaktor alle in gleicher Orientierung und ähnlicher gestreckter Konformation auf der C-terminalen Seite eines zentralen β -Faltblatts binden (vgl. Ohlsson et al., 1974 und Bellamacina, 1996, aber auch Baici et al., 1974), resultiert daraus, daß eine ausreichende Kompaktheit der ADP-Bindungsfalte ($\beta_1\alpha_1\beta_2$) und ein enger Kontakt zwischen der als Helixdipol wirkenden Helix α_1 und den Phosphatresten des NAD(P)H (Hol, 1978; Wierenga et al., 1985) nur gewährleistet werden können, wenn an bestimmten Stellen keine größeren Reste als Glycin bzw. Alanin positioniert sind (Ohlsson et al., 1974; Wierenga et al., 1985; Baker et al., 1992).

Die terminale Aminosäure der Konsensussequenz (P6) bestimmt nach Baker et al. (1992), ob der Hauptkettenamidstickstoff ihres zweiten Rests (P2) direkt (falls P6 = Alanin) oder indirekt (falls P6 = Glycin) an der Erkennung der Adeninribose beteiligt ist (eine direkte Wasserstoffbrücke zwischen P2 und dem Zuckerrest gebildet wird oder eine Wasserstoffbrücke zwischen der NH-Gruppe von P2 und der Seitenkettencarboxylgruppe eines sauren Restes am C-Terminus des zweiten β -Strangs der ADP-Bindungsfalte entsteht, der seinerseits Wasserstoffbrücken mit der Adeninribose eingeht). Da die Invertebraten-OpDHs und die CENDH aus *Arthrobacter spec.* in dieser Position differieren (Alanin bei den tierischen Enzymen versus Glycin bei der bakteriellen OpDH; Abb. 23, S. 95), unterscheiden sie sich offenbar in der Art ihrer NADH-Bindung. Das wird allerdings dadurch relativiert, daß bei der CENDH nach Britton et al. (1998a) abweichend von der starren Regel von Baker und Mitarbeitern (1992) eine Mischform aus direkter und indirekter Adeninriboseerkennung verwirklicht ist.

Abgesehen vom glycinreichen Motiv zeichnen Proteine mit klassischer Nukleotidbindestelle sich typischerweise durch kleine hydrophobe Aminosäuren an sechs Positionen der Fingerprintregion aus (Wierenga et al., 1985 und 1986). Diese bilden einen hydrophoben Bereich zwischen den beiden β -Strängen und der α -Helix der ADP-Bindungsfalte (Baker et al., 1992) und vermitteln so die Interaktion zwischen diesen Sekundärstrukturelementen. Gemäß ihrer Lage relativ zueinander und zu den genannten Sekundärstrukturelementen (vgl. Wierenga et al., 1985 und 1986) entsprechen den hydrophoben Resten im Fall der CENDH offenbar die Aminosäuren Tyrosin-7, Valin-9, Alanin-20, Leucin-23, Valin-30 und Alanin-32 (Abb. 23, S. 95). Während Tyrosin-7 größer und polarer ist als die üblicherweise an äquivalenter Position auftretenden Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin, Valin, Methionin oder Cystein (Wierenga, 1986; Tyrosin nach Schulz (1982) als Ausnahme möglich), genügen die übrigen fünf Reste exakt dem Fingerprint (Wierenga, 1986). Die CENDH-Reste Phenylalanin-19 und Tyrosin-22, die Janßen (2000) statt Alanin-20 und Leucin-23 dem hydrophoben Kern der ADP-Bindungsfalte zuordnete, können dagegen angesichts ihrer räumlichen Lage auf der von β_1 und β_2 abgewandten Seite der Nukleotidbindungshelix nicht an der Interaktion zwischen dieser Helix und den beiden β -Strängen beteiligt sein. An den zu den CENDH-Resten 7, 9, 20, 23, 30 und 32 homologen Positionen sind auch bei den OpDHs höherer Invertebraten fast durchweg kleine, hydrophobe Aminosäuren konserviert, die nur in Einzelfällen durch die zwar kleinen, jedoch mehr oder weniger polaren Reste Threonin oder Serin ersetzt sind (Abb. 23, S. 95; zur Aminosäureklassifizierung vgl. Taylor, 1986).

Einen negativ geladenen Rest am C-Terminus des zweiten β -Strangs der ADP-Bindungsfalte als drittes Sequenzmerkmal vieler klassischer Nukleotidbindungsdomänen (Ohlsson et

al., 1974; Wierenga et al., 1985 und 1986) weisen die OpDHs des Mollusken- und Annelidentyps im Unterschied zur bakteriellen CENDH (Aspartat-34) nicht auf (Abb. 23, S. 95). Das scheint wenig verwunderlich, da die tierischen Enzyme die Adeninribose des Cofaktors wie oben diskutiert (S. 168) vermutlich direkt, das heißt ohne Wasserstoffbrückenbildung zwischen einem solchen sauren Rest und einer oder mehreren Hydroxylgruppen des Zuckers erkennen. Alternativ könnten die sauren Reste, die bei Invertebraten-OpDHs an den auf das jeweilige Pendant zu Aspartat-34 der CENDH folgenden Positionen konserviert sind (Abb. 23, S. 95), mit der Adeninribose interagieren (vgl. Janßen, 2000, aber auch Müller, 2007). Im Fall der ODH aus *Pseudocardium sachalinensis* (BAD81062) wäre außerdem eine Beteiligung des gemäß Sekundärstrukturprognose an vorletzter Position von β_2 liegenden Aspartatrests (Aspartat-39) möglich.

Als viertes und letztes Fingerprintmerkmal dinukleotidbindender Rossmannfalten gilt ein hydrophiler (Wierenga et al., 1985) oder sogar positiv geladener (Bellamacina, 1996) Rest unklarer Funktion am N-terminalen Ende des ersten β -Strangs. Er findet sich, sofern man von einer ungenauen PROFsec-Vorhersage dieses Sekundärstrukturelements ausgeht (vgl. 4.2.1 und Rost, 2001) in Form eines konservierten Lysins nicht nur bei der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (Lysin-5), sondern auch bei allen in Abb. 23 (S. 95) alinierten Mollusken-OpDHs, während er bei den OpDHs der Anneliden und Sipunculiden fehlt (Spritzwurm-StrDH der vorliegenden Arbeit und TaDH aus *Arabella iricolor*, BAB86769) bzw. wie bei der von Schulz et al. (1982) untersuchten Glutathionreduktase durch Aspartat ersetzt ist (Aspartat-5 der Wattwurm-AloDH).

Da die OpDHs höherer Invertebraten und die bakterielle CENDH fast alle charakteristischen Sequenzmerkmale dinukleotidbindender Proteine mit Rossmannfalte aufweisen, entspricht ihr N-Terminus zweifelsfrei einer klassischen Nukleotidbindungsdomäne und nicht bloß einer konvergent entstandenen Struktur ähnlicher Faltung (Ohlsson et al., 1974; Rossmann et al., 1975; Wierenga und Hol, 1983; Wierenga et al., 1985 und 1986; Bellamacina, 1996; Orengo und Thornton, 2005). Nach Britton et al. (1998a) und 4.2.1, ist von einer LDH-ähnlichen Nukleotidbindungsdomäne der OpDHs auszugehen. Eine solche umfaßt in der Regel zwei pseudo-symmetrische Struktureinheiten mit alternierendem β -Strang- α -Helix-Motiv ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$), die zu einem sechssträngigen parallelen β -Faltblatt mit zwei assoziierten α -Helices auf jeder Seite zusammengelagert sind (Rossmann et al., 1974; Ohlsson et al., 1974; Bellamacina, 1996; die CENDH-Helices α_1 und α_2 liegen bei Orientierung wie in Abb. 26, S. 165 oberhalb des parallelen CENDH-Faltblatts aus β_1 , β_2 , β_5 , β_6 , β_7 und β_8 , die Helices α_3 und α_4 darunter). Die erste $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Einheit klassischer Nukleotidbindungsdomänen ist bei den Mol-

lusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs allerdings möglicherweise zu einer $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2$ -Einheit reduziert (zum offensichtlichen Fehlen von β_5 bei den tierischen Enzymen vgl. 4.2.1). Alternativ könnte bei den tierischen OpDHs abweichend von der CENDH (Abb. 26, S. 165; Britton et al., 1998a), β_3 wie bei klassischen LDH-ähnlichen Dehydrogenasen zum zentralen Faltblatt der Nukleotidbindungsdomäne (zum ersten $\beta\alpha\beta\alpha$ -Motiv) gehören.

Die katalytische Domäne klassischer NAD(P)H-bindender Enzyme unterliegt deutlich größerer Variabilität als die strukturell stark konservierte Nukleotidbindungsdomäne und ermöglicht so die beachtliche Diversität der Reaktionen, die von diesen stets modular aufgebauten Proteinen katalysiert werden können (Ohlsson et al., 1974; Rossmann et al., 1975; Bellamacina, 1996). Allen klassischen Dehydrogenasen ist jedoch gemeinsam, daß die Bindung des Cofaktors und der Substrate und damit die Katalyse im Bereich des Interdomänen-spalts erfolgen (Ohlsson et al., 1974; Bellamacina, 1996). Bakterielle (D,L)-OpDHs wie die CENDH aus *Arthrobacter spec.*, aber auch die Octopin- und Nopalinsynthasen aus *Agrobacterium tumefaciens* (vgl. Einleitung und 4.3.2) weisen nach Britton et al. (1998a) bzw. Monneuse-Doublet und Rouzé (1987) ebenso wie die OpDHs der Mollusken und Anneliden (Janßen, 2000; Kan-no et al., 2005a; Müller, 2007) nicht nur hinsichtlich der von ihnen katalysierten Reaktionen, sondern auch in bezug auf ihren mutmaßlichen Reaktionsmechanismus Ähnlichkeiten zur Enzymfamilie der NAD(P)H-abhängigen L-Laktat- und L-Malatdehydrogenasen auf.

Letztere verfügen stets über eine katalytische Triade aus Histidin (H) und je einem in der linearen Sequenz in Form eines DXXR-Motivs angeordneten Aspartat- und Argininrest (Birktoft und Banaszak, 1983; Monneuse und Rouzé, 1987). Das Histidin-Aspartat-Paar fungiert als Protonenübertragungssystem, das je nach Reaktionsrichtung die Carbonylgruppe des Substrats protonieren oder ein Proton von dessen Hydroxylgruppe aufnehmen kann, während gleichzeitig ein Hydridion vom Dihydronicotinamidring des Coenzym auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe transferiert bzw. vom Substrat auf NAD(P)⁺ übertragen wird (Birktoft und Banaszak, 1983; Clarke et al., 1988 und 1989). Während das Histidin den eigentlichen Säure-Base-Katalysator bildet, stabilisiert das katalytische Aspartat, indem es den pK und damit den Protonierungszustand dieses Restes beeinflußt, den ternären Enzym-substratkomplex und den Übergangszustand des Hydridtransfers (Birktoft und Banaszak, 1983; Clarke et al., 1988 und 1989). Zugleich wird die α -Carboxylgruppe des Substrats durch eine Zwei-Punkt-Interaktion mit der Guanidiniumgruppe des katalytischen Arginins fixiert (Holbrook et al., 1975; Birktoft und Banaszak, 1983).

Monneuse-Doulet und Rouzé (1987) diskutierten ein an die katalytische Triade der L-LDHs und L-MDHs erinnerndes DXXR-Motiv sowie mögliche Kandidaten für ein katalytisches Histidin auch bei Opinsynthesen aus *A. tumefaciens*. Das Motiv wurde zudem bei der CENDH aus *Arthrobacter spec.* identifiziert (D-238-XX-R-241, Dairi und Asano, 1995), scheint jedoch zumindest bei letzterer nicht funktionell relevant zu sein, da die entsprechenden Reste als Teil der Helix α_7 nicht im Bereich des Domänenspalts lokalisiert sind (Britton et al., 1998a; Abb. 26, S. 165). Außerdem fehlt das Motiv an äquivalenter Position aller sequenzierten Invertebraten-OpDHs (Abb. 23, S. 95; Janßen, 2000; Kan-no et al., 2005a). Die katalytische Triade der OpDHs höherer Invertebraten und ihrer bakteriellen Homologen wird statt dessen wohl von den Resten Histidin-202, Arginin-292 und Aspartat-297 (CENDH-Nummerierung) gebildet. Diese sind außer bei der CENDH und anderen bakteriellen (D,L)-OpDHs auch bei den Invertebraten-OpDHs des Mollusken-Annelidentyps einschließlich der neu sequenzierten Alo/StrDHs durchgehend konserviert (Abb. 23, S. 95; Britton et al., 1998a; Janßen, 2000; Kan-no et al., 2005a) und im CENDH-Modell nach Britton et al. (1998a; Abb. 27, S. 173) in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer unidentifizierten Elektronendichte lokalisiert, die nach Ansicht der Autoren vermutlich das aktive Zentrum des Enzyms markiert (vgl. dazu Birktoft und Banaszak, 1983 sowie Phillips et al., 1995). Ihre funktionelle Bedeutung konnte am Beispiel rekombinanter ODH aus *Pecten maximus* durch gerichtete Mutagenese nachgewiesen werden (Müller, 2007). Die klassische DXXR-Signatur der 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen ist somit bei den genannten OpDHs durch ein RXXXXD-Motiv ersetzt.

Die katalytische Triade der CENDH aus *Arthrobacter spec.* und anderer bakterieller (D,L)-OpDHs ist nach Britton et al. (1998a) eng mit je einem konservierten Asparagin-, Tyrosin- und Glutamatrest (CENDH-Positionen 198, 293 und 296) assoziiert (Abb. 23, S. 95). Bis auf Asparagin-198, das sich nur bei den OpDHs der Anneliden und Sipunculiden, nicht jedoch bei Mollusken-OpDHs wiederfindet, sind diese Aminosäuren auch bei den OpDHs höherer Invertebraten durchgehend konserviert (ebenefalls Abb. 23 und Janßen, 2000). Das unterstreicht ihre mutmaßliche funktionelle Relevanz. Während Glutamat-296 der CENDH trotz seiner Zugehörigkeit zur katalytischen Enzymdomäne an der Cofaktorbindung beteiligt zu sein scheint (Britton et al., 1998a), ist die Aufgabe von Tyrosin-293 weniger klar. Aufgrund seiner räumlichen Nähe zum katalytischen Histidin und damit zum reaktiven Zentrum der CENDH (Britton et al., 1998a) läßt sich allerdings spekulieren, daß der aromatische Rest wesentlich zu der für den Hydridtransfer erforderlichen hydrophoben Umgebung (Clarke et al., 1989) beitragen könnte.

Auch hinsichtlich des genauen Reaktionsmechanismus der OpDHs lassen sich trotz der durch ihre Histidin-Arginin-Aspartat-Triade unterstrichenen Ähnlichkeit zum katalytischen Zentrum NAD(P)H-abhängiger L-LDHs und L-MDHs (Holbrook et al., 1975; Birktoft und Banaszak, 1983) nur Vermutungen aufstellen (Müller, 2007; van Os, 2007). Vorstellbar ist, daß als Intermediate, so wie von Grimshaw und Mitarbeitern (1981) bzw. Stillman et al. (1993) für diverse Aminosäuredehydrogenasen postuliert, Carbinolamine und Iminosäuren auftreten (Britton et al., 1998a). Schließlich erinnern die OpDH-katalysierten reduktiven Kondensationsreaktionen zwischen einer α -Keto- und einer Aminosäure (und die zugehörigen Umkehrreaktionen) stark an die reversiblen Aminierungsreaktionen der Aminosäuredehydrogenasen, in die anstelle einer Aminosäure Ammoniak eingeht. Übereinstimmend mit spektroskopischen Daten von Olomucki et al. (1975) und Müller (2007) ist zudem davon auszugehen, daß der katalytische Zyklus der OpDHs wie jener der Glutamatdehydrogenasen (Stillman et al., 1993) mindestens eine durch die Cofaktor- und Substratbindung induzierte Konformationsänderung umfaßt, die mit einer Reduktion der Spaltweite zwischen den beiden Enzymdomänen verbunden ist. Diese könnte einen für die Katalyse unverzichtbaren Ausschluß von Wasser aus dem aktiven Zentrum des Enzyms bewirken (Singh et al., 1993; Stillman et al., 1993; Baker et al., 1998; Müller, 2007), zugleich aber auch erforderlich sein, um nach dem nukleophilen Angriff der Aminosäure auf Pyruvat (oder eine alternative α -Ketosäure) das resultierende Zwischenprodukt in unmittelbare Nachbarschaft zum reduzierten Cofaktor zu bringen (Man beachte, daß in Abwesenheit der Substrataminosäure die räumliche Trennung von α -Ketosäure und NAD(P)H gewährleistet sein muß, um eine Aminosäure-unabhängige Reaktion zu verhindern; Britton et al., 1998a).

4.2.3 Aminosäurespezifität

An der Bindung des Aminosäuresubstrats von OpDHs ist vermutlich generell mindestens ein basischer Enzymrest beteiligt, der mit der α -Carboxylgruppe der Aminosäure (bzw. der Sulfonsäuregruppe von Taurin) zu interagieren vermag. Analog zur Wechselwirkung des katalytischen Arginins mit Pyruvat (oder einer anderen α -Ketosäure, 4.2.2) ist zum Beispiel eine Zweipunktinteraktion mit der Guanidiniumgruppe eines Argininrestes vorstellbar. Als mögliche Kandidaten für eine entsprechende Funktion kommen daher neben den bei allen OpDHs höherer Invertebraten und der CENDH aus *Arthrobacter spec.* konservierten Resten Histidin-17, Histidin-61, Histidin-88 und Lysin-156 insbesondere Arginin-39 und Arginin-143 (jeweils CENDH-Nummerierung) in Frage, die auch bei anderen bakteriellen OpDHs auftreten (Abb. 23, S. 95; Janßen, 2000; Müller, 2007). Letztere zeichnen sich im Fall der

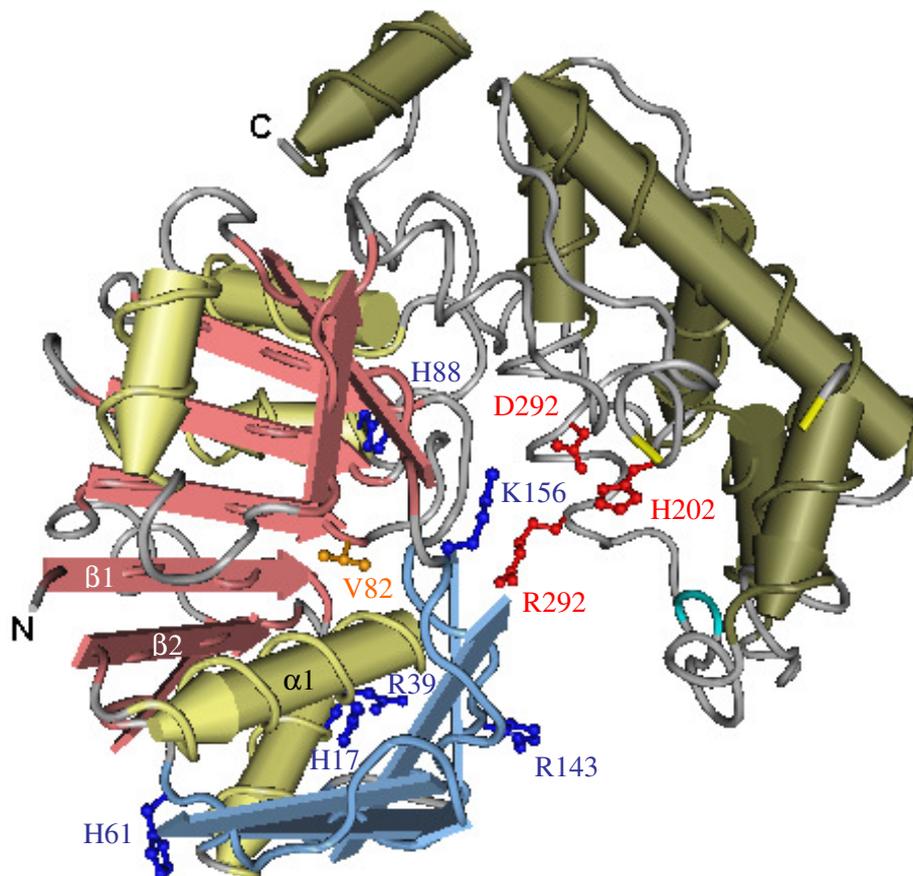


Abb. 27: Katalytische Triade und möglicherweise an der Aminosäurebindung beteiligte Reste der CENDH aus *Arthrobacter spec.*

Die Darstellung des CENDH-Monomers (Britton et al., 1998a; 1bg6) entspricht in Farbwahl und Symbolik weitgehend der aus Abb. 26 (S. 165; Orientierung jedoch leicht modifiziert). Einige Reste sind in Kugel-Stab-Form wiedergegeben. Dazu gehören neben den Resten der katalytischen Histidin-Arginin-Aspartat-Triade (rot), alle basischen CENDH-Reste (blau), die auch bei den OpDHs höherer Invertebraten hochkonserviert sind. Diejenigen von ihnen, die unmittelbar am Interdomänenspalt der CENDH-Untereinheit positioniert sind (Arginin-39, Histidin-88, Arginin-143 und Lysin-156) könnten mit der α -Carboxylgruppe der Substrataminosäure interagieren und so zu deren Bindung beitragen. Dagegen beeinflussen der gelb-orange eingefärbte CENDH-Rest (Valin-82) und seine Äquivalente aus tierischen Alo/StrDHs oder ODHs möglicherweise die Aminosäurepräferenz der verschiedenen OpDHs (nähere Informationen siehe Text). Gelb markiert ist die Lage der CENDH-Reste Tyrosin-259 und Prolin-267, die an einen im Strukturmodell fehlenden Loopabschnitt der CENDH angrenzen. Zwischen den CENDH-Resten Glycin-285 und Prolin-286, deren Position türkis hervorgehoben wurde, sind bei den OpDHs der Mollusken, Anneliden und Sipunculiden offenbar neun bis siebzehn zusätzliche Aminosäuren inseriert (vgl. Abb. 23, S. 95).

CENDH-Untereinheit durch eine relativ exponierte, dem Interdomänenspalt zugewandte Position am distalen Ende des N-terminalem Enzymschenkels aus (Britton et al., 1998a und Abb. 27, S. 173), was eine Interaktion mit dem Aminosäuresubstrat sterisch möglich erscheinen läßt. Gleiches gilt für Histidin-88 und Lysin-153 (ebenfalls CENDH-Nummerierung), das angesichts seiner Lage relativ zum katalytischen Histidin und Arginin und damit zum gebundenen α -Ketosäuresubstrat (Abb. 27, S. 173; mögliche substratinduzierte Konformationsände-

rungen bedenken) statt dessen aber auch zur Polarisierung von dessen Carbonylgruppe beitragen könnte (vgl. basischen Rest dieser Bestimmung bei L-Laktat- und L-Alanindehydrogenasen, Clarke et al., 1989 und Baker et al., 1998).

Welche Reste die unterschiedliche Aminosäurepräferenz der OpDHs determinieren, ist bisher noch völlig unklar (Britton et al., 1998a; Janßen, 2000; Kan-no et al., 2005a; Müller, 2007). Auch die aktuelle Arbeit konnte, obwohl mit den neu sequenzierten OpDHs aus Watt- und Spritzwurm sowie Pazifischer und Europäischer Auster neben ODHs und TaDHs erstmals mehrere eindeutig als solche identifizierte Alo/StrDHs für OpDH-Alinierungen zur Verfügung standen (Abb. 23, S. 95), nur bedingt zum Verständnis der OpDH-Spezifität beitragen (3.9). Die Differenzanalysen der vorliegenden Arbeit fokussierten ähnlich wie jene von Britton et al. (1998a) und Janßen (2000) primär auf positionsspezifische Polaritätsunterschiede zwischen OpDHs, die als Substrat Aminosäuren mit ungeladener Seitenkette wie Glycin, L-Alanin oder L-Norvalin bevorzugen, und ODHs mit ihrer Präferenz für L-Arginin sowie andere bei neutralem pH⁵ positiv geladene Aminosäuren. Schließlich ist zu erwarten, daß sich der Ladungszustand des präferierten Aminosäuresubstrats unmittelbar in der Art der an der Aminosäurebindung beteiligten Reste widerspiegelt. Alo/StrDHs und die CENDH, die neutrale Aminosäuren umsetzen, dürften an entsprechenden Positionen überwiegend hydrophobe Reste aufweisen, ODHs dagegen durch eine deutlich polarere Aminosäurebindungstasche mit einem negativ geladenen Schlüsselrest zur Kompensation der positiven Seitenkettenladung von Arginin charakterisiert sein.

Ein solcher ODH-spezifischer Aspartat- oder Glutamatrest könnte in Analogie zum Arginin-102 der NAD(P)H-abhängigen L-MDHs, das substantiell zu deren Fähigkeit beiträgt, zwischen Laktat und Oxalacetat zu unterscheiden (Wilks et al., 1988), erklären, weshalb einzelne OpDHs in der Regel entweder basische oder neutrale Aminosäuren, aber nur in Ausnahmefällen (Seeanemonen-OpDHs, Ellington, 1979) beide Aminosäuretypen effizient umzusetzen vermögen (3.8 und 4.1.5.3). Letzteres spricht jedenfalls dafür, daß die Seitenkette des Aminosäuresubstrats im OpDH-Substratkomplex unmittelbar mit dem Enzym interagiert und nicht solvatisiert in Kontakt zum Umgebungsmedium verbleibt. Eine Ladungspaarung zwischen einem sauren ODH-Rest und der Guanidiniumgruppe des Substratarginins könnte zudem ursächlich dafür sein, daß ODHs sich typischerweise durch eine weit höhere Affinität zu ihrem präferierten Aminosäuresubstrat auszeichnen als Alo/StrDHs, die mit der Seitenkette ihrer

⁵ entspricht ungefähr dem intrazellulären pH mariner Invertebratengewebe (Pörtner et al., 1984a; Haas, 2000; Michaelidis et al., 2005)

Substrataminosäure(n) keine derartige Wechselwirkung einzugehen vermögen (apparenter Km-Wert der ODHs für L-Arginin in der Regel etwa 1 mM, apparente Km-Werte der Alo/StrDHs für Glycin bzw. L-Alanin dagegen häufig zwischen 10 und 50 mM, vgl. Livingstone et al., 1983; Km-Wert der CENDH für L-Norvalin mit 2 mM allerdings ähnlich gering wie der vieler ODHs, Kato et al., 1996).

Ein negativ geladener Enzymrest, der bei allen verfügbaren Invertebraten-ODHs konserviert, bei den Alo/StrDHs und der CENDH aus *Arthrobacter spec.* jedoch durch einen ungeladenen Rest ersetzt ist, konnte ausgehend von der Alinierung in Abb. 23 (S. 95) nicht identifiziert werden. Zudem fand sich nur eine einzige Position (20 nach CENDH-Nummerierung), an der bei allen Alo/StrDHs und der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (sowie bei den TaDHs aus *Arabella iricolor* und *Haliothis discus hannai*) ein hydrophober (Alanin), bei den Invertebraten-ODHs dagegen ein hydrophiler Rest (Serin oder Threonin) konserviert ist. Da es sich dabei um eine im Zentrum der ADP-Bindungshelix (α_1) gelegene Position handelt, die entsprechend dem Fingerprint klassischer Dinukleotidbindungsproteine mit einer hydrophoben, in Richtung der parallelen β -Stränge β_1 und β_2 orientierten Aminosäure besetzt sein sollte (4.2.2), der zugehörige Rest also nicht im Bereich des Interdomänenspalt mit dem mutmaßlichen katalytischen Zentrum lokalisiert ist, dürfte eine grundlegende Bedeutung dieser Position für die Aminosäurespezifität der OpDHs allerdings auszuschließen sein.

Diesbezüglich interessanter erscheint der am C-Terminus des Strangs β_6 gelegene Rest (Position 82 gemäß CENDH-Nummerierung; in Abb. 23, S. 95 mit der Ziffer 1 markiert), der im dreidimensionalen Strukturmodell der CENDH (Britton et al., 1998a) gegenüber vom katalytischen Arginin unmittelbar am Interdomänenspalt positioniert ist (Abb. 27, S. 173). Während hier sowohl bei der CENDH als auch bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs ein hydrophober Rest (Valin oder Isoleucin) konserviert ist, weisen die ODHs höherer Invertebraten an dieser Stelle einen hydrophilen Rest (Threonin oder Cystein) auf (Abb. 23, S. 95). Daß letzteres auch für die angebliche AloDH aus *Fusitriton oregonensis* gilt, ist wenig aussagekräftig, da die Aminosäurespezifität dieses Enzyms im Unterschied zu den Substratpräferenzen der in der aktuellen Arbeit sequenzierten bzw. von Dairi und Asano (1995), Kato et al. (1996; jeweils CENDH aus *Arthrobacter spec.*), Janßen (2000, ODH aus *Pecten maximus*) sowie Kan-no und Mitarbeitern (2005a, TaDH aus *Arabella iricolor*) charakterisierten OpDHs nicht experimentell verifiziert wurde (vgl. S. 159).

Die Relevanz der Position für die Aminosäurespezifität der OpDHs vom Mollusken-Anneliden-Typ wird aber dadurch in Frage gestellt, daß Müller (2007) die Substratpräferenz rekombinanter *Pecten*-ODH durch gerichtete Mutagenese des entsprechenden Rests nicht mo-

difizieren konnte und die TaDHs aus *A. iricolor* und *H. discus hannai* dort wie die ODHs einen hydrophilen Rest aufweisen. Schließlich liegt Taurin unter physiologischen Bedingungen fast vollständig in Form von Zwitterionen mit ausgeglichener Nettoladung vor und unterscheidet sich von Glycin außer durch seine andere Säurefunktion (Sulfonsäure- statt Carboxylgruppe) nur dadurch, daß zwischen das α -Kohlenstoffatom und die Aminogruppe eine zusätzliche Methylengruppe inseriert ist (vgl. S. 153). Daher sollte die Polarität der an der Aminosäurebindung beteiligten TaDH-Reste eher mit der entsprechender Alo/StrDH- und CENDH-Reste übereinstimmen. Angesichts der ungewöhnlichen Stereochemie von Taurin ist allerdings davon auszugehen, daß die räumliche Lage der katalytisch relevanten bzw. an der Substratbindung beteiligten TaDH-Reste von der Geometrie im aktiven Zentrum etwa der Alo/StrDHs abweicht. Darauf deuten auch die meist enge Substratspezifität von TaDHs und die Tatsache hin, daß umgekehrt OpDHs wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Alo/StrDHs Taurin fast gar nicht umzusetzen vermögen (3.8; Abb. 18, S. 84 und 4.1.5.3). Insofern könnte das unerwartete Auftreten von Threonin an der zu Valin-82 der CENDH homologen Position der TaDHs damit zu erklären sein, daß diese Enzyme sich hinsichtlich der Position spezifitätsdeterminierender Reste grundsätzlich von den übrigen OpDHs unterscheiden.

Position 82 (CENDH-Nummerierung) entspricht der einzigen von Britton et al. (1998a) bzw. Janßen (2000) vermuteten OpDH-Positionen (in der Alinierung aus Abb. 23, S. 95 mit den Ziffern 1 bis 8 markiert), an der sich ein Polaritätswechsel in Abhängigkeit von der Aminosäurepräferenz der OpDHs nicht aufgrund neuerer Datenbanksequenzen bzw. der im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs ausschließen läßt. Daß an den mit den Ziffern 2, 5 und 7 gekennzeichneten Positionen des Alignments aus Abb. 23 (S. 95) unabhängig von der Aminosäurespezifität der einzelnen OpDHs fast durchweg der gleiche Rest konserviert ist, deutet zwar vor allem deshalb, weil sie in Loopregionen liegen, wo eine Konservierung aus strukturellen Gründen unwahrscheinlich ist (Taylor, 1986), auf eine funktionelle Bedeutung hin, zeigt aber zugleich, daß diese Reste nicht die Aminosäurespezifität der OpDHs determinieren (vgl. Müller, 2007). Interessanterweise weicht die *Crassostrea*-AloDH2 (Abb. 30, S. 288) gerade dadurch von den übrigen OpDHs höherer Invertebraten ab, daß bei ihr die hoch konservierten Reste Glutamin und Histidin in den Positionen 2 und 7 vertauscht sind (Abb. 23, S. 95). Es liegt nahe, einen Zusammenhang zwischen diesen Substitutionen und der mäßigen katalytischen Aktivität der *Crassostrea*-AloDH2 (3.8, Abb. 18, S. 84 und 4.1.5.3) zu vermuten. Eventuell sichert nur die Doppelmutation überhaupt eine gewisse Aktivität des Enzyms, während die entsprechenden Einfachmutanten katalytisch inaktiv wä-

ren. Auch die Alignmentpositionen 6 sowie 3 (siehe Müller, 2007), 4 und 8, an denen alle in Abb. 23 (S. 95) verglichenen OpDHs einen hydrophoben Rest aufweisen bzw. ihre Hydrophathie ohne erkennbares Muster variiert, scheinen die Aminosäurepräferenz der einzelnen OpDHs nicht zu beeinflussen.

Ein besonderes Augenmerk der Spezifitätsanalysen richtete sich auch auf die Reste, die im Modell der CENDH-Untereinheit fehlen (Lysin-260 bis Serin-266 der CENDH, in Abb. 23, S. 95 unterstrichen, Position der angrenzenden Reste in Abb. 27, S. 173 gelb hervorgehoben). Schließlich deutet die Tatsache, daß sie bei der Röntgenstrukturanalyse von Britton et al. (1998a) trotz der ansonsten hohen Qualität der Strukturdaten nicht erfaßt werden konnten, auf eine große Beweglichkeit dieser Reste hin (siehe S. 166; Rhodes, 2000). Die entsprechenden Aminosäuren könnten somit Teil eines CENDH-Loops sein, der sich ähnlich wie der flexible Loop der L-LDHs (Ohlsson et al., 1974; Bellamacina, 1996) nach der Cofaktor- oder auch erst nach der Substratbindung über der Bindungstasche des Enzyms schließt und damit zu der bereits unter 4.2.2 (S. 172) diskutierten Konformationsänderung beiträgt. Da ein solcher „induced fit“ für die Substraterkennung wichtige Gruppen ins aktive Zentrum des Enzyms bringen und damit für eine komplette Solvatisierung des Substrats durch das Enzym und eine hohe Substratdiskriminität sorgen könnte (vgl. Wilks et al. (1988), die dies am Beispiel einer L-LDH aus *Bacillus stearothermophilus* erörterten), wäre in diesem Fall zu erwarten, daß die beteiligten Reste in Abhängigkeit von der Aminosäurespezifität der jeweiligen OpDH variieren.

Das ließ sich anhand der Alinierung aus Abb. 23 (S. 95) jedoch nicht manifestieren. Im fraglichen Sequenzabschnitt wurden weder spezifitätskorrelierte Polaritätsunterschiede noch signifikante Größenabweichungen oder sonstige je nach Aminosäurepräferenz der OpDHs differierende Merkmale erkannt. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß die OpDHs höherer Invertebraten im entsprechenden Sequenzbereich grundsätzlich von der CENDH aus *Arthrobacter spec.* abweichen (Abb. 23, S. 95 und 4.2.1). Speziell deshalb, weil katalytisch relevante bzw. an der Substratbindung beteiligte Enzymreste meist außerhalb regelmäßiger Sekundärstrukturelemente liegen (Rost, 2001), für die tierischen OpDHs im Bereich des mutmaßlich flexiblen CENDH-Loops aber eine helikale Struktur vorhergesagt wurde (4.2.1), läßt sich spekulieren, daß die für den CENDH-Loop postulierte Funktion bei den Invertebraten-OpDHs durch einen anderen Enzymabschnitt wie etwa die bei der CENDH fehlende Insertion zwischen den Resten Glycin-285 und Prolin-286 (letztere in Abb. 27, S. 173 türkisfarben hervorgehoben, vgl. auch Abb. 23, S. 95) erfüllt werden könnte.

Obwohl im Bereich dieser Insertion keine strikt mit der Aminosäurespezifität der Invertebraten-OpDHs variierenden Sequenzmerkmale identifiziert werden konnten, scheint der Konservierungsgrad der einzelnen Reste auffällig hoch für eine Loopregion. Das könnte wie die zentrale Lage der angrenzenden Reste im 3D-Modell der CENDH-Untereinheit (Abb. 27, S. 173; Britton et al, 1998a) für eine tatsächliche funktionelle Bedeutung des Sequenzabschnitts bei den OpDHs des Mollusken- und Annelidentyps sprechen. Möglicherweise bestehen zwischen den Insertionen der verschiedenen tierischen OpDHs subtile Unterschiede (man beachte, daß gleichartige Reste des Insertionsbereichs bei den einzelnen Enzymen zum Teil um eine Alignmentposition verschoben auftreten, Abb. 23, S. 95), deren strukturelle Auswirkungen auf die Bindungstasche und damit die Aminosäurespezifität der Pyruvatoxidoreduktasen gegenwärtig mangels dreidimensionaler Strukturdaten bloß nicht zu verstehen sind.

Die angesprochene Insertion erscheint auch deshalb interessant, weil sie bei der Wattwurm-AloDH mit ihrer ausgeprägten L-Alanin-Präferenz (unter Testbedingungen wie unter 2.5.1 mindestens 10-mal höhere AloDH- als StrDH-Aktivität, vgl. Abb. 18, S. 84; apparente Km-Werte für L-Alanin und Glycin in Gegenwart von 3 mM Pyruvat und 0,16 mM NADH nach Feyen (2006) etwa 19 bzw. 1569 mM) sechs bis sieben Aminosäuren mehr umfaßt als bei den übrigen Invertebraten-OpDHs aus Abb. 23 (S. 95). Da die anderen in der vorliegenden Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs sich bei entsprechenden Messungen durchweg durch eine weit geringere Vorliebe für L-Alanin auszeichneten (unter den verwendeten Testbedingungen maximal dreimal mehr AloDH- als StrDH-Aktivität) oder wie jene aus *O. edulis* und *S. nudus* sogar Glycin als Aminosäuresubstrat bevorzugten (Abb. 18, S. 84, Tab. 5, S. 90 und 4.1.5.3), läßt sich spekulieren, daß die verlängerte Loopregion zwischen den Helices α_8 und α_9 entscheidend zur Präferenz der Wattwurm-AloDH für ein größeres Aminosäuresubstrat beitragen könnte. Sofern der fragliche Sequenzbereich tatsächlich einem flexiblen Loop entspricht, der sich nach der Substratbindung über dem aktiven Zentrum der Invertebraten-OpDHs schließt, könnte der im Vergleich zu anderen Alo/StrDHs längere Loop der Wattwurm-AloDH deren geschlossene Bindungstasche so vergrößern, daß das kleine Glycin deutlich weniger gut als L-Alanin mit seiner größeren Seitenkette umgesetzt werden kann. Daß die Invertebraten-ODHs mit L-Arginin trotz einer kurzen „Insertionsschleife“ eine noch weit größere Substrataminosäure als L-Alanin bevorzugen, muß dem nicht zwangsläufig widersprechen. Schließlich könnte die lokale Geometrie der ODHs sich von jener der Alo/StrDH unterscheiden.

Die Hypothese einer mit der Länge des mutmaßlichen Substratbindungsloops korrelierenden L-Alanin- bzw. Glycin-Präferenz von Alo/StrDHs läßt sich auch durch die kürzlich von Schäfer (2007) sequenzierte Str/AloDH aus *A. marina* (CAL90921; siehe S. 143) unter-

mauern, bei der die möglicherweise AloDH-spezifischen, zusätzlichen Reste der fraglichen Loopregion wie bei anderen Alo/StrDHs mit verhältnismäßig hoher StrDH-Aktivität fehlen. Diese StrDH weist außerdem wie die übrigen Alo/StrDHs aus Abb. 23 (S. 95) an der zu Lysin-30 der Wattwurm-AloDH äquivalenten Position einen Prolinrest auf. Somit könnte auch die Substitution von Prolin-30 gegen Lysin zur ausgeprägten L-Alanin-Präferenz der Wattwurm-AloDH beitragen. Obwohl dieser Rest im Loopbereich zwischen der Nukleotidbindungshelix (α_1) und dem zweiten β -Strang der ADP-Bindungsfalte (β_2) und damit weit vom Interdomänenspalt entfernt lokalisiert ist (vgl. Abb. 27, S. 173), könnte gerade der Austausch eines Prolinrests (spezielle Geometrie dieser Aminosäure beachten) die Hauptkettenkonformation des Enzyms lokal so deutlich verändern, daß sich dies im Sinne einer gewissen Feinabstimmung mittelbar auch auf die in größerer Entfernung gelegene Bindungstasche auswirkt (MacArthur und Thornton, 1991; Golding und Dean, 1998).

Letztlich wird sich die Frage nach der molekularen Basis der Aminosäurespezifität von Mollusken-, Anneliden- oder Sipunculiden-OpDHs ohne Kenntnis der dreidimensionalen Struktur wenigstens einer derartigen Pyruvatoxidoreduktase und eine zumindest ungefähre Vorstellung von der Positionierung der gebundenen Substrate wohl nicht wirklich klären lassen (vgl. Golding und Dean, 1998). Der Einfluß von Größenunterschieden zwischen äquivalenten OpDH-Resten auf die Geometrie des jeweiligen katalytischen Zentrums dürfte ausgehend von bloßen Sequenzalinierungen ebenso wie andere subtile Differenzen, welche die Beschaffenheit der Bindungstasche und damit die Aminosäurepräferenz der Enzyme beeinflussen könnten, noch schwerer einzuschätzen sein als Ladungs- und Polaritätsunterschiede. Das gilt um so mehr, als es dabei entscheidend auf das Zusammenspiel mehrerer, in der linearen Sequenz möglicherweise weit entfernt liegender Reste ankommen könnte. Gerade weil die OpDHs höherer Invertebraten sich augenscheinlich durch einen recht großen Freiheitsgrad auszeichnen (siehe S. 145 und S. 161), drohen die wenigen adaptiven Substitutionen (vgl. Golding und Dean, 1998) bei eindimensionalen Sequenzvergleichen im Rauschen funktionell irrelevanter Variabilität unterzugehen. Außerdem korreliert die relativ breite Substrattoleranz etwa der in der vorliegenden Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs (sie setzten mit Ausnahme der generell nur wenig aktiven *Crassostrea*-AloDH2 neben Glycin, L-Alanin, L-Norvalin und β -Alanin alle auch andere L-Aminosäuren wie vor allem L-Cystein, L-Serin, L-Valin und L-Threonin um; 3.8, Abb. 18, S. 84 und nicht dargestellte Ergebnisse) offenbar mit einer vergleichsweise geringen Aminosäureaffinität (siehe S. 175), was auf eine geringe Interaktion zwischen diesen Enzymen und ihrem Aminosäuresubstrat hindeutet (vgl. ähnliche Argumen-

tation von Goodman et al., 2004 und Kan-no et al., 2005a) und die Detektion spezifitätsrelevanter OpDH-Reste zusätzlich erschweren dürfte.

Die Röntgenkristallstruktur der mit NAD^+ kokristallisierten CENDH aus *Arthrobacter spec.* (Britton et al., 1998a, 1bg6) stellt, abgesehen von offensichtlichen lokalen Unterschieden zwischen dem bakteriellen Enzym und den OpDHs höherer Invertebraten (Abb. 23, S. 95; 4.2.1 und 4.2.2), insbesondere deshalb nur einen unzureichenden Ersatz für fehlende Strukturdaten tierischer OpDHs dar, weil die Aminosäurebindestelle des Bakterienenzym nicht experimentell charakterisiert wurde und die postulierte Konformationsänderung im Verlauf des katalytischen Zyklus der OpDHs (4.2.2 und S. 177) den Radius um das mutmaßliche aktive Zentrum erweitert, innerhalb dessen nach spezifitätsrelevanten Resten gesucht werden muß. Schließlich ist unklar, welche Reste bei einer substratinduzierten Konformationsänderung gegeneinander verschoben und welche im binären CENDH-NADH-Komplex weit entfernten Reste dadurch möglicherweise in unmittelbare Nähe zum aktiven Zentrum gebracht werden. Immerhin können substratinduzierte Konformationsänderungen die Position einzelner Enzymreste nach Beobachtungen von Stillman und Mitarbeitern (1993) unter Umständen um mehr als 10 Å verschieben. Wilks et al. (1988) diskutierten daher ein fehlendes Verständnis der intramolekularer Mobilität als zentrale Ursache dafür, daß viele in der Literatur beschriebene Versuche, die Substratspezifität eines Enzyms auf molekularer Ebene zu verstehen und gezielt zu modifizieren, sogar trotz verfügbarer Strukturdaten für das jeweilige Apoenzym scheiterten.

Das phylogenetische Netz aus Abb. 24 (S. 98) deutet zudem darauf hin, daß sich Invertebraten-OpDHs spezieller Aminosäurepräferenz mehrfach unabhängig aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym entwickelten (4.3.1). Deshalb können Versuche, ODH-, Alo/StrDH- oder TaDH-spezifische Merkmale durch Vergleich von Invertebraten-OpDHs eines möglichst breiten phylogenetischen Spektrums abzuleiten, wahrscheinlich gar nicht erfolgreich sein. Schließlich dürfte eine Anpassung der OpDH-Spezifität an die Zusammensetzung des Aminosäurepools im Gewebe (Gäde, 1988) oder sonstige Selektionsfaktoren in unabhängigen Entwicklungslinien auf unterschiedliche Weise erfolgt sein (vgl. Golding und Dean, 1998), so daß die Aminosäurepräferenz etwa der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Austern-Alo/StrDHs möglicherweise eine ganz andere molekulare Grundlage besitzt als die der Alo/StrDHs aus *A. marina* und *S. nudus*. Obwohl in der Regel Alinierungen homologer Enzyme unterschiedlichster Herkunft die größte Chance bieten, funktionell relevante Reste zu detektieren, könnte es bei der Suche nach spezifitätsdeterminierenden OpDH-Resten erfolg-

versprechender sein, OpDHs differierender Aminosäurepräferenz aus nah verwandten Arten zu vergleichen.

Dazu sind allerdings mehr OpDH-Sequenzen erforderlich als bislang verfügbar. Schließlich kann die Signifikanz von Sequenzunterschieden nur beurteilt werden, wenn jeweils mehrere OpDHs einer Spezifität pro Vergleichsgruppe (zum Beispiel Tierstamm oder Klasse) zur Verfügung stehen. Das ist bisher nur für Mollusken-Alo/StrDHs und -ODHs gewährleistet (Abb. 23, S. 95), deren Gegenüberstellung sich als wenig aufschlußreich erwies (Ergebnisse nicht explizit dargestellt). Anneliden- oder Sipunculiden-ODHs, die zwar wenig verbreitet sind (Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a; Hammen und Fielding, 1993), durch Vergleich mit den Alo/StrDHs aus *A. marina* und *S. nudus* oder der TaDH aus dem Sandwurm, *A. iricolor*, aber möglicherweise entscheidend zum Verständnis der Spezifität entsprechender OpDHs beitragen könnten, wurden bisher noch nicht sequenziert. Von besonderem Interesse für zukünftige Arbeiten erscheint daher die Primärsequenz einer Spritzwurm-ODH. Schließlich bietet sich durch die Koexistenz von ODHs und Alo/StrDHs in den Geweben von *S. nudus* (Kreutzer, 1987; Abb. 2, S. 50; Abb. 3, S. 52 und 4.1.1) die Gelegenheit, zwei möglicherweise sehr nah verwandte OpDHs stark gegensätzlicher Aminosäurespezifität zu untersuchen.

4.3 Evolution von Invertebraten-OpDHs

Da die Vielfalt der bei marinen Invertebraten auftretenden Pyruvatoxidoreduktasen die Frage nach ihrer Entstehungsgeschichte und den Verwandtschaftsverhältnissen zwischen den OpDHs unterschiedlicher Substratspezifität und Stammeszugehörigkeit aufwirft, bildeten phylogenetische Analysen, die zum Verständnis der OpDH-Evolution beitragen sollten, einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

4.3.1 Phylogenetische Beziehungen zwischen Invertebraten-OpDHs

Eine immunologische Ähnlichkeit konnte nur zwischen Invertebraten-ODHs aus nah verwandten Arten, nicht jedoch zwischen OpDHs aus phylogenetisch weniger nahestehenden Spezies nachgewiesen werden (Baldwin, 1982 und Fort et al., 1982). Gäde und Grieshaber (1986) glaubten daher nicht an eine Verwandtschaft zwischen ODHs und sonstigen Invertebraten-OpDHs. Erst spätere Sequenzanalysen von Janßen (2000), Kimura et al. (2005), Kanno et al. (2005a) und Müller (2007) zeigten, daß die ODHs und TaDHs der Mollusken- und Anneliden (zumindest die aktuell bekannten, vgl. Einleitung) einen gemeinsamen Ursprung besitzen. Gemäß der N-terminalen Sequenzübereinstimmung zwischen einer β -AloDH und

einer TaDH aus der Napfschnecke *Cellana grata* gehören die β -AloDHs der Mollusken möglicherweise zur gleichen Verwandtschaftsgruppe (Kan-no et al., 1999). Ob dies auch für Alo/StrDHs aus Mollusken, Anneliden oder anderen Invertebraten gilt, war bisher allerdings völlig offen. Sequenzierte und eindeutig als solche identifizierte AloDHs oder StrDHs standen nicht zur Verfügung (vgl. 4.1.5.1 und 4.1.5.3). Ihre Verwandtschaft untereinander sowie zu den tierischen OpDHs anderer Substratspezifität wurde vielmehr dadurch in Frage gestellt, daß Kan-no et al. (2005b) aus dem Schwamm *Halichondria japonica* eine TaDH ohne signifikante Sequenzähnlichkeit zu den Mollusken- und Anneliden-OpDHs aus öffentlichen Datenbanken isolierten. Entgegen der Hypothese diverser Autoren (Sato et al., 1993a; Urich, 1990; Kan-no et al., 1996b und 2005a; Janßen, 2000) sind somit nicht alle Invertebraten-OpDHs homolog, sondern es existieren mindestens zwei unabhängige Entwicklungslinien tierischer OpDHs.

Eine Bestätigung für die Zugehörigkeit von Alo/StrDHs zur Enzymfamilie der Mollusken-Anneliden-OpDHs (vgl. Kan-no et al., 2005b) lieferten erst die Sequenzierungen und Expressionsversuche der vorliegenden Dissertation und die anschließenden Diplomarbeiten von Primaßin (2005; Sequenzierung und heterologe Expression einer wenig aktiven Spritzwurm-AloDH, AM158253, Datenbankeintrag noch vertraulich; vgl. 3.10) und Schäfer (2007; Sequenzierung und heterologe Expression einer Wattwurm-StrDH, AM418448, Datenbankeintrag ebenfalls noch nicht öffentlich; S. 143). Angesichts paarweiser Aminosäuresequenzidentitäten von mindestens 33 % (meist mehr als 40 %) zwischen den in ihrem Rahmen sequenzierten Alo/StrDHs aus *A. marina*, *S. nudus*, *C. gigas* und *O. edulis* sowie den in öffentlichen Sequenzdatenbanken verfügbaren ODHs und TaDHs höherer Invertebraten einschließlich der OpDH unsicherer Aminosäurespezifität aus *Fusitriton oregonensis* (Tab. 6, S. 92 und S. 159) und den erst vor kurzem publizierten OpDHs aus dem Blutkieferwurm, *Marphysa sanguinea* (AB278571 und AB278572; in Tab. 6, S. 92 nicht erfaßt), kann an der Verwandtschaft dieser OpDHs kein Zweifel bestehen (Brenner et al., 1998; Rost, 1999). Das gilt um so mehr, als sich auf Nukleotidebene ähnlich hohe Sequenzübereinstimmungen fanden (Ergebnisse nicht dargestellt) und multiple Sequenzalinierungen wie die aus Abb. 23 (S. 95; vor allem solche ohne die bakterielle CENDH) über ihre gesamte Länge konservierte Sequenzmotive erkennen lassen (4.2.1 und 4.2.2). Vermutlich besitzen alle Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs gleich welcher Substratspezifität einen gemeinsamen Vorläufer.

Zur näheren Analyse der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den verfügbaren OpDHs höherer Invertebraten wurden Neighbor-Netze nach Bryant und Moulton (2004) erstellt (2.7.4 und 3.10). Solche bieten gegenüber herkömmlichen dichotomen Stammbäumen

den Vorteil, daß in ihnen auch widersprüchliche Signale eines Datensatzes dargestellt werden können. Damit liefern sie ein deutlich besseres Abbild der Wirklichkeit als bifurzierende Graphen. Schließlich verläuft die evolutive Geschichte eines Gens nicht immer baumartig. Vielmehr können Rekombination, lateraler Gentransfer oder andere biologische Phänomene dazu führen, daß verschiedene Teile eines Gens unterschiedliche Genbäume stützen (Penny et al., 1993; Gribaldo und Philippe, 2002; Bryant und Moulton, 2004). Widersprüchlichkeiten können aber auch aus Unzulänglichkeiten der verwendeten Baumkonstruktionsverfahren bzw. einer fehlerhaften Berechnung paarweiser phylogenetischer Distanzen resultieren (Gribaldo und Philippe, 2002; Bryant und Moulton, 2004).

Fehler bei der Distanzberechnung sind selbst bei korrekter Alinierung der in die Verwandtschaftsanalysen einbezogenen Sequenzen nicht auszuschließen, da die Sequenzmuster, die auf eine gemeinsame Abstammung zurückzuführen sind, von anderen (zum Beispiel durch Konvergenz entstandenen) Signalen überlagert werden können (Penny et al., 1993; Foster und Hickey, 1999; Gribaldo und Philippe, 2002). Vor allem beim Vergleich entfernt verwandter Sequenzen finden sich oft völlig verrauschte Positionen, an denen infolge einer Sättigung durch Mehrfachmutationen das Auftreten der einzelnen Basen oder Aminosäuren einer Zufallsverteilung unterliegt (Gribaldo und Philippe, 2002). Obwohl derartige Alignmentpositionen eigentlich kein verwertbares Signal liefern und damit eine Sterntopologie stützen sollten, können Verzerrungen wie eine ungleiche Nukleotid- bzw. Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Sequenzen sowie sequenz- oder positionsspezifisch variierende Substitutionsraten fälschlich zu einem aufgelösten Stammbaum führen (Penny et al., 1993; Steel et al., 1993; Foster und Hickey, 1999; Gribaldo und Philippe, 2002). Im Extremfall werden mit hoher statistischer Signifikanz falsche Verwandtschaftshypothesen erhalten (Penny et al., 1993; Lockhart et al., 1994 und 1996; Foster und Hickey, 1999).

Systematische Distanzberechnungsfehler sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des LogDet-Algorithmus nach Tamura und Kumar (2002) umgangen werden (2.7.4). Dieser liefert nach Angaben der Autoren für asymmetrisch evolvierende Proteine zuverlässigere Ergebnisse als herkömmliche phylogenetische Methoden oder andere LogDet-Verfahren (vgl. zum Beispiel Lockhart et al., 1994 oder Lake, 1994). Um außer Fehlern durch heterogene Substitutionsmuster bzw. eine differierende Nukleotid- und Aminosäurezusammensetzung einzelner Sequenzen auch mögliche Artefakte durch positionsspezifisch variierende Evolutionsraten (solche manifestieren sich insbesondere in unveränderlichen Resten) zu minimieren, wurden bei einigen Analysen alle invarianten Alignmentpositionen ausgeschlossen (Lockhart et al., 1996; Thollesson, 2004). Dennoch können Netze wie das aus Abb. 24 (S. 98)

letztlich nur Verwandtschaftshypothesen begründen. Splits (2.7.4), die bloß durch Kanten geringer Länge gestützt werden, und stark netzartige Teilbereiche, die auf viele inkompatible Signale hindeuten, sollten nicht überinterpretiert werden.

Zu den unzweifelhaften Erkenntnissen, die sich aus dem Neighbor-Netz tierischer OpDHs (Abb. 24, S. 98) ableiten lassen, gehört die nahe Verwandtschaft der OpDHs aus *A. marina*, *A. iricolor* und *S. nudus*. Die in das Netz einbezogenen Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs sind untereinander eindeutig näher verwandt als mit allen verglichenen Mollusken-OpDHs, was nicht zuletzt deshalb interessant ist, weil die phylogenetische Stellung der Sipuncula bis heute kontrovers diskutiert wird. Es gibt sowohl Hinweise, die für eine nahe Verwandtschaft zu den Mollusken sprechen, als auch Merkmale, die eine engere Beziehung der Sipunculiden und Anneliden vermuten lassen (Schulze et al., 2005). Da sich nur orthologe Gene für die Rekonstruktion von Artenstambäumen eignen, während der Vergleich von Paralogen (durch Genduplikation entstandenen Homologen) zur Annahme falscher Art-Divergenzzeiten führen kann (Wägele, 2001), vermögen OpDHs, in deren Evolution es offenbar wiederholt zu Genduplikationen kam (siehe unten, 4.1.4.2, 4.1.4.3, 4.1.5.2 und 4.1.5.3), allerdings nicht wirklich zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Sipunculiden, Anneliden und Mollusken beizutragen.

Unter den Mollusken-OpDHs aus dem Neighbor-Netz in Abb. 24 (S. 98) bilden außer den Enzymen aus den Schnecken *H. discus hannai* und *F. oregonensis* vor allem die ODHs der Kopffüßer eine distinkte Verwandtschaftsgruppe. Letzteres wurde bereits von Janßen (2000) festgestellt. Die lange Kante, welche die ODHs aus *L. vulgaris* und *S. officinalis* von allen anderen tierischen OpDHs trennt, läßt sich gut mit den Ergebnissen der oben erwähnten immunologischen Studien vereinbaren (S. 181), die ebenfalls auf eine geringe Ähnlichkeit zwischen Cephalopoden-ODHs und OpDHs anderer Herkunft schließen ließen (Fort et al., 1982; Baldwin et al., 1982). Auch proteinbiochemische Arbeiten, die das Vorkommen hochspezialisierter ODH-Isozyme bei Kalmaren dokumentierten (Fields et al., 1976a; Storey, 1977b oder Storey und Storey, 1979), scheinen gut kompatibel mit einer großen phylogenetischen Distanz zwischen Cephalopoden-ODHs und sonstigen Mollusken-OpDHs.

Anders als die OpDHs der Gastropoden und Kopffüßer treten Bivalvia-OpDHs an verschiedenen Stellen des Netzes auf (Abb. 24, S. 98). Auffällig ist vor allem die Stellung der ODH aus der Pilgermuschel, *P. maximus*. Das durch einen relativ stark gewichteten Split (in Abb. 24 rot hervorgehoben) von allen anderen Mollusken-OpDHs separierte Enzym entspricht unter den sequenzierten Weichtier-OpDHs offenbar derjenigen, die am nächsten mit den OpDHs der Anneliden und Sipunculiden verwandt ist. Ob sich die zur *Pecten*-ODH bzw.

den Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs führenden Entwicklungslinien tatsächlich erst nach Abspaltung der Linien trennten, aus denen die übrigen Mollusken-OpDHs hervorgingen, erscheint allerdings aufgrund eines Alternativsignals, das die *Pecten*-ODH unmittelbar mit diversen Weichtier-Enzymen gruppiert (in Abb. 24 gelb-orange markiert), unsicher. Auch das zuletzt genannte Signal stellt die Pilgermuschel-ODH nicht etwa zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Austern-Alo/StrDHs, wie dies wegen der vergleichsweise nahen Verwandtschaft von *P. maximus* und den beiden Ostreiden *C. gigas* und *O. edulis* (alles Filibranchia) erwartet werden könnte, sondern spricht für eine phylogenetische Nähe der *Pecten*-ODH zu den OpDHs aus Schnecken, Kopffüßern und der Muschel *P. sachalinensis* (letztere gehört zu den Eulamellibranchiern). Angesichts der geringen Gewichtung des Splits und der schlechten Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Gastropoden-, Cephalopoden- und Bivalvia-OpDHs (viele annähernd auf einen Punkt zusammenlaufende Zweige; Abb. 24, S. 98), ist dem allerdings keine größere Bedeutung zuzumessen. Die genauen phylogenetischen Beziehungen zwischen den OpDHs der verschiedenen Mollusken-Klassen bzw. einzelnen Muschel-OpDHs lassen sich ausgehend von den aktuell verfügbaren Sequenzdaten nicht eindeutig klären.

Sofern man sich nur auf das proteinbasierte Netz aus Abb. 24 (S. 98) bezieht, scheint sogar unklar, ob die Alo/StrDHs aus den Austern *O. edulis* und *C. gigas* untereinander näher verwandt sind als letztere mit den ODHs der Cephalopoden. Eine eindeutig engere Beziehung zwischen den OpDHs der *Ostreidae* ließ sich erst durch Neighbor-Net-Analysen manifestieren, bei denen die codierenden Nukleotidsequenzen der verschiedenen OpDHs genutzt wurden (3.10, ohne Abbildung). Solche können bei nah verwandten Proteinen wie den OpDHs höherer Invertebraten (paarweise Sequenzidentitäten siehe Tab. 6, S. 92), bei denen noch keine Sättigung synonymen Mutationspositionen vorliegt, zusätzlichen Informationsgewinn liefern und so zu einer besseren Auflösung mancher Verwandtschaftsverhältnisse führen. Da Nukleotidsequenzen einem geringeren Selektionsdruck als Proteinsequenzen unterliegen und speziell in der dritten Codonposition vermehrt konvergente Signale akkumulieren können (Foster et al., 1997; Foster und Hickey, 1999; Singer und Hickey, 2000), treten bei DNA-basierten Verwandtschaftsanalysen allerdings vermehrt widersprüchliche Signale auf (vgl. 3.10).

Falls es sich bei den beiden vollständig sequenzierten *Crassostrea*-Alo/StrDHs (Alo/StrDH1 und AloDH2; 80 % Aminosäureübereinstimmung, vgl. Tab. 6, S. 92) wie unter 4.1.5.2 und 4.1.5.3 postuliert um Isozyme unterschiedlicher Genloci handelt, folgt aus der Divergenz der OpDHs aus *C. gigas* und *O. edulis* (Abb. 24, S. 98), daß die Genduplikation, die zur Entwicklung der beiden *Crassostrea*-OpDHs führte, möglicherweise erst nach Bildung

der beiden Austernarten erfolgte. Ähnliches gilt für die beiden in die phylogenetischen Analysen einbezogenen Spritzwurm-OpDHs (diese Arbeit und Primaßin, 2005; 55 % Aminosäureübereinstimmung) bzw. die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierte AloDH und die von Schäfer klonierte StrDH aus *A. marina* (53 % Aminosäureübereinstimmung, siehe S. 143). Das Netz aus Abb. 24 (S. 98) und Verwandtschaftsanalysen, in die auch letztere einbezogen wurde (nicht dargestellt), deuten darauf hin, daß es sich bei den OpDHs aus *S. nudus* bzw. *A. marina* jeweils um Enzymvarianten handeln könnte, deren an ein Genduplikationsereignis gekoppelte Divergenz erst nach der Trennung von Sipunculiden und Anneliden bzw. sogar erst nach Aufspaltung der zu den heutigen Watt- und Sandwürmern (*A. marina* und *A. iricolor*) führenden Entwicklungslinien einsetzte.

Verwendet man die relativen Kantenlängen in den phylogenetischen Netzen als Maß für die Divergenzzeit der mutmaßlichen OpDH-Duplikate (vgl. Kimura, 1968 und 1977; Bromham und Penny, 2003), so folgt, daß die Genduplikation, aus der die beiden *Crassostrea*-Enzyme hervorgegangen sein könnten, zeitlich weniger weit zurückliegt als die Duplikationsereignisse, die möglicherweise zur Entwicklung der beiden Watt- bzw. Spritzwurm-OpDHs führten. Allerdings muß eine stärkere Sequenzdivergenz nicht immer auf eine längere Divergenzzeit zurückzuführen sein, sondern kann ebenso aus einer im Vergleich zu anderen Entwicklungslinien höheren Mutationsrate resultieren (Lockhart et al., 1994 und 1996; Lynch und Conery, 2000). Das ist auch hinsichtlich der auffällig langen Kante zu berücksichtigen, welche die ODH aus der Muschel *P. sachalinensis* von allen übrigen Invertebraten-OpDHs aus dem Netz in Abb. 24 (S. 98) separiert. Das Enzym, das offenbar weder mit der ODH aus der Pilgermuschel, *P. maximus*, noch mit den Austern-Alo/StrDHs Bivalvia-spezifische OpDH-Merkmale teilt (siehe oben), bildet unter allen verglichenen Invertebraten-OpDHs diejenige mit der geringsten Ähnlichkeit zu den übrigen Sequenzen (vgl. Tab. 6, S. 92). Das bedeutet entweder, daß die zur ODH aus *P. sachalinensis* bzw. anderen tierischen OpDHs führenden Entwicklungslinien vor besonders langer Zeit separiert wurden oder daß es sich bei der *Pseudocardium*-ODH um eine besonders schnell evolvierende OpDH handelt. Das Enzym scheint gemäß Abb. 25 (S. 101) näher mit den bakteriellen Homologen der Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs verwandt zu sein als die anderen tierischen OpDHs (siehe 4.3.2).

Die wichtigste Erkenntnis, die sich aus dem phylogenetischen Netz tierischer OpDHs (Abb. 24, S. 98) ableiten läßt, besteht darin, daß Invertebraten-OpDHs spezieller Aminosäurepräferenz evolutiv mehrfach entstanden sind (siehe auch 4.2.3). Schließlich erscheinen die OpDHs gleicher oder ähnlicher Aminosäurespezifität (in Abb. 24, S. 98 in gleicher Farbe dar-

gestellt) im Netz nicht gruppiert und sind untereinander nicht näher verwandt als OpDHs unterschiedlicher Substratpräferenz aus phylogenetisch nahestehenden Arten. So sind die TaDHs aus dem Sandwurm, *A. iricolor*, und dem Seeohr, *H. discus hannai*, im Netz deutlich separiert. Zugleich besteht aber eine recht nahe Verwandtschaft zwischen der Sandwurm-TaDH und der AloDH aus *A. marina* (vgl. S. 184 und Tab. 6, S. 92). Die Alo/StrDHs der Anneliden und Sipunculiden sind scheinbar näher mit der Pilgermuschel-ODH als mit den Alo/StrDHs der Austern verwandt (siehe oben). Außerdem existiert keine enge phylogenetische Beziehung zwischen den ODHs aus *P. maximus* und anderen Mollusken. Die ODHs, Alo/StrDHs und TaDHs des Mollusken-Anneliden-Typs sind demzufolge offenbar nach vorheriger evolutiver Divergenz (ausgehend von einem gemeinsamen Vorläuferenzym möglicherweise breiter Aminosäurespezifität, siehe 4.3.3) durch funktionelle Konvergenz entstanden (vgl. Todd et al., 2001).

Diese Befunde bestätigen die Hypothesen von Kimura et al. (2005) und Kan-no et al. (1999 und 2005a), die Ähnliches postulierten, ihre Annahmen allerdings mangels verfügbarer AloDH- oder StrDH-Sequenzen allein darauf stützten, daß die Sequenzähnlichkeiten zwischen diversen Invertebraten-ODHs, TaDHs und einer partiellen β -AloDH stärker die phylogenetische Verwandtschaft der Herkunftsarten als ihre Substratspezifität widerspiegeln. Kan-no und Mitarbeiter (1999 und 2005a) gingen davon aus, daß es sich bei den verschiedenen OpDH-Typen (ODHs, Alo/StrDHs, β -AloDHs und TaDHs) um artspezifische Varianten einer Ausgangs-OpDH handeln könnte, deren differierende Aminosäurespezifität möglicherweise auf der Substitution von jeweils nur wenigen Enzymresten beruht. Während die Autoren dies nur durch die partielle Sequenzähnlichkeit zwischen einer β -AloDH und einer TaDH aus der Napfschnecke *Cellana grata* (Kan-no et al., 1999) untermauern konnten, stehen mit den Alo/StrDHs aus der vorliegenden Arbeit, den von Primaßin (2005) und Schäfer (2007) sequenzierten OpDHs sowie den kürzlich in öffentliche Sequenzdatenbanken eingestellten hypothetischen Alo/StrDHs aus dem Blutkieferwurm (AB278571 und AB278572, siehe S. 182) jetzt für vier Arten (*C. gigas*, *S. nudus*, *A. marina* und *M. sanguinea*) jeweils zwei vollständig sequenzierte OpDHs zur Verfügung. Die neuen Sequenzinformationen belegen, daß die einzelnen Typen tierischer OpDHs tatsächlich das Resultat einer art- oder klassenspezifischen OpDH-Variabilität bilden könnten.

Unsicher scheint, ob dies auch für die in den Geweben von *S. nudus* coexistierenden ODHs und Alo/StrDHs mit ihren völlig verschiedenen Aminosäuresubstraten gilt. Gerade die Tatsache, daß bei diversen anderen Sipunculiden (*Themiste spec.*, *Phascolosoma spec.*, *Phascolopsis spec.* und *Phascolion strombi*) keine ODH-Aktivität nachgewiesen werden konnte

(Hammen und Fielding, 1993; Livingstone et al., 1983 und 1990), wirft die Frage auf, ob diese Arten ursprünglich ebenfalls über inzwischen verloren gegangene ODHs verfügten oder ob die ODHs des Spritzwurms erst nach Abspaltung der Schwesterarten aus einer Genduplikation hervorgingen. Auch ein lateraler Gentransfer, durch den *S. nudus* die ODH eines Mollusken, Bakteriums oder sonstigen nicht näher verwandten Organismus erworben haben könnte, läßt sich nicht ausschließen (4.3.3). Insofern kann nur nochmals das besondere Interesse an der Sequenzierung einer Spritzwurm-ODH betont werden (siehe 4.2.3).

Um weitere Belege für die mehrfach unabhängige Spezialisierung von Invertebraten-OpDHs zu erhalten und die Frage nach der Aminosäurespezifität ursprünglicher Invertebraten-OpDHs (vgl. 4.3.3) zu klären, ist zudem die Sequenzierung und heterologe Expression von OpDHs aus anderen, vor allem niederen Invertebraten-Stämmen erforderlich. Schließlich wurde bisher abgesehen von Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs nur die nicht mit den OpDH des Mollusken-Anneliden-Typs verwandte TaDH aus dem Schwamm *H. japonica* (BAD52445, Kan-no et al., 2005b; siehe S. 182) sequenziert, was angesichts der Verbreitung von OpDHs auch bei Cnidarien, Brachiopoden, Nemertinen, Crustaceen und Echinodermen (Livingstone et al., 1983 und 1990; Hammen und Bullock, 1991; Sato et al., 1993a) ein sehr geringes Spektrum darstellt. Bisher ist völlig unklar, ob OpDHs des *Halichondria*-Typs wie von Kan-no et al. (2005b) vermutet auf Poriferen beschränkt sind oder auch bei Eumetazoen vorkommen. Es bleibt zu prüfen, ob bei Coelenteraten oder anderen niederen Invertebraten ebenfalls OpDHs dieses Typs auftreten. Da die TaDH aus *H. japonica* nach Kan-no et al. (1997) kinetische Eigenschaften einer H-Typ-OpDH aufweist, läßt sich zudem spekulieren, daß es sich bei den H-Typ-ODHs der Cephalopoden (Fields et al., 1976b; Storey, 1977b; Storey und Storey, 1979) statt um Homologe der aus Mantelgewebe isolierten M-Typ-ODHs aus *L. vulgaris*, *L. opalescens* oder *S. officinalis* (CAC36301, CAC20642 und CAC36306; Janßen, 2000) um Verwandte der *Halichondria*-TaDH handeln könnte. Auch die Existenz weiterer OpDH-Familien ist nicht auszuschließen. Tierische OpDHs könnten entgegen bisheriger Annahmen mehr als zweimal unabhängig entstanden sein. So sollte zum Beispiel überprüft werden, ob die von Kan-no und Mitarbeitern (1998) gereinigte TaDH aus dem Seestern *Asterina pectinifera* tatsächlich dem Mollusken-Anneliden-Typ zuzurechnen ist, wie dies die Sequenz ihrer ersten 38 N-terminalen Aminosäurereste vermuten läßt (knapp 60 % Übereinstimmung mit den Resten 4 bis 41 der TaDH aus *H. discus hannai*, BLASTp-Erwartungswert = $6 \cdot 10^{-5}$).

4.3.2 Verwandtschaft der Invertebraten-OpDHs mit bakteriellen OpDHs und anderen Proteinen

Das Interesse der vorliegenden Arbeit galt nicht nur den phylogenetischen Beziehungen zwischen tierischen OpDHs (4.3.1), sondern auch deren möglicher Verwandtschaft zu bakteriellen OpDHs und sonstigen Proteinen. Insbesondere sollte geklärt werden, ob es sich bei den OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs wie verschiedentlich postuliert (Ward und Barnes, 1983; Janßen, 2000; Kan-no et al., 2005a; Müller, 2007) um Homologe der durch pathogene Agrobakterien codierten Opinsynthesen und anderer bakterieller (D,L)-OpDHs einschließlich der CENDH aus *Arthrobacter spec.* handelt. Letzteres scheint, weil diese Enzyme alle sehr ähnliche Reaktionen katalysieren und sich durch ein vergleichbares Molekulargewicht zumindest ihrer Monomere auszeichnen (vgl. Kemp et al., 1979; Hack und Kemp, 1980; Gäde und Grieshaber, 1986; Asano et al., 1989; Thompson und Donkersloot, 1992) plausibel, läßt sich jedoch anhand der geringen prozentualen Sequenzübereinstimmung zwischen den tierischen und bakteriellen OpDHs nicht unmittelbar manifestieren (vgl. Rost, 1999; maximal 23 % gleiche Aminosäurereste zwischen der CENDH aus *Arthrobacter spec.* und einer der tierischen Pyruvatoxidoreduktasen aus Tab. 6, S. 92; 20 % bzw. 10 % identische Reste zwischen einer Octopin- [P0A394, De Greve et al. 1982] bzw. Nopalinsynthase [CAA52223, Drevet et al., 1994] aus *Agrobacterium tumefaciens* und der von Janßen [2000] klonierten ODH aus *P. maximus* als ähnlichster Invertebraten-OpDH).

Da sich selbst zwischen OpDHs aus weniger nah verwandten Invertebraten keine immunologische Ähnlichkeit nachweisen ließ (siehe 4.3.1, Baldwin, 1982 und Fort et al., 1982), erscheint es wenig verwunderlich, daß Goldmann et al. (1981) keine immunologischen Hinweise auf eine Verwandtschaft zwischen den Octopinsynthesen aus Wurzelhalsgallen und der ODH aus *P. maximus* fanden. Ward und Barnes (1983) schlossen zwar nach ersten Hybridisierungsexperimenten mit einer gegen die Octopinsynthase des *A. tumefaciens*-Plasmids A6 gerichteten Sonde und DNA aus dem Kalmar *Loligo pealii* bzw. der Riesentrogmuschel, *Spi-sula solidissima*, auf eine Verwandtschaft zwischen bakteriellen Opinsynthesen und Mollusken-OpDHs, konnten ihre Ergebnisse allerdings augenscheinlich nicht bestätigen (Monneuse und Rouzé, 1987). Janßen (2000) und Kan-no et al. (2005a) untermauerten die Homologiehypothese statt dessen, indem sie in Alinierungen diverser Invertebraten-ODHs und TaDHs mit einzelnen bakteriellen OpDHs konservierte Sequenzmotive wie die glycinreiche Konsensussequenz klassischer NAD(P)H-bindender Dehydrogenasen und eine Konservierung der mutmaßlichen katalytischen Triade der OpDHs (vgl. 4.2.2) nachwiesen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden, um sichere Belege für die Homologie tierischer und bakterieller (D,L)-OpDHs zu gewinnen und möglicherweise neben bakteriellen auch archaebakterielle, pflanzliche oder zu den Pilzen gehörende Homologe der Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs zu identifizieren, öffentliche Proteindatenbanken nach Sequenzen mit lokaler Ähnlichkeit zu den neu sequenzierten Alo/StrDHs aus *A. marina*, *S. nudus*, *C. gigas* und *O. edulis* durchsucht (2.7.3). Die Suche erfolgte auf Proteinebene (BLASTp und PSI-BLAST) weil das nach Pearson (1996) eher die Identifizierung weit entfernter Verwandter ermöglicht als nukleotidbasierte Datenbanksuchen. Indem als Treffer nur vollständig sequenzierte Proteine berücksichtigt wurden, die über eine Länge von mindestens 300 (in einem Ausnahmefall nur 294) Aminosäuren signifikante Sequenzähnlichkeit zu den genannten Alo/StrDHs aufwiesen (3.10), sollte ihre Homologie zu beiden OpDH-Domänen (4.2.1) sichergestellt werden. Schließlich können Proteindomänen als „molekulare Bausteine“ der Proteinevolution in unterschiedlichen Kombinationen auftreten (Apic et al., 2001; Vogel et al., 2004; Orengo und Thornton, 2005), weshalb lokale Sequenzähnlichkeiten zwischen Mehrdomänenproteinen nicht zwangsläufig eine Verwandtschaft der Gesamtproteine implizieren. So weist die N-terminale OpDH-Domäne als Variante der ubiquitär verbreiteten und in einer Vielzahl von Domänenkombinationen vorkommenden klassischen Dinukleotidbindungsdomäne (vgl. 4.2.2 sowie Rossmann et al., 1974 und 1975; Apic et al., 2001; Orengo und Thornton, 2005) Ähnlichkeiten zu zahlreichen nukleotidbindenden Multidomänenproteinen auf, die mit der C-terminalen OpDH-Domäne weder funktionelle noch strukturelle Gemeinsamkeiten teilen. Das Interesse der vorliegenden Arbeit fokussierte jedoch auf Verwandte der Mollusken-Anneliden-OpDHs mit der gleichen, in der Primärsequenz in derselben Reihenfolge angeordneten Zwei-Domänenkombination.

Abgesehen von der Forderung nach Sequenzähnlichkeit über rund drei Viertel der Gesamtlänge von Invertebraten-OpDHs wurden bei den Datenbanksuchen der aktuellen Arbeit nur BLAST-Treffer mit einem kleineren Erwartungswert⁶ als 10^{-4} als statistisch signifikant bewertet. Aufgrund dieses konservativen Grenzwertes (vgl. Wilson et al., 2000) ist davon auszugehen, daß nur echte OpDH-Homologe erfaßt und in die nachfolgenden phylogenetischen Analysen einbezogen wurden. Das gilt auch für die entfernteren Verwandten der Mollusken-Anneliden-OpDHs, die sich nur durch positions-spezifischen iterierten BLAST (PSI-BLAST) identifizieren ließen (2.7.3; Altschul et al., 1997; Altschul und Koonin, 1998; Schäffer et al., 2001). Um eine möglichst hohe Zuverlässigkeit der PSI-BLAST-Treffer zu gewährleisten,

⁶ BLAST-Erwartungswerte geben die Zahl ähnlich guter oder besserer Treffer an, die bei der Suche in einer Datenbank der gegebenen Größe zufällig zu erwarten sind (Altschul und Koonin, 1998).

wurde das Verfahren bei den Datenbankrecherchen der vorliegenden Arbeit auf drei Suchrunden begrenzt. Schließlich steigt mit jedem weiteren Suchlauf das Risiko, fälschlich Nicht-Homologe in die Alinierung einzubeziehen, auf deren Grundlage die Ähnlichkeitsmatrix für den nächsten Iterationsschritt generiert wird. Weil nachfolgende Datenbanksuchen in diesem Fall auch Treffer mit signifikanter Ähnlichkeit zu nicht mit dem Ausgangsprotein verwandten Sequenzen liefern würden (Altschul et al., 1997; Schäffer et al., 2001), eignen die oft beeindruckend niedrigen Erwartungswerte späterer PSI-BLAST-Iterationsrunden (vgl. Beispiele unter 3.10) sich nur dann als Homologienachweis, wenn die Gültigkeit aller zuvor detektierten Sequenzverwandtschaften garantiert werden kann (Altschul und Koonin, 1998).

Die verlässlichsten Treffer der Homologensuche bildeten die Proteine, die im Netz aus Abb. 25 (S. 101) in blauer Schriftfarbe dargestellt sind. Sie wurden durch nicht-iterative Datenbanksuche als Verwandte der Alo/StrDHs aus *A. marina*, *S. nudus*, *C. gigas* und *O. edulis* (in Abb. 25 rot hervorgehoben) identifiziert. Daß Datenbanksuchen, bei denen vorherige PSI-BLAST-Treffer als Ausgangssequenz dienten, letztlich immer wieder die gleiche Sequenzfamilie lieferten (3.10), deutet aber darauf hin, daß es sich auch bei den übrigen in das Netz einbezogenen Sequenzen um echte Homologe der Invertebraten-OpDHs vom Mollusken-Anneliden-Typ handelt.

Die mutmaßliche Homologie aller in das Netz aus Abb. 25 (S. 101) einbezogenen Proteine konnte außerdem durch visuelle Inspektion der zugehörigen multiplen Sequenzalinierung (nicht dargestellt) untermauert werden (vgl. Altschul und Koonin, 1998). Ähnlich wie von Janßen (2000) und Kan-no et al. (2005a) für eine kleinere Auswahl tierischer und bakterieller OpDHs festgestellt (S. 189), weisen die OpDH-Homologen mit Ausnahme je einer Sequenz aus *Silicibacter pomeroyi* (AAV94753) und *Burkholderia cepacia* (ZP_00217591) alle das GXGXXG/A-Motiv klassischer Nukleotidbindungsproteine (4.2.2) auf. Bei den Proteinen aus *S. pomeroyi* und *B. cepacia* findet sich an letzter Position des Motivs statt eines Glycin- oder Alaninrests Serin bzw. Cystein. Diese Aminosäuren sind vermutlich klein genug, um ebenfalls eine enge Assoziation zwischen dem ersten β -Strang und der α -Helix der ADP-Bindungsfalte zu ermöglichen (vgl. 4.2.2 und Bellamacina, 1996). Auch die Reste der mutmaßlichen katalytischen Triade der OpDHs (entsprechend Histidin-202, Arginin-292 und Aspartat-297 der CENDH) sowie die in der Primärsequenz eng mit diesen assoziierten Aminosäuren Tyrosin-293 und Glutamat-296 (CENDH-Nummerierung, siehe 4.2.2) sind bei fast allen in das Neighbor-Netz (Abb. 25, S. 101) einbezogenen Proteinen konserviert. Nur bei zwei Nopal- und einer weiteren mutmaßlichen Opinsynthese aus *A. tumefaciens* (NOS1 = CAA52223, NOS2 = CAB44644 und putOpS = AAC25914) ist das katalytische Aspartat durch Glutamat

substituiert. Bei fünf Proteinen (denen aus den Proteobakterien *Rhizobium spec.*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* und *Ralstonia eutropha* sowie dem Schlauchpilz *Magnaporthe grisea*, vgl. Abb. 25, S. 101) tritt anstelle von Tyrosin-293 ein Threonin-, Alanin-, Valin- oder Asparaginrest auf.

Da die Transitivität von Homologiehypothesen, derzufolge zwei stark divergierende Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit zu überlappenden Sequenzabschnitten eines dritten Proteins auch untereinander homolog sind (Doolittle, 1981; Park et al., 1997; Neuwald et al., 1997; Rost, 1999; Todd et al., 2001), es zudem ermöglichte, „Brücken“ zwischen verschiedenen Subgruppen jeweils nah verwandter Sequenzen aus dem Neighbor-Netz in Abb. 25 (S. 101) zu schlagen, kann an der Verwandtschaft aller in das Netz einbezogenen Sequenzen kein Zweifel bestehen.

Leider wurden nur wenige der OpDH-Homologen proteinbiochemisch untersucht. Bei den meisten handelt es sich lediglich um von DNA-Sequenzen abgeleitete Proteine, deren mögliche Funktion aufgrund von Ähnlichkeiten zu anderen Datenbanksequenzen vorhergesagt wurde (3.10). Datenbankannotationen, die statt auf experimentellen Ergebnissen allein auf Sequenzübereinstimmungen und der mutmaßlichen phylogenetischen Beziehung zwischen einzelnen Proteinen basieren, sind jedoch abgesehen von der Gefahr einer Fehlerfortpflanzung auch deshalb nur bedingt aussagekräftig, weil bereits geringfügige strukturelle Veränderungen die metabolische Funktion eines Proteins signifikant verändern können (Doolittle, 1981; Brenner, 1999; Wilson et al., 2000). So umfassen nach Todd et al. (2001) 25 % der in der Proteinstrukturdatenbank (PDB) erfaßten Proteinfamilien mehr als einen Enzymtyp. Während Enzyme mit mehr als 40 % Sequenzübereinstimmung in der Regel eine sehr ähnliche Funktion erfüllen (in den ersten drei Stellen ihrer EC-Nummer übereinstimmen), findet sich bei Proteinen mit weniger als 30 % Sequenzidentität häufig eine deutliche Funktionsvariabilität (Wilson et al., 2000; Todd et al., 2001).

Allerdings zeichnen die hier betrachteten OpDH-Homologen sich alle durch die gleiche, in derselben Reihenfolge angeordnete Domänenkombination aus (S. 190), was nach Hegyi und Gerstein (2001) die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Ähnlichkeit erhöht. Das und die erwähnten konservierten Reste (S. 191) deuten (obwohl eine Konservierung funktionell bedeutsamer Aminosäuren nicht notwendigerweise impliziert, daß Enzymhomologe katalytisch aktiv sind, und eine katalytische Triade wie die der OpDHs auch bei anderen Enzymen ähnlicher Reaktionschemie auftreten könnte, vgl. Todd et al., 2001), darauf hin, daß unter den in der vorliegenden Arbeit identifizierten OpDH-Homologen OpDHs dominieren könnten. Deren Substratspezifität läßt sich allerdings nicht vorhersagen (vgl. 4.2.3), weshalb die Auto-

ren einiger Datenbankeinträge sich nicht darauf festlegten, von einem bestimmten OpDH-Typ zu sprechen, sondern die jeweilige Sequenz lediglich der Familie der ODH- und NoDH-ähnlichen Proteine zuordneten bzw. unverfänglich als „mögliche OpDH“ bezeichneten (vgl. Bildunterschrift zu Abb. 25, S. 101).

Zu den proteinbiochemisch charakterisierten bakteriellen OpDH-Homologen gehören neben der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (Dairi und Asano, 1995) ausschließlich Ti-Plasmid-codierte Opinsynthesen aus *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium vitis*: je eine Octopinsynthese (OCS) aus *A. tumefaciens* Ach5 (P0A394, De Greve et al., 1982) und dem auf Weinreben spezialisierten *A. vitis*-Stamm CG474 (P94210), eine auf dem *A. vitis*-Plasmid S4 codierte Vitopinsynthese (VIS, Q04554, Canaday et al., 1992) und indirekt zwei Nopalinsynthesen aus *A. tumefaciens* 82.139 bzw. C58 (NOS1 = CAA52223, Drevet et al., 1994 und NOS2 = CAB44644, Gielen et al., 1999), die zwar nicht selbst auf ihre enzymatische Aktivität untersucht wurden, jedoch zu 97 bzw. 98 % mit experimentell als Nopalinsynthese-Untereinheit identifizierten Datenbanksequenzen (Q44524, Otten und De Ruffray, 1994 bzw. P00386, Depicker et al., 1982 und Bevan et al., 1983) übereinstimmen (3.10). Sie alle werden wie in der Einleitung erläutert in Agrobakterien-induzierten Pflanzentumoren exprimiert, wo sie für die Produktion von Opinen sorgen, die von den infizierenden Bakterien aufgenommen und als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden können (Zambryski et al., 1989; Dessaux et al., 1993). Während die Octopinsynthesen vornehmlich die NAD(P)H-abhängige reduktive Kondensation von Pyruvat mit basischen Aminosäuren katalysieren (Thompson und Donkersloot, 1992), setzt die Vitopinsynthese primär Pyruvat und L-Glutamin um (Canaday et al., 1992). Die homotetrameren Nopalinsynthesen bevorzugen als Substrate α -Ketoglutarat und L-Arginin bzw. L-Ornithin und zeichnen sich durch mehr oder weniger strikte NADPH-Spezifität aus (Goldmann, 1977; Kemp et al., 1979; Thompson und Donkersloot, 1992).

Trotz ihrer ähnlichen Funktion und Herkunft aus nah verwandten Organismen differieren die Sequenzen der genannten Octopin- und Vitopinsynthesen (stimmen untereinander zu mindestens 66 % überein) stark von denen der beiden Nopalinsynthesen (besitzen ihrerseits 83 % gleiche Aminosäuren), was sich außer in geringen prozentualen Sequenzübereinstimmungen (nur 15 bzw. 16 % zwischen der Octopin- und den Nopalinsynthesen aus *A. tumefaciens*) in größeren Alinierungslücken sowie einem gegenüber den Octopinsynthesen um 20 Aminosäuren längeren N-Terminus der Nopalinsynthesen manifestiert (ohne Abbildung). Monneuse und Rouzé (1987) vermuteten einen unmittelbaren Bezug zum differierenden Oligomerisationszustand der beiden Enzymtypen. Möglicherweise weichen die tetrameren Nopalinsynthesen speziell in den Oberflächenbereichen, die den Kontakt zwischen den einzelnen Unter-

einheiten vermitteln, stark von den monomeren Octopinsynthesen ab. Jedenfalls besetzen die Octopin- (plus Vitopin-) und Nopalinsynthesen in phylogenetischen Netzen wie dem aus Abb. 25 (S. 101) separate, allenfalls durch schwache Splits gruppierte Äste, sind also untereinander nicht näher verwandt.

Außer den Verwandtschaftsgruppen der Octopin- und Vitopin- bzw. Nopalinsynthesen (zu letzterer gehört auch eine mutmaßliche Opinsynthese [putOpS] aus dem *A. tumefaciens*-Stamm AB2/73; AAC25914, Otten und Schmidt, 1998) findet sich im Netzdiagramm der Abb. 25 (S. 101) noch ein dritter Zweig, der neben anderen proteobakteriellen Sequenzen Proteine aus *A. tumefaciens* umfaßt. Sie sind in den zugehörigen Datenbankeinträgen (NP_536135 und NP_535789, Wood et al., 2001) als Octopin-/Nopalin- bzw. Opin-/Octopindehydrogenase annotiert, wurden in Abb. 25 als „NoDH“ bzw. „OpDH“ abgekürzt und entsprechen wahrscheinlich Enzymen des Opinkatabolismus, die anders als die zuvor erwähnten Opinsynthesen nicht in Pflanzentumoren exprimiert werden, sondern in den Agrobakterien selbst die Oxidation von Opinen katalysieren.

So wird die „NoDH“ aus *A. tumefaciens* zwar ebenso wie die Nopalinsynthese NOS2 durch das Plasmid pTiC58 codiert (weshalb die beträchtlichen Sequenzunterschiede zwischen den beiden Enzymen nicht mit ihrer Herkunft aus unterschiedlichen Bakterienstämmen erklärt werden können), ist jedoch laut Datenbankeintrag nicht in dem Plasmidabschnitt lokalisiert, der zum Transfer in Pflanzenzellen bestimmt ist (T-DNA), sondern findet sich in der sogenannten noc-Region des Plasmids zwischen Genen, die eine Arginase und eine Ornithin-Cyclodesaminase determinieren. Die „NoDH“ entspricht offenbar dem 40 kd-Protein unbekannter Funktion (AAA50521, Schrell und Schröder, 1993), das zuerst von Sans et al. (1987) beschrieben wurde. Damit gehört sie zu einer durch Nopalin induzierbaren Transkriptionseinheit, die neben anderen Genen des Opinkatabolismus die Untereinheiten einer membranständigen Nopalinoxidase (noxB und noxA) umfaßt (Schrell und Schröder, 1993, Zanker et al., 1994). Das legt, weil Ti-Plasmide sich durch eine modulare Struktur auszeichnen, innerhalb derer Gene ähnlicher Zweckbestimmung gruppiert auftreten (Zhu et al., 2000), die Vermutung nahe, daß es sich bei der „NoDH“ ebenfalls um ein Enzym kataboler Funktion (eine weitere Opinoxidase) handelt. Da Nopalinstämme wie *A. tumefaciens* C58 sowohl Nopalin als auch Octopin zu nutzen vermögen (Montoya et al., 1977 und 1978), ist allerdings unklar, welches der beiden Opine die „NoDH“ hydrolysiert oder ob sie wie die von Zanker et al. (1994) charakterisierte Nopalinoxidase den Abbau beider Opine zu katalysieren vermag.

Daß es sich vermutlich auch bei der „OpDH“ aus *A. tumefaciens* C58 (NP_535789, Wood et al., 2001) um ein Enzym des Opinkatabolismus handelt, folgt daraus, daß diese mut-

maßliche OpDH nicht durch das Ti-Plasmid, sondern durch ein zweites Plasmid (pAtC58) des Agrobakterienstamms codiert wird, das keine T-DNA zum Export in Pflanzenzellen umfaßt. Die Koexistenz dieses Enzyms, der „NoDH“ und der von Zanker et al. (1994) beschriebenen Nopalinoxidase des NoxB-NoxA-Typs innerhalb eines einzelnen Bakterienstamms, unterstreicht die von Wabiko et al. (1990) betonte Vielfalt des N-(Carboxyalkyl)-Aminosäure-Katabolismus von Agrobakterien.

Gemäß den Neighbor-Net-Analysen der vorliegenden Arbeit sind die Octopin- und Vitopinsynthesen der Agrobakterien näher mit den im Netz aus Abb. 25 (S. 101) durch eine lange Kante von allen anderen Sequenzen separierten Invertebraten-OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs verwandt als die bakteriellen Nopalinsynthesen und die Sequenzgruppe um die „NoDH“ aus *A. tumefaciens* C58. So läßt das Netzdiagramm aus Abb. 25 (S. 101) neben Splits, die alle Octopin- und Vitopinsynthesen oder nur die aus *A. vitis* mit den Invertebraten-OpDHs gruppieren, auch solche Signale erkennen, die für eine engere Beziehung zwischen der Vitopinsynthase aus *A. vitis* und den OpDHs der Anneliden und Sipunculiden sowie der ODH aus *P. maximus* sprechen. Obwohl es sich dabei durchweg um schwache Splits geringer Aussagekraft handelt, erwies sich insbesondere das Signal, das sämtliche Octopin- und Vitopinsynthesen mit den tierischen Enzymen verbindet, als gut reproduzierbar. Eine nähere Verwandtschaft der tierischen OpDHs zu den Octopin- und Vitopinsynthesen als zu den Nopalinsynthesen aus *A. tumefaciens* erscheint auch deshalb plausibel, weil sie mit ersteren ihre Präferenz für das α -Ketosäuresubstrat Pyruvat teilen.

Die nächsten in öffentlichen Sequenzdatenbanken erfaßten Verwandten der OpDHs höherer Invertebraten bilden jedoch nicht die Octopin- und Vitopinsynthesen aus *A. tumefaciens*, sondern diverse proteobakterielle Proteine unbekannter Funktion, zu denen unter anderem Y4xOa und Y4xOb aus *Rhizobium spec.* NGR234 (AAB91938, Freiberg et al., 1997 bzw. AAQ87281, Streit et al., 2004) gehören. Obwohl die Proteine des deutlich von allen übrigen Sequenzen abgegrenzten „*Rhizobium*-Clusters“ nur zu maximal 27 % mit einer der tierischen OpDHs übereinstimmen (Y4xOa mit der ODH aus *P. maximus* und Y4xOb mit der TaDH aus *A. iricolor*), erscheinen sie in Neighbor-Netzen wie dem aus Abb. 25 (S. 101) durch einen klaren Split mit ihnen verbunden.

Die beiden Y4xO-Proteine aus *Rhizobium spec.* NGR234 werden auf zwei verschiedenen Megaplasmiden des Stamms codiert (Y4xOa auf pNGR234a und Y4xOb auf pNGR234b; Downie, 1997; Flores et al., 1998; Streit et al., 2004), die offenbar stark durch Insertions- und Deletionsereignisse sowie lateralen Gentransfer geprägt wurden und partiell mit den Ti-Plasmiden der Agrobakterien verwandt sind (Hadley und Szalay, 1982; Otten et al., 1992; Frei-

berg et al., 1997; Moriguchi et al., 2001; Wood et al., 2001; Streit et al., 2004). Letzteres erscheint wenig verwunderlich, da die Bakteriengattungen *Agrobacterium* und *Rhizobium* einander phylogenetisch sehr nahe stehen und ihre Vertreter ähnliche Habitate besiedeln (Martinez-Romero und Caballero-Mellado, 1996; Young et al., 2001). Freiberg und Mitarbeiter (1997) vermuteten daher, daß die pathogene Interaktion zwischen Agrobakterien und ihren Wirtspflanzen und die Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen eine gemeinsame molekulare Grundlage besitzen.

Tatsächlich weist die mutualistische Beziehung zwischen den Stickstoff-fixierenden Bodenbakterien der Gattungen *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* oder *Sinorhizobium* und ihren Wirtspflanzen diverse Parallelen zum *Agrobacterium*-System auf. Obwohl diese Bakterien über längere Zeiträume frei im Boden leben können, vermögen sie ihr Wachstum zu beschleunigen (Downie, 1997), indem sie in Leguminosenwurzeln eindringen, dort die Bildung von Wurzelknöllchen (Noduli) induzieren und sich zu sogenannten Bakteroiden differenzieren, die Stickstoff zu Ammoniak reduzieren und auf diese Weise die Pflanze mit mineralischem Stickstoff versorgen, während sie selbst im Gegenzug pflanzliche Photosyntheseprodukte beziehen (Dixon, 1969; Beringer et al., 1979; Sprent, 1989; Ludwig und Poole, 2003). Manche Rhizobien bilden darüber hinaus nodulspezifische Substanzen, die freilebenden Bakterien ihres Stamms einen selektiven Wachstumsvorteil verschaffen könnten. Möglicherweise fördern diese sogenannten Rhizopine, ohne für die Symbiose essentiell zu sein, das Überleben effektiver Knöllchenbilder und Stickstoff-Fixierer in der Leguminosen-Rhizosphäre (Murphy et al., 1987, 1988 und 1995; Murphy und Saint, 1992). Auch wenn dies von Gordon et al. (1996) experimentell nicht unmittelbar bestätigt werden konnte, bietet sich das „Rhizopinkonzept“ als schlüssige Erweiterung des Opinkonzepts nach Petit et al. (1978) an. Insbesondere scheinen die Gene für die Rhizopinsynthese und den Rhizopinkatabolismus sich wie die Gene für die Bildung und Degradation von *Agrobacterium*-Opinen als funktionelle Einheit entwickelt zu haben (Murphy et al., 1987) und wie diese differentiell exprimiert zu werden (allerdings nicht an verschiedenen Orten [Wirtspflanze versus Bakterium], sondern in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Bakterien [Bakteroide versus freilebende Rhizobien]; Murphy et al., 1988 und 1995; Murphy und Saint, 1992).

Obwohl es sich bei den bisher identifizierten Rhizopinen um Inositolderivate handelt (Murphy und Saint, 1992; Murphy et al., 1995), liegt die Vermutung nahe, daß Rhizopine ähnlich wie die Opine der Agrobakterien (Dessaux et al., 1993; Moore et al., 1997) eine heterogene Stoffklasse großer struktureller Variabilität bilden. Schließlich können diese Metabolite nur dann spezifisch das Wachstum oder den Nodulationserfolg einzelner Rhizobienstämme

erhöhen, wenn konkurrierende Rhizobakterien sie nicht zu nutzen vermögen, ihrerseits also gegebenenfalls andere Rhizopine verwenden (Murphy et al., 1995). Auch N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren könnten bei manchen Rhizobien als Rhizopine fungieren. Vielleicht handelt es sich bei den als Y4xO annotierten OpDH-Homologen aus *Rhizobium spec.* um Opinsynthesen zur nodulspezifischen Produktion von N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren mit Rhizopinfunktion. Das scheint insbesondere für das Protein Y4xOa plausibel, das ebenso wie die meisten für die Nodulation und die Stickstoff-Fixierung erforderlichen *Rhizobium*-Proteine durch das Plasmid pNGR234a des Bakterienstamms codiert wird (siehe oben und Freiberg et al., 1997). Seine Expression läßt sich nach Perret et al. (1999) durch Flavonoide induzieren, was auf eine symbiotische Regulation hindeutet (vgl. auch Streit et al., 2004).

Das Gen y4xOb vom Vektor pNGR234b, der nach Streit et al. (2004) den Katabolismus eines breiten Spektrums unterschiedlicher Kohlenstoff- und Energiequellen determiniert, könnte dagegen eine OpDH des katabolen Opinstoffwechsels repräsentieren. Das ließe sich gut damit vereinbaren, daß sich die Fähigkeit, N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren abzubauen, nicht auf Vertreter der Gattung *Agrobacterium* beschränkt, sondern auch diverse andere Rhizobiaceen und sonstige wurzelkolonisierende Bakterien von Octopin oder anderen Iminodicarbonsäuren als einziger Kohlenstoffquelle zu leben vermögen (siehe Einleitung sowie Rossignol und Dion, 1985; Tremblay et al., 1987a; Beauchamp et al., 1991). Die Homologen der Octopinoxidase-Untereinheiten aus *A. tumefaciens* (ooxA und ooxB), die Streit et al. (2004) auf pNGR234b nachwies, sind allerdings nicht in der Nachbarschaft von y4xOb, sondern an weit entfernten Positionen des Plasmids lokalisiert.

Beauchamp et al. (1991) fanden zudem Hinweise auf eine Korrelation zwischen den bakteriellen Fähigkeiten, Stickstoff zu fixieren und Octopin abzubauen, was sie zu der Vermutung veranlaßte, daß Octopin oder andere N^α-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren die Eisenassimilation Stickstoff-fixierender Bakterien regulieren könnten. Eisen, das zur Stickstoff-Fixierung in größeren Mengen benötigt wird (Beauchamp et al., 1991) tritt in aerober Umgebung vornehmlich als Eisen(III) auf, das bei neutralem oder alkalischem pH nur eine geringe Wasserlöslichkeit besitzt (Ratledge und Dover, 2000). Es limitiert daher in bestimmten Böden und wäßrigen Umgebungen, in denen der pH neutrale Werte übersteigt, das Wachstum von Mikroorganismen (Smith und Neilands, 1987). Pathogene oder endosymbiontisch lebende Bakterien sind im Gewebe ihrer Wirte vor allem deshalb eisenlimitiert, weil letztere das Spurenelement zwecks gezielter Infektionsabwehr an Ferritine oder andere Moleküle zu binden pflegen (Ratledge und Dover, 2000). Die meisten aeroben bzw. fakultativ anaeroben Bakterien oder Pilze mit entsprechender Lebensweise produzieren daher spezielle Chelatbildner

(sogenannte Siderophore), sich durch eine so hohe Affinität für Eisen(III)-Ionen auszeichnen, daß sie den Mikroorganismen den Zugriff auf gebundene Eisenvorräte ihres Wirts ermöglichen (Neilands, 1981 und 1995; Ratledge und Dover, 2000). Smith und Neilands (1987) und später Beauchamp et al. (1991) wiesen auf strukturelle Ähnlichkeiten zwischen einem Siderophor aus *Rhizobium meliloti* (Rhizobactin) und Lysopin oder anderen N^α-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren und hin und postulierten, daß letztere aufgrund der Komplexbildungseigenschaften ihrer Iminodicarbonsäuregruppe als Siderophore wirken könnten. Alternativ könnte Opinen eine Hilfsfunktion beim „Entladen“ anderer Siderophore zukommen, wie dies angesichts ihrer mäßigen Eisen(III)-Affinität für diverse mit der Eisenaufnahme von Mikroorganismen assoziierte α -Keto- und α -Hydroxysäuren vermutet wurde (vgl. Ratledge und Dover, 2000).

Ein funktionsfähiges Siderophorsystem umfaßt neben dem Siderophor und einem oder mehreren für seine Bildung verantwortlichen Enzymen auch Membranrezeptoren und Transporter für die Aufnahme des eisenbeladenen Chelatbildners ins Bakterieninnere sowie möglicherweise recht unspezifische Ferri-Siderophor-Reduktasen, die Siderophor-gebundenes Eisen(III) NAD(P)H-abhängig zu Eisen(II) reduzieren. Letzteres kann anschließend als gut lösliche Substanz freigegeben bzw. auf Rezeptormoleküle wie die Apoform eisenhaltiger Bakterienproteine oder das Eisenspeicherprotein Bakterioferritin übertragen werden (Ratledge und Dover, 2000). Andere Ferri-Siderophore werden eventuell hydrolysiert, um das gebundene Eisen(III) freizusetzen und nachfolgend separat zu reduzieren (vgl. Ratledge und Dover, 2000). Vor dem Hintergrund der Hypothesen von Smith und Neilands (1987) sowie Beauchamp et al. (1991), läßt sich daher spekulieren, daß Opinsynthesen und Opinoxidasen bei Rhizobakterien wie *Rhizobium spec.* und möglicherweise auch anderen Mikroorganismen als Siderophorsynthesen bzw. -hydrolasen fungieren könnten. Vielleicht wurde das Opinsystem der Agrobakterien bei Rhizobien in den Dienst der Eisenassimilation gestellt. Oder N^α-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren und die mit ihrer Synthese, ihrem Transport und Abbau assoziierten Proteine bildeten ursprünglich eine Funktionseinheit des bakteriellen Eisenmetabolismus und erwarben bei den Agrobakterien eine neue Aufgabe. Alternativ könnten nur die Opinsynthesen und zugehörigen Opintransporter einem evolutiven Funktionswandel unterlegen haben. Schließlich ist, sofern Ferri-Opine nicht hydrolysiert, sondern durch eine unspezifische Ferri-Siderophor-Reduktase zu Eisen(II)-Opinen reduziert werden, ein opinabhängiges Siderophorsystem auch ohne unmittelbare Beteiligung von Opinoxidasen vorstellbar.

Diese Überlegungen besitzen zwar stark spekulativen Charakter, werden jedoch dadurch gestützt, daß die OpDH-Homologen y4xOa und y4xOb aus *Rhizobium spec.* einem sowohl

auf dem Plasmid pNGR234a wie auch auf pNGR234b vorkommenden Gencluster angehören, das eine Reihe offener Leseraster mit Homologie zu Proteinen des bakteriellen Eisentransports umfaßt (Streit et al., 2004). Zumindest das auf dem symbiotischen *Rhizobium*-Plasmid (pNGR234a) positionierte *y4xO*-Gen wird offenbar nodulspezifisch mit den übrigen Genen des Clusters cotranskribiert (Perret et al., 1999; Streit et al., 2004), was einen unmittelbaren Bezug zwischen OpDHs und dem rhizobiellen Eisenmetabolismus zu belegen scheint. Allerdings könnte die nodulspezifische OpDH-Expression auch damit zu erklären sein, daß OpDHs in Bakteroiden, die typischerweise durch eine niedrige Sauerstoffspannung gekennzeichnet sind, ähnlich wie in Invertebraten-Geweben das NAD^+/NADH -Verhältnis regulieren (Beauchamp et al., 1991).

Interessanterweise finden sich Loci mit klar erkennbarer Homologie zu den offensichtlich durch Duplikation auseinander hervorgegangenen Genclustern rund um *y4xOa* bzw. *y4xOb* auch auf dem zirkulären Chromosom des enterobakteriellen Kartoffelschädling *Erwinia carotovora* sowie im Genom anderer phytopathogener Bakterien wie etwa des β -Proteobakteriums *Ralstonia solanacearum* (Streit et al., 2004). Das deutet auf lateralen Gentransfer zwischen nicht näher verwandten Bakterien hin und läßt vermuten, daß die im Netz aus Abb. 25 (S. 101) mit den *Rhizobium*-Proteinen gruppierten OpDH-Homologen aus *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (CAG77009, Bell et al., 2004) und dem Bodenbakterium *Ralstonia eutropha* JMP134 (YP_297885) unabhängig von ihrer Datenbankannotation OpDHs mit einer ähnlichen Funktion wie die rhizobiellen Enzyme repräsentieren. Bell et al. (2004) identifizierten im Genom von *E. carotovora* subsp. *atroseptica* neben Genen, die darauf schließen lassen, daß der Stamm ein breites Nahrungsspektrum zu nutzen vermag, auch solche, die auf ein Stickstoff-Fixierungspotential hinweisen. Das pflanzenpathogene γ -Proteobakterium scheint somit auch an ein Leben im Boden oder in der Rhizosphäre angepaßt zu sein.

Eine große metabolische Flexibilität, die sich unter anderem in der Fähigkeit manifestiert, eine Vielzahl unterschiedlicher Nahrungsressourcen zu verwerten, bildet offenbar ein gemeinsames Merkmal fast aller Bakterienstämme, bei denen im Rahmen der vorliegenden Arbeit Homologe der Mollusken-Anneliden-OpDHs nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 25, S. 101; Wood et al., 2001; Finan et al., 2001; Nelson et al., 2002; Ueda et al., 2004; Ishikawa et al., 2004; Bell et al., 2004; Moran et al., 2004; Streit et al., 2004). Das Spektrum dieser Bakterien, zu denen viele wurzelkolonisierende und sonstige Bodenbakterien gehören (neben den Rhizobiaceen *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Rhizobium spec.* und *Sinorhizobium meliloti* zum Beispiel das γ -Proteobakterium *Pseudomonas putida* und das Actinobakterium *Arthrobacter spec.*), korreliert gut mit der Gruppe der Bakterien, die gemäß Literaturangaben

Iminodicarbonsäuren wie Octopin, Octopinsäure oder Nopalin als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zu nutzen vermögen (siehe Einleitung sowie Beaulieu et al., 1983; Rossignol und Dion, 1985; Tremblay et al., 1987a; Beauchamp et al., 1991; Bergeron et al. 1993). Übereinstimmend mit Beauchamp und Mitarbeitern (1990), gemäß denen auch verschiedene Sordariomyceten der Gattungen *Cylindrocarpon* und *Fusarium* Octopin und Octopinsäure als Wachstumssubstrate verwenden können, lieferte die Homologensuche zudem ein Protein aus dem Sordariomyceten *Magnaporthe grisea* (XP_366142, Dean et al., 2005).

Daß neben zahlreichen bakteriellen OpDH-Homologen nur eine einzige homologe Pilzsequenz identifiziert wurde, könnte darauf hindeuten, daß *M. grisea* das entsprechende Gen durch lateralen Gentransfer erwarb. Möglicherweise ist das Auftreten eines offenen Leserahens mit signifikanter Ähnlichkeit zu den OpDHs höherer mariner Invertebraten im Genom dieses Ascomyceten, nicht jedoch in dem des nah verwandten Sordariomyceten *Neurospora crassa* oder anderen vollständig sequenzierten Pilzgenomen wie dem der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, unmittelbar auf die Evolution des Reisbrandpilzes als Pflanzenpathogen zurückzuführen (vgl. Dean et al., 2005). Das erscheint insbesondere deshalb plausibel, weil der Reisbrandpilz, der in der Regel in die Blätter seines Wirts eindringt (Hamer et al., 1988; Howard et al., 1991), nach Sesma und Osbourn (2004) auch die Wurzeln der Kulturpflanze zu besiedeln vermag, so daß es sich beim Donor des OpDH-ähnlichen Gens um ein Rhizobakterium gehandelt haben könnte. Allerdings ist bei derartigen Überlegungen insofern Vorsicht geboten, als bakterielle Proteine in öffentlichen Sequenzdatenbanken im Vergleich zu Pilzproteinen deutlich überrepräsentiert sind. Das Ergebnis der Homologensuche läßt somit keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die Verbreitung von OpDH-ähnlichen Proteinen bei Bakterien und Pilzen zu.

Die gute Korrelation zwischen den Bakterienstämmen und Pilzen, bei denen Verwandte der Mollusken-Anneliden-OpDHs nachgewiesen wurden und den Taxa, die bekanntermaßen Iminodicarbonsäuren als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zu nutzen vermögen, stützt aber die Hypothese, daß viele der in der vorliegenden Arbeit identifizierten OpDH-Homologen, wie von Asano et al. (1989) für die CENDH aus *Arthrobacter spec.* postuliert, Pyruvatoxidoreduktasen des katabolen Energiestoffwechsels repräsentieren könnten. Das gilt auch für das Enzym aus *Silicibacter pomeroyi* (AAV94753, Moran et al., 2004), einem an das Leben in nährstoffarmen Meeren angepaßten Bakterium, das häufig in Assoziation mit Algen auftritt (Riemann et al., 2000). Insbesondere deshalb, weil sich im Genom von *S. pomeroyi* Hinweise auf Transporter zur Aufnahme von Algenmetaboliten fanden (Moran et al., 2004) und bei diversen marinen Rotalgen Tauropin nachgewiesen wurde (Kuriyama, 1961; Sato et al., 1993b),

scheint die Annahme plausibel, daß *S. pomeroyi* algenproduzierte Opine als Nahrung nutzen kann. Weniger klar ist die Funktion OpDH-ähnlicher Proteine dagegen im Fall des anaeroben Schwefelatmers *Thermoanaerobacter tengcongensis* (NP_622575, Bao et al., 2002) oder bei humanpathogenen Staphylokokken (YP_18 7100 und YP_189443, Gill et al., 2005). Da für letztere die erfolgreiche Aufnahme von Eisen von zentraler Bedeutung zu sein scheint (Gill et al., 2005), läßt sich allerdings spekulieren, daß OpDHs bei diesen eher als Siderophorsynthesen (siehe obige Diskussion) denn als Enzyme des Opinkatabolismus fungieren könnten.

Abgesehen von den Proteinen des „*Rhizobium*-Clusters“, die unter den Bakterien- und Pilzproteinen aus Abb. 25 (S. 101) eindeutig die nächsten Verwandten der OpDHs höherer Invertebraten bilden (siehe S. 195), sind die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den bakteriellen OpDH-Homologen bzw. einzelnen Subgruppen untereinander nah verwandter Bakterienenzyme im Neighbor-Netz aus Abb. 25 (S. 101) schlecht aufgelöst. Während die Gliederung des Netzes in drei übergeordnete Sequenzcluster (Invertebraten-OpDHs versus Gruppe um die *Rhizobium*-Proteine Y4xOa und Y4xOb versus übrige bakterielle OpDH-Homologe plus das Protein aus *M. grisea*) und diverse klar abgegrenzte Gruppen bakterieller OpDH-Homologer auch dann erhalten blieben, wenn die Eingabereihenfolge der einzelnen Proteine permutiert⁷ oder das Netz ausgehend von einer Teilauswahl der Sequenzen bzw. einem Alignment ohne invariante Positionen erstellt wurde, erwies sich die relative Positionierung einzelner Bakterienenzyme (insbesondere der Außenseitersequenzen aus *Mesorhizobium spec.*, *Photobacterium profundum* und *M. grisea*, vgl. dazu Felsenstein, 1978; Thompson et al., 1999; Gribaldo und Philippe, 2002) als variabel. Das verdeutlicht die bereits unter 4.3.1 diskutierten Grenzen phylogenetischer Analysen, die im Fall stark divergierender Sequenzen auch daraus resultieren, daß für deren in Loopregionen positionierte Aminosäuren in der Regel keine exakte Alinierung erzielt werden kann (Thompson et al., 1994 und 1999).

Das verstreute Auftreten der OpDH-Homologen aus α - (*Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium spec.*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Mesorhizobium spec.* und *Silicibacter pomeroyi*), β - (*Burkholderia cepacia* und *Ralstonia eutropha*) bzw. γ -Proteobakterien (*Pseudomonas putida*, *Photobacterium profundum* und *Erwinia carotovora*, vgl. Abb. 25,

⁷ Da progressive Alinierungsmethoden wie ClustalW (Thompson et al., 1994b) multiple Alignments ausgehend von einer paarweisen Alinierung der am nächsten verwandten Sequenzen durch sukzessives Hinzufügen von Sequenzen immer geringerer Ähnlichkeit generieren (Feng und Doolittle, 1987), kann die Alinierung mancher Reste von der Eingabereihenfolge der einzelnen Sequenzen abhängen (Lake et al., 1991). Schließlich wird die Position einmal in das Alignment eingefügter Lücken bei späterer Hinzunahme weiterer Sequenzen nicht mehr korrigiert, so daß frühe Alinierungsfehler erhalten bleiben. (Thompson et al., 1994b).

S. 101) dürfte aber weniger auf Artefakte als auf horizontale Gentransfers zwischen verschiedenen Bakterien eines Habitats zurückzuführen sein. Solche bilden bekanntlich eine entscheidende Kraft der prokaryotischen Proteinevolution (Ochman et al., 2000; Koonin et al., 2001). Da bakterielle OpDH-Gene und ihre Homologen vielfach plasmidcodiert sind (gilt außer für die proteinbiochemisch charakterisierten und hypothetischen Opinsynthesen aus *A. tumefaciens* und *A. vitis* auch für die *A. tumefaciens*-„NoDH“ und „OpDH“, das hypothetische Protein aus *S. meliloti* und die Y4xO-Proteine aus *Rhizobium spec.*, siehe Abb. 25, S. 101), ist ihr Austausch vermutlich besonders begünstigt. Schließlich ist Plasmid-DNA in der Regel leichter zu mobilisieren als chromosomale DNA. Außerdem könnten manche der Abweichungen zwischen Gen- und Artenstammbaum darauf zurückzuführen sein, daß paraloge Sequenzen verglichen wurden (vgl. 4.3.1 und Wägele, 2001).

Um neben den in das Netz aus Abb. 25 (S. 101) einbezogenen Homologen auch entferntere Verwandte der OpDHs vom Mollusken-Anneliden-Typ zu identifizieren, die diesen zwar in ihrer dreidimensionalen Proteinstruktur, jedoch nicht mehr signifikant in ihrer Sequenz ähneln (4.2.1, Rost, 1999 und Todd et al., 2001), wurde die Proteindatenbank MMDB nach Strukturnachbarn der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (1bg6, Britton et al., 1998a; Abb. 26, S. 165) durchsucht (2.7.5). Während die N-terminale Domäne der bakteriellen OpDH eine Vielzahl verschiedener Strukturnachbarn lieferte, was angesichts der ubiquitären Verbreitung klassischer Nukleotidbindungsdomänen (siehe S. 190; Rossmann et al., 1974 und 1975; Orengo und Thornton, 2005) wenig verwundert (vgl. auch ähnliche Ergebnisse von Britton et al., 1998a; Matak-Vinkovic et al., 2001; Kavanagh et al., 2002; Choe et al., 2003), fand sich für die C-terminale CENDH-Domäne allein kein signifikanter Treffer (3.10). Das deutet darauf hin, daß katalytische Domänen dieses Typs außerhalb der Enzymfamilie der (D,L)-OpDHs wenig verbreitet sind bzw. in Anpassung an unterschiedliche katalytische Erfordernisse stark variieren. Auch die nächsten Strukturnachbarn des Gesamtproteins (darunter eine Mannitol-2-Dehydrogenase und mehrere Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen, siehe S. 102) ähneln der C-terminalen CENDH-Domäne übereinstimmend mit Beobachtungen anderer Autoren (Britton et al., 1998a; Matak-Vinkovic et al., 2001; Choe et al., 2003) nur mäßig.

Die unter 3.10 aufgeführten Strukturnachbarn der CENDH aus *Arthrobacter spec.* besitzen alle auch eine geringe Sequenzähnlichkeit zu dem bakteriellen Enzym, was auf ihre tatsächliche Verwandtschaft zu den OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs hinweist. Beispielsweise stimmt die humane Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase 1 (1WPQ, Ou et al., 2006) in 13 % ihrer Aminosäurereste mit der CENDH überein und zeichnet sich darüber hinaus durch zahlreiche, über die gesamte Sequenzlänge verteilte konservierte und semikonservierte Posi-

tionen aus, die zusammen rund 31 % der CENDH-Sequenz abdecken (ohne Abbildung). Die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* (1LJ8, Kavanagh et al., 2002) und die CENDH sind zwar nur zu 5 % identisch, teilen jedoch ebenfalls einen weit höheren Anteil ähnlicher Reste, die sich blockweise über die Gesamtsequenz verteilen (nicht dargestellt) und damit gegen eine bloß zufällige Strukturähnlichkeit zwischen den beiden Proteinen sprechen (vgl. Thompson et al., 1994; Rost, 1999). Daß die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *P. fluorescens* deutlich mehr Aminosäuren als das CENDH-Monomer umfaßt (493 statt nur 359), was bei entsprechenden Alinierungen zu ausgedehnten Lücken führt, könnte auf Insertionen bzw. Deletionen im Verlauf der Entwicklungsgeschichte der beiden Proteine zurückzuführen sein.

Einige der Strukturnachbarn wurden auch bei iterierten BLAST-Suchen (2.7.3) als mögliche Verwandte der Mollusken-Anneliden-OpDHs identifiziert und blieben bei den Neighbor-Net-Analysen (Abb. 25, S. 101) nur deshalb unberücksichtigt, weil sie den in der vorliegenden Arbeit verwendeten konservativen Homologiekriterien (2.7.3 und S. 190) nicht genügten. Zusätzliche Hinweise auf eine Verwandtschaft zwischen den OpDHs höherer Invertebraten bzw. ihren bakteriellen Homologen und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen, Ketopantoat-Reduktasen sowie anderen durch die nächsten Strukturnachbarn der CENDH repräsentierten Enzymtypen (siehe 3.10) lieferte die sequenzbasierte Suche nach konservierten Proteindomänen in der Conserved Domain Database des NCBI (Marchler-Bauer und Bryant, 2004). Daher läßt sich weitgehend ausschließen, daß die ähnliche Topologie der CENDH und ihrer unmittelbaren Strukturnachbarn, die allein nicht ausreichen würde, um eine Verwandtschaftshypothese zu begründen (Orengo und Thornton, 2005), konvergenten Ursprungs ist.

Da die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *P. fluorescens* (1LJ8, Kavanagh et al., 2002) und die unter den nächsten Strukturnachbarn der CENDH dominierenden NAD(P)H-abhängigen Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen (G3PDHs; aus *Homo sapiens* [1WPQ, Ou et al., 2006], *Leishmania mexicana* [1N1E, Choe et al., 2003], *Archaeoglobus fulgidus* [1TXG, Sakasegawa et al., 2004] und *Thermotoga maritima* [1Z82]) speziell im C-terminalen Bereich eine deutlich größere strukturelle Ähnlichkeit zu der bakteriellen OpDH aufweisen als die übrigen Strukturnachbarn (ohne Abbildung), sind vor allem sie für Überlegungen zur OpDH-Evolution von Interesse. Die vergleichsweise hohe Struktur- und Sequenzähnlichkeit zwischen der CENDH aus *Arthrobacter spec.* und diversen G3PDHs erklärt zugleich, weshalb die OpDH-Homologen aus *Burkholderia cepacia* und *Ralstonia eutropha* (Abb. 25, S. 101) in den zugehörigen Datenbankeinträgen (ZP_00217591 und YP_297885) als G3PDH (bzw. G3PDH oder Ketopantoat-Reduktase) annotiert wurden. Da die beiden Enzyme katalytisch bedeutsame OpDH-Reste (S. 192), jedoch weder die von Ou et al. (2006) beschriebenen Schlüssel-

reste NAD⁺-abhängiger G3PDHs, noch deren PROSITE-Profil aufweisen (ScanProsite, <http://expasy.org/tools/scanprosite/>, Gattiker et al., 2002), ist aber trotzdem eher von einer OpDH-, denn von einer G3PDH-Aktivität der beiden Burkholderiaceen-Proteine auszugehen.

NAD(P)H-abhängige G3PDHs (EC 1.1.1.8 und EC 1.1.1.94) katalysieren mit der reversiblen Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-Phosphat eine Reaktion, die sich durch eine gewisse Ähnlichkeit zu den reduktiven Kondensationsreaktionen der OpDHs auszeichnet. Im Unterschied zu klassischen L-LDHs handelt es sich sowohl bei den G3PDHs als auch bei den OpDHs um B-Typ-Dehydrogenasen (Biellmann et al., 1973; You et al., 1978; Otto et al., 1980). Auch die physiologischen Aufgaben von G3PDHs und OpDHs lassen gewisse Parallelen erkennen.

In vielen bakteriellen und eukaryotischen Zellen dienen G3PDHs vor allem der Bildung von Glycerin-3-Phosphat für die Phospholipidsynthese (Sakasegawa et al., 2004). Bei Hefen (Larsson et al., 1998), Pflanzen (Shen et al., 2003) und Säugern (Ou et al., 2006), aber auch in der Flugmuskulatur von Insekten (Crabtree und Newsholme, 1972; von Kalm et al., 1989) oder anderen Invertebratenmuskeln mit kohlehydratbasiertem Energiestoffwechsel (Storey und Hochachka, 1975) können cytosolische G3PDHs zudem zusammen mit FAD⁺-abhängigen, an die innere Mitochondrienmembran gebundenen G3PDHs (EC 1.1.99.5) ein Shuttle-System zum Transport von Reduktionsäquivalenten in die Mitochondrien bilden. Außerdem sichern G3PDHs, indem sie NADH aus der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion der Glykolyse reoxidieren, im anaeroben Metabolismus von *Saccharomyces cerevisiae* (Ansell et al., 1997; Costenoble et al., 2000) und manchen Bakterien (Ueda et al., 2004), in den Glykosomen des Endoparasiten *Trypanosoma brucei* (Opperdoes, 1987; Kohl et al., 1996; Choe et al., 2003) sowie in zeitweilig hypoxischen Invertebratengewebe wie dem Adduktor von Austern (Storey und Hochachka, 1975) die Aufrechterhaltung der Redoxbalance.

G3PDHs können somit unter Sauerstoffmangel die gleiche physiologische Funktion wie Invertebraten-OpDHs erfüllen, was eine mögliche Verwandtschaft zwischen diesen Enzymen besonders plausibel erscheinen läßt. Schließlich könnten OpDHs sich somit ohne notwendige Veränderung der zugehörigen regulatorischen Elemente aus dem Genduplikat einer primordialen, unter hypoxischen Bedingungen exprimierten G3PDH (vgl. Ansell et al., 1997) entwickelt haben. Sofern man davon ausgeht, daß die in der vorliegenden Arbeit untersuchte OpDH-Familie bakteriellen Ursprungs ist (4.3.3), drängt sich bei diesen Überlegungen allerdings die Frage auf, ob OpDHs, die der anaeroben Redoxregulation dienen, auch bei Bakterien vorkommen. Das konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, wurde aber wie oben

angesprochen von Beauchamp et al. (1991) für OpDHs knöllchenbildender Rhizobien diskutiert (siehe S. 199).

Eine weitere interessante Parallele zwischen G3PDHs und OpDHs besteht darin, daß für beide eine osmoregulatorische Funktion diskutiert wird. So wurde bei *Saccharomyces cerevisiae* neben einer hypoxiespezifischen G3PDH auch eine G3PDH nachgewiesen, die durch hyperosmotischen Streß induziert wird. Sie ermöglicht zusammen mit einer Glycerin-3-Phosphatase die Produktion des zellkompatiblen Osmolyts Glycerin (André et al., 1991; Ansell et al., 1997; Shen et al., 1999; Costenoble et al., 2000). Auch für OpDHs wurde, da sich durch die von ihnen katalysierten Kondensationsreaktionen bzw. Hydrolysen die Zahl osmotisch wirksamer Moleküle verändert und die beteiligten Aminosäuren zum Teil (zum Beispiel Glycerin, Alanin oder Taurin) wichtige Osmolyte mariner Invertebraten bilden (Schoffeniels und Gilles, 1972; Reitze und Schöttler, 1989; Zurburg und De Zwaan, 1981) verschiedentlich eine osmoregulatorische Bedeutung postuliert (Dando et al., 1981 und Fields, 1983 versus Grieshaber und Kreutzer, 1986; siehe S. 224).

G3PDHs treten fast nur bei Eubakterien und Eukaryonten auf. Bei Archäen, deren Phospholipide sich abweichend von denen eubakterieller und eukaryotischer Organismen durch ein Glycerin-1-Phosphatrückgrat auszeichnen, sind diese Enzyme dagegen in der Regel durch nicht verwandte Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenasen ersetzt (Koga et al., 1998; Nishihara et al., 1999; Sakasegawa et al., 2004). Das erscheint bemerkenswert, da sich auch unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Homologen der OpDHs höherer Invertebraten kein einziger archaebakterieller Vertreter befindet (Abb. 25, S. 101).

Vor dem Hintergrund einer möglichen Verwandtschaft zwischen G3PDHs und (D,L)-OpDHs ist zudem interessant, daß es sich bei dem einzigen in der vorliegenden Arbeit identifizierten Pilzprotein aus der Verwandtschaft der Mollusken-Anneliden-OpDHs gerade um ein Enzym des Reisbrandpilzes handelt (XP_36 6142, Dean et al., 2005; siehe S. 200). Die keimenden Sporen dieses Ascomyceten bilden nach dem Anheften an Reisblätter eine spezialisierte Infektionszelle (ein sogenanntes Appressorium), innerhalb derer bis zu 3 M Glycerin akkumulieren. Dadurch wird ein enormer Turgor aufgebaut, der die Blattcuticula zerstört und den Sporen das Eindringen in das darunterliegende Blattgewebe ermöglicht (Howard et al., 1991; de Jong et al., 1997; Dean et al., 2005). Da das Glycerin in den Appressorien offenbar zumindest teilweise mittels NAD(P)H-abhängiger G3PDHs aus Dihydroxyacetonphosphat oder Dihydroxyaceton gebildet wird (Thines et al., 2000; Dean et al., 2005), liegt es nahe, einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines OpDH-ähnlichen Proteins bei *M. grisea* und der Bedeutung von G3PDHs für den Metabolismus dieses Pilzes zu vermuten.

Größere strukturelle Ähnlichkeit zur CENDH aus *Arthrobacter spec.* als die oben aufgeführten G3PDHs (S. 203) offenbarte nur die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *P. fluorescens* (1LJ8, Kavanagh et al., 2002 und 2003). Sie gehört zur überwiegend prokaryotischen Enzymfamilie langkettiger Mannitol-Dehydrogenasen, die sich von anderen Alkohol- oder Polyoldehydrogenasen unter anderem dadurch unterscheiden, daß ihre Aktivität nicht von einem Metallcofaktor abhängt (Kavanagh et al., 2002 und 2003; Klimacek et al., 2003). Das Enzym zeichnet sich wie die CENDH und viele ihrer unmittelbaren Strukturnachbarn durch eine N-terminale Domäne mit einer um zwei antiparallele β -Stränge erweiterten Rossmannfalte aus. Abweichend von den meisten anderen Strukturnachbarn einschließlich der G3PDHs umfaßt die N-terminale Mannitol-2-Dehydrogenase-Domäne zudem auch ein CENDH-ähnliches viersträngiges β -Faltblatt (Abb. 26, S. 165; Britton et al., 1998a; Kavanagh et al., 2002 und 2003). Die ausschließlich α -helikale C-terminale Domäne des Enzyms läßt ähnliche Helix-Loop-Helix-Motive wie die katalytische CENDH-Domäne erkennen (Kavanagh et al., 2003). Neben einem Asparaginrest, der äquivalent zu Asparagin-196 oder Asparagin-198 der CENDH ist und außer bei der Ketolsäure-Reduktoisomerase aus *E. coli* (1YRL, Tyagi et al., 2005) bei allen unter 3.10 aufgeführten Strukturnachbarn der CENDH auftritt, findet sich in der Primärsequenz der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *P. fluorescens* auch ein Histidin, das homolog zum katalytischen Histidin der bakteriellen OpDH zu sein scheint (Abb. 23, S. 95 und Abb. 27, S. 173; Britton et al., 1998; Kavanagh et al., 2002 und 2003). Diese Konservierung katalytisch relevanter Enzymreste (4.2.2) unterstreicht die mutmaßliche Verwandtschaft zwischen der γ -proteobakteriellen Mannitol-2-Dehydrogenase und den durch die CENDH repräsentierten (D,L)-OpDHs (Kavanagh et al., 2002 und 2003).

Mannitol-2-Dehydrogenasen (EC 1.1.1.67) katalysieren die NADH-abhängige, reversibel Reduktion von D-Fruktose zu D-Mannitol (Kavanagh et al., 2002; Voegele et al., 2005). Dieser in der Natur häufig vorkommende nicht-zyklischer Zuckeralkohol wird von Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Protozoen als Speichersubstanz für Kohlenstoff und Reduktionsäquivalente genutzt, kann ähnlich wie Glycerin als Osmoregulator dienen und wird darüber hinaus von manchen phytopathogenen Pilzen als Radikalfänger verwendet, um die auf reaktiven Sauerstoffspezies basierende Pathogenabwehr ihrer Wirtspflanzen zu unterdrücken (Hult et al., 1980; Jennings, 1984; Stoop et al., 1996; Schmatz, 1997; Shen et al., 1997; Jennings et al., 1998; Shen et al., 1999; Hörer et al., 2001; Kavanagh et al., 2002; Voegele et al., 2005). Interessant im Hinblick auf eine entfernte Verwandtschaft zwischen langkettigen Mannitol-2-Dehydrogenasen und (D,L)-OpDHs erscheint neben der möglichen Beteiligung von Mannitol-2-Dehydrogenasen an der Redoxregulation der Zelle vor allem ihr Bezug zur Virulenz pflan-

zenpathogener Pilze. Schließlich bilden die OpDHs der Agrobakterien und vermutlich auch ihre rhizobiellen Homologen (siehe obige Diskussion) ebenfalls wichtige Determinanten einer pathogenen bzw. symbiotischen Beziehung zwischen Mikroorganismen und ihren pflanzlichen Wirten und werden meist durch virulente oder symbiotische Plasmide codiert.

Außerdem könnte die postulierte Verwandtschaft zwischen OpDHs wie den Octopin- und Nopalinsynthasen aus *A. tumefaciens* und langkettigen Mannitol-2-Dehydrogenasen in Zusammenhang zum Mannityl-Opinsystem der Agrobakterien stehen. Zur Familie der Mannityl-Opine, bei denen es sich um echte Opine im Sinne von Petit et al. (1978) handelt, gehören Iminkonjugate aus Mannose und Glutamin oder Glutamat (Mannopin und Mannopinsäure) sowie deren zyklische Derivate Agropin und Agropinsäure (Firmin und Fenwick, 1978; Guyon et al., 1980; Tate et al., 1982; Dessaux et al., 1992 und 1993). Sie werden in vivo allerdings nicht ausgehend von Mannose (dem korrespondierenden Zucker von Mannitol), sondern in mehreren Reaktionsschritten ausgehend von Glucose gebildet (Salomon et al., 1984; Ellis et al., 1984). Eine Verwandtschaft zwischen den Enzymen des anabolen oder katabolen Mannityl-Opin-Metabolismus und N-(Carboxyalkyl)-Aminosäure-Dehydrogenasen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Kim und Farrand, 1996; Kim et al., 1996; vgl. aber auch Baek et al., 2005).

Die ebenfalls zu den näheren Strukturnachbarn der CENDH gehörende Ketopantoat-Reduktase aus *E. coli* (1KS9, Matak-Vinkovic et al., 2001; EC 1.1.1.169) katalysiert als Enzym des auf Pflanzen und Mikroorganismen beschränkten Pantothenat-Biosynthesewegs die NADPH-abhängige, reversible Reduktion von Ketopantoat zu Pantoat und erfüllt darüber hinaus wahrscheinlich eine Funktion bei der Thiaminbiosynthese über den alternativen Pyrimidinweg (Matak-Vinkovic et al., 2001; Frodyma und Downs, 1998a und 1998b). Auf ihre mögliche phylogenetische Beziehung zur CENDH deutet neben diversen konservierten Strukturelementen die Beobachtung hin, daß die mutmaßlich an der Substratbindung beteiligten Ketopantoat-Reduktase-Reste Serin-244 und Glutamat-256 sowohl in der Primärsequenz als auch in der dreidimensionalen Enzymstruktur ähnliche Positionen einnehmen wie die katalytisch relevanten Reste Arginin-292 und Glutamat-296 der CENDH (Matak-Vinkovic et al., 2001; Britton et al., 1998a; vgl. Abb. 23, S. 95 und Abb. 27, S. 173).

Alle weiteren Strukturnachbarn (einschließlich der unter 3.10 aufgeführten UDP-Glucose- [203J; 1DLJ, Campbell et al., 2000] und 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenasen [2I9P; 2CVZ, Lokanath et al., 2005], einer Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Trypanosoma brucei* [1PGJ, Phillips et al., 1998] und einer Ketolsäure-Reduktoisomerase aus *E. coli* [1YRL, Tyagi et al., 2005]) differieren vor allem im Bereich der C-terminalen Domäne stär-

ker von der CENDH, weshalb ihre Homologie zur katalytischen Domäne CENDH-ähnlicher OpDHs zweifelhaft erscheint (vgl. Britton et al. (1998a), welche die strukturelle Ähnlichkeit zwischen der CENDH aus *Arthrobacter spec.* und einer Gluconat-6-Dehydrogenase aus Schafsleber [6-PGDH, Adams et al., 1994; EC 1.1.1.44] ebenfalls für insignifikant hielten).

Hinweise auf eine Verwandtschaft zwischen (D,L)-OpDHs (N^2 -(D-Carboxyalkyl)-L-Aminosäure-Dehydrogenasen) und N^5 -(L-Carboxyalkyl)-L-Aminosäure-Oxidoreduktasen wie der N^5 -(1-Carboxyethyl)-Ornithin-Synthase aus *Lactococcus lactis* (P15244; Thompson, 1989; Donkersloot und Thompson, 1995; EC 1.5.1.24) oder eukaryotischen Saccharopin-Dehydrogenasen (L-Lysin- bzw. L-Glutamat-bildende N^5 -(L-1,3-Dicarboxypropyl)-L-Lysin : NAD(P)⁺-Oxidoreduktasen, EC 1.5.1.7 und EC 1.5.1.10; Enzyme des Lysinmetabolismus) wie denen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (P38998, P38999 und 2AXQ; Ogawa et al., 1978; Borell et al., 1984; Churcher et al., 1997; Philippsen et al., 1997) oder dem Kreuzblütler *Arabidopsis thaliana* (Q9SMZ4; Tang et al., 1997; Epelbaum et al., 1997) lieferten, sofern man von der Dinukleotidbindungsfalte der Enzyme absieht, weder die sequenz- noch die strukturbasierten Datenbankrecherchen (2.7.3 und 2.7.5). Das stützt die Hypothese von Britton et al. (1998a und 1998b), daß OpDHs differierender Regio- und Stereochemie verschiedenen Superfamilien untereinander nicht verwandter Enzyme angehören. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigten außerdem, daß die OpDHs höherer Invertebraten und ihre bakteriellen Homologen, soweit sich dies auf Sequenzebene feststellen läßt, weder mit der TaDH des Schwamms *H. japonica* (Kan-no et al., 2005b; vgl. S. 182), noch mit den membranständigen Octopin- und Nopalinoxidasen aus *A. tumefaciens* (Zanker et al., 1994) einen gemeinsamen Vorläufer teilen. Auch eine gemeinsame phylogenetische Herkunft von OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs und L-Aminosäuredehydrogenasen konnte, obwohl deren ähnliche Reaktionschemie (siehe S. 172) und gewisse Parallelen zwischen dem katalytische Zentrum der CENDH aus *Arthrobacter spec.* und einer bakteriellen L-Alanindehydrogenase (Baker et al., 1998) eine solche Verwandtschaft vermuten lassen könnten (Thompson und Donkersloot, 1992; Britton et al., 1998a), nicht manifestiert werden.

Eine Verwandtschaft zwischen den CENDH-ähnlichen (D,L)-OpDHs und der Superfamilie NAD(P)H-abhängiger L-Laktat- und L-Malatdehydrogenasen (L-LDHs und L-MDHs; EC 1.1.1.27, EC 1.1.1.37 und EC 1.1.1.82; Birktoft et al., 1982; Madern et al., 2002) bzw. sonstigen LDHs (zum Beispiel NADH-abhängigen D-LDHs, EC 1.1.1.28) erscheint trotz der funktionellen Äquivalenz von OpDHs und LDHs im Metabolismus tierischer Organismen ebenfalls fraglich. Sofern man von der Gliederung in eine (überwiegend) N-terminale Nukleo-

tidbindungsdomäne und eine C-terminale katalytische Domäne (Read et al., 2001) sowie Übereinstimmungen im Bereich der Nukleotidbindungsdomänen mit klassischer bzw. modifizierter Rossmannfalte (Rossmann et al., 1974 und 1975; Britton et al., 1998a) absieht, konnte keine dreidimensionale Strukturähnlichkeit zwischen dem CENDH-Monomer (1bg6, Britton et al., 1998a) und den Untereinheiten etwa der menschlichen Muskel- oder Herztyp-LDH (1I10 und 1I0Z, Read et al., 2001) nachgewiesen werden (VAST-Suchen und Cn3D-gestützte Strukturalinierungen, Gibrat et al., 1996 bzw. Hogue, 1997; 2.7.5). Die Aminosäuresequenzen der CENDH und der menschliche Muskel-LDH (Read et al., 2001) ähneln sich zwar in fast 50 % ihrer Reste (Reste wenigstens semi-konserviert, Terminologie gemäß Bildunterschrift zu Abb. 23, S. 95), stimmen jedoch nur zu 11 bis 12 % überein (je nach Alinierung, die von mehreren größeren Lücken geprägt und dementsprechend unzuverlässig ist; ohne Abbildung).

Da die Reste der katalytischen Histidin-Arginin-Aspartat-Triade in der Primärstruktur von OpDHs bzw. L-LDHs und L-MDHs keine äquivalenten Positionen einnehmen und sich die beiden Enzymfamilien in der relativen Orientierung der zugehörigen Aspartat- und Argininreste unterscheiden (RXXXXD-Motiv der OpDHs versus DXXR-Motiv der L-LDHs und L-MDHs; 4.2.2; Birktoft und Banaszak, 1983; Britton et al., 1998a; Janßen, 2000; Read et al., 2001; Müller, 2007), ist zu vermuten, daß die katalytische OpDH-Triade und die katalytische L-LDH- bzw. L-MDH-Triade konvergent entstanden sind (vgl. Todd et al., 2001 und Goldberg et al., 1994). Allerdings könnte die Position der katalytischen Reste auch infolge genetischer Umlagerungen variieren (Todd et al., 2001). Außerdem ist an äquivalenter Position zum katalytischen Arginin bzw. Histidin der OpDHs (Arginin-292 und Histidin-202 der CENDH, Abb. 23, S. 95) bei vielen L-LDHs (einschließlich der oben erwähnten menschlichen Enzyme) ebenfalls ein (nicht zu deren katalytischer Triade gehörender) Arginin- bzw. Histidinrest konserviert (Alinierungen nicht dargestellt). Das könnte trotz der geringen Ähnlichkeit der dreidimensionalen Enzymstrukturen (vgl. 4.2.1, Rost, 1999 und Todd et al., 2001) auf eine entfernte Verwandtschaft zwischen den durch die CENDH repräsentierten OpDHs und NADH-abhängigen L-LDHs hinweisen. Möglicherweise wurde die Funktion der ursprünglichen katalytischen Triade bei einem der beiden Enzymtypen von zufällig im Bereich des aktiven Zentrums verfügbaren bzw. neu auftretenden Alternativresten übernommen, die den modifizierten katalytischen Anforderungen dieses Enzyms besser genügten (vgl. Todd et al., 2001). Auch bei dem von Monneuse und Rouzé (1987) beschriebenen, mutmaßlich funktionslosen DXXR-Motiv mancher OpDHs (entsprechend D-238 bis R-241 der CENDH, 4.2.2 und Britton et al., 1998a) könnte es sich, obwohl dieses in den OpDH-Sequenzen keine zum katalytischen DXXR-Motiv der L-LDHs äquivalente Position einnimmt, um ein evolutives Relikt handeln.

Eine zuverlässige Antwort auf die Frage nach einer möglichen Verwandtschaft zwischen NADH-abhängigen L-LDHs und CENDH-ähnlichen OpDHs läßt sich aus diesen Überlegungen nicht ableiten. Weil verwandte Proteine so stark divergieren können, daß sie keine signifikante Ähnlichkeit mehr aufweisen, läßt sich eine gemeinsame evolutive Abstammung von Proteinen generell nie völlig ausschließen (Doolittle, 1981), unter Umständen aber auch nicht fundiert belegen. Manche entfernten Verwandtschaftsbeziehungen der Mollusken-Anneliden-OpDHs werden sich trotz der stetigen Erweiterung öffentlicher Sequenz- und Strukturdatenbanken auch durch weiterführende Analysen, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätten, vielleicht nie aufdecken lassen.

4.3.3 Hypothesen zur Entwicklung alternativer Pyruvatoxidoreduktasen

Wie unter 4.3.2 diskutiert bilden die Invertebraten-OpDHs des Mollusken-Annelidentyps mit der CENDH aus *Arthrobacter spec.*, den Ti-Plasmid-codierten Octopin- bzw. Nopalinsynthesen aus *A. tumefaciens* und anderen mutmaßlichen (D,L)-OpDHs (siehe S. 191) eine möglicherweise auf tierische Organismen, Eubakterien und Fungi beschränkte Enzymfamilie. Pflanzliche oder archaeobakterielle Homologe, die mit den Invertebraten-OpDHs mehr als eine ähnliche Nukleotidbindungsdomäne teilen, konnten nicht identifiziert werden (3.10). Allerdings läßt sich nicht ausschließen, daß das Ergebnis der Homologiestudien durch die wenig repräsentative Zusammensetzung öffentlicher Sequenzdatenbanken verzerrt wurde. Schließlich werden diese klar durch bakterielle Proteine, darunter aus wirtschaftlichen und pharmazeutischen Gründen vor allem solche aus Pflanzen-, Tier- oder Humanpathogenen dominiert (S. 200; Todd et al., 2001; Ochman und Moran, 2001). Insbesondere Agrobakterien-OpDHs dürften angesichts des wissenschaftlichen und biotechnologischen Interesses am Opinkonzept und den agrobakteriellen Ti-Vektoren (Schell et al., 1979; Zambryski et al., 1989; Zupan et al., 2000; Escobar und Dandekar, 2003) in öffentlichen Sequenzdatenbanken überrepräsentiert sein.

Davon unabhängig folgt aus der Stellung nachweislich katalytisch aktiver OpDHs (der tierischen OpDHs, der Octopin-, Vitopin- und Nopalinsynthesen aus *A. tumefaciens* bzw. *A. vitis* und der CENDH aus *Arthrobacter spec.*, vgl. S. 192) innerhalb des Neighbor-Netzes aus Abb. 25 (S. 101), daß der gemeinsame Vorläufer aller in das Netz einbezogenen OpDH-Homologen wahrscheinlich bereits OpDH-Aktivität besaß. Er könnte gemäß des unter 4.3.2 diskutierten Vergleichs dreidimensionaler Proteinstrukturen aus einer NADH-abhängigen G3PDH oder einer Mannitol-2-Dehydrogenase hervorgegangen sein. Es stellt sich die Frage, bei welchen Organismen und aufgrund welcher Selektionsdrücke sich eine solche Entwick-

lung vollzogen haben könnte und welche physiologische Funktion die ersten CENDH-ähnlichen OpDHs erfüllten.

Angesichts der nach bisherigen Erkenntnissen geringen Verbreitung von N-(Carboxyalkyl)-Aminosäure-Oxidoreduktasen bei Pilzen (Ergebnisse der aktuellen Homologensuche; kleine Zahl von Pilzen, bei denen die Fähigkeit nachgewiesen wurde, entsprechende Opine als Wachstumssubstrate zu nutzen, Beauchamp et al., 1990) erscheint ein tierischer oder eubakterieller Ursprung der betrachteten OpDH-Familie wahrscheinlich. Sofern OpDHs sich wie von Dessaux und Mitarbeitern (1993) postuliert zuerst bei marinen Mollusken entwickelten, könnten die ersten OpDHs wie jene rezenter Invertebraten der Aufrechterhaltung der cytosolischen Redoxbalance unter funktions- oder biotopbedingter Hypoxie gedient haben. Das Auftreten zum Beispiel von Octopin in der Umgebung mariner Mollusken könnte nachfolgend den Selektionsdruck geliefert haben, unter dem mit Weichtieren assoziierte Bakterien durch lateralen Gentransfer die Fähigkeit erwarben, Opine als Wachstumssubstrate zu nutzen (Dion et al., 1986; Dessaux et al., 1993).

Für die Theorie eines eukaryotischen Ursprungs speziell der Opinsynthesen aus *A. tumefaciens* scheint zu sprechen, daß deren codierende Gene eukaryotische Promotorsequenzen sowie typische eukaryotische Ribosomenbindungsstellen und Polyadenylierungssignale aufweisen (Barker et al., 1983; Monneuse und Rouzé, 1987; Otten et al., 1992; Thompson und Donkersloot, 1992; Zhu et al., 2000). Die eukaryotenähnlichen Expressionssignale könnten allerdings auch durch einen Selektionsprozeß entstanden sein, der die zunehmend effizientere Expression von Genen prokaryotischer Herkunft in pflanzlichem Gewebe ermöglichte (Otten et al., 1992). Das wäre besser damit zu vereinbaren, daß die für CENDH-ähnliche OpDHs codierenden Gene soweit bisher bekannt keine Introns aufweisen (persönliche Mitteilungen Frank Janßen; Thompson und Donkersloot, 1992; Zhu et al., 2000). Auch die Kantenlängen innerhalb des phylogenetischen Netzes aus Abb. 25 (S. 101) sprechen gegen eine eukaryotische Entstehung der OpDHs. Schließlich differieren ihnen zufolge schon die verschiedenen *A. tumefaciens*-OpDHs untereinander stärker als alle in das Neighbor-Netz einbezogenen Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs. Obwohl stärkere Sequenzdivergenz nicht immer in einer längeren Divergenzzeit begründet sein muß, sondern auch auf eine erhöhte Mutationsrate zurückzuführen sein kann (siehe S. 186; Lockhart et al., 1994 und 1996; Grimaldo und Philippe, 2002), und gerade Bakterien eine Überlebensstrategie entwickelt haben, die auf der schnellen Replikation ihrer Genome basiert (Orengo und Thornton, 2005), deutet die im Vergleich zu den tierischen Enzymen weit stärkere Radiation der bakteriellen OpDHs

bzw. OpDH-Homologen darauf hin, daß diese phylogenetisch älter sind als die OpDHs höherer Invertebraten (vgl. Kollman und Doolittle, 2000).

Sofern man von einer prokaryotischen Herkunft der CENDH-ähnlichen OpDHs ausgeht, läßt sich hinsichtlich ihrer ursprünglichen physiologischen Funktion nur spekulieren. Vielleicht handelte es sich bei den ersten OpDHs ähnlich wie nach Vermutungen von Asano et al. (1989) bei der rezenten CENDH aus *Arthrobacter spec.* (siehe S. 200) um Opin-degradierende Enzyme, die Bakterien eines nährstoffarmen Lebensraums einen Selektionsvorteil boten, indem sie es ihnen ermöglichten, N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zu nutzen (vgl. Dessaux et al., 1992). Diese Annahme ist gut mit der großen ernährungsphysiologischen Vielfalt der Boden- und Rhizobakterien zu vereinbaren, unter denen die Fähigkeit zum Abbau von Iminodicarbonsäuren verbreitet ist (Rossignol und Dion, 1985; Tremblay et al., 1987a; Nautiyal und Dion, 1990; Beauchamp et al., 1991). Da diese Bakterien oft über katabolische Plasmide oder chromosomal codierte Gene verfügen, die sie zur Verwertung eines breiten Spektrums teils exotischer Wachstumssubstrate befähigen (Dessaux et al., 1993; Finan et al., 2001; Nelson et al., 2002; Streit et al., 2004; Ishikawa et al., 2004), könnte sich das Potential, Opine zu verstoffwechseln, als eine Nahrungsspezialisierung unter vielen darstellen (Rossignol und Dion, 1985). Bei den pathogenen *Agrobacterium*-Plasmiden könnte es sich demnach um besonders hoch spezialisierte katabolische Plasmide handeln (Dessaux et al., 1993). Mit anderen Worten: Das Opinkonzept der Agrobakterien, die in ihren Wirtspflanzen die Produktion ihrer eigenen Nahrung induzieren (Petit et al., 1978), könnte einer Weiterentwicklung entsprechen, die es pathogenen Agrobakterien erlaubte, unabhängig vom schwankenden Opinangebot ihrer Umwelt zu werden (Dessaux et al., 1993). Aus OpDHs ursprünglich opindegradierender Funktion wären demnach bei den Agrobakterien oder - sofern das von Murphy und Mitarbeitern (1987, 1988 und 1995) postulierte Rhizopinkonzept (4.3.2) zutrifft - vielleicht auch bei anderen Rhizobiaceen spezialisierte Opinsynthesen entstanden, während der Opinkatabolismus überwiegend durch Opinoxidasen des OoxB-OoxA-Typs (Zanker et al., 1994) übernommen wurde.

Das wirft allerdings die Frage nach der Verfügbarkeit von N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren im Lebensraum der Bakterien auf, bei denen sich die ersten Opin-degradierenden Enzyme entwickelten. Eine nicht-enzymatische Bildung von N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren wurde anders als die spontane Bildung von Mannityl-Opinen (Baek et al., 2005) bisher noch nicht beschrieben. Das Auftreten entsprechender Opin-Reservoirs scheint vielmehr an die Aktivität von Opinsynthesen gebunden sein (Dessaux et al., 1993), die demnach vor OpDHs mit Opinoxidasefunktion oder zeitgleich mit ihnen entstanden sein müßten.

Weil davon auszugehen ist, daß die ersten CENDH-ähnlichen OpDHs lange vor der Evolution höherer Pflanzen auftraten (siehe unten), ist auszuschließen, daß sich die ersten Opinsynthesen als Teil des Opinsystems der Agrobakterien oder der Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen entwickelten. Die Enzyme könnten aber ähnlich wie eventuell heute noch die Y4xO-Proteine aus *Rhizobium spec.* als Siderophorsynthesen fungiert haben (4.3.2). Als Triebkraft für ihre Evolution käme in diesem Fall eine allmähliche Zunahme der Sauerstoffkonzentration in Atmosphäre und Hydrosphäre in Frage (Holland und Beukes, 1990; Karhu und Holland, 1996; Canfield, 1996; Martin et al., 2003), die mit der Bildung von schwer löslichem Eisen(III) einhergegangen sein und somit zu einer wachsenden Eisenlimitierung geführt haben könnte (vgl. Ratledge und Dover, 2000). Von Rhizobiaceen oder anderen Bakterien als Siderophore produzierte N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren könnten durch ihre langsame Akkumulation in den Habitaten dieser Mikroorganismen sekundär die Evolution von Opinoxidasen ernährungsphysiologischer Bedeutung nach sich gezogen haben. Dasselbe gilt für den Fall, daß die ersten CENDH-ähnlichen OpDHs im Dienst der zellulären Redoxregulation vielleicht fakultativ anaerober Bakterien standen. Für diese Hypothese spricht, daß eine redoxregulatorische Funktion nicht nur für heutige Invertebraten-OpDHs, sondern auch für NADH-abhängige G3PDHs und Mannitol-2-Dehydrogenasen als ihre möglichen Verwandten nachgewiesen wurde (4.3.2). Eine ähnliche physiologische Aufgabe und damit ähnliche regulatorische Erfordernisse könnten die Evolution primordialer OpDHs aus einem eventuellen G3PDH- oder Mannitol-2-Dehydrogenase-Vorläufer (oder die umgekehrte Entwicklungsrichtung) begünstigt haben (siehe S. 204).

Aufschlußreich im Hinblick auf die mögliche Funktion ursprünglicher OpDHs erscheint auch ein Vergleich der Cofaktorspezifität ihrer rezenten Vertreter. So setzen die in vivo überwiegend als Pyruvatreduktasen wirkenden OpDHs höherer Invertebraten (Gäde, 1980a; De Zwaan und Dando, 1984; Gäde und Grieshaber, 1986; Grieshaber und Kreutzer, 1986) und die vermutlich als Opinoxidase fungierende CENDH aus *Arthrobacter spec.* (Asano et al., 1989) als Enzyme des katabolen Energiestoffwechsels beinahe ausschließlich NADH um (Olomucki, 1981; Fields und Hochachka, 1981; Storey und Dando, 1982; Carvajal et al., 1994; Kan-no et al., 1998; Asano et al., 1989; Müller, 2007). Obwohl die NADH-Spezifität dieser Enzyme natürlich auch konvergent entstanden sein könnte, deutet sie zusammen mit der Position der tierischen OpDHs und der CENDH im Neighbor-Netz aus Abb. 25 (S. 101) darauf hin, daß es sich bei den ursprünglichen OpDHs der Proteinfamilie ebenfalls um NADH-spezifische, der Energieproduktion dienende Enzyme gehandelt haben könnte. Die Fähigkeit, der Octopinsynthesen aus *A. tumefaciens*, neben NADPH als bevorzugtem und für

Enzyme des anabolen Stoffwechsels erwartungsgemäßen Cofaktor auch NADH umzusetzen (Hack und Kemp, 1977; Otten et al., 1977; Goldmann, 1977; Hack und Kemp, 1980; Birnberg et al., 1983), entspräche demzufolge einem evolutiven Relikt. Möglicherweise hat sich der Übergang von einer ausschließlichen NADH- zu einer reinen NADPH-Nutzung, der eine entscheidende Veränderung der metabolischen Rolle markiert (Golding und Dean, 1998), bei diesen Enzymen anders als bei den mehr oder weniger strikt NADPH-spezifischen Nopalinsynthesen der Agrobakterien (Goldmann, 1977; Kemp et al., 1979) noch nicht vollständig vollzogen.

Unabhängig von der metabolischen Funktion ursprünglicher CENDH-ähnlicher OpDHs und unabhängig davon, bei welchen Eubakterien sie entstanden sind, stellt sich die Frage, wie Homologe dieser Enzyme ins Genom tierischer Organismen gelangen konnten (vgl. Hochachka, 1988). Daß alle bisher sequenzierten Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs untereinander näher verwandt sind als mit ihren bakteriellen Homologen (Abb. 25, S. 101), belegt, daß es offenbar nur einmal und nicht mehrfach unabhängig zu einem solchen Transfer kam. Die naheliegende Hypothese, OpDH-codierende Gene könnten mit dem α -proteobakteriellen Endosymbionten, der den Vorläufer des Mitochondriums bildete, in Proto-Eukaryonten gelangt und später vom Mitochondrium in den eukaryotischen Zellkern eingewandert sein (Martin und Müller, 1998; Doolittle, 1998; Gupta, 2000; Martin et al., 2001; Embley und Martin, 2006), läßt sich gut damit vereinbaren, daß sich unter den nächsten Verwandten der Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs viele α -proteobakterielle Sequenzen befinden (3.10). Allerdings deutet das phylogenetische Netz aus Abb. 25 (S. 101) speziell vor dem Hintergrund verschiedener Parallelen zwischen dem Opinsystem der Agrobakterien und den Symbiosen der Rhizobien und Leguminosen (4.3.2 und Freiberg et al., 1997) darauf hin, daß der letzte gemeinsame Vorläufer der Octopinsynthesen rezenter Agrobakterien, der Y4xO-Proteine aus *Rhizobium spec.* und der OpDHs höherer Invertebraten ein symbiotisch reguliertes Enzym aus dem Funktionskontext einer symbiotischen oder parasitischen Beziehung zwischen einem Bakterium und seinem pflanzlichen oder sonstigen eukaryotischen Wirt gewesen sein könnte. Das würde bedeuten, daß der OpDH-Transfer von pro- zu eukaryotischen Organismen sich erst lange nach der endosymbiotischen Entstehung der ersten Eukaryonten vollzog. Es müßte also eine CENDH-ähnliche OpDH durch horizontalen Gentransfer aus einem proteobakteriellen Donor (Abb. 25, S. 101) in einen gemeinsamen eukaryotischen Vorläufer der heutigen Mollusken, Anneliden und Sipunculiden gelangt sein (vgl. Livingstone, 1991; Graur und Li, 2000; Brown, 2003; Lacroix et al., 2006).

Angesichts fossiler Belege für die Existenz fast sämtlicher heutiger Invertebraten-Stämme bereits während des Kambriums vor mehr als 500 Millionen Jahren (Runnegar, 1991; Knoll und Carroll, 1999; Wang et al., 1999; Jermini et al., 2005), müßte eine solche bakterielle Transfektion zu einer Zeit erfolgt sein, als sich das eukaryotische Leben auf der Erde noch auf marine Habitate beschränkte und Algen die einzigen Pflanzen bildeten (Benton, 1995). Das schließt aus, daß ein Sym- oder Ti-Plasmid-codiertes Enzym übertragen wurde, das wie das heutige Protein Y4xOa aus *Rhizobium spec.* (Freiberg et al., 1997) oder die Opinsynthesen moderner Agrobakterien (vgl. 4.3.2) zu einer symbiotischen oder parasitischen Beziehung zwischen Bakterien und Leguminosen bzw. anderen dikotylen Pflanzen beitrug. Damit erübrigen sich auch Überlegungen, die Mobilität der Transfer-DNAs bakterieller Ti-Plasmide und die eukaryotenähnlichen regulatorischen Elemente der durch sie codierten Opinsynthesen (siehe S. 211) könnten den Gentransfer von einem pro- in einen eukaryotischen Organismus erleichtert haben (Monneuse und Rouzé, 1987).

Es könnte jedoch die OpDH eines in symbiotischer oder parasitischer Gemeinschaft zu einer marinen Alge lebenden Bakteriums transferiert worden sein. Schließlich wurden in Analogie zu den durch Agrobakterien verursachten Wurzelhalstumoren dikotyler Pflanzen auch bei marinen Rot- und Braunalgen zum Beispiel der Gattungen *Chondrus*, *Gigartina* oder *Fucus* bakterieninduzierte Gallen beschrieben (Tsekos, 1982; Apt, 1988; Apt und Gibor, 1989; Ashen und Goff, 1998). Die Bildung dieser gewebsspezifischen Proliferationen des Medullagewebes (Apt, 1988; Apt und Gibor, 1989) ist offenbar an die Überproduktion von Phytohormonen wie Indol-3-Essigsäure gekoppelt (Ashen et al., 1999). Bei den induzierenden Bakterien, welche die Intrazellulärräume der Gallen besiedeln (Apt, 1988; Apt und Gibor, 1989), handelt es sich nach bisherigem Kenntnisstand durchweg um α -Proteobakterien der marinen *Roseobacter*-Gruppe (Ashen und Goff, 1996 und 2000). Obwohl das Wissen über deren symbiotische oder parasitische Beziehungen zu marinen Makroalgen insgesamt noch sehr lückenhaft ist und kaum Informationen über die biochemischen Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Arten sowie die metabolischen Vor- oder Nachteile für die beiden Interaktionspartner vorliegen (Apt, 1988; Ashen und Goff, 1998 und 2000), erinnern diese nach Ashen und Goff (2000) durch hohe Symbiont-Wirtsspezifität gekennzeichneten Lebensgemeinschaften entfernt an die Parasitosen der Agrobakterien. Es ist vorstellbar, daß eine ähnliche Zweckgemeinschaft zwischen primordialen α -Proteobakterien und marinen Algen den primitiven Vorläufer sowohl des heutigen *Agrobacterium*-Systems wie auch der Symbiosen zwischen rezenten Rhizobien und Leguminosen bildete.

Ungewiß scheint, welche Funktion OpDHs innerhalb einer primordialen Bakterien-Algen-Symbiose bzw. Parasitose erfüllt haben könnten. Die Existenz eines hochentwickelten Opinsystems wie bei rezenten Agrobakterien läßt sich mit ziemlicher Sicherheit ausschließen. Ein Hinweis auf die mögliche Aufgabe von OpDHs urtümlicher Algen-Symbionten könnte sich aber daraus ergeben, daß die *Roseobacter*-Gruppe, zu der die mit rezenten Makroalgen assoziierten Bakterien gehören (siehe oben), diverse aerobe anoxygene photoheterotrophe Vertreter umfaßt, deren Photosystem an das der anaeroben photosynthetischen Purpurbakterien erinnert (Yurkov und Beatty, 1998; Allgaier et al., 2003; Buchan et al., 2005). Beide bakteriellen Photosynthesesysteme waren in primordialer Zeit vermutlich sehr viel weiter verbreitet als heute. So sind nach Woese (1987) möglicherweise sämtliche rezenten Proteobakterien aus einem photosynthetischen Vorläuferbakterium hervorgegangen. Die aeroben anoxygenen Photoheterotrophen repräsentieren unter Umständen einen Übergangszustand der Evolution von anaeroben photosynthetischen Purpurbakterien zu nicht-photosynthetischen Aeroben (Woese et al., 1984; Shimada, 1995; Yurkov und Beatty, 1998). Das legt die Vermutung nahe, daß es sich bei ursprünglichen bakteriellen Algen-Symbionten durchweg um anaerobe photosynthetische Purpurbakterien oder aerobe anoxygene Photoheterotrophe mit einem durch eine zyklische Elektronentransportkette charakterisierten Photosystem gehandelt haben könnte (Crofts und Wraight, 1983; Fleischman und Kramer, 1998). Um einen fortwährenden Elektronenfluß durch ein solches System gewährleisten zu können, bedarf es nach Fleischman und Kramer (1998) peripherer Hilfsreaktionen, die es erlauben, gezielt Elektronen in die Elektronentransportkette einzuschleusen bzw. aus dem System abzuziehen (vgl. auch Ferguson et al., 1987). Das könnte die gesuchte Verbindung zu den hypothetischen OpDHs primordialer Algen-Symbionten liefern. Möglicherweise erfüllten OpDHs bei diesen Symbionten wie vielleicht auch bei manchen rezenten photosynthetischen Bakterien eine redoxregulatorische Funktion im Kontext des photosynthetischen Elektronenflusses.

Die Annahme, eine symbiotische oder parasitische Beziehung zwischen einem urtümlichen Photosynthese betreibenden Proteobakterium und marinen Makroalgen könnte den Vorläufer heutiger rhizobieller Symbiosen und des modernen *Agrobacterium*-Systems gebildet haben, läßt sich dadurch untermauern, daß bei manchen Leguminosen oberirdische Noduli mit photosynthetischen Rhizobien auftreten, deren Photosynthesesystem an das der aeroben anoxygenen photoheterotrophen Bakterien erinnert (Fleischman und Kramer, 1998). Diese Noduli bilden vermutlich autonome Strukturen, innerhalb derer Nodulchloroplasten und photosynthetische Bakterioide gemeinsam den für die bakterielle Stickstoff-Fixierung erforderlichen Kohlenstoff assimilieren (Fleischman und Kramer, 1998). Da die meisten photosynthetischen

Purpurbakterien wie Rhizobien Stickstoff zu fixieren vermögen (Fleischman und Kramer, 1998), dürfte es sich auch bei den primordialen Symbionten mariner Makroalgen um Stickstoff-Fixierer gehandelt haben. Sofern die Symbionten wie oben spekuliert über OpDHs verfügten, die eine redoxregulatorische Funktion im Kontext des photosynthetischen Elektronentransports erfüllten, ergibt sich damit auch eine mögliche Erklärung für die von Beauchamp (1991) aufgezeigte Korrelation zwischen den bakteriellen Fähigkeiten, Stickstoff zu assimilieren und Opine als Wachstumssubstrate zu nutzen.

Vorstehende Hypothesen lassen sich außerdem gut damit vereinbaren, daß das vor kurzem publizierte Genom des mit marinen Algen assoziierten (Shiba, 1991) aeroben anoxygenen photoheterotrophen Bakteriums *Roseobacter denitrificans* (Swingley et al., 2007) sowohl ein CENDH-ähnliches Gen (YP_680692) als auch Homologe der *Halichondria*-TaDH (YP_681740, YP_683099, YP_680733) und der Opinoxidase-Untereinheiten OoxA bzw. OoxB aus *A. tumefaciens* (zum Beispiel YP_682013 und YP_680993) umfaßt. Auch *Silicibacter pomeroyi*, dessen CENDH-ähnliches Gen (AAV94753) in das phylogenetische Netz aus Abb. 25 (S. 101) einbezogen wurde, gehört nach Moran et al. (2004) zur marinen *Roseobacter*-Gruppe und tritt wie bereits diskutiert oft zusammen mit Algen auf (siehe 4.3.2 und Riemann et al., 2000). Besonders bemerkenswert erscheint jedoch, daß aus marinen Rotalgen einiger Gattungen, bei denen bakterieninduzierte Gallen beschrieben wurden (zum Beispiel *Chondrus*; Tsekos, 1982; Apt, 1988; Apt und Gibor, 1989; Ashen und Goff, 1998), Tauropin und TaDHs isoliert werden konnten (Kuriyama, 1961; Sato und Sato, 1987a; Sato et al., 1993b). Welche Aufgabe diese Enzyme im Stoffwechsel der Algen erfüllen, ist bis heute unklar. Sato und Mitarbeiter (1993b) vermuteten jedoch, da der Tauropingehalt der Rotalge *Rhodoglossum japonicum* bei entsprechenden Messungen im Tagesverlauf variierte und tagsüber deutlich höhere Werte als nachts erreichte, daß TaDHs bei Rhodophyceen in einen Nebenweg des photosynthetischen Elektronenflusses involviert sein könnten.

Das fügt sich gut ins Bild obiger Überlegungen. Möglicherweise erwarben Rotalgen ihre OpDHs durch lateralen Gentransfer aus einem zu den anaeroben photosynthetischen Purpurbakterien oder den aeroben anoxygenen photoheterotrophen Bakterien gehörenden Symbionten und nutzen die Enzyme in einem ähnlichen physiologischen Kontext wie oben (S. 216) für die OpDHs entsprechender photosynthetischer Bakterien postuliert. Alternativ könnte es sich bei den von der Gruppe um Sato (Sato und Sato, 1987a; Sato et al., 1993b) detektierten TaDHs, statt wie von den Autoren angenommen um Rotalgen-Enzyme, um OpDHs bakterieller Algen-Symbionten bzw. Parasiten gehandelt haben. In diesem Fall könnten die von Sato und Sato (1987a) beschriebenen saisonalen Schwankungen des Tauropingehalts von Rhodo-

phyceen auf jahreszeitliche Schwankungen der bakteriellen Populationsdichte zurückzuführen sein (vgl. Buchan et al., 2005).

Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe treten interessanterweise nicht nur freilebend oder in Assoziation mit Algen, sondern auch als Epiphyten, Symbionten oder Parasiten anderer mariner Eukaryonten auf (Ashen und Goff, 2000; Buchan et al., 2005). Sie tragen beispielsweise entscheidend zur Funktion der akzessorischen Nidamentaldrüsen von Kalmaren bei (Pichon et al., 2005), wurden in symbiotischer Gemeinschaft mit Schwämmen oder Austern nachgewiesen (Althoff et al., 1998; Boettcher et al., 2000) und sind möglicherweise für die Toxizität von Dinoflagellaten verantwortlich (Prokic et al., 1998). Cantacuzene (1930) diskutierte zudem marine Mollusken als möglichen Vektor für die bakterielle Infektion von Makroalgen. All das legt die Vermutung nahe, daß es sich bei dem bakteriellen Donor eines CENDH-ähnlichen Gens, das in ein ursprüngliches Metazoon transferiert wurde, um ein primordiales, photosynthetisches (α -)Proteobakterium handelte, das in seinen Eigenschaften rezenten aeroben anoxygenen Photoheterotrophen aus der marinen *Roseobacter*-Gruppe ähnelte. Das gilt möglicherweise auch für den hypothetischen Donor eines Gens aus der Proteinfamilie der *Halichondria*-TaDH, Ornithin-Cyclodesaminasen und μ -Kristalline (Kim et al., 1992; Schröder et al., 2004; Kan-no et al., 2005b), das gemeinsam mit der CENDH-ähnlichen OpDH oder durch unabhängigen Gentransfer in eukaryotische Organismen gelangt sein könnte.

Da bei Poriferen bisher noch keine OpDHs vom Mollusken-Anneliden-Typ nachgewiesen wurden, sie also möglicherweise ausschließlich über *Halichondria*-Typ-OpDHs (Kan-no et al., 2005b) verfügen, könnte der Empfänger des transferierten CENDH-ähnlichen Bakteriengens ein ursprüngliches Eumetazoon gewesen sein. Ob es sich dabei um einen gemeinsamen Vorläufer sämtlicher Eumetazoen einschließlich der Cnidarien und Ctenophoren als deren ursprünglichsten Vertretern (Knoll und Carroll, 1999; Giribet, 2002; Rokas et al., 2005) handelte oder die Genübertragung sich erst nach der Trennung diplo- und triploblastischer Tiere (Giribet, 2002) vollzog, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings nicht voraussagen. Schließlich wurden bisher noch keine Nesseltier-OpDHs (vgl. Ellington, 1979 und 1980; Walsh, 1981; Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a) sequenziert, weshalb unklar ist, ob diese dem Mollusken-Anneliden-, dem *Halichondria*- oder vielleicht einem anderen, noch unbekanntem OpDH-Typ zuzurechnen sind (siehe S. 188). Die weite Verbreitung von OpDHs bei Lophotrochozoen wie Mollusken, Anneliden, Sipunculiden, Nemertinen, Phoroniden, Brachiopoden und Bryozoen (Livingstone et al., 1983 und 1990; Hammen und Bullock, 1991; Sato et al., 1993a; Hammen und Fielding, 1993) gegenüber ihrem nach bisherigem Kenntnisstand nur vereinzelt auftreten bei anderen Protostomiern (einigen Crusta-

ceen; Livingstone et al., 1990; Sato et al., 1993a) und deuterostomen Organismen (Echinodermaten; Livingstone et al., 1990; Sato et al., 1993a; Kan-no et al., 1998), könnte sogar darauf hindeuten, daß Invertebraten-OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs eine Lophotrochozoenspezifische Errungenschaft darstellen (zur Lophotrochozoa-Hypothese vgl. Halanych et al., 1995; Giribet, 2002; Philippe et al., 2005). Dagegen spricht allerdings die mutmaßliche Zugehörigkeit der von Kan-no et al. (1998) untersuchten TaDH aus dem Seestern *Asterina pectinifera* zu dieser OpDH-Familie (vgl. S. 188). Sie läßt vermuten, daß der Transfer des CENDH-ähnlichen bakteriellen Enzyms schon vor der Aufspaltung von Proto- und Deuterostomiern erfolgte (Knoll und Carroll, 1999; Giribet, 2002; Philippe et al., 2005; Rokas et al., 2005). Rezenten Bilaterier wie der Mensch oder andere Vertebraten, die keine OpDHs besitzen (Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a und Datenbanksuchen der aktuellen Arbeit), haben ihre alternativen Pyruvatoxidoreduktasen somit offenbar im Verlauf ihrer Stammesgeschichte sekundär verloren.

An diese Überlegungen schließt unmittelbar die Frage nach der Aminosäurespezifität der CENDH-ähnlichen OpDH an, deren codierendes Gen die Domänengrenze zwischen pro- und eukaryotischen Organismen passierte. Das entspricht der Frage nach der mutmaßlichen Aminosäurepräferenz der ersten Invertebraten-OpDHs vom Mollusken-Anneliden-Typ. Autoren wie Livingstone et al. (1983 und 1990) oder Sato und Mitarbeiter (1993a) leiteten ihre Hypothesen zur Aminosäurespezifität ursprünglicher tierischer OpDHs aus dem Spektrum der bei rezenten Invertebraten-Stämmen nachgewiesenen Pyruvatoxidoreduktase-Aktivitäten ab. Sie werteten die in den Geweben von Poriferen, aber auch bei den als urtümlich geltenden Brachiopoden oder Archaegastropoden dominierenden StrDH- bzw. TaDH-Aktivitäten (Livingstone et al., 1983 und 1990; Hammen und Bullock, 1991; Sato et al., 1993a) als Hinweis darauf, daß die OpDHs ursprünglicher Metazoen eine dieser Substratpräferenzen besessen haben könnten. Daß die TaDH des Schwamms *H. japonica* gemäß Kan-no et al. (2005b) nicht mit den OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs verwandt ist (siehe 4.3.1), Invertebraten-OpDHs also mindestens zweimal unabhängig entstanden sind, schränkt den Wert dieser Überlegungen allerdings ein. Das fast ausschließliche Auftreten von TaDHs und StrDHs bei Poriferen läßt nur dann Rückschlüsse auf die ursprüngliche Aminosäurespezifität von OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs zu, wenn man annimmt, daß die beiden Familien tierischer OpDHs (*Halichondria*-Typ und Mollusken-Anneliden-Typ) sich anfangs unter ähnlichen Selektionsdrücken entwickelten bzw. unter ähnlichen Selektionsdrücken im Genom der jeweiligen Eukaryonten fixiert wurden. In diesem Fall könnte es sich bei den ersten OpDHs des Mollusken-

Anneliden-Typs wie bei den alternativen Pyruvatoxidoreduktasen der Schwämme um TaDHs oder StrDHs gehandelt haben.

Das ließe sich gut mit den hohen Taurin- bzw. Glycinkonzentrationen in den Geweben vieler mariner Invertebraten (Lynch und Wood, 1966; Schoffeniels und Gilles, 1972; Zurburg und De Zwaan, 1981; Reitze und Schöttler, 1989) vereinbaren. Vor allem Taurin als eine phylogenetisch alte Substanz (Choughuley und Lemmon, 1966; Huxtable, 1992) und eines der wichtigsten Osmolyte mariner Invertebraten und Fische tritt vielfach in höheren Gewebekonzentrationen als andere freie Aminosäuren auf (Jacobsen und Smith, 1968; Huxtable, 1992). Bei Bakterien und Pflanzen (Ausnahme Rotalgen), die aufgrund ihrer rigiden Zellwände weniger auf eine osmoregulatorische Kontrolle des Zellvolumens angewiesen sind, kommt das Derivat des Methionin- und Cysteinmetabolismus (Stapleton et al., 1998) dagegen offenbar nur in geringen Mengen vor (Jacobsen und Smith, 1968; Huxtable, 1992). Trotz der mutmaßlich bakteriellen Herkunft von Rotalgen-TaDHs (siehe obige Diskussion) erscheint daher die Existenz prokaryotischer TaDHs fraglich. TaDHs wurden bei Bakterien bisher ebensowenig nachgewiesen wie StrDHs, was allerdings auch darauf zurückzuführen sein könnte, daß nicht nach ihnen gesucht und potentielle Kandidaten wie die CENDH-Homologen aus *Roseobacter denitrificans* (YP_680692, Swingley et al., 2007) oder *Silicibacter pomeroyi* (AAV94753, Moran et al., 2004) nicht proteinbiochemisch charakterisiert wurden.

Besser mit der postulierten bakteriellen Herkunft der Invertebraten-OpDHs in Einklang zu bringen ist die Alternativhypothese, derzufolge es sich bei den ursprünglichen Invertebraten-OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs um ODHs handelte (vgl. Müller, 2007). Schließlich sind solche bei Eubakterien recht weit verbreitet, was außer durch das Auftreten von Octopinsynthesen bei Agrobakterien (Goldmann, 1977; Hack und Kemp, 1977 und 1980; Birnberg et al., 1983) insbesondere durch die Vielzahl der Bakterien unterstrichen wird, die Octopin als Wachstumssubstrat zu nutzen vermögen (Rossignol und Dion, 1985; Tremblay et al., 1987b; Bergeron et al., 1990; Beauchamp et al., 1991).

Sofern man übereinstimmend mit Kan-no et al. (2005b) davon ausgeht, daß OpDHs aus der Verwandtschaft der Ornithin-Cyclodesaminasen und μ -Kristalline nur bei Poriferen auftreten und sämtliche Eumetazoen-OpDHs zum Mollusken-Anneliden-Typ gehören, läßt sich die Annahme einer speziellen Aminosäurepräferenz der ersten CENDH-homologen Invertebraten-OpDHs allerdings nur schwer damit vereinbaren, daß bei Cnidarien als den vielleicht ursprünglichsten rezenten Eumetazoen (Knoll und Carroll, 1999) das gesamte Spektrum alternativer Pyruvatoxidoreduktase-Aktivitäten (ODH-, AloDH-, StrDH-, TaDH- und β -AloDH-Aktivität) detektiert wurde (Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a). Letzteres

deutet darauf hin, daß bei frühen Eumetazoen bereits alle bekannten OpDH-Aktivitäten auftraten. Aufgrund der phylogenetischen Analysen der vorliegenden Arbeit (3.10) ist jedoch auszuschließen, daß in der Frühzeit der Eumetazoen-Evolution bereits das komplette Spektrum spezialisierter Mollusken-Anneliden-Typ-OpDHs existierte, die nachfolgend bei bestimmten Stämmen ganz oder teilweise verloren gingen (vgl. Livingstone et al., 1983 sowie Hammen und Bullock, 1991). Sonst müßten die in das Neighbor-Netz aus Abb. 24 (S. 98) einbezogenen OpDHs gleicher Aminosäurespezifität untereinander näher verwandt sein als solche differierender Substratpräferenz, was wie unter 4.3.1 diskutiert nicht zutrifft. Ursprüngliche Invertebraten-OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs zeichneten sich somit höchstwahrscheinlich durch breite Aminosäurespezifität aus.

Die auch von Hammen und Fielding (1993) sowie Janßen (2000) vertretene Hypothese, daß primordiale Invertebraten-OpDHs (mit vermutlich mäßiger katalytischer Effizienz) viele verschiedene Aminosäuren umzusetzen vermochten und die Evolution der alternativen Pyruvatoxidoreduktasen auf ein zunehmend engeres Substratspektrum der einzelnen Enzyme ausgerichtet ist (vgl. auch Storey und Dando, 1982), steht in Einklang mit der Annahme von Jensen (1976), daß ursprüngliche Enzyme generell eine breite Substratspezifität besaßen. Sie läßt sich gut mit der großen Aminosäuretoleranz der von Ellington (1980) gereinigten Seeanemonen-ODH vereinbaren (vgl. S. 153), die angesichts geringer Gewebekonzentrationen vieler ihrer Substrataminosäuren (Ellington, 1980) eher ein evolutives Relikt denn das Resultat einer selektiv begünstigten Erweiterung des Substratspektrums darzustellen scheint. Dasselbe gilt für die breite Aminosäureakzeptanz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten StrDH aus *O. edulis*. Da ihr wie unter 4.1.1 diskutiert möglicherweise nur geringe physiologische Bedeutung zukommt und sie dementsprechend keinem großen, auf Spezifitätsänderungen zielenden Selektionsdruck unterliegen dürfte, erscheint die Vermutung, daß dieses Enzym relativ ursprüngliche OpDH-Merkmale aufweist, plausibler als die Alternativhypothese, nach der es sich bei ihr um ein besonders abgeleitetes Enzym handelt. Schließlich postulierten schon Storey und Dando (1982), daß der evolutive Trend zu einer engeren Substratspezifität von OpDHs (speziell ODHs) von einer wachsenden physiologischen Bedeutung der alternativen Pyruvatoxidoreduktasen sowie im Fall der ODHs von einer Zunahme der intrazellulären Argininphosphat-Konzentrationen (siehe unten) begleitet worden sein könnte. Auch die große Aminosäuretoleranz der durch *A. tumefaciens* codierten Octopinsynthesen (S. 9; Hack und Kemp, 1980; Otten et al, 1977; Birnberg et al., 1983; Tempé, 1983; Otten und Szegedi, 1985; Chilton et al., 2001) und das breite Substratspektrum der CENDH aus *Arthrobacter spec.* (Kato et al., 1996 und S. 10) passen gut in das Szenario ursprünglich mehr oder weniger uni-

verseller Metazoen-OpDHs des Mollusken-Anneliden-Typs, aus denen sich nachfolgend in mehreren unabhängigen Entwicklungslinien spezialisierte, an die Zusammensetzung des Aminosäurepools in den jeweiligen Tiergeweben angepaßte (Gäde, 1988) Enzyme entwickelten (Neighbor-Netz aus Abb. 24, S. 98 und 4.3.1).

Darüber hinaus beleibt die Frage nach den Selektionsvorteilen, die der Erwerb alternativer Pyruvatoxidoreduktasen für ursprüngliche metazoische Organismen mit sich gebracht haben könnte. Es fragt sich, weshalb OpDH-Gene eubakterieller Herkunft in deren Genom fixiert und speziell bei vielen Lophotrochozoen bis heute konserviert wurden, während die anaerobe Glykolyse etwa rezenter Vertebraten ausschließlich durch LDHs terminiert wird. Das erscheint vor allem deshalb interessant, weil davon auszugehen ist, daß die primordialen Metazoen, in die ein CENDH-ähnliches oder anderes OpDH-codierendes Gen transferiert wurde, bereits über NADH-abhängige LDHs verfügten. Jedenfalls werden LDHs aufgrund ihrer weiten Verbreitung nicht nur im Tierreich, sondern auch bei Pilzen und Pflanzen (Long, 1976; Livingstone et al., 1983 und 1990; Hammen und Bullock, 1991; Hammen und Fielding, 1993; Sato et al., 1993a; Madern, 2002; Gleason et al., 1966; LéJohn, 1971; Soler et al., 1982; Genga et al., 1983; Gruber et al., 1974; O'Carra und Mulcahy, 1996) in der Regel für die im Vergleich zu OpDHs ursprünglicheren terminalen Dehydrogenasen der eukaryotischen anaeroben Glykolyse gehalten (Hochachka, 1988). Dafür sprechen auch die minimalen LDH-Aktivitäten in den Geweben des Wattwurms, der Pazifischen Auster oder anderer rezenter Invertebraten mit katalytisch aktiven OpDHs (3.1; Livingstone et al., 1983 und 1990). Sie deuten darauf hin, daß es sich bei den LDHs der entsprechenden Arten um physiologisch unbedeutende evolutive Relikte handelt, die funktionell durch OpDHs substituiert wurden.

Wie in der Einleitung erwähnt kommen bei tierischen Organismen sowohl NADH-abhängige L- als auch NADH-abhängige D-LDHs vor (EC 1.1.1.27 und EC 1.1.1.28), die allerdings nur selten in den Geweben rezenter Arten coexistieren (Long und Kaplan, 1968; Long, 1976; Hammen und Fielding, 1993; Mulcahy et al., 1997). Erstere bilden mit den NADH-abhängigen L-LDHs aus Pflanzen, Pilzen und Eubakterien sowie pro- und eukaryotischen NAD(P)H-abhängigen L-MDHs eine Superfamilie homologer Enzyme (S. 208 und Madern, 2002), sind jedoch offenbar nicht mit den NADH-abhängigen D-LDHs verwandt (Taguchi und Ohta, 1991; Madern, 2002 und Datenbanksuchen der vorliegenden Arbeit, Ergebnisse nicht dargestellt). Letztere wurden bisher außer bei Eubakterien, Archäen und Pilzen (Gleason et al., 1966; LéJohn, 1971; Garvie, 1980; Hecht, 1990; Oren und Gurevich, 1995) bei Mollusken, Polychaeten, Echiuren, Nemertinen, Merostomata, Arachniden sowie Crustaceen nachgewiesen (Long und Kaplan, 1968 und 1973; Long, 1976; Ellington und Long, 1978; Hammen

und Fielding, 1993; Grieshaber et al., 1994; Mulcahy et al., 1997) und treten im Unterschied zu den klassischerweise tetrameren L-LDHs (Everse und Kaplan, 1973; Madern, 2002, vgl. aber auch Gäde, 1979) meist als funktionelle Dimere auf (S. 7; Long und Kaplan, 1973; Storey, 1977a; Ellington und Long, 1978; Gäde, 1979; Gäde und Grieshaber, 1986; Mulcahy et al., 1997). Das wirft viele zusätzliche Fragen auf, die zu diskutieren jedoch den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte. Obwohl die Entstehung metazoischer OpDHs untrennbar mit der Evolution von LDHs differierender Stereospezifität (möglicherweise aber auch mit der Entwicklung anderer terminaler Pyruvatoxidoreduktasen des Tierreichs wie etwa der Ethanoldehydrogenasen von Mückenlarven oder Fischen (De Zwaan und van den Thillart, 1985; van Waarde, 1991; van Waarde et al., 1991; Grieshaber et al., 1994) verbunden sein dürfte, konzentrieren sich die folgenden Ausführungen auf eine Gegenüberstellung möglicher Vor- bzw. Nachteile von OpDHs und LDHs gleich welcher Stereospezifität, ohne dabei auf eine eventuelle Koexistenz von D- und L-LDHs in primordialen Eukaryonten oder die zeitliche Abfolge des Erwerbs verschiedener LDHs näher einzugehen.

Die Fixierung eines OpDH-Gens in einem ursprünglichen marinen Metazoon (vgl. S. 214, S. 215 und S. 218 folgende) wurde höchstwahrscheinlich durch einen großen Pool freier Aminosäuren in dessen Geweben begünstigt. Schließlich ist davon auszugehen, daß bei primordialen marinen Metazoen ähnlich wie bei rezenten Meeresinvertebraten Glycin, Alanin, Prolin, Taurin, β -Alanin oder andere zellkompatible freie Aminosäuren (vgl. Brown, 1976; Yancey et al., 1982; Yancey, 2005) als wichtige intrazelluläre Osmolyte fungierten und in entsprechend hohen Gewebekonzentrationen auftraten (Lynch und Wood, 1966; Schoffeniels und Gilles, 1972; Zurburg und De Zwaan, 1981; Yancey et al., 1982; Gilles, 1987; Huxtable, 1992). Die Verfügbarkeit beträchtlicher Aminosäuremengen ist offenbar von zentraler Bedeutung für die Funktionalität von OpDHs, was sich insbesondere daraus ableiten läßt, daß diese Enzyme unter rezenten Metazoen fast ausschließlich bei marinen Invertebraten verbreitet sind, während sie bei den meisten limnischen Spezies und allen bisher untersuchten Landtieren mit ihren durch sehr viel geringere Osmolaritäten gekennzeichneten Körperflüssigkeiten fehlen (siehe Einleitung; Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a). Der sekundäre Verlust alternativer Pyruvatoxidoreduktasen, zu dem es entsprechend obiger Diskussion im Verlauf der Metazoenevolution in verschiedenen Entwicklungslinien kam (S. 219), könnte demnach in vielen Fällen mit der Anpassung an einen nicht-marinen Lebensraum und einer damit verbundenen Verringerung der Gewebekonzentrationen freier Aminosäuren (Schoffeniels und Gilles, 1972; Zurburg und De Zwaan, 1981) einhergegangen sein (Livingstone et al., 1983; Livingstone, 1991; Hammen, 1991).

Auch das offensichtliche Fehlen von OpDHs bei modernen Seewasserrfischen läßt sich auf diese Weise erklären. Denn marine Fische haben im Verlauf ihrer Entwicklungsgeschichte trotz eines nach neueren Erkenntnissen unzweifelhaft marinen Ursprungs der Vertebraten (Holland und Chen, 2001) wahrscheinlich eine limnische Phase durchlaufen (Goldstein und Kleinzeller, 1987) und zeichnen sich daher durch eine völlig andere Osmolyt-Zusammensetzung ihrer Körperflüssigkeiten aus als marine Invertebraten. Während es sich bei Meeresteleostiern in der Regel um Osmoregulatoren handelt, die eine konstant niedrige Osmolarität ihrer Intrazellulärflüssigkeiten aufrechterhalten und daher keiner organischen Osmolyte bedürfen (Yancey, 2005), bilden bei osmokonformen Quastenflossern und marinen Elasmobranchiern wie Haien und Rochen Harnstoff und N-Trimethylamin-Oxid (TMAO) die Hauptosmolyte (Chamberlin und Strange, 1989; Yancey, 2005). Lediglich die intrazelluläre Osmoregulation des Schleimaals, *Myxine glutinosa*, der unter den rezenten Fischen angeblich als einziger ausschließlich marine Vorläufer besitzt (Goldstein und Kleinzeller, 1987), hängt ähnlich wie die mariner Invertebraten wesentlich von freien Aminosäuren ab (Cholette und Gagnon, 1973). Eine interessante Fragestellung für zukünftige Arbeiten ist daher, ob diese Art über OpDHs verfügt.

Ein Zusammenhang zwischen dem Osmoregulationssystem mariner Invertebraten und dem Besitz von OpDHs besteht allerdings offenbar nur insoweit, als ersteres die Verfügbarkeit der für OpDH-Reaktionen benötigten Aminosäuren garantiert. Die osmoregulatorische Wirkung, die daraus resultieren könnte, daß sich die Zahl osmotisch wirksamer Teilchen durch die Bildung oder Degradation von Opinen verändert, dürfte zu vernachlässigen sein. Zumindest das von Dando et al. (1981) formulierte Argument, die Produktion konjugierter Endprodukte könnte glykolysebedingte Veränderungen des intrazellulären osmotischen Drucks minimieren und daher vor allem während länger andauernder Hypoxie vorteilhaft für Osmokonformer sein, greift nicht, da sich der osmotische Druck der Zellen durch die Akkumulation von Opinen oder Laktat in der bei rezenten Arten nachgewiesenen Größenordnung nur geringfügig verändert (Fields, 1983; Grieshaber und Kreutzer, 1986).

OpDHs ermöglichen allerdings nach Fields und Quinn (1981) sowie Fields (1983) unter der Voraussetzung, daß die von ihnen genutzten Aminosäuren in hohen Gewebekonzentrationen vorliegen, über längere Zeiträume als LDHs die Aufrechterhaltung eines niedrigen cytosolischen $[NADH] : [NAD^+]$ -Verhältnisses (Massenwirkungsgesetz beachten). Sie können daher bei marinen Invertebraten den zellulären Redoxstatus unter biotop- oder funktionsbedingter Hypoxie effektiver regulieren. Vielleicht lieferte gerade das den entscheidenden Selektionsvorteil, der bei vielen marinen Invertebraten zur Substitution von NADH-abhängigen

LDHs durch OpDHs führte (vgl. Grieshaber und Kreutzer, 1986). Durch den Besitz von OpDHs breiter Substratspezifität oder die Coexpression mehrerer NADH-abhängiger Pyruvat-oxidoreduktasen (vgl. Abb. 2, S. 50; Kreutzer, 1987; Sato et al., 1987b; Grieshaber et al., 1994; Mulcahy et al., 1997), lassen sich zudem nicht nur bei zufälligem Aufeinanderfolgen von funktioneller und biotopbedingter Hypoxie (Grieshaber und Kreutzer, 1986) Endprodukt-hemmungen der anaeroben Glykolyse eher vermeiden als mittels einer einzelnen, auf ein en- ges Substratspektrum begrenzten Pyruvatoxidoreduktase. Außerdem erhöht sich mit der Zahl der Aminosäuresubstrate, die von den OpDHs eines Gewebes umgesetzt werden können, die Größe des Aminosäurepools, der die Kapazität des jeweiligen OpDH-Systems bestimmt (Livingstone, 1983 und 1991). Vor allem angesichts jahreszeitlicher bzw. stoffwechselabhän- giger Schwankungen seiner Zusammensetzung (Zurburg und De Zwaan, 1981; Livingstone, 1983; Kan-no et al., 1999) kann einer großen Vielfalt möglicher OpDH-Reaktionen große Be- deutung zukommen.

Die Argumentation, daß der Besitz von OpDHs durch den großen Pool freier Aminosäu- ren in den Geweben mariner Invertebraten begünstigt wird, greift, da L-Arginin keine osmo- regulatorische Bedeutung besitzt und in der Regel auch bei marinen Organismen nur in mode- raten Gewebekonzentrationen auftritt (Schoffeniels und Gilles, 1972; Bowlus und Somero, 1979; Yancey et al., 1982; Livingstone, 1991), nicht für ODHs. Deren Evolution wurde of- fenbar durch das verbreitete Vorkommen von L-Argininphosphat bei Invertebraten gefördert (vgl. Zammit und Newsholme, 1976; Bowlus und Somero, 1979; Yancey et al., 1982; Living- stone, 1983 und 1991). Schließlich kann, indem der Abbau dieses Phosphagens an die Aktivi- tät einer ODH gekoppelt wird, etwa während energieintensiver Fluchtreaktionen eine über- mäßige L-Arginin-Akkumulation vermieden werden (Grieshaber und Gäde, 1976). Das ist deshalb von Bedeutung, weil Arginin aufgrund seiner hohen Affinität für phosphorylierte Metabolite und aufgrund seiner Fähigkeit, mit katalytischen Argininresten um Enzymsubstra- te zu konkurrieren, die Zellfunktion bereits in geringen Konzentrationen beeinträchtigt (Cot- ton et al., 1973; Bowlus und Somero, 1979; Yancey et al., 1982). Da Octopin die Aktivität von Enzymen weniger einschränkt (Bowlus und Somero, 1979) und durch das Entfernen von L-Arginin aus dem Gewebe zugleich die weitere Nutzung des Phosphagens L-Argininphos- phat erleichtert wird (Zammit und Newsholme, 1976), scheint der Besitz von ODHs speziell für aktive Arten mit großem L-Argininphosphat-Pool vorteilhaft zu sein (Livingstone, 1991).

Invertebraten-ODHs treten nach bisherigem Kenntnisstand nur in Kombination mit L-Ar- gininphosphat auf (De Zwaan und Putzer, 1985; Grieshaber und Kreutzer, 1986), was zum Beispiel dadurch unterstrichen wird, daß unter den bisher untersuchten Sipunculiden nur der

über dieses Phosphagen verfügende Spritzwurm (Pörtner, 1982) ODHs exprimiert (siehe 3.1, 3.2 und S. 187; Livingstone et al., 1983; Pörtner et al., 1984b; Kreutzer, 1987; Hammen und Fielding, 1993). Auch das Vorkommen von ODHs bei Süßwassermuscheln wie *Anodonta cygnea* oder *Dreissena polymorpha* korreliert offenbar mit einem relativ großen L-Argininphosphat-Pool dieser Arten (Gäde und Zebe, 1973; Gäde, 1974; Livingstone et al., 1983). Umgekehrt könnte das Fehlen von ODHs bei Vertebraten darin begründet liegen, daß bei diesen als einziges Phosphagen das besonders gut zur raschen Energiebereitstellung geeignete Keratinphosphatauftritt (Livingstone, 1983 und 1991; Grieshaber et al., 1994).

Ähnlich wie die hohen ODH-Aktivitäten in den Geweben vieler mobiler Invertebraten (Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a; Grieshaber et al., 1994) sich durch die Kopplung von L-Argininphosphat und ODHs zu erklären scheinen, könnte die Evolution zum Teil ebenfalls beträchtlicher ALODH-Aktivitäten (Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a; Grieshaber et al., 1994) dadurch begünstigt worden sein, daß mit ihrer Hilfe im anaeroben Energiestoffwechsel einer durch die Transaminierung von L-Aspartat bedingten L-Alaninakkumulation entgegengewirkt werden kann (Abb. 1, S. 2; Felbeck und Grieshaber, 1980; De Zwaan und Dando, 1984; Grieshaber et al., 1994). Da L-Alanin trotz seiner üblichen Beschreibung als zellkompatibles Osmolyt (Bowlus und Somero, 1979; Yancey et al., 1982) ein starker Inhibitor der Pyruvatkinase ist (Larade und Storey, 2002), dürfte dies speziell unter funktionsbedingter Hypoxie die Aufrechterhaltung hoher Glykolyseraten erleichtern.

Bemerkenswerterweise sind sowohl NADH-abhängige LDHs als auch OpDHs eher auf das Überdauern kurzfristiger Hypoxie als auf die Energiebereitstellung während länger andauernden Sauerstoffmangels ausgerichtet. Sie ermöglichen zwar einen hohen glykolytischen Flux, jedoch keinen über die Standard-Substratkettenphosphorylierungen der anaeroben Glykolyse hinausgehenden ATP-Gewinn. Während fortgesetzter Hypoxie nimmt daher die Bedeutung anderer anaerober Stoffwechselwege wie des Aspartat-Succinat- oder des Glucose-Succinat-Wegs zu, die durch geringere Energieproduktionsraten bei gleichzeitig größerer Energieausbeute je Mol umgesetzter Glykosyleinheiten gekennzeichnet sind (siehe Einleitung; Livingstone et al., 1983; De Zwaan und Putzer, 1985; Livingstone, 1983 und 1991; Grieshaber et al., 1994). Das legt die Vermutung nahe, daß es sich bei letzteren um phylogenetisch sehr alte, unter permanent anoxischen Umweltbedingungen entstandene Errungenschaften handelt, während sich die terminalen Pyruvatoxidoreduktasen als spätere Anpassung an Lebensräume mit schwankendem Sauerstoffgehalt entwickelt haben könnten. Dies läßt sich gut mit einigen der oben diskutierten Hypothesen zur Evolution von OpDHs (zum Beispiel S. 213) vereinbaren und wurde für NADH-abhängige L-LDHs bereits von Madern

(2002) postuliert. Er ging anders als Webster (2003), nach dem LDHs wie die übrigen glykolytischen Enzyme in der Archäenperiode des Präkambriums und damit vor dem Übergang zu sauerstoffabhängigen Lebensformen entstanden, davon aus, daß NADH-abhängige L-LDHs zuerst bei fakultativ anaeroben Urbakterien auftraten, die in ihrem Habitat vorübergehendem Sauerstoffmangel ausgesetzt waren.

Unabhängig davon, bei welchen Organismen die verschiedenen terminalen Enzyme der anaeroben Glykolyse entstanden sind, dürfte ihr unterschiedliches Potential, einen hohen glykolytischen Durchsatz zu ermöglichen, ihre Evolution und Verbreitung bei verschiedenen Tierstämmen entscheidend beeinflußt haben. LDHs gestatten in der Regel höhere Energieproduktionsraten als ODHs, deren maximale Umsatzraten ihrerseits diejenigen der anderen OpDHs zu übertreffen pflegen (S. 106; Livingstone et al., 1983; Livingstone, 1983 und 1991). Gleichzeitig erscheint die schnelle Verfügbarkeit von Stoffwechselenergie speziell für die Flucht vor Freißfeinden oder für die Jagd nach Beute und damit vor allem für höher entwickelte Metazoen mit aktivem Lebensstil essentiell (De Zwaan und van den Thillart, 1985; Livingstone, 1983 und 1991). L-LDHs (und Keratinphosphat statt L-Argininphosphat oder anderen Phosphagenen) könnten demnach bei Vertebraten unter anderem deshalb selektiert worden sein, weil sie sich besonders zur kurzfristigen sauerstoffunabhängigen Energiebereitstellung eignen (Livingstone et al., 1983; Livingstone, 1983). Das ist für Wirbeltiere offensichtlich wichtiger als die Fähigkeit, unter Hypoxie möglichst lange ein niedriges cytosolisches $[NADH] : [NAD^+]$ -Verhältnis aufrechtzuerhalten (siehe S. 224).

Insgesamt dürfte sich jedoch die Bedeutung terminaler glykolytischer Enzyme in der vertebratischen Entwicklungslinie durch die Evolution effizienter Kreislaufsysteme und Sauerstofftransportmoleküle verringert haben. Leistungsfähige zirkulatorische Systeme ermöglichen, abgesehen davon, daß sie die aerobe Kapazität der Gewebe erhöhen, den raschen Abtransport glykolytischer Endprodukte aus der arbeitenden Skelettmuskulatur, so daß Endprodukthemmungen unabhängig von alternativen Pyruvatoxidoreduktasewege (siehe S. 225) vermieden und die Stoffwechsellasten akuter Muskelbeanspruchung gegebenenfalls auf mehrere Organe verteilt werden können (vgl. Cori-Zyklus, Stryer, 1996). Obwohl unklar ist, ob Laktat tatsächlich wie verschiedentlich diskutiert leichter als Opine vom Gewebe ins Blut zu diffundieren vermag (Grieshaber und Kreutzer, 1986), könnte der Verlust von OpDHs bei den Vorfahren heutiger Wirbeltiere mit der Evolution von deren Blutkreislaufsystem einhergegangen sein (Livingstone, 1983).

Vorstellbar ist auch ein Zusammenhang zwischen dem typischen Oligomerisationszustand der verschiedenen terminalen Pyruvatoxidoreduktasen und ihrer Selektion innerhalb

bestimmter metazoischer Entwicklungslinien. Schließlich können NADH-abhängige D- und L-LDHs als meist di- bzw. tetramere Enzyme im Unterschied zu den monomeren Invertebraten-OpDHs (Everse und Kaplan, 1973; Long und Kaplan, 1973; Long et al., 1979; Gäde, 1979; Livingstone et al., 1983; Gäde und Grieshaber, 1986) allosterisch reguliert werden, was besonders für Organismen mit einem komplexen Metabolismus von Vorteil sein könnte. Die Tetramerie klassischer L-LDHs ermöglicht es zudem, durch bloßes Kombinieren von Untereinheiten eine Vielzahl unterschiedlicher Isoenzyme mit abgestuften katalytischen Eigenschaften zu erhalten, die in den stark differenzierten Geweben hochentwickelter Organismen gegebenenfalls verschiedene physiologische Funktionen erfüllen können (Bailey und Thye, 1975; Markert et al., 1975)

Entscheidend für die Selektion von L-LDHs nicht nur bei Vertebraten, sondern zum Beispiel auch bei vielen Crustaceen (Livingstone et al., 1983 und 1990; Sato et al., 1993a) könnte darüber hinaus eine besonders gut auf die metabolischen Erfordernisse der Zelle abgestimmte Genexpression gewesen sein (vgl. Hochachka, 1988; Orengo und Thornton, 2005). So werden rezente metazoische L-LDHs wie die übrigen tierischen Glykolyseenzyme einschließlich der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen, mit denen sie im anaeroben Energiestoffwechsel unmittelbar zusammenwirken (Abb. 1, S. 2), durch hypoxieinduzierbare Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α reguliert (Webster, 2003). Das ermöglicht eine koordinierte Modulation ihrer Expression in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck (Webster, 2003). Über die Transkriptionskontrolle tierischer OpDHs ist dagegen bisher noch nichts bekannt. In diese Richtung zielende Arbeiten könnten vielleicht weiteres Licht in das Rätsel um die Verteilung terminaler glykolytischer Enzyme im Tierreich bringen. Ob dieses sich jemals vollständig lösen lassen wird, ist allerdings unklar. Manche Spuren der evolutiven Vergangenheit alternativer Pyruvatoxidoreduktasen könnten bereits so stark verwischt sein, daß sie sich mittels der verfügbaren Analyseverfahren nicht mehr detektieren lassen (S. 210 und Doolittle, 1981). Zugleich muß es, da manche Entwicklungen von Zufallsfaktoren bestimmt worden sein könnten, gar nicht für alle Facetten der OpDH-Evolution eine logische Erklärung geben.

Von Interesse für weiterführende Untersuchungen zur Substratspezifität und Evolution tierischer OpDHs ist zunächst eine kinetische Charakterisierung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit klonierten Enzyme (vgl. Feyen, 2006). Sie sollte vor allem größere Klarheit hinsichtlich deren Aminosäurepräferenzen erbringen. Durch gezielte Mutagenese (Müller, 2007) und Röntgenkristallisationsexperimente, bei denen unter anderem auf die in der aktuellen Arbeit etablierten Systeme zur Expression und Reinigung von OpDHs zurückgegriffen werden könnte, ließe sich vielleicht auch die Frage nach der molekularen Basis der Substrat-

spezifität einzelner OpDHs klären. Um einige der vorstehend entwickelten Hypothesen zur Evolution tierischer OpDHs zu überprüfen, ist zudem die Sequenzierung und Expression weiterer OpDHs vor allem aus niederen Invertebraten und metazoischem Herzgewebe, aber auch aus Rotalgen anzustreben. Eine profilbasierte Suche nach OpDH-Relikten in vollständig sequenzierten Genomen wie dem des Menschen könnte im Erfolgsfall den vermuteten sekundären OpDH-Verlust in der vertebratischen Entwicklungslinie bestätigen. Ein umfassendes Verständnis der OpDH-Evolution dürfte, wie die vorliegende Arbeit verdeutlicht, letztlich nur durch das Kombinieren physiologischer und ökologischer Daten mit strukturellen und phylogenetischen Erkenntnissen zu erreichen sein.

Folgende Publikation konnte nicht mehr in die bereits druckfertige Arbeit einbezogen werden: Endo, N., Kan-no, N. und Nagahisa, E. (2007) Purification, characterization, and cDNA cloning of opine dehydrogenases from the polychaete rockworm *Marphysa sanguinea*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 147: 293-307.

5 Zusammenfassung

In den Geweben mariner Invertebraten findet sich eine bemerkenswerte Vielfalt terminaler Pyruvatoxidoreduktasen. Außer L- und D-Laktatdehydrogenasen treten Opindehydrogenasen (OpDHs) unterschiedlicher Substratspezifität auf, die durch NADH-abhängige reduktive Kondensation von Pyruvat mit einer Aminosäure ebenfalls die Redoxbalance der anaeroben Glykolyse sicherstellen können. Auf die molekulare Basis der Aminosäurespezifität und die Evolution dieser alternativen Pyruvatoxidoreduktasen fokussierte die vorliegende Arbeit. Da in öffentlichen Sequenzdatenbanken bis vor kurzem noch keine Alanopin- oder Strombindehydrogenasen (AloDHs oder StrDHs, bevorzugt als Substrataminosäure L-Alanin bzw. Glycin) verfügbar waren, wurden aus dem Wattwurm, *Arenicola marina*, dem Spritzwurm, *Sipunculus nudus*, sowie den Austern *Crassostrea gigas* und *Ostrea edulis* insgesamt fünf vollständige und eine partielle OpDH dieses Typs sequenziert, heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und mit Einträgen aus öffentlichen Sequenzdatenbanken verglichen. Die Ergebnisse der proteinbiochemischen, molekularbiologischen und bioinformatischen Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Im Hautmuskelschlauch des Wattwurms kommen nebeneinander genetisch differierende Alo(Str)DHs und Str(Alo)DHs vor. Zusätzlich wurden chromatographisch und elektrophoretisch separierbare Alo/StrDH-Varianten nachgewiesen, die sich möglicherweise nur in ihren posttranslationalen Modifikationen unterscheiden. Während die AloDHs diverser Wattwürmer in nativen Trägerampholytgradienten-Gelen bei einem mittleren pH von 5,26 fokussierten, offenbarten die StrDHs alkalischere isoelektrische Punkte von bis zu 6,12.

Aus Adduktoren Pazifischer Austern wurden dreierlei Alo/StrDHs mit isoelektrischen Punkten von $5,30 \pm 0,09$, $5,22 \pm 0,08$ und $5,15 \pm 0,03$ gereinigt. Sie setzten L-Alanin alle ähnlich effizient wie Glycin um. Die molekulare Basis ihres differierenden ionenchromatographischen und elektrophoretischen Verhaltens konnte durch massenspektrometrische Sequenzierung tryptischer Spaltpeptide nicht geklärt werden. cDNA-Amplifikationen lieferten jedoch (Teil-)Sequenzen von drei in jeweils rund 80 % ihrer Aminosäurereste übereinstimmenden *Crassostrea*-OpDHs (Alo/StrDH1, AloDH2 und Alo/StrDH3_{partiell}), die im Adduktor einer einzelnen diploiden Auster cotranskribiert wurden. *C. gigas* verfügt somit über mindestens zwei OpDH-Loci. Möglicherweise leitet sich die *Crassostrea*-Alo/StrDH1, die bei Standardexpressionsversuchen in *E. coli* etwa gleich hohe Alanopin- und Strombinsyntheseaktivitäten zeigte, von einem polymorphen Alo/StrDH-Locus, die durch geringe Alanopin- und Strom-

binsynthese-, aber vergleichsweise hohe Opinoxidaseaktivitäten gekennzeichnete *Crassostrea*-AloDH2 dagegen von einem AloDH-Locus der Art ab. Die N-terminal unvollständige Alo/StrDH3_{partiell} könnte ein Nullallel oder Pseudogen repräsentieren.

Nicht nur in *Crassostrea*-Adduktoren, sondern auch in Einzeladduktoren Europäischer Austern wurde elektrophoretisch die Koexistenz reiner AloDHs und kombinierter Alo/StrDHs nachgewiesen, die möglicherweise an unterschiedlichen Genorten codiert werden. Die sequenzierte *Ostrea*-OpDH entspricht offenbar einem Enzym der letztgenannten Art.

Isozymelektrophoresen und die Sequenzierung einer Spritzwurm-Alo/StrDH, die gemäß Expressionsanalyse in *E. coli* keine Octopindehydrogenase-Aktivität (ODH-Aktivität = L-Arginin-abhängige OpDH-Aktivität) besitzt, zeigten, daß die ODH- und die Alo/StrDH-Aktivität aus dem Hautmuskelschlauch von *S. nudus* auf verschiedene Enzyme zurückzuführen sind.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Alo/StrDHs aus *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* und *S. nudus* stimmen untereinander sowie mit den Mollusken- und Anneliden-OpDHs aus öffentlichen Sequenzdatenbanken in mindestens 33 % ihrer Aminosäurereste überein und zeichnen sich durch eine strikt konservierte katalytische Histidin-Arginin-Asparat-Triade sowie diverse andere konservierte Schlüsselreste aus. Das belegt, daß es sich bei den genannten Enzymen um homologe Proteine handelt.

Obwohl mit den neu sequenzierten Enzymen neben ODHs und Tauropindehydrogenasen (TaDHs = OpDHs mit Taurinpräferenz) erstmals mehrere experimentell als solche verifizierte Alo/StrDHs für Sequenzalinierungen zur Verfügung standen, ließen sich nur bedingt Sequenzmerkmale identifizieren, welche die Aminosäurepräferenz der verschiedenen OpDHs determinieren könnten. Das ist vermutlich primär darauf zurückzuführen, daß Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-OpDHs spezieller Aminosäurespezifität sich mehrfach unabhängig aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym möglicherweise breiter Aminosäuretoleranz entwickelten. Die gleiche oder ähnliche Substratspezifität von Alo/StrDHs, ODHs bzw. TaDHs aus nicht unmittelbar verwandten Arten (etwa die der Austern-Alo/StrDHs und der Alo/StrDHs aus *A. marina* sowie *S. nudus*) besitzt somit wahrscheinlich eine unterschiedliche molekulare Grundlage.

Die Invertebraten-OpDHs des Mollusken-, Anneliden- und Sipunculiden-Typs bilden mit der N-(1-D-Carboxyethyl)-L-Norvalin-Dehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec.*, Ti-Plasmid-codierten Opinsynthesen aus *Agrobacterium tumefaciens* und anderen mutmaßli-

chen (D,L)-OpDHs eine möglicherweise auf tierische Organismen, Eubakterien und Pilze beschränkte Enzymfamilie. Zu den nächsten in öffentlichen Sequenzdatenbanken erfaßten Verwandten der OpDHs höherer Invertebraten gehören plasmidcodierte Rhizobienproteine unbekannter Funktion, von denen offenbar zumindest eins relevant für die symbiotische Beziehung zwischen Rhizobien und Leguminosen ist. Wahrscheinlich besteht auch eine entfernte Verwandtschaft zu langkettigen Mannitol-2-Dehydrogenasen sowie NADH-abhängigen Glycerin-3-Phosphatdehydrogenasen.

Bei den ersten CENDH-ähnlichen OpDHs handelte es sich möglicherweise um Opinsynthesen, die im Dienst der Eisenassimilation oder der zellulären Redoxregulation fakultativ anaerober Bakterien standen. Durch ihre Aktivität könnte es in den Habitaten entsprechender Bakterien zu einer allmählichen Akkumulation von N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren gekommen sein, die sekundär die Evolution von Opinoxidasen ernährungsphysiologischer Bedeutung nach sich zog. CENDH-ähnliche OpDHs gelangten vermutlich durch einmaligen (jedenfalls nach bisherigem Kenntnisstand nicht mehrfach unabhängig erfolgreichen) horizontalen Gentransfer aus einem (α -)proteobakteriellen Donor in einen gemeinsamen (eu-)metazoischen Vorläufer der heutigen Mollusken, Anneliden und Sipunculiden. Vielleicht wurde die OpDH eines in symbiotischer oder parasitischer Gemeinschaft zu einer marinen Makroalge lebenden, daneben aber auch als Epiphyt, Symbiont oder Parasit anderer Eukaryonten auftretenden photosynthetischen Bakteriums übertragen, das in seinen Eigenschaften denen rezenter aerober anoxygener Photoheterotropher aus der marinen *Roseobacter*-Gruppe ähnelte und das Enzym für redoxregulatorische Zwecke im Kontext des photosynthetischen Elektronenflusses nutzte. Die Fixierung des bakteriellen OpDH-Gens im Genom eines ursprünglichen marinen Metazoons wurde wahrscheinlich dadurch begünstigt, daß dieser Organismus in seinen Geweben über hohe Konzentrationen freier Aminosäuren verfügte und L-Argininphosphat als Phosphagen nutzte. Da der OpDH-Transfer vermutlich bereits vor der Aufspaltung von Proto- und Deuterostomiern erfolgte, ist davon auszugehen, daß Vertebraten oder andere rezente Bilaterier, die nicht über OpDHs verfügen, ihre alternativen Pyruvatoxidoreduktasen im Verlauf ihrer Stammesgeschichte sekundär verloren haben.

6 Summary

A remarkable diversity of terminal pyruvate oxidoreductases is found in tissues of marine invertebrates. In addition to L- and D-lactate dehydrogenases opine dehydrogenases (opdhs) of different substrate specificity occur. They catalyse the NADH-dependent reductive condensation of pyruvate with an amino acid and thus can also ensure redox balance during anaerobic glycolysis. The present work focused on the molecular basis of the amino acid specificity and the evolution of these alternative pyruvate oxidoreductases. Since until recently no alanopine or strombine dehydrogenases (alodhs or strdhs, which prefer L-alanine and glycine, respectively, as their amino acid substrates) have been available in public sequence databases, mRNAs coding for five complete and one partial opdhs of this type were sequenced from the lugworm, *Arenicola marina*, the peanut worm, *Sipunculus nudus*, and the oysters *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. The enzymes were heterologously expressed in *Escherichia coli* and compared to entries in public sequence databases. The results of the biochemical, molecular and bioinformatic analyses of the work in hand can be summarised as follows:

In the body wall of the lugworm genetically distinguishable alo(str)dhs and str(alo)dhs coexist. Furthermore chromatographically and electrophoretically separable alo/strdh variants, which possibly only differ in posttranslational modifications, were detected. Whereas the alodhs of several lugworms electrofocussed at an average pH of 5.26 on native carrier ampholyte gradient gels, strdhs revealed more alkaline isoelectric points of up to 6.12.

Three kinds of alo/strdhs with isoelectric points of 5.30 ± 0.09 , 5.22 ± 0.08 and 5.15 ± 0.03 , which likewise used L-alanine and glycine at comparable rates, were purified from adductor muscles of Pacific oysters. The molecular basis of their different behaviour during anion exchange chromatography and native polyacrylamide gel electrophoresis could not be elucidated by mass spectrometric sequencing of tryptic peptides. cDNA amplifications, however, yielded (partial) sequences of three *Crassostrea* opdhs (alo/strdh1, alodh2 and alo/strdh3_{partial}) with a coincidence of 80 % of their amino acid residues that were cotranscribed in the adductor of a single diploid oyster. Thus, *C. gigas* possesses at least two opdhs loci. *Crassostrea* alo/strdh1, which during standard expression experiments in *E. coli* showed similar alanopine and strombine synthesising activities, possibly originates from a polymorphic alo/strdh locus. *Crassostrea* alodh2, which revealed only small alanopine and strombine synthesising activities, but proved to be a relatively efficient opine oxidase, might derive from

an *alodh* locus of the species. The N-terminally incomplete *alo/strdh3_{partial}* could represent a null allele or pseudogene.

In individual adductor muscles of *Ostrea edulis* as in *Crassostrea* the coexistence of pure *alodhs* and combined *alo/strdhs* potentially encoded at different genetic loci was demonstrated electrophoretically. The sequenced *Ostrea opdh* is obviously equivalent to an enzyme of the latter type.

Isozyme electrophoreses and sequencing of an *alo/strdh* of the peanut worm, which according to expression analysis in *E. coli* does not exhibit octopine dehydrogenase activity (*odh* activity = *opdh* activity depending on L-arginine), confirmed that the *odh* and *alo/strdh* activities from the body wall of *S. nudus* result from different enzymes.

The *alo/strdhs* of *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* and *S. nudus*, which were sequenced within the present work, match each other and molluscan as well as annelid *opdhs* from public sequence databases in at least 33 % of their amino acids. Together with the strict conservation of several key residues including those of the Rossmann motif and a catalytic histidine-arginine-aspartate-triade this verifies that the enzymes are homologous.

Although for the first time several experimentally confirmed *alo/strdhs* were available for sequence alignments in addition to *odhs* and tauropine dehydrogenases (*tadh*s = *opdh*s preferring taurine as their amino acid substrate) no definite sequence characteristics determining the amino acid preferences of *opdh*s could be identified. This might primarily be due to the fact that molluscan, annelid and sipunculid *opdh*s of particular amino acid specificity developed several times independently from a common precursor of possibly broad amino acid tolerance. For this reason the same or similar substrate specificities of *alo/strdhs*, *odhs* and *tadh*s, respectively, from species that are not directly related (for example those of *alo/strdhs* from oysters or rather *A. marina* as well as *S. nudus*) presumably possess a different molecular basis.

Invertebrate *opdh*s of the mollusc-annelid-sipunculid-type, the N-(1-D-carboxyethyl)-L-norvaline dehydrogenase (CENDH) of *Arthrobacter spec.*, Ti-plasmid encoded opine synthases from *Agrobacterium tumefaciens* and other putative (D,L)-*opdh*s form an enzyme family probably restricted to animals, eubacteria and fungi. Plasmid encoded rhizobial proteins of unknown function, at least one of which seems to be relevant for symbiosis between rhizobia and legumes, belong to the closest relatives of *opdh*s from higher animals currently available

in public sequence databases. Long-chained mannitol 2-dehydrogenases and NADH-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenases may also be related to these opdhs.

Perhaps the first CENDH-like opdhs were opine synthases helping for iron assimilation or cellular redox regulation of facultative anaerobic bacteria. Due to their activity N-(carboxy alkyl)-amino acids could have been accumulated in the habitats of such bacteria. This in turn might have caused the secondary evolution of opdhs that possess nutritional relevance. Presumably a common (eu-)metazoan ancestor of today's molluscs, annelids and sipunculids acquired CENDH-like opdhs by nonrecurring (or at least not more than once independently successful) horizontal gene transfer from an (α -)proteobacterial donor. The transferred opdh could have originated from a photosynthetic bacterium, which lived in symbiotic or parasitic relationship with a marine macro alga, but also occurred as an epiphyte, symbiont or parasite of other eukaryotes. Maybe the bacterium resembled recent aerobic anoxygenic photoheterotrophs and used the enzyme for redox regulation in the context of photosynthetic electron transport. The fixation of the bacterial opdh in the genome of a primordial marine metazoan could have been favoured since this organism contained high concentrations of free amino acids in its tissues and used phospho-L-arginine as phosphagene. It seems likely that the transfer took place before the divergence of proto- and deuterostomes. Thus it is assumed that vertebrates and other bilaterians, which do not exhibit opdhs, secondarily lost their alternative pyruvate oxidoreductases in the course of their evolution.

7 Literatur

- Abderhalden, E. und Haase, E. (1931) Gewinnung von Iminodicarbonsäuren aus Aminosäuren und Halogenfettsäuren. *Z. Physiol. Chem.* 202: 49-55
- Adams, M. J., Ellis, G. H., Gover, S., Naylor, C. E. und Phillips, C. (1994) Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analog and substrate-binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase - Implications for NADP specificity and the enzyme mechanism. *Structure* 2: 651-668
- Allgaier, M., Uphoff, H., Felske, A. und Wagner-Döbler, I. (2003) Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5051-5059
- Almeida, T. A., Pérez, J. A. und Pinto, F. M. (2000) Size-fractionation of RNA by hot agarose electrophoresis. *BioTechniques* 28: 414, 416
- Althoff, K., Schütt, C., Steffen, R., Batel, R. und Müller, W. E. G. (1998) Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria? *Mar. Biol.* 130: 529-536
- Altland, K. und Rossmann, U. (1985) Hybrid isoelectric focusing in rehydrated immobilized pH gradients with added carrier ampholytes: demonstration of human globins. *Electrophoresis* 6: 314-325
- Altland, K., Becher, P., Rossmann, U. und Bjellqvist, B. (1988) Isoelectric focusing of basic proteins: the problem of oxidation of cysteines. *Electrophoresis* 9: 474-485
- Altschul, S. F. und Koonin, E. V. (1998) Iterated profile searches with PSI-BLAST - a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem. Sci.* 23: 444-447
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- André, L., Hemming, A. und Adler, L. (1991) Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett.* 286: 13-17
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M. und Adler, L. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* 16: 2179-2187
- Apic, G., Gough, J. und Teichmann, S. A. (2001) Domain combinations in archaeal, eubacterial and eukaryotic proteomes. *J. Mol. Biol.* 310: 311-325
- Apt, K. E. (1988) Galls and tumor-like growths on marine macroalgae. *Dis. aquat. Org.* 4: 211-217

- Apt, K. und Gibor, A. (1989) Development and induction of bacteria-associated galls on *Prionitis lanceolata* (Rhodophyta). *Dis. aquat. Org.* 6: 151-156
- Asano, Y., Yamaguchi, K. und Kondo, K. (1989) A new NAD⁺-dependent opine dehydrogenase from *Arthrobacter* sp. strain 1C. *J. Bacteriol.* 171: 4466-4471
- Ashen, J. B. und Goff, L. J. (1996) Molecular identification of a bacterium associated with gall formation in the marine red alga *Prionitis lanceolata*. *J. Phycol.* 32: 286-297
- Ashen, J. B. und Goff, L. J. (1998) Galls on the marine red alga *Prionitis lanceolata* (Halymeniaceae): specific induction and subsequent development of an algal-bacterial symbiosis. *Am. J. Bot.* 85: 1710-1721
- Ashen, J. B. und Goff, L. J. (2000) Molecular and ecological evidence for species specificity and coevolution in a group of marine algal-bacterial symbioses. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3024-3030
- Ashen, J. B., Cohen, J. D. und Goff, L. J. (1999) GC-SIM-MS detection and quantification of free indole-3-acetic acid in bacterial galls on the marine alga *Prionitis lanceolata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 35: 493-500
- Baek, C.-H., Farrand, S. K., Park, D.-K., Lee, K.-E., Hwang, W. und Kim, K.-S. (2005) Genes for utilization of deoxyfructosyl glutamine (DFG), an amadori compound, are widely dispersed in the family *Rhizobiaceae*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 221-233
- Baici, A., Luisi, P. L., Olomucki, A., Doublet, M.-O. und Klincak, J. (1974) Influence of ligands on the coenzyme dissociation constants in octopine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 46: 59-66
- Bailey, G. S. und Thye, L. S. (1975). Gene duplication in salmonid fish: evolution of a lactate dehydrogenase with an altered function. In *Isozymes IX: Genetics and Evolution* (Hrsg. C. Markert), S. 401-414. New York: Academic Press
- Baker, P. J., Britton, K. L., Rice, D. W., Rob, A. und Stillman, T. J. (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
- Baker, P. J., Sawa, Y., Shibata, H., Sedelnikova, S. E. und Rice, D. W. (1998) Analysis of the structure and substrate binding of *Phormidium lapideum* alanine dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* 5: 561-567
- Balakirev, E. S. und Ayala, F. J. (2003) Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? *Annu. Rev. Genet.* 37: 123-151
- Baldwin, J. (1982) An immunochemical study of structural and evolutionary relationships among molluscan octopine dehydrogenases. *Pac. Sci.* 36: 357-363
- Baldwin, J. und England, W. R. (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

- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 411-421
- Baneyx, F. und Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22: 1399-1408
- Bao, Q., Tian, Y., Li, W., Xu, Z., Xuan, Z., Hu, S., Dong, W., Yang, J., Chen, Y., Xue, Y. et al. (2002) A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res.* 12: 689-700
- Barcia, R., Lopez-García, J. M. und Ramos-Martínez, J. I. (1997) The 28S fraction of rRNA in molluscs displays electrophoretic behaviour different from that of mammal cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42: 1089-1092
- Barker, R. F., Idler, K. B., Thompson, D. V. und Kemp, J. D. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2: 335-350
- Barlow, D. J. und Thornton, J. M. (1988) Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.* 201: 601-619
- Barstow, D. A., Sharman, A. F., Atkinson, T. und Minton, N. P. (1986) Cloning and complete nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* tryptophanyl transfer-RNA synthetase gene. *Gene* 46: 37-45
- Bauw, G., De Loose, M., Inzé, D., Van Montagu, M. und Vandekerckhove, J. (1987) Alterations in the phenotype of plant cells studied by NH₂-terminal amino acid-sequence analysis of proteins electroblotted from two-dimensional gel-separated total extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4806-4810
- Beauchamp, C. J., Chilton, W. S., Dion, P. und Antoun, H. (1990) Fungal catabolism of crown gall opines. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 150-155
- Beauchamp, C. J., Kloepper, J. W., Lifshitz, R., Dion, P. und Antoun, H. (1991) Frequent occurrence of the ability to utilize octopine in rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 37: 158-164
- Beaulieu, C., Coulombe, L. J., Granger, R. L., Miki, B., Beauchamp, C., Rossignol, G. und Dion, P. (1983) Characterization of opine-utilizing bacteria isolated from Quebec. *Phytoprotection* 64: 61-68
- Beaumont, A. R., Day, T. R. und Gäde, G. (1980) Genetic variation at the octopine dehydrogenase locus in the adductor muscle of *Cerastoderma edule* (L.) and six other bivalve species. *Mar. Biol. Letters* 1: 137-148
- Behm, C. A. (1991). Fumarate reductase and the evolution of electron transport systems. In *Metazoan Life without Oxygen* (Hrsg. C. Bryant), S. 89-108. London: Chapman and Hall
- Bell, K. S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M. T. G., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher, L. J. C., Mungall, K. et al. (2004) Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11105-11110

- Bellamacina, C. R. (1996) Protein motifs 9. The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.* 10: 1257-1269
- Benton, M. J. (1995) Diversification and extinction in the history of life. *Science* 268: 52-58
- Bergeron, J., MacLeod, R. A. und Dion, P. (1990) Specificity of octopine uptake by *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1453-1458
- Bergeron, J., Beaulieu, C., Levesque, R. C., Kondorosi, A. und Dion, P. (1993) Homology between the genes of octopine catabolism of *Rhizobium meliloti* A3 and corresponding genes from the Ti plasmid. *Can. J. Microbiol.* 39: 1041-1050
- Beringer, J. E., Brewin, N., Johnston, A. W. B., Schulman, H. M. und Hopwood, D. A. (1979) *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 204: 219-233
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242
- Bernard, P. und Couturier, M. (1992) Cell killing by the F plasmid ccdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* 226: 735-745
- Bernard, P., Kézdy, K. E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M. L., Higgins, P. N. und Couturier, M. (1993) The F plasmid ccdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* 234: 534-541
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M. und Couturier, M. (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 148: 71-74
- Berschick, P. (1997) One primer pair amplifies small subunit ribosomal DNA from mitochondria, plastids and bacteria. *BioTechniques* 23: 494-498
- Bevan, M., Barnes, W. M. und Chilton, M.-D. (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res.* 11: 369-385
- Biellmann, J.-F., Branlant, G. und Olomucki, A. (1973) Stereochemistry of the hydrogen transfer to the coenzyme by octopine dehydrogenase. *FEBS Lett.* 32: 254-256
- Bininda-Emonds, O. R. (2005) transAlign: using amino acids to facilitate the multiple alignment of protein-coding DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 6: 156
- Birktoft, J. J. und Banaszak, L. J. (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
- Birktoft, J. J., Fernley, R. T., Bradshaw, R. A. und Banaszak, L. J. (1982) Amino acid sequence homology among the 2-hydroxy acid dehydrogenases: mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenases form a homologous system with lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6166-6170
- Birnberg, P. R., Lippincott, B. B. und Lippincott, J. A. (1977) Two octopine dehydrogenases in crown-gall tumor tissue. *Phytochemistry* 16: 647-650

- Birnberg, P. R., Rao, S. S. und Lippincott, J. A. (1983) Octopine dehydrogenase of a *Vinca rosea* crown gall tumor. *Phytochemistry* 22: 1345-1355
- Boettcher, K. J., Barber, B. J. und Singer, J. T. (2000) Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the *Roseobacter* group and colonization of non-affected animals by *Stappia stellulata*-like strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3924-3930
- Bomhoff, G., Klapwijk, P. M., Kester, H. C. M., Schilperoort, R. A., Hernalsteens, J. P. und Schell, J. (1976) Octopine and Nopaline Synthesis and Breakdown Genetically Controlled by a Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 145: 177-181
- Borell, C. W., Urrestarazu, L. A. und Bhattacharjee, J. K. (1984) Two unlinked lysine genes (LYS9 and LYS14) are required for the synthesis of saccharopine reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159: 429-432
- Bowlus, R. D. und Somero, G. N. (1979) Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *J. Exp. Zool.* 208: 137-151
- Bradford, M. M. (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
- Brenner, S. E. (1999) Errors in genome annotation. *Trends Genet.* 15: 132-133
- Brenner, S. E., Chothia, C. und Hubbard, T. J. P. (1998) Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6073-6078
- Britton, K. L., Asano, Y. und Rice, D. W. (1998a) Crystal structure and active site location of N-(1-D-carboxylethyl)-L-norvaline dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* 5: 593-601
- Britton, K. L., Rogers, H. F., Asano, Y., Dairi, T., Kato, Y. und Stillman, T. J. (1998b) Crystallization of *Arthrobacter* sp. strain 1C N-(1-D-carboxyethyl)-L-norvaline dehydrogenase and its complex with NAD⁺. *Acta Crystallogr. D* 54: 124-126
- Bromham, L. und Penny, D. (2003) The modern molecular clock. *Nat. Rev. Genet.* 4: 216-224
- Brooks, S. P. J. und Storey, K. B. (1997) Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 118: 1103-1114
- Brosius, J. und Gould, S. J. (1992) On "genomenclature": a comprehensive (and respectful) taxonomy for pseudogenes and other "junk DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10706-10710
- Brot, N. und Weissbach, H. (1983) Biochemistry and physiological role of methionine sulf-oxide residues in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 271-281
- Brown, A. D. (1976) Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40: 803-846

- Brown, J. R. (2003) Ancient horizontal gene transfer. *Nat. Rev. Genet.* 4: 121-132
- Bryant, D. und Moulton, V. (2004) Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* 21: 255-265
- Buchan, A., González, J. M. und Moran, M. A. (2005) Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5665-5677
- Cammarano, P., Pons, S. und Londei, P. (1975) Discontinuity of the large ribosomal subunit RNA and rRNA molecular weights in eukaryote evolution. *Acta Biol. Med. Ger.* 34: 1123-1135
- Cammarano, P., Londei, P., Mazzei, F. und Biagini, R. (1982) Size heterogeneity of ribosomal RNA in eukaryote evolution-2. rRNA molecular weights in species containing discontinuous large ribosomal subunit RNA. *Comp. Biochem. Physiol. B* 73: 435-449
- Campbell, R. E., Mosimann, S. C., Rijn, I. van de, Tanner, M. E. und Strynadka, N. C. J. (2000) The first structure of UDP-glucose dehydrogenase reveals the catalytic residues necessary for the two-fold oxidation. *Biochemistry* 39: 7012-7023
- Canaday, J., Gérard, J.-C., Crouzet, P. und Otten, L. (1992) Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4. *Mol. Gen. Genet.* 235: 292-303
- Canfield, D. E. und Teske, A. (1996) Late proterozoic rise in atmospheric oxygen concentration inferred from phylogenetic and sulphur-isotope studies. *Nature* 382: 127-132
- Cantacuzene, A. (1930) Contribution à l' étude des tumeurs bactériennes chez les algues marines. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l' Université de Paris
- Carvajal, N., Vega, E., Erices, A., Bustos, D. und Torres, C. (1994) Lactate dehydrogenase, alanopine dehydrogenase and octopine dehydrogenase from the heart of *Concholepas concholepas* (Gastropoda: Muricidae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 108: 543-550
- Chamberlin, M. E. und Strange, K. (1989) Anisotonic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol.* 257: C159-C173
- Chang, C.-C. und Chen, C.-M. (1983) Evidence for the presence of N²-(1,3-dicarboxypropyl)-L-amino acids in crown-gall tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens* strains 181 and EU6. *FEBS Lett.* 162: 432-435
- Chang, C.-C., Chen, C.-M., Adams, B. R. und Trost, B. M. (1983) Leucinopine, a characteristic compound of some crown-gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3573-3576
- Chen, G. F. T. und Inouye, M. (1994) Role of the AGA/AGG Codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 8: 2641-2652
- Chilton, W. S., Rinehart, K. L. und Chilton, M.-D. (1984) Structure and stereochemistry of succinamopine. *Biochemistry* 23: 3290-3297
- Chilton, W. S., Hood, E. und Chilton, M.-D. (1985a) Absolute stereochemistry of leucinopine, a crown gall opine. *Phytochemistry* 24: 221-224

- Chilton, W. S., Hood, E., Rinehart, K. L. und Chilton, M.-D. (1985b) L,L-succinamopine: an epimeric crown gall opine. *Phytochemistry* 24: 2945-2948
- Chilton, W. S., Stomp, A. M., Beringue, V., Bouzar, H., Vaudequindransart, V., Petit, A. und Dessaux, Y. (1995) The chrysopine family of amadori-type crown gall opines. *Phytochemistry* 40: 619-628
- Chilton, W. S., Petit, A., Chilton, M.-D. und Dessaux, Y. (2001) Structure and characterization of the crown gall opines heliopine, vitopine and ridéopine. *Phytochemistry* 58: 137-142
- Cho, K., Fuqua, C. und Winans, S. C. (1997) Transcriptional regulation and locations of *Agrobacterium tumefaciens* genes required for complete catabolism of octopine. *J. Bacteriol.* 179: 1-8
- Choe, J., Guerra, D., Michels, P. A. M. und Hol, W. G. J. (2003) *Leishmania mexicana* glycerol-3-phosphate dehydrogenase showed conformational changes upon binding a bi-substrate adduct. *J. Mol. Biol.* 329: 335-349
- Cholette, C. und Gagnon, A. (1973) Isosmotic adaptation in *Myxine glutinosa* L.-II. Variations of the free amino-acids, trimethylamine oxide and potassium of the blood and muscle cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 45: 1009-1021
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Chothia, C. und Lesk, A. M. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5: 823-826
- Choughuley, A. S. U. und Lemmon, R. M. (1966) Production of cysteic acid, taurine and cystamine under primitive earth conditions. *Nature* 210: 628-629
- Churcher, C., Bowman, S., Badcock, K., Bankier, A., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Devlin, K., Gentles, S., Hamlin, N. et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IX. *Nature* 387: 84-87
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. und Barton, G. J. (2004) The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20: 426-427
- Clark, J. M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16: 9677-9686
- Clarke, A. R., Wilks, H. M., Barstow, D. A., Atkinson, T., Chia, W. N. und Holbrook, J. J. (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, A. R., Atkinson, T. und Holbrook, J. J. (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I. *Trends Biochem. Sci.* 14: 101-105
- Cleland, W. W. (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3: 480-482

- Cline, J., Braman, J. C. und Hogrefe, H. H. (1996) PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24: 3546-3551
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. und Deleage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25: 147-150
- Costenoble, R., Valadi, H., Gustafsson, L., Niklasson, C. und Franzén, C. J. (2000) Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16: 1483-1495
- Cotton, F. A., Hazen, E. E., Day, V. W., Larsen, S., Norman, J. G., Wong, S. T. K. und Johnson, K. H. (1973) Biochemical importance of binding of phosphate by arginyl groups - model compounds containing methylguanidinium ion. *J. Am. Chem. Soc.* 95: 2367-2369
- Coughlan, M. und O'Carra, P. (1996) The lysopine and octopine dehydrogenase activities of *Mytilus edulis* are catalysed by a single enzyme. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 128S
- Crabtree, B. und Newsholme, E. A. (1972) The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 126: 49-58
- Crofts, A. R. und Wraight, C. A. (1983) The electrochemical domain of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 726: 149-185
- Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. und Stalon, V. (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* 50: 314-352
- Dairi, T. und Asano, Y. (1995) Cloning, nucleotide sequencing, and expression of an opine dehydrogenase gene from *Arthrobacter* sp. strain 1C. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3169-3171
- Dando, P. R., Storey, K. B., Hochachka, P. W. und Storey, J. M. (1981) Multiple dehydrogenases in marine molluscs: electrophoretic analysis of alanopine dehydrogenase, strombine dehydrogenase, octopine dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Mar. Biol. Lett.* 2: 249-257
- Darwin, C. (1859) *On the origin of species*. London: Murray
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K. und Moraga, D. (2005) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J.* 272: 5635-5652
- Davis, B. J. (1964) Disk electrophoresis – II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-427
- De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. und Schell, J. (1982) Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 499-511
- De Zwaan, A. und Zandee, D. I. (1972) Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 43A: 53-58

- De Zwaan, A. und Zurburg, W. (1981) The formation of strombine in the adductor muscle of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol. Lett.* 2: 179-192
- De Zwaan, A. und Dando, P. R. (1984) Phosphoenolpyruvate-pyruvate metabolism in bivalve molluscs. *Molecular Physiology* 5: 285-310
- De Zwaan, A. und Putzer, V. (1985) Metabolic adaptations of intertidal invertebrates to environmental hypoxia (a comparison of environmental anoxia to exercise anoxia). *Symp. Soc. Exp. Biol.* 39: 33-62
- De Zwaan, A. und Thillart, G. van den (1985) Low and high output modes of anaerobic metabolism: invertebrate and vertebrate strategies. In *Circulation, Respiration, and Metabolism* (Hrsg. R. Gilles), S. 167-192. Berlin: Springer-Verlag
- De Zwaan, A., Holwerda, D. A. und Veenhof, P. R. (1981) Anaerobic malate metabolism in mitochondria of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol. Lett.* 2: 131-140
- Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H. Q. et al. (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434: 980-986
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. und Goodman, H. M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561-573
- Dessaux, Y., Petit, A. und Tempé, J. (1992). Opines in *Agrobacterium* biology. In *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications* (Hrsg. D. P. Verma), S. 109-136. London: CRC Press
- Dessaux, Y., Petit, A. und Tempe, J. (1993) Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. *Phytochemistry* 34: 31-38
- Deutscher, M. P. (1990) Maintaining protein stability. *Methods Enzymol.* 182: 83-89
- Dice, J. F. und Goldberg, A. L. (1975) Relationship between in vivo degradative rates and isoelectric points of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3893-3897
- Diederich, S., Nehls, G., Beusekom, J. E. E. van und Reise, K. (2005) Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: invasion accelerated by warm summers? *Helgoland Marine Research* 59: 97-106
- Dion, P. (1986) Utilization of octopine by marine bacteria isolated from mollusks. *Can. J. Microbiol.* 32: 959-963
- Dixon, R. O. D. (1969) Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants). *Annu. Rev. Microbiol.* 23: 137-158
- Donkersloot, J. A. und Thompson, J. (1995) Cloning, expression, sequence analysis, and site-directed mutagenesis of the Tn5306-encoded N⁵-(carboxyethyl)ornithine synthase from *Lactococcus lactis* K1. *J. Biol. Chem.* 270: 12226-12234
- Doolittle, R. F. (1981) Similar amino acid sequences: chance or common ancestry? *Science* 214: 149-159

- Doolittle, W. E. (1998) You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet.* 14: 307-311
- Doumen, C. und Ellington, W. R. (1987) Isolation and characterization of a taurine-specific opine dehydrogenase from the pedicles of the brachiopod, *Glottidea pyramidata*. *J. Exp. Zool.* 243: 25-31
- Downie, A. (1997) Fixing a symbiotic circle. *Nature* 387: 352-354
- Drevet, C., Brasileiro, A. C. M. und Jouanin, L. (1994) Oncogene arrangement in a shooty strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 25: 83-90
- Driessen, H. P., Jong, W. W. de, Tesser, G. I. und Bloemendal, H. (1985) The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18: 281-325
- Dubendorff, J. W. und Studier, F. W. (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219: 45-59
- Duijn, P. van (1952a) Arenicochrome. Degradation to arenicochromine, a sulphur-free pigment. *Recl. Trav. Chim. Pays Bas* 71: 595-600
- Duijn, P. van (1952b) Arenicochrome, a new pigment from *Arenicola marina* L. - Isolation and Composition. *Recl. Trav. Chim. Pays Bas* 71: 585-594
- Duijn, P. van, Havinga, E. und Lignac, G. O. E. (1951) Arenicochrome, a new pigment from *Arenicola marina*. *Experientia* 7: 376-377
- Dunphy, B. J., Wells, R. M. G. und Jeffs, A. G. (2006) Oxygen consumption and enzyme activity of the subtidal flat oyster (*Ostrea chilensis*) and intertidal Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): responses to temperature and starvation. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 40: 149-158
- Ebberink, R. H. M. und De Zwaan, A. (1980) Control of glycolysis in the posterior adductor muscle of the sea mussel *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.* 137: 165-171
- Eberlee, J. C., Storey, J. M. und Storey, K. B. (1983) Anaerobiosis, recovery from anoxia, and the role of strombine and alanopine in the oyster *Crassostrea virginica*. *Can. J. Zool.* 61: 2682-2687
- Edman, P. (1956a) Mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. *Nature* 177: 667-668
- Edman, P. (1956b) On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. *Acta Chem. Scand.* 10: 761-768
- Edman, P. und Sjoquist, J. (1956) Identification and semiquantitative determination of phenyl thiohydantoins. *Acta Chem. Scand.* 10: 1507-1509
- Edman, P. und Begg, G. (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1: 80-91
- Edwalds-Gilbert, G., Veraldi, K. L. und Milcarek, C. (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res.* 25: 2547-2561

- Ellington, W. (1979) Evidence for a broadly-specific, amino acid requiring dehydrogenase at the pyruvate branchpoint in sea anemones (1). *J. Exp. Zool.* 209: 151-159
- Ellington, W. R. (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. Biochem. Mol. Biol.* 67: 625-631
- Ellington, W. R. und Long, G. L. (1978) Purification and characterization of a highly unusual tetrameric D-lactate dehydrogenase from muscle of giant barnacle, *Balanus nubilus* Darwin. *Arch. Biochem. Biophys.* 186: 265-274
- Ellis, J. G., Ryder, M. H. und Tate, M. E. (1984) *Agrobacterium tumefaciens* T_R-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 195: 466-473
- Ellis, R. J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* 26: 597-604
- Ellis, R. J. und Minton, A. P. (2003) Join the crowd. *Nature* 425: 27-28
- Embley, T. M. und Martin, W. (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440: 623-630
- Epelbaum, S., McDevitt, R. und Falco, S. C. (1997) Lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: nucleotide sequence and characterization. *Plant Mol. Biol.* 35: 735-748
- Escobar, M. A. und Dandekar, A. M. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci.* 8: 380-386
- Everse, J. und Kaplan, N. O. (1973) Lactate dehydrogenases - structure and function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 37: 61-133
- Felbeck, H. (1980) Investigations on the role of the amino acids in anaerobic metabolism of the lugworm *Arenicola marina* L. *J. Comp. Physiol.* 137: 183-192
- Felbeck, H. und Grieshaber, M. K. (1980) Investigations on some enzymes involved in the anaerobic metabolism of amino acids in *Arenicola marina*. *Comp. Biochem. Physiol.* 66B: 205-213
- Felsenstein, J. (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27: 401-410
- Feng, D. F. und Doolittle, R. F. (1987) Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* 25: 351-360
- Ferguson, S. J., Jackson, J. B. und McEwan, A. G. (1987) Anaerobic respiration in the *Rhodospirillaceae*: characterization of pathways and evaluation of roles in redox balancing during photosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 117-143
- Feyen, S. (2006) Charakterisierung der heterolog überexprimierten Alanopin-/Strombin-Dehydrogenase aus dem Wattwurm, *Arenicola marina*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Fields, J. H. A. (1983) Alternatives to lactic acid: possible advantages. *J. Exp. Zool.* 228: 445-457
- Fields, J. H. A. und Hochachka, P. W. (1981) Purification and properties of alanopine dehydrogenase from the adductor muscle of the oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Eur. J. Biochem.* 114: 615-621
- Fields, J. H. A. und Quinn, J. F. (1981) Some theoretical considerations on cytosolic redox balance during anaerobiosis in marina invertebrates. *J. theor. Biol.* 88: 35-45
- Fields, J. H. A., Baldwin, J. und Hochachka, P. W. (1976a) On the role of octopine dehydrogenase in cephalopod mantle muscle metabolism. *Can. J. Zool.* 54: 871-878
- Fields, J. H., Guderley, H., Storey, K. B. und Hochachka, P. W. (1976b) The pyruvate branch point in squid brain: competition between octopine dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Can. J. Zool.* 54: 879-885
- Fields, J. H. A., Eng, A. K., Ramsden, W. D., Hochachka, P. W. und 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
- Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorhölter, F. J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. und Pühler, A. (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9889-9894
- Firmin, J. L. und Fenwick, G. R. (1978) Agropine - major new plasmid-determined metabolite in crown gall tumors. *Nature* 276: 842-844
- Fleischman, D. und Kramer, D. (1998) Photosynthetic rhizobia. *Biochim. Biophys. Acta* 1364: 17-36
- Flores, M., Mavingui, P., Girard, L., Perret, X., Broughton, W. J., Martínez-Romero, E., Dávila, G. und Palacios, R. (1998) Three replicons of *Rhizobium* sp. strain NGR234 harbor symbiotic gene sequences. *J. Bacteriol.* 180: 6052-6053
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. und Postlethwait, J. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531-1545
- Fort, L., Dando, P. R., Rouze, P., Monneuse, M.-O. und Olomucki, A. (1982) Immunological comparative studies of octopine dehydrogenase and other "pyruvate reductases" from different species. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 73: 865-871
- Foster, P. G. und Hickey, D. A. (1999) Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions. *J. Mol. Evol.* 48: 284-290
- Foster, P. G., Jermini, L. S. und Hickey, D. A. (1997) Nucleotide composition bias affects amino acid content in proteins coded by animal mitochondria. *J. Mol. Evol.* 44: 282-288
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A. und Perret, X. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387: 394-401

- Frodyma, M. E. und Downs, D. (1998a) *ApbA*, the ketopantoate reductase enzyme of *Salmonella typhimurium* is required for the synthesis of thiamine via the alternative pyrimidine biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 5572-5576
- Frodyma, M. E. und Downs, D. (1998b) The *panE* gene, encoding ketopantoate reductase, maps at 10 minutes and is allelic to *apbA* in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 180: 4757-4759
- Frohman, M. A., Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002
- Gäde, G. (1974) Octopine dehydrogenase in the fresh water bivalve, *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 48B: 513-517
- Gäde, G. (1979) L-lactate specific, dimeric lactate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo vulgaris*: purification and catalytic properties. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 63: 387-393
- Gäde, G. (1980a) Biological role of octopine formation in marine molluscs. *Mar. Biol. Lett.* 1: 121-135
- Gäde, G. (1980b) The energy metabolism of the foot muscle of the jumping cockle, *Cardium tuberculatum* - sustained anoxia versus muscular activity. *J. Comp. Physiol.* 137: 177-182
- Gäde, G. (1983) Mode of energy production during environmental and functional anoxia in the nemertean *Cerebratulus lacteus*. *Amer. Zool.* 23: 892
- Gäde, G. (1986) Purification and properties of tauropine dehydrogenase from the shell adductor muscle of the ormer, *Haliotis lamellosa*. *Eur. J. Biochem.* 160: 311-318
- Gäde, G. (1988) Energy metabolism during anoxia and recovery in shell adductor and foot muscle of the gastropod mollusc *Haliotis lamellosa*: formation of the novel anaerobic end product tauropine. *Biol. Bull.* 175: 122-131
- Gäde, G. und Zebe, E. (1973) Über den Anaerobiosestoffwechsel von Molluskenmuskeln. *J. Comp. Physiol.* 85: 291-301
- Gäde, G. und Grieshaber, M. K. (1986) Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 255-272
- Gäde, G., Weeda, E. und Gabbott, P. A. (1978) Changes in the level of octopine during the escape responses of the scallop, *Pecten maximus*. *J. Comp. Physiol.* 124: 121-127
- Gaede, G. und Grieshaber, M. (1975) A rapid and specific enzymatic method for the estimation of L-arginine. *Anal. Biochem.* 66: 393-399
- Gaffney, P. M. (1994) Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light? In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (Hrsg. A. R. Beaumont), S. 146-153. London: Chapman und Hall
- Garfin, D. E. (1990) Isoelectric focusing. *Methods Enzymol.* 182: 459-477

- Garvie, E. I. (1980) Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* 44: 106-139
- Gattiker, A., Gasteiger, E. und Bairoch, A. (2002) ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl. Bioinformatics* 1: 107-108
- Gelius-Dietrich, G. und Henze, K. (2004) Pyruvate formate lyase (PFL) and PFL activating enzyme in the chytrid fungus *Neocallimastix frontalis*: a free-radical enzyme system conserved across divergent eukaryotic lineages. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 456-463
- Genga, A. M., Tassi, F., Lodi, T. und Ferrero, I. (1983) Mitochondrial NAD, L-lactate dehydrogenase and NAD, D-lactate dehydrogenase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiologica* 6: 1-8
- Gething, M.-J. und Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45
- Gianazza, E. (1995) Isoelectric focusing as a tool for the investigation of posttranslational processing and chemical modifications of proteins. *J. Chromatogr. A* 705: 67-87
- Gibrat, J. F., Madej, T. und Bryant, S. H. (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 377-385
- Gielen, J., Terryn, N., Villarroel, R. und Van Montagu, M. (1999) Complete nucleotide sequence of the T-DNA region of the plant tumour-inducing *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58. *J. Exp. Bot.* 50: 1421-1422
- Gilbert, H. F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63: 69-172
- Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., DeBoy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M. et al. (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187: 2426-2438
- Gilles, R. (1987) Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. *Current Topics in Membranes and Transport* 30: 205-247
- Giribet, G. (2002) Current advances in the phylogenetic reconstruction of metazoan evolution. A new paradigm for the Cambrian explosion? *Mol. Phylogenet. Evol.* 24: 345-357
- Gleason, F. H., Nolan, R. A., Wilson, A. C. und Emerson, R. (1966) D(-)-lactate dehydrogenase in lower fungi. *Science* 152: 1272-&
- Goldberg, J. D., Yoshida, T. und Brick, P. (1994) Crystal structure of a NAD-dependent D-glycerate dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 236: 1123-1140
- Golding, G. B. und Dean, A. M. (1998) The structural basis of molecular adaptation. *Mol. Biol. Evol.* 15: 355-369
- Goldmann, A. (1977) Octopine and nopaline dehydrogenases in crown-gall tumors. *Plant Sci. Lett.* 10: 49-58

- Goldmann, A., Moureaux, T. und Rouzé, P. (1981) Antibody against octopine dehydrogenase from crown gall tumor tissue, a tool in studies of plant cell transformation. *FEBS Lett.* 130: 213-216
- Goldstein, L. und Kleinzeller, A. (1987) Cell volume regulation in lower vertebrates. *Current Topics in Membranes and Transport* 30: 181-204
- Goodman, J. L., Wang, S., Alam, S., Ruzicka, F. J., Frey, P. A. und Wedekind, J. E. (2004) Ornithine cyclodeaminase: structure, mechanism of action, and implications for the μ -crystallin family. *Biochemistry* 43: 13883-13891
- Gordon, D. M., Ryder, M. H., Heinrich, K. und Murphy, P. J. (1996) An experimental test of the rhizopine concept *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3991-3996
- Görg, A., Postel, W. und Westermeier, R. (1978) Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane. *Anal. Biochem.* 89: 60-70
- Graur, D. (1985) Amino acid composition and the evolutionary rates of protein-coding genes. *J. Mol. Evol.* 22: 53-62
- Graur, D. und Li, W.-H. (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2. Auflage. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates
- Gribaldo, S. und Philippe, H. (2002) Ancient phylogenetic relationships. *Theor. Popul. Biol.* 61: 391-408
- Grieshaber, M. (1978) Breakdown and formation of high-energy phosphates and octopine in adductor muscle of the scallop, *Chlamys opercularis* (L.), during escape swimming and recovery. *J. Comp. Physiol.* 126: 269-276
- Grieshaber, M. und Gäde, G. (1976) The biological role of octopine in squid, *Loligo vulgaris* (Lamarck). *J. Comp. Physiol.* 108: 225-232
- Grieshaber, M. K. und Kreutzer, U. (1986) Opine formation in marine invertebrates. *Zool. Beitr. N. F.* 30: 205-229
- Grieshaber, M., Kronig, E. und 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-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359: 133-136
- Grieshaber, M. K., Hardewig, I., Kreutzer, U. und Pörtner, H.-O. (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 125: 43-147
- Grimshaw, C. E., Cook, P. F. und Cleland, W. W. (1981) Use of isotope effects and pH studies to determine the chemical mechanism of *Bacillus subtilis* L-alanine dehydrogenase. *Biochemistry* 20: 5655-5661
- Gruber, P. J., Frederick, S. E. und Tolbert, N. E. (1974) Enzymes related to lactate metabolism in green algae and lower land plants. *Plant Physiol.* 53: 167-170
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723

- Gupta, R. S. (2000) The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 367-402
- Guyon, P., Chilton, M.-D., Petit, A. und Tempé, J. (1980) Agropine in "null-type" crown gall tumors: evidence for generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2693-2697
- Haas, D. (2000) Der Einfluß von Hypoxie und Sulfid auf den Säure-Basenhaushalt beim Wattwurm (*Arenicola marina* L.). Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hack, E. und Kemp, J. D. (1977) Comparison of octopine, histopine, lysopine, and octopinic acid synthesizing activities in sunflower crown gall tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 785-791
- Hack, E. und Kemp, J. D. (1980) Purification and characterization of the crown gall-specific enzyme, octopine synthase. *Plant Physiol.* 65: 949-955
- Hadley, R. G. und Szalay, A. A. (1982) DNA-sequences homologous to the T DNA region of *Agrobacterium tumefaciens* are present in diverse *Rhizobium* species. *Mol. Gen. Genet.* 188: 361-369
- Halanych, K. M., Bacheller, J. D., Aguinaldo, A. M. A., Liva, S. M., Hillis, D. M. und Lake, J. A. (1995) Evidence from 18S ribosomal DNA that the Lophophorates are protostome animals. *Science* 267: 1641-1643
- Hamer, J. E., Howard, R. J., Chumley, F. G. und Valent, B. (1988) A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239: 288-290
- Hamilton, P. B. und Anderson, R. A. (1955) Hydroxylysine in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 2892-2893
- Hammen, C. S. (1991) Anoxibiosis in living metazoa: an overview. In *Metazoan Life without Oxygen* (Hrsg. C. Bryant), S. 271-278. London: Chapman and Hall
- Hammen, C. S. und Bullock, R. C. (1991) Opine oxidoreductases in brachiopods, bryozoans, phoronids and molluscs. *Biochem. Syst. Ecol.* 19: 263-269
- Hammen, C. S. und Fielding, C. (1993) Opine oxidoreductases in marine worms of five phyla. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 989-992
- Harrison, P. M. und Gerstein, M. (2002) Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution. *J. Mol. Biol.* 318: 1155-1174
- Hart, K. W., Clarke, A. R., Wigley, D. B., Waldman, A. D. B., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Jones, J. B. und Holbrook, J. J. (1987) A strong carboxylate-arginine interaction is important in substrate orientation and recognition in lactate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 914: 294-298
- Hecht, K., Langer, T., Wrba, A. und Jaenicke, R. (1990) Lactate dehydrogenase from the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium marismortui*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 371: 515-519

- Hegyí, H. und Gerstein, M. (2001) Annotation transfer for genomics: measuring functional divergence in multi-domain proteins. *Genome Res.* 11: 1632-1640
- Hoare, K. und Beaumont, A. R. (1995) Effects of an *Odh* null allele and a GPI low-activity allozyme on shell length in laboratory-reared *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 123: 775-780
- Hochachka, P. W. (1988) The nature of evolution and adaptation: resolving the unity – diversity paradox. *Can. J. Zool.* 66: 1146-1152
- Hochachka, P. W., French, C. J. und Meredith, J. (1978) Metabolic and ultrastructural organization in *Nautilus* muscles. *J. Exp. Zool.* 205: 51-62
- Hochuli, E., Dobeli, H. und Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411: 177-184
- Hogue, C. W. (1997) Cn3D: a new generation of three-dimensional molecular structure viewer. *Trends Biochem. Sci.* 22: 314-316
- Hol, W. G. J., Duijnen, P. T. van und Berendsen, H. J. C. (1978) The alpha-helix dipole and the properties of proteins. *Nature* 273: 443-446
- Holbrook, J. J., Liljas, A., Steindel, S. J. und Rossmann, M. G. (1975) Lactate dehydrogenase. In *The Enzymes*, Bd. XI, Teil A (Hrsg. P. D. Boyer), S. 191-292. 3. Auflage. New York: Academic Press
- Holland, H. D. und Beukes, N. J. (1990) A paleoweathering profile from Griqualand West, South Africa - evidence for a dramatic rise in atmospheric oxygen between 2.2 and 1.9 bybp. *Am. J. Sci.* 290A: 1-34
- Holland, N. D. und Chen, J. Y. (2001) Origin and early evolution of the vertebrates: new insights from advances in molecular biology, anatomy, and palaeontology. *BioEssays* 23: 142-151
- Hollemeyer, K., Heinzle, E. und Tholey, A. (2002) Identification of oxidized methionine residues in peptides containing two methionine residues by derivatization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* 2: 1524-1531
- Holwerda, D. A., Kruitwagen, E. C. J. und Bont, A. M. T. de (1981) Regulation of pyruvate-kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity during anaerobiosis in *Mytilus edulis*-L. *Molecular Physiology* 1: 165-171
- Hörer, S., Stoop, J., Mooibroek, H., Baumann, U. und Sassoon, J. (2001) The crystallographic structure of the mannitol 2-dehydrogenase NADP⁺ binary complex from *Agaricus bisporus*. *J. Biol. Chem.* 276: 27555-27561
- Horner, D. S., Foster, P. G. und Embley, T. M. (2000) Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1695-1709
- Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H. und Money, N. P. (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11281-11284

- Huang, X. Q. und Miller, W. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics* 12: 337-357
- Hult, K., Veide, A. und Gatenbeck, S. (1980) The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Arch. Microbiol.* 128: 253-255
- Huson, D. H. und Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23: 254-267
- Huxtable, R. J. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72: 101-163
- Ishikawa, J., Yamashita, A., Mikami, Y., Hoshino, Y., Kurita, H., Hotta, K., Shiba, T. und Hattori, M. (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14925-14930
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) (1978) Nomenclature of multiple forms of enzymes. Recommendations, 1976. *Eur. J. Biochem.* 82: 1-3
- Jacobsen, J. G. und Smith, L. H. (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48: 424-511
- Janßen, F. (2000) Klonierung, Struktur und Evolution einiger Octopindehydrogenasen aus marinen Invertebraten. (Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) Aachen: Shaker Verlag
- Jennings, D. B., Ehrenshaft, M., Pharr, D. M. und Williamson, J. D. (1998) Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15129-15133
- Jennings, D. H. (1984) Polyol metabolism in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 25: 149-193
- Jensen, O. N., Wilm, M., Schevchenko, A. und Mann, M. (1998) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods Mol. Biol.* 112: 513-530
- Jensen, R. A. (1976) Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu. Rev. Microbiol.* 30: 409-425
- Jermiin, L. S., Poladian, L. und Charleston, M. A. (2005) Is the "big bang" in animal evolution real? *Science* 310: 1910-1911
- Johnson, G. B. (1974) Enzyme polymorphism and metabolism. *Science* 184: 28-37
- Jong, J. C. de, McCormack, B. J., Smirnoff, N. und Talbot, N. J. (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389: 244-245
- Jukes, T. H. (1978) Neutral changes during divergent evolution of hemoglobins. *J. Mol. Evol.* 11: 267-269
- Kalm, L. von, Weaver, J., DeMarco, J., MacIntyre, R. J. und Sullivan, D. T. (1989) Structural characterization of the α -glycerol-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5020-5024

- Kan-no, N., Nagahisa, E., Sato, Y. und Sato, M. (1997) Purification and characterization of tauropine dehydrogenase from the marine sponge *Halichondria japonica* Kadota (Demospongia). *Fish. Sci.* 63: 414-420
- Kan-no, N., Sato, M., Yokoyama, T., Nagahisa, E. und Sato, Y. (1998) Tauropine dehydrogenase from the starfish *Asterina pectinifera* (Echinodermata: Asteroidea): presence of opine production pathway in a deuterostome invertebrate. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121: 323-332
- Kan-no, N., Sato, M., Yokoyama, T. und Nagahisa, E. (1999) Occurrence of β -alanine-specific opine dehydrogenase in the muscle of the limpet *Cellana grata* Gould (Archaeogastropoda). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 123: 125-136
- Kan-no, N., Endo, N., Moriyama, S., Nagahisa, E. und Sato, M. (2005a) The amino acid sequence of tauropine dehydrogenase from the polychaete *Arabella iricolor*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 140: 475-485
- Kan-no, N., Matsu-ura, H., Jikihara, S., Yamamoto, T., Endo, N., Moriyama, S., Nagahisa, E. und Sato, M. (2005b) Tauropine dehydrogenase from the marine sponge *Halichondria japonica* is a homolog of ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 141: 331-339
- Kanno, N., Kamimura, K., Nagahisa, E., Sato, M. und Sato, Y. (1996a) Application of isoelectric focusing in thin-layer polyacrylamide gels to the study of opine dehydrogenases in marine invertebrates. *Fish. Sci.* 62: 122-125
- Kanno, N., Sato, M., Nagahisa, E. und Sato, Y. (1996b) Tauropine dehydrogenase from the sandworm *Arabella iricolor* (Polychaeta: Errantia): purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 114: 409-416
- Karhu, J. A. und Holland, H. D. (1996) Carbon isotopes and the rise of atmospheric oxygen. *Geology* 24: 867-870
- Kato, Y., Nakamura, K. und Hashimoto, T. (1987) High-performance hydroxyapatite chromatography of proteins. *J. Chromatogr.* 398: 340-346
- Kato, Y., Yamada, H. und Asano, Y. (1996) Stereoselective synthesis of opine-type secondary amine carboxylic acids by a new enzyme opine dehydrogenase use of recombinant enzymes. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 1: 151-160
- Kaufmann, M. (1997) Unstable proteins: how to subject them to chromatographic separations for purification procedures. *J. Chromatogr. B* 699: 347-369
- Kavanagh, K. L., Klimacek, M., Nidetzky, B. und Wilson, D. K. (2002) Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase binary and ternary complexes. Specificity and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 277: 43433-43442
- Kavanagh, K. L., Klimacek, M., Nidetzky, B. und Wilson, D. K. (2003) Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase: evidence for a very divergent long-chain dehydrogenase family. *Chem. Biol. Interact.* 143: 551-558

- Kawasaki, T., Kobayashi, W., Ikeda, K., Takahashi, S. und Monma, H. (1986) High-performance liquid-chromatography using spherical aggregates of hydroxyapatite micro-crystals as adsorbent. *Eur. J. Biochem.* 157: 291-295
- Kemp, J. D., Sutton, D. W. und Hack, E. (1979) Purification and characterization of the crown gall specific enzyme nopaline synthase. *Biochemistry* 18: 3755-3760
- Kilias, R. (2000) *Austern – Ostreidae*. 1. Auflage. Hohenwarsleben: Westarp Wissenschaften-Verlagsgesellschaft
- Kim, K.-S. und Farrand, S. K. (1996) Ti plasmid-encoded genes responsible for catabolism of the crown gall opine mannopine by *Agrobacterium tumefaciens* are homologs of the T-region genes responsible for synthesis of this opine by the plant tumor. *J. Bacteriol.* 178: 3275-3284
- Kim, K.-S., Chilton, W. S. und Farrand, S. K. (1996) A Ti plasmid-encoded enzyme required for degradation of mannopine is functionally homologous to the T-region-encoded enzyme required for synthesis of this opine in crown gall tumors. *J. Bacteriol.* 178: 3285-3292
- Kim, R. Y., Gasser, R. und Wistow, G. J. (1992) μ -crystallin is a mammalian homolog of *Agrobacterium* ornithine cyclodeaminase and is expressed in human retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9292-9296
- Kimura, M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626
- Kimura, M. (1977) Preponderance of synonymous changes as evidence for neutral theory of molecular evolution. *Nature* 267: 275-276
- Kimura, M. (1991) The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn. J. Genet.* 66: 367-386
- Kimura, T., Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M., Ogawa, T., Muramoto, K., Yokoyama, T., Kan-no, N., Nagahisa, E., Janssen, F. und Grieshaber, M. K. (2005) Complementary DNA cloning and molecular evolution of opine dehydrogenases in some marine invertebrates. *Mar. Biotechnol.* 6: 493-502
- King, J. L. und Jukes, T. H. (1969) Non-Darwinian evolution. *Science* 164: 788-798
- Klapwijk, P. M. und Schilperoort, R. A. (1982). Genetic determination of octopine degradation. In *Molecular Biology of Plant Tumors* (Hrsg. G. Kahl und J. Schell), S. 475-495. New York: Academic Press
- Klapwijk, P. M., Hooykaas, P. J. J., Kester, H. C. M., Schilperoort, R. A. und Rorsch, A. (1976) Isolation and characterization of *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in utilization of octopine, octopinic acid and lysopine. *J. Gen. Microbiol.* 96: 155-163
- Klimacek, M., Kavanagh, K. L., Wilson, D. K. und Nidetzky, B. (2003) *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase and the family of polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductases: sequence-based classification and analysis of structure-function relationships. *Chem. Biol. Interact.* 143: 559-582

- Knoll, A. H. und Carroll, S. B. (1999) Early animal evolution: emerging views from comparative biology and geology. *Science* 284: 2129-2137
- Koga, Y., Kyuragi, T., Nishihara, M und Sone, N. (1998) Did archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerophosphate backbones caused the separation of the two lines of descent. *J. Mol. Evol.* 46: 54-63
- Kohl, L., Drmota, T., Thi, C. D., Callens, M., Van Beeumen, J., Opperdoes, F. R. und Michels, P. A. (1996) Cloning and characterization of the NAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenases of *Trypanosoma brucei brucei* and *Leishmania mexicana mexicana* and expression of the trypanosome enzyme in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76: 159-173
- Kollman, J. M. und Doolittle, R. F. (2000) Determining the relative rates of change for prokaryotic and eukaryotic proteins with anciently duplicated paralogs. *J. Mol. Evol.* 51: 173-181
- Koonin, E. V., Makarova, K. S. und Aravind, L. (2001) Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 709-742
- Koormann, R. und Grieshaber, M. K. (1980) Investigations on the energy metabolism and on octopine formation of the common whelk, *Buccinum undatum* L., during escape and recovery. *Comp. Biochem. Physiol.* 65B: 543-547
- Kopaciewicz, W., Rounds, M. A., Fausnaugh, J. und Regnier, F. E. (1983) Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 266: 3-21
- Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292
- Kozak, M. (1989) The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* 108: 229-241
- Kozak, M. (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870
- Kreutzer, U. (1987) Untersuchungen über die Regulation der Bildung glykolytischer Endprodukte in marinen Invertebraten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kreutzer, U., Siegmund, B. und Grieshaber, M. K. (1985) Role of coupled substrates and alternative end products during hypoxia tolerance in marine invertebrates. *Molecular Physiology* 8: 371-392
- Kreutzer, U., Siegmund, B. R. und Grieshaber, M. K. (1989) Parameters controlling opine formation during muscular activity and environmental hypoxia. *J. Comp. Physiol. (B)* 159: 617-628
- Krüger, F. (1971) Bau und Leben des Wattwurmes *Arenicola marina*. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* 22: 149-200
- Kuonen, D. R., Kemp, M. C. und Roberts, P. J. (1988) Demonstration and biochemical characterization of rat brain NADPH-dependent diaphorase. *J. Neurochem.* 50: 1017-1025

- Kuriyama, M. (1961) New ninhydrin-reactive substance from red algae. *Nature* 192: 969
- Lacroix, B., Tzfira, T., Vainstein, A. und Citovsky, V. (2006) A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends Genet.* 22: 29-37
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lake, J. A. (1991) The order of sequence alignment can bias the selection of tree topology. *Mol. Biol. Evol.* 8: 378-385
- Lake, J. A. (1994) Reconstructing evolutionary trees from DNA and protein sequences: parallel distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1455-1459
- Lane, L. C. (1978) A simple method for stabilizing protein-sulfhydryl groups during SDS-gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 86: 655-664
- Larade, K. und Storey, K. B. (2002). A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. In *Sensing, Signaling and Cell Adaptation* (Hrsg. K. B. Storey und J. M. Storey), S. 27-46. Amsterdam: Elsevier Science
- Larsson, C., Pahlman, I.-L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L. und Gustafsson, L. (1998) The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 347-357
- Latner, A. L. und Skillen, A. W. (1968). Technical methods. In *Isozymes in Biology and Medicine* (Hrsg. A. L. Latner), S. 190. London: Academic Press
- LéJohn, H. B. (1971) D(-)-lactate dehydrogenases in fungi. Kinetics and allosteric inhibition by guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 246: 2116-2126
- Lesk, A. M. und Chothia, C. (1980) How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. *J. Mol. Biol.* 136: 225-270
- Li, W.-H., Gojobori, T. und Nei, M. (1981) Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* 292: 237-239
- Little, C. und O'Brien, P. J. (1969) Mechanism of peroxide-inactivation of the sulphhydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 10: 533-538
- Liu, Y. C. und Chou, Y. C. (1990) Formaldehyde in formaldehyde agarose-gel may be eliminated without affecting the electrophoretic separation of RNA molecules. *BioTechniques* 9: 558-560
- Livingstone, C. D. und Barton, G. J. (1993) Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Comput. Appl. Biosci.* 9: 745-756
- Livingstone, D. R. (1983) Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. *J. Geol. Soc. London* 140: 27-37
- Livingstone, D. R. (1991) Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. *Amer. Zool.* 31: 522-534

- Livingstone, D. R., De Zwaan, A. und Thompson, R. J. (1981) Aerobic metabolism, octopine production and phosphoarginine as sources of energy in the phasic and catch adductor muscles of the giant scallop *Placopecten magellanicus* during swimming and the subsequent recovery period. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B: 35-44
- Livingstone, D. R., De Zwaan, A., Leopold, M. und Marteijn, E. (1983) Studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductases. *Biochem. Syst. Ecol.* 11: 415-425
- Livingstone, D. R., Stickle, W. B., Kapper, M. A., Wang, S. und Zurburg, W. (1990) Further studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B: 661-666
- Lockhart, P. J., Steel, M. A., Hendy, M. D. und Penny, D. (1994) Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 11: 605-612
- Lockhart, P. J., Larkum, A. W. D., Steel, M. A., Waddell, P. J. und Penny, D. (1996) Evolution of chlorophyll and bacteriochlorophyll: the problem of invariant sites in sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1930-1934
- Lodwig, E. und Poole, P. (2003) Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 37-78
- Lokanath, N. K., Ohshima, N., Takio, K., Shiromizu, I., Kuroishi, C., Okazaki, N., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Miyano, M. und Kunishima, N. (2005) Crystal structure of novel NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Mol. Biol.* 352: 905-917
- Long, G. L. (1976) The stereospecific distribution and evolutionary significance of invertebrate lactate dehydrogenases. *Comp. Biochem. Physiol.* 55B: 77-83
- Long, G. L. und Kaplan, N. O. (1968) D-lactate specific pyridine nucleotide lactate dehydrogenase in animals. *Science* 162: 685-686
- Long, G. L. und Kaplan, N. O. (1973) Diphosphopyridine nucleotide-linked D-lactate dehydrogenases from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* and the seaworm, *Nereis virens*. I. Physical and chemical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 696-710
- Long, G. L., Ellington, W. R. und Duda, T. F. (1979) Comparative enzymology and physiological role of D-lactate dehydrogenase from the foot muscle of two gastropod mollusks. *J. Exp. Zool.* 207: 237-248
- Lottspeich, F. (2000) *Bioanalytik* (Hrsg. H. Zorbas). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Lynch, M. und Conery, J. S. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290: 1151-1155
- Lynch, M. P. und Wood, L. (1966) Effects of environmental salinity on free amino acids of *Crassostrea virginica* Gmelin. *Comp. Biochem. Physiol.* 19: 783-790
- MacArthur, M. W. und Thornton, J. M. (1991) Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* 218: 397-412

- Madern, D. (2002) Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family. *J. Mol. Evol.* 54: 825-840
- Manchenko, G. P., McGoldrick, D. J. und Hedgecock, D. (1998) Genetic basis of opine dehydrogenase activities in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 121: 251-255
- Mann, M. und Jensen, O. N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* 21: 255-261
- Marchler-Bauer, A. und Bryant, S. H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32: W327-W331
- Markert, C. L., Shaklee, J. B. und Whitt, G. S. (1975) Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 189: 102-114
- Martin, W. und Müller, M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392: 37-41
- Martin, W., Hoffmeister, M., Rotte, C. und Henze, K. (2001) An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol. Chem.* 382: 1521-1539
- Martin, W., Rotte, C., Hoffmeister, M., Theissen, U., Gelius-Dietrich, G., Ahr, S. und Henze, K. (2003) Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. *IUBMB Life* 55: 193-204
- Martinez-Romero, E. und Caballero-Mellado, J. (1996) *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 113-140
- Maruyama, K. und Sugano, S. (1994) Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 138: 171-174
- Mason, R. P. und Rao, D. N. R. (1990) Thiyl free radical metabolites of thiol drugs, glutathione, and proteins. *Methods Enzymol.* 186: 318-329
- Matak-Vinkovic, D., Vinkovic, M., Saldanha, S. A., Ashurst, J. L., Delft, F. von, Inoue, T., Miguel, R. N., Smith, A. G., Blundell, T. L. und Abell, C. (2001) Crystal structure of *Escherichia coli* ketopantoate reductase at 1.7 Å resolution and insight into the enzyme mechanism. *Biochemistry* 40: 14493-14500
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038
- Mayr, E. (1963) *Animal Species and Evolution*. Cambridge, Massachusetts, USA: Harvard University Press
- Mayr, E. (1977) Darwin and natural selection. *Am. Sci.* 65: 321-327
- McDonald, J. F. und Ayala, F. J. (1974) Genetic response to environmental heterogeneity. *Nature* 250: 572-574

- McKerrow, J. H. und Robinson, A. B. (1971) Deamidation of asparaginyl residues as a hazard in experimental protein and peptide procedures. *Anal. Biochem.* 42: 565-568
- Meinardus-Hager, G. und 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.* 45: 91-110
- Meinardus-Hager, G. und Gäde, G. (1986b) The separate function of D-lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, and alanopine dehydrogenase in the foot muscle of the jumping cockle *Cardium tuberculatum* during anaerobiosis. *J. Comp. Physiol. (B)* 156: 873-881
- Melville, J. (1935) Labile glutamine peptides, and their bearing on the origin of the ammonia set free during the enzymic digestion of proteins. *Biochem. J.* 29: 179-186
- Meyer, V. R. (2004) *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4. Auflage. Weinheim: John Wiley und Söhne
- Michaelidis, B., Haas, D. und Grieshaber, M. K. (2005) Extracellular and intracellular acid-base status with regard to the energy metabolism in the oyster *Crassostrea gigas* during exposure to air. *Physiol. Biochem. Zool.* 78: 373-383
- Michal, G., Möllering, H. und Siedel, J. (1983) Chemical design of indicator reactions for the visible range. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Hrsg. J. Bergmeyer), Bd. I, S. 197-232. 3. Auflage. Weinheim: Verlag Chemie
- Michov, B. (1996) *Elektrophorese. Theorie und Praxis*. Berlin: Walter de Gruyter
- Miroux, B. und Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260: 289-298
- Moerschell, R. P., Hosokawa, Y., Tsunasawa, S. und Sherman, F. (1990) The specificities of yeast methionine aminopeptidase and acetylation of amino-terminal methionine in vivo. Processing of altered iso-1-cytochromes c created by oligonucleotide transformation. *J. Biol. Chem.* 265: 19638-19643
- Monneuse, M.-O. und Rouzé, 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
- Monneuse-Doublet, M.-O., Lefebure, F. und Olomucki, A. (1980) Isolation and characterization of two molecular forms of octopine dehydrogenase from *Pecten maximus* L. *Eur. J. Biochem.* 108: 261-269
- Montoya, A. L., Chilton, M.-D., Gordon, M. P., Sciaky, D. und Nester, E. W. (1977) Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells: role of plasmid genes. *J. Bacteriol.* 129: 101-107
- Montoya, A. L., Moore, L. W., Gordon, M. P. und Nester, E. W. (1978) Multiple genes coding for octopine-degrading enzymes in *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 136: 909-915

- Moon, T. W. und Pritchard, A. W. (1970) Metabolic adaptations in vertically-separated populations of *Mytilus californianus* Conrad. J. exp. mar. Biol. Ecol. 5: 35-46
- Moore, L. W., Chilton, W. S. und Canfield, M. L. (1997) Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. Appl. Environ. Microbiol. 63: 201-207
- Moran, M. A., Buchan, A., González, J. M., Heidelberg, J. F., Whitman, W. B., Kiene, R. P., Henriksen, J. R., King, G. M., Belas, R., Fuqua, C. et al. (2004) Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. Nature 432: 910-913
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S. N., Kataoka, M., Tanaka, N. und Yoshida, K. (2001) The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. J. Mol. Biol. 307: 771-784
- Morimoto, I., Shaikh, M. I. N., Thomson, R. H. und Williamson, D. G. (1970) The structure of arenicochromine, a trihydroxymethoxybenzpyrenequinone from *Arenicola marina*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 550-551
- Mulcahy, P., Cullina, A. und O'Carra, P. (1997) Both D- and L-specific lactate dehydrogenases co-exist in individual cephalopods. Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol. 116: 143-148
- Mülhardt, C. (2002) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Müller, A. (2007) Die Octopindehydrogenase der Pilgermuschel *Pecten maximus*: Neue Einblicke in die Struktur und den Reaktionsmechanismus. (Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) Göttingen: Cuvillier Verlag
- Müller, W. (1990) New ion exchangers for the chromatography of biopolymers. J. Chromatogr. 510: 133-140
- Murphy, P. J. und Saint, C. P. (1992). Rhizopines in the legume-*Rhizobium* symbiosis. In *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications* (Hrsg. D. P. Verma), S. 377-390. London: CRC Press.
- Murphy, P. J., Heycke, N., Banfalvi, Z., Tate, M. E., De Bruijn, F., Kondorosi, A., Tempé, J., und Schell, J. (1987) Genes for the catabolism and synthesis of an opine-like compound in *Rhizobium meliloti* are closely linked and on the Sym plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 493-497
- Murphy, P. J., Heycke, N., Trenz, S. P., Ratet, P., De Bruijn, F. J. und Schell, J. (1988) Synthesis of an opine-like compound, a rhizopine, in alfalfa nodules is symbiotically regulated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9133-9137
- Murphy, P. J., Wexler, W., Grzemeski, W., Rao, J. P. und Gordon, D. (1995) Rhizopines - their role in symbiosis and competition. Soil Biol. Biochem. 27: 525-529
- Myllyharju, J. (2005) Intracellular post-translational modifications of collagens. Top. Curr. Chem. 247: 115-147

- Naor, D., Fischer, D., Jernigan, R. L., Wolfson, H. J. und Nussinov, R. (1996) Amino acid pair interchanges at spatially conserved locations. *J. Mol. Biol.* 256: 924-938
- Nautiyal, C. S. und Dion, P. (1990) Characterization of the opine-utilizing microflora associated with samples of soil and plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2576-2579
- Negishi, O. und Ozawa, T. (2000) Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. *Phytochemistry* 54: 481-487
- Nei, M. (2005) Selectionism and neutralism in molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 22: 2318-2342
- Neilands, J. B. (1981) Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 715-731
- Neilands, J. B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726
- Nell, J. A. (2002) Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210: 69-88
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M. et al. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799-808
- Neuwald, A. F., Liu, J. S., Lipman, D. J. und Lawrence, C. E. (1997) Extracting protein alignment models from the sequence database. *Nucleic Acids Res.* 25: 1665-1677
- Nevo, E., Lavie, B. und Ben-Shlomo, R. (1983) Selection of allelic isozyme polymorphisms in marine organisms: pattern, theory, and application. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* 10: 69-92
- Nisbet, E. G. und Sleep, N. H. (2001) The habitat and nature of early life. *Nature* 409: 1083-1091
- Nishihara, M., Yamazaki, T., Oshima, T. und Koga, Y. (1999) sn-glycerol-1-phosphate-forming activities in Archaea: separation of archaeal phospholipid biosynthesis and glycerol catabolism by glycerophosphate enantiomers. *J. Bacteriol.* 181: 1330-1333
- Nishiyama, M., Matsubara, N., Yamamoto, K., Iijima, S., Uozumi, T. und Beppu, T. (1986) Nucleotide sequence of the malate dehydrogenase gene of *Thermus flavus* and its mutation directing an increase in enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 261: 4178-4183
- O'Carra, P. und Mulcahy, P. (1996) Lactate dehydrogenase in plants: distribution and function. *Phytochemistry* 42: 581-587
- Ochman, H. und Moran, N. A. (2001) Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 292: 1096-1098
- Ochman, H., Lawrence, J. G. und Groisman, E. A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304
- Ogawa, H. und Fujioka, M. (1978) Purification and characterization of saccharopine dehydrogenase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 253: 3666-3670

- Ohkawa, H., Ostell, J. und Bryant, S. (1995) MMDB: an ASN.1 specification for macromolecular structure. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 3: 259-267
- Ohlsson, I., Nordström B. und Brändén, C.-I. (1974) Structural and functional similarities within the coenzyme binding domains of dehydrogenases. J. Mol. Biol. 89: 339-354
- Olomucki, A. (1981) Structure and function of octopine dehydrogenase of *Pecten maximus* (great scallop). Biochem. Soc. Trans. 9: 278-279
- Olomucki, A., Huc, C., Lefebure, F. und Thoai, N. van (1972) Octopine dehydrogenase. Evidence for a single-chain structure. Eur. J. Biochem. 28: 261-268
- Olomucki, A., Thomé-Beau, F., Biellmann, J.-F. und Branlant, G. (1975) Study of coenzyme binding site of octopine dehydrogenase using analogues of NAD⁺. Eur. J. Biochem. 56: 109-116
- Olsen, J. V., Ong, S.-E. und Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. Mol. Cell Proteomics 3: 608-614
- Opperdoes, F. R. (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. Annu. Rev. Microbiol. 41: 127-151
- Oren, A. und Gurevich, P. (1995) Diversity of lactate metabolism in halophilic archaea. Can. J. Microbiol. 41: 302-307
- Orengo, C. A. und Thornton, J. M. (2005) Protein families and their evolution – a structural perspective. Annu. Rev. Biochem. 74: 867-900
- Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis - I. Background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 321-349
- Os, N. van (2007) Vergleichende thermodynamische Analyse der Substratbindung an die rekombinante Oktopindehydrogenase aus der Pilgermuschel, *Pecten maximus*, und an die Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel. (Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) Göttingen: Cuvillier-Verlag
- Otten, L. und Szegedi, E. (1985) Crown galls induced by octopine-degrading biotype 3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* contain a new form of lysopine dehydrogenase. Plant Sci. 40: 81-85
- Otten, L. und De Ruffray, P. (1994) *Agrobacterium vitis* nopaline Ti plasmid pTiAB4: relationship to other Ti plasmids and T-DNA structure. Mol. Gen. Genet. 245: 493-505
- Otten, L. und Schmidt, J. (1998) A T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* limited-host-range strain AB2/73 contains a single oncogene. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 335-342
- Otten, L., Canaday, J., Gérard, J.-C., Fournier, P., Crouzet, P. und Paulus, F. (1992) Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids - a review. Mol. Plant-Microbe Interact. 5: 279-287
- Otten, L. A. B. M., Vreugdenhil, D. und Schilperoort, R. A. (1977) Properties of D(+)-lysopine dehydrogenase from crown gall tumour tissue. Biochim. Biophys. Acta 485: 268-277

- Otto, J., Argos, P. und Rossmann, M. G. (1980) Prediction of secondary structural elements in glycerol-3-phosphate dehydrogenase by comparison with other dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 109: 325-330
- Ou, X. J., Ji, C., Han, X. Q., Zhao, X., Li, X., Mao, Y., Wong, L.-L., Bartlam, M. und Rao, Z. (2006) Crystal structures of human glycerol 3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1). *J. Mol. Biol.* 357: 858-869
- Palanichelvam, K. und Veluthambi, K. (1996) Octopine- and nopaline-inducible proteins in *Agrobacterium tumefaciens* are also induced by arginine. *Curr. Microbiol.* 33: 156-162
- Park, J., Teichmann, S. A., Hubbard, T. und Chothia, C. (1997) Intermediate sequences increase the detection of homology between sequences. *J. Mol. Biol.* 273: 349-354
- Park, O. K. und Bauerle, R. (1999) Metal-catalyzed oxidation of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*: inactivation and destabilization by oxidation of active-site cysteines. *J. Bacteriol.* 181: 1636-1642
- Pascarella, S. und Argos, P. (1992) Analysis of insertions/deletions in protein structures. *J. Mol. Biol.* 224: 461-471
- Pearson, W. R. (1996) Effective protein sequence comparison. *Meth. Enzymol.* 266: 227-258
- Penny, D., Watson, E. E., Hickson, R. E. und Lockhart, P. J. (1993) Some recent progress with methods for evolutionary trees. *N.Z. J. Bot.* 31: 275-288
- Perret, X., Freiberg, C., Rosenthal, A., Broughton, W. J. und Fellay, R. (1999) High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* 32: 415-425
- Petit, A., Dessaux, Y. und Tempé, J. (1978) *Proc. Int. Conf. Plant. Pathog. Bacteria* 4: 143-152
- Philippe, H., Lartillot, N. und Brinkmann, H. (2005) Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1246-1253
- Philippson, P., Kleine, K., Pohlmann, R., Dusterhoft, A., Hamberg, K., Hegemann, J. H., Obermaier, B., Urrestarazu, L. A., Aert, R., Albermann, K. et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XIV and its evolutionary implications. *Nature* 387: 93-98
- Phillips, C., Gover, S. und Adams, M. J. (1995) Structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase refined at 2 Å resolution. *Acta Crystallogr. D.* 51: 290-304
- Phillips, C., Dohnalek, J., Gover, S., Barrett, M. P. und Adams, M. J. (1998) A 2.8 Å resolution structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: comparison with the sheep enzyme accounts for differences in activity with coenzyme and substrate analogues. *J. Mol. Biol.* 282: 667-681
- Pichon, D., Gaia, V., Norman, M. D. und Boucher-Rodoni, R. (2005) Phylogenetic diversity of epibiotic bacteria in the accessory nidamental glands of squids (Cephalopoda : Loliginidae and Idiosepiidae). *Mar. Biol.* 147: 1323-1332

- Plaxton, W. C. und Storey, K. B. (1982) Tissue specific isozymes of alanopine dehydrogenase in the channeled whelk *Busycotypus canaliculatum*. *Can. J. Zool.* 60: 1568-1572
- Poirot, O., O'Toole, E. und Notredame, C. (2003) Tcoffee@igs: a web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* 31: 3503-3506
- Polevoda, B. und Sherman, F. (2000) N^α-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 36479-36482
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599
- Pörtner, H.-O. (1982) Biochemische und physiologische Anpassungen an das Leben im marinen Sediment: Untersuchungen am Spritzwurm *Sipunculus nudus* L. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Pörtner, H.-O., Surholt, B. und Grieshaber, M. (1979) Recovery from anaerobiosis of the lugworm, *Arenicola marina* L. - changes of metabolite concentrations in the body wall musculature. *J. Comp. Physiol.* 133: 227-231
- Pörtner, H.-O., Grieshaber, M. K. und Heisler, N. (1984a) Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: effect of environmental hypoxia on extracellular and intracellular pH in *Sipunculus nudus* L. *J. Comp. Physiol. (B)* 155: 13-20
- Pörtner, H.-O., Kreutzer, U., Siegmund, B., Heisler, N. und Grieshaber, M. K. (1984b) Metabolic adaptation of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and environmental hypoxia. *Mar. Biol.* 79: 237-247
- Powell, J. R. (1971) Genetic polymorphisms in varied environments. *Science* 174: 1035-1036
- Primaßin, S. (2005) Primärstruktur und Evolution der Opindehydrogenasen aus dem Spritzwurm, *Sipunculus nudus*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Prince, V. E. und Pickett, F. B. (2002) Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat. Rev. Genet.* 3: 827-837
- Prokic, I., Brümmer, F., Brigge, T., Görtz, H. D., Gerdts, G., Schütt, C., Elbrächter, M. und Müller, W. E. G. (1998) Bacteria of the genus *Roseobacter* associated with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Protist* 149: 347-357
- Qian, N. und Sejnowski, T. J. (1988) Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models. *J. Mol. Biol.* 202: 865-884
- Queiroz, J. A., Tomaz, C. T. und Cabral, J. M. S. (2001) Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology* 87: 143-159
- Racker, E. (1955) Mechanism of action and properties of pyridine nucleotide-linked enzymes. *Physiol. Rev.* 35: 1-56
- Ratledge, C. und Dover, L. G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 881-941

- Read, J. A., Winter, V. J., Eszes, C. M., Sessions, R. B. und Brady, R. L. (2001) Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins* 43: 175-185
- Regnier, F. E. (1987) The role of protein structure in chromatographic behavior. *Science* 238: 319-323
- Reissner, K. J. und Aswad, D. W. (2003) Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1281-1295
- Reitze, M. (1983) Untersuchungen über Alanopin-Dehydrogenase und Strombin-Dehydrogenase bei Polychaeten. Diplomarbeit, Westfälische-Wilhelms-Universität Münster
- Reitze, M. und Schöttler, U. (1989) The time dependence of adaption to reduced salinity in the lugworm *Arenicola marina* L. (Annelida: Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 93: 549-559
- Rhodes, G. (2000) *Crystallography Made Crystal Clear*. 2. Auflage. New York: Academic Press
- Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y. und Gardan, L. (2000) Characterization of plasmid-borne and chromosome-encoded traits of *Agrobacterium* biovar 1, 2, and 3 strains from France. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1818-1825
- Riemann, L., Steward, G. F. und Azam, F. (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 578-587
- Roberts, J. D., Bebenek, K. und Kunkel, T. A. (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242: 1171-1173
- Roberts, J. D., Preston, B. D., Johnston, L. A., Soni, A., Loeb, L. A. und Kunkel, T. A. (1989) Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 9: 469-476
- Roepstorff, P. (1997) Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 6-13
- Rokas, A., Krüger, D. und Carroll, S. B. (2005) Animal evolution and the molecular signature of radiations compressed in time. *Science* 310: 1933-1938
- Rossignol, G. und Dion, P. (1985) Octopine, nopaline, and octopinic acid utilization in *Pseudomonas*. *Can. J. Microbiol.* 31: 68-74
- Rossmann, M. G., Moras, D. und Olsen, K. W. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* 250: 194-199
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C.-I. und Banazak, L. J. (1975) Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. In *The Enzymes*, Bd. XI, Teil A (Hrsg. P. D. Boyer), S. 61-102. 3. Auflage. New York: Academic Press
- Rost, B. (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* 12: 85-94

- Rost, B. (2001) Review: protein secondary structure prediction continues to rise. *J. Struct. Biol.* 134: 204-218
- Rost, B. und Sander, C. (1993a) Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7558-7562
- Rost, B. und Sander, C. (1993b) Prediction of protein secondary structure at better than 70 % accuracy. *J. Mol. Biol.* 232: 584-599
- Rost, B., Yachdav, G. und Liu, J. F. (2004) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res.* 32: W321-W326
- Runnegar, B. (1991) Oxygen and the early evolution of the metazoa. In *Metazoan Life without Oxygen* (Hrsg. C. Bryant), S. 65-87. London: Chapman and Hall
- Sachs, L. (1992) *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* 7. Auflage. Berlin: Springer-Verlag
- Saitou, N. und Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425
- Sakasegawa, S.-I., Hagemeyer, C. H., Thauer, R. K., Essen, L.-O. und Shima, S. (2004) Structural and functional analysis of the *gpsA* gene product of *Archaeoglobus fulgidus*: a glycerol-3-phosphate dehydrogenase with an unusual NADP⁺ preference. *Protein Sci.* 13: 3161-3171
- Salomon, F., Deblaere, R., Leemans, J., Hernalsteens, J.-P., Van Montagu, M. und Schell, J. (1984) Genetic identification of functions of TR-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* 3: 141-146
- Sans, N., Schröder, G. und Schröder, J. (1987) The *Noc* region of Ti plasmid C58 codes for arginase and ornithine cyclodeaminase. *Eur. J. Biochem.* 167: 81-87
- Sans, N., Schindler, U. und Schröder, J. (1988) Ornithine cyclodeaminase from Ti plasmid C58: DNA sequence, enzyme properties and regulation of activity by arginine. *Eur. J. Biochem.* 173: 123-130
- Sato, M. und Gäde, G. (1986) Rhodoic acid dehydrogenase: a novel amino acid-linked dehydrogenase from muscle tissue of *Haliotis* species. *Naturwissenschaften* 73: 207-209
- Sato, M., Kanno, N. und Sato, Y. (1987a) Studies on the distribution and metabolism of D-rhodoic acid in algae. *Hydrobiologia* 151: 457-462
- Sato, M., Takahara, M., Kanno, N., Sato, Y. und Ellington, W. R. (1987b) Isolation of a new opine, β -alanopine, from the extracts of the muscle of the marine bivalve mollusc, *Scapharca broughtonii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 803-806
- Sato, M., Takeuchi, M., Kanno, N., Nagahisa, E. und Sato, Y. (1991) Characterization and physiological role of tauropine dehydrogenase and lactate dehydrogenase from muscle of abalone, *Haliotis discus hannai*. *Tohoku J. Agr. Res.* 41: 83-95

- Sato, M., Takeuchi, M., Kanno, N., Nagahisa, E. und Sato, Y. (1993a) Distribution of opine dehydrogenases and lactate dehydrogenase activities in marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 106: 955-960
- Sato, M., Takeuchi, M., Kanno, N., Nagahisa, E. und Sato, Y. (1993b) Purification and properties of tauropine dehydrogenase from a red alga, *Rhodoglossum japonicum*. *Hydrobiologia* 261: 673-678
- Schäfer, M. (2007) Charakterisierung einer Opindehydrogenase aus dem Wattwurm, *Arenicola marina*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Schäffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. und Altschul, S. F. (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* 29: 2994-3005
- Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J. P., Holsters, M., Seurinck, J., Silva, B., Van Vliet, F. und 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
- Schindler, U., Sans, N. und Schröder, J. (1989) Ornithine cyclodeaminase from octopine Ti plasmid Ach5: identification, DNA sequence, enzyme properties, and comparison with gene and enzyme from nopaline Ti plasmid C58. *J. Bacteriol.* 171: 847-854
- Schmatz, D. M. (1997) The mannitol cycle in *Eimeria*. *Parasitology* 114: S81-S89
- Schmitt, J., Hess, H. und Stunnenberg, H. G. (1993) Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* 18: 223-230
- Schoffeniels, E. und Gilles, R. (1972). Ionregulation and osmoregulation in Mollusca. In *Chemical Zoology*, Bd. VII (Hrsg. M. Florkin und B. T. Scheer), S. 393-420. New York: Academic Press.
- Schöttler, U., Surholt, B. und Zebe, E. (1984a) Anaerobic metabolism in *Arenicola marina* and *Nereis diversicolor* during low tide. *Mar. Biol.* 81: 69-73
- Schöttler, U., Wienhausen, G. und Westermann, J. (1984b) Anaerobic metabolism in the lugworm *Arenicola marina* L. - the transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 79: 93-103
- Schrell, A. und Schröder, J. (1993) Characterization of a nopaline-induced gene for a 40 kDa protein in the nopaline catabolic (noc) region of Ti plasmid pTiC58. *Biochim. Biophys. Acta* 1174: 303-304
- Schröder, I., Vadas, A., Johnson, E., Lim, S. und Monbouquette, H. G. (2004) A novel archaeal alanine dehydrogenase homologous to ornithine cyclodeaminase and μ -crystallin. *J. Bacteriol.* 186: 7680-7689
- Schröder, J., Schröder, G., Schell, J., Huisman, H. und Schilperoort, R. A. (1981) Ti-Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* contains the structural gene for lysopine dehydrogenase which is expressed in transformed plant cells. *Eur. J. Cell Biol.* 24: 342

- Schulz, G. E., Schirmer, R. H. und Pai, E. F. (1982) FAD-binding site of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* 160: 287-308
- Schulze, A., Cutler, E. B. und Giribet, G. (2005) Reconstructing the phylogeny of the Sipuncula. *Hydrobiologia* 535: 277-296
- Scotchler, J. W. und Robinson, A. B. (1974) Deamidation of glutaminy residues: dependence on pH, temperature, and ionic strength. *Anal. Biochem.* 59: 319-322
- Sesma, A. und Osbourn, A. E. (2004) The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431: 582-586
- Sheikh, S. und Katiyar, S. S. (1993) 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
- Shen, B., Jensen, R. G. und Bohnert, H. J. (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol.* 115: 527-532
- Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R. G. und Bohnert, H. J. (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol.* 121: 45-52
- Shen, W., Wei, Y., Dauk, M., Zheng, Z. und Zou, J. (2003) Identification of a mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: evidence for a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in plants. *FEBS Lett.* 536: 92-96
- Sherman, F., Stewart, J. W. und Tsunasawa, S. (1985) Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays* 3: 27-31
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858
- Shiba, T. (1991) *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 140-145
- Shimada, K. (1995). Aerobic anoxygenic phototrophs. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Hrsg. R. E. Blankenship, M. T. Madigan und C. E. Bauer), S. 105-122. Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers
- Shuman, S. (1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10104-10108
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269: 32678-32684
- Siebenaller, J. F. (1979) Octopine dehydrogenase (E.C.1.5.1.a) polymorphism in *Mytilus edulis*. *Isozyme Bull.* 12
- Siegmund, B. (1986) Funktionsbedingte und biotopbedingte Hypoxien: Zur Bedeutung der Opine im anaeroben Energiestoffwechsel. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Siegmund, B. und Grieshaber, M. K. (1983) Determination of meso-alanopine and D-strombine by high pressure liquid chromatography in extracts from marine invertebrates. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364: 807-812
- Siegmund, B., Grieshaber, M. K., Reitze, M. und Zebe, E. (1985) Alanopine and strombine are end products of anaerobic glycolysis in the lugworm, *Arenicola marina* L. (Annelida, Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.* 82B: 337-345
- Singer, G. A. C. und Hickey, D. A. (2000) Nucleotide bias causes a genomewide bias in the amino acid composition of proteins. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1581-1588
- Singh, N., Maniscalco, S. J. und Fisher, H. F. (1993) The real-time resolution of proton-related transient-state steps in an enzymatic-reaction. The early steps in the oxidative deamination reaction of bovine liver glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 268: 21-28
- Smale, S. T. (1997) Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1351: 73-88
- Smith, M. J. und Neilands, J. B. (1987) Rhizobactin, a structurally novel siderophore biochemically related to the opines. In *Molecular Strategies for Crop Protection* (Hrsg. C. J. Arentzen und C. Ryan), S. 157-168. New York: A. R. Liss
- Soler, J., De Arriaga, D., Busto, F. und Cadenas, E. (1982) Lactate dehydrogenase in *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochem. J.* 203: 383-391
- Soto, M. J., Dillewijn, P. van, Olivares, J. und Toro, N. (1994) Ornithine cyclodeaminase activity in *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 119: 209-213
- Speicher, D. W. (1989) Microsequencing with PVDF membranes: efficient electroblotting, direct protein adsorption and sequencing program modifications. In *Techniques in Protein Chemistry* (Hrsg. T. Hugli), S. 24-35. New York: Academic Press
- Sprent, J. I. (1989) Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytol.* 111: 129-153
- Stadtman, E. R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid-residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 797-821
- Stapleton, P. P., O'Flaherty, L., Redmond, H. P. und Boucher-Hayes, D. J. (1998) Host defense - a role for the amino acid taurine? *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 22: 42-48
- Steel, M. A., Lockhart, P. J. und Penny, D. (1993) Confidence in evolutionary trees from biological sequence data. *Nature* 364: 440-442
- Steen, H. und Mann, M. (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 699-711
- Stevens, R., Stevens, L. und Price, N. C. (1983) The stabilities of various thiol compounds used in protein purifications. *Biochem. Educ.* 11: 70
- Stillman, T. J., Baker, P. J., Britton, K. L. und Rice, D. W. (1993) Conformational flexibility in glutamate dehydrogenase. Role of water in substrate recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.* 234: 1131-1139

- Stoop, J. M. H., Williamson, J. D. und Pharr, D. M. (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci.* 1: 139-144
- Storey, K. B. (1977a) Lactate dehydrogenase in tissue extracts of the land snail, *Helix aspersa*: unique adaptation of LDH subunits in a facultative anaerobe. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 56: 181-187
- Storey, K. B. (1977b) Tissue specific isozymes of octopine dehydrogenase in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. The Roles of octopine dehydrogenase and lactate dehydrogenase in *Sepia*. *J. Comp. Physiol.* 115: 159-169
- Storey, K. B. und Hochachka, P. W. (1975) The kinetic requirements of cytoplasmic alpha-glycerophosphate (α -GP) dehydrogenase in muscles with active α -GP cycles. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 52: 175-178
- Storey, K. B. und Storey, J. M. (1979) 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, K. B. und Dando, P. R. (1982) Substrate specificities of octopine dehydrogenases from marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 73: 521-528
- Storey, K. B. und Storey, J. M. (1985). meso-alanopine and D-strombine. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bd. VIII (Hrsg. J. Bergmeyer), S. 583-591. 3. Auflage. Weinheim: VCH.
- Storey, K. B. und Storey, J. M. (1990) Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q. Rev. Biol.* 65: 145-174
- Streit, W. R., Schmitz, R. A., Perret, X., Staehelin, C., Deakin, W. J., Raasch, C., Liesegang, H. und Broughton, W. J. (2004) An evolutionary hot spot: the pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* 186: 535-542
- Stryer, L. (1996) *Biochemie*. 4. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89
- Swingley, W. D., Sadekar, S., Mastrian, S. D., Matthies, H. J., Hao, J., Ramos, H., Acharya, C. R., Conrad, A. L., Taylor, H. L., Dejesa, L. C., Shah, M. K., O'Huallachain, M. E., Lince, M. T., Blankenship, R. E., Beatty, J. T. und Touchman, J. W. (2007) The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J. Bacteriol.* 189: 683-690
- Taguchi, H. und Ohta, T. (1991) D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* 266: 12588-12594
- Tamura, K. und Kumar, S. (2002) Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. *Mol. Biol. Evol.* 19: 1727-1736

- Tang, G. L., Miron, D., Zhu-Shimoni, J. X. und Galili, G. (1997) Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1305-1316
- Tate, M. E., Ellis, J. G., Kerr, A., Tempé, J., Murray, K. E. und Shaw, K. J. (1982) Agropine - a revised structure. *Carbohydr. Res.* 104: 105-120
- Taylor, W. R. (1986) The classification of amino acid conservation. *J. Theor. Biol.* 119: 205-218
- Tempé, J. (1983) Chemistry and biochemistry of open-chain imino acids. In *Chemistry and Biochemistry of Amino-Acids, Peptides and Proteins*, Bd. 7 (Hrsg. B. Weinstein), S. 113-201. New York: Marcel Dekker
- Teschner, W., Rudolph, R. und Garel, J.-R. (1987) Intermediates on the folding pathway of octopine dehydrogenase from *Pecten jacobaeus*. *Biochemistry* 26: 2791-2796
- Thines, E., Weber, R. W. S. und Talbot, N. J. (2000) MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 12: 1703-1718
- Thoai, N. van und Robin, Y. (1959) [Metabolism of guanidylated derivatives VIII. Biosynthesis of octopine and repartition of the enzyme operating it in invertebrates]. *Biochim. Biophys. Acta* 35: 446-453
- Thoai, N. van, Huc, C., Pho, D. B. und Olomucki, A. (1969) [Octopine dehydrogenase: purification and catalytic properties]. *Biochim. Biophys. Acta* 191: 46-57
- Thollessen, M. (2004) LDDist: a Perl module for calculating LogDet pair-wise distances for protein and nucleotide sequences. *Bioinformatics* 20: 416-418
- Thomé-Beau, F. und 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. (1989) N⁵-(L-1-carboxyethyl)-L-ornithine : NADP⁺ oxidoreductase from *Streptococcus lactis*. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 264: 9592-9601
- Thompson, J. und Donkersloot, J. A. (1992) N-(carboxyalkyl)amino acids: occurrence, synthesis, and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 517-557
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (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, J. D., Plewniak, F. und Poch, O. (1999) A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res.* 27: 2682-2690
- Tiselius, A., Hjertén, S. und Levin, Ö. (1956) Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem. Biophys.* 65: 132-155
- Todd, A. E., Orengo, C. A. und Thornton, J. M. (2001) Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J. Mol. Biol.* 307: 1113-1143

- Tremblay, G., Gagliardo, R., Chilton, W. S. und Dion, P. (1987a) Diversity among opine-utilizing bacteria: identification of coryneform isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1519-1524
- Tremblay, G., Lambert, R., Lebeuf, H. und 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
- Tsekos, I. (1982) Tumor-like growths induced by bacteria in the thallus of a red alga, *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. *Ann. Bot.* 49: 123-126
- Tyagi, R., Duquerroy, S., Navaza, J., Guddat, L. W. und Duggleby, R. G. (2005) The crystal structure of a bacterial Class II ketol-acid reductoisomerase: domain conservation and evolution. *Protein Sci.* 14: 3089-3100
- Ueda, K., Yamashita, A., Ishikawa, J., Shimada, M., Watsuji, T., Morimura, K., Ikeda, H., Hattori, M. und Beppu, T. (2004) Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalism. *Nucleic Acids Res.* 32: 4937-4944
- Urich, K. (1990) *Vergleichende Biochemie der Tiere*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
- Van Noorden, C. J. F. (1984) Histochemistry and cytochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Prog. Histochem. Cytochem.* 15: 1-82
- Van Noorden, C. J., Kooij, A., Vogels, I. M. C. und Frederiks, W. M. (1985) On the nature of the 'nothing dehydrogenase' reaction. *Histochem. J.* 17: 1111-1118
- Vanhoof, G., Goossens, F., Meester, I. de, Hendriks, D. und Scharpé, S. (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9: 736-744
- Venugopal, K. S. und Adiga, P. R. (1980) Artfactual staining of proteins on polyacrylamide gels by nitrobluetetrazolium chloride and phenazine methosulfate. *Anal. Biochem.* 101: 215-220
- Vié, M. P., Evrard, C., Osty, J., Breton-Gilet, A., Blanchet, P., Pomerance, M., Rouget, P., Francon, J. und Blondeau, J. P. (1997) Purification, molecular cloning, and functional expression of the human nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-regulated thyroid hormone-binding protein. *Mol. Endocrinol.* 11: 1728-1736
- Voegele, R. T., Hahn, M., Lohaus, G., Link, T., Heiser, I. und Mendgen, K. (2005) Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiol.* 137: 190-198
- Vogel, C., Bashton, M., Kerrison, N. D., Chothia, C. und Teichmann, S. A. (2004) Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 208-216
- Volloch, V., Schweitzer, B. und Rits, S. (1994) Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of β globin mRNA with an extended 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Res.* 22: 2507-2511
- Waarde, A. van (1991) Alcoholic fermentation in multicellular organisms. *Physiol. Zool.* 64: 895-920

- Waarde, A. van, Graaff, I. de, Thillart, G. van den und Erkelens, C. (1991) Acidosis (measured by nuclear magnetic resonance) and ethanol production in anoxic goldfish acclimated to 5 and 20°C. *J. Exp. Biol.* 159: 387-405
- Wabiko, H., Kagaya, M. und Sano, H. (1990) Various nopaline catabolism genes located outside the Ti-plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* strains. *J. Gen. Microbiol.* 136: 97-103
- Wägele, J.-W. (2001) *Grundlagen der phylogenetischen Systematik*. 2. Auflage. München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil
- Wahle, E. und Keller, W. (1992) The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 419-440
- Wahlefeld, A. W. (1983) Lactate dehydrogenase. UV-method with L-lactate and NAD. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bd. III (Hrsg. H. U. Bergmeyer), S. 126-133. 3. Auflage. Weinheim: VCH
- Walsh, P. J. (1981) Purification and characterization of two allozymic forms of octopine dehydrogenase from California populations of *Metridium senile*. The role of octopine dehydrogenase in the anaerobic metabolism of sea anemones. *J. Comp. Physiol.* 143: 213-222
- Wang, D. Y.-C., Kumar, S. und Hedges, S. B. (1999) Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266: 163-171
- Wang, Y., Anderson, J. B., Chen, J., Geer, L. Y., He, S., Hurwitz, D. I., Liebert, C. A., Madej, T., Marchler, G. H., Marchler-Bauer, A., Panchenko, A. R., Shoemaker, B. A., Song, J. S., Thiessen, P. A., Yamashita, R. A. und Bryant, S. H. (2002) MMDB: Entrez's 3D-structure database. *Nucleic Acids Res.* 30: 249-252
- Warburg, O. und Christian, W. (1936) Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten. *Helv. Chim. Acta* 19: E79-E88
- Ward, E. R. und Barnes, W. M. (1983) Marine molluscan genomes contain sequences homologous to the octopine synthase gene of *Agrobacterium tumefaciens*. *Biol. Bull.* 165: 498
- Webster, K. A. (2003) Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J. Exp. Biol.* 206: 2911-2922
- Wernersson, R. und Pedersen, A. G. (2003) RevTrans: multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. *Nucleic Acids Res.* 31: 3537-3539
- Westermeier, R. (1990) *Elektrohorese-Praktikum*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft
- Wierenga, R. K. und Hol, W. G. J. (1983) Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant. *Nature* 302: 842-844
- Wierenga, R. K., De Maeyer, M. C. H. und Hol, W. G. J. (1985) Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* 24: 1346-1357

- Wierenga, R. K., Terpstra, P. und Hol, W. G. J. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187: 101-107
- Wilks, H. M., Hart, K. W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R. und Holbrook, J. J. (1988) A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science* 242: 1541-1544
- Williamson, D. H. (1985) L-alanine. Determination with alanine dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bd. VIII (Hrsg. J. Bergmeyer), S. 341-344. 3. Auflage. Weinheim: VCH.
- Wilson, C. A., Kreychman, J. und Gerstein, M. (2000) Assessing annotation transfer for genomics: quantifying the relations between protein sequence, structure and function through traditional and probabilistic scores. *J. Mol. Biol.* 297: 233-249
- Winberg, J.-O., Thatcher, D. R. und McKinley-McKee, J. S. (1983) *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase: an electrophoretic study of the Adh^S, Adh^F, and Adh^{UF} alleloenzymes. *Biochem. Genet.* 21: 63-80
- Wistow, G. und Kim, H. (1991) Lens protein expression in mammals: taxon-specificity and the recruitment of crystallins. *J. Mol. Evol.* 32: 262-269
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H. und Fox, G. E. (1984) The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 315-326
- Wollenberger, A., Ristau, O. und Schoffa, G. (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflügers Arch.* 270: 399-412
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida Jr., N. F. et al. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2323
- Wright, H. T. (1991) Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 1-52
- Yancey, P. H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208: 2819-2830
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. und Somero, G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222
- You, K.-S., Arnold Jr., L. J., Allison, W. S. und Kaplan, N. O. (1978) Enzyme stereospecificities for nicotinamide nucleotides. *Trends Biochem. Sci.* 3: 265-268
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. und Sawada, H. (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de

- Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 89-103
- Yurkov, V. V. und Beatty, J. T. (1998) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 695-724
- Zahn, K. (1996) Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. J. Bacteriol. 178: 2926-2933
- Zambryski, P., Tempe, J. und Schell, J. (1989) Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. Cell 56: 193-201
- Zammit, V. A. und Newsholme, E. A. (1976) The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenase, 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
- Zanker, H., Lurz, G., Langridge, U., Langridge, P., Kreusch, D. und Schröder, J. (1994) Octopine and nopaline oxidases from Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*: molecular analysis, relationship, and functional characterization. J. Bacteriol. 176: 4511-4517
- Zebe, E. und Schiedek, D. (1996) The lugworm *Arenicola marina*: a model of physiological adaptation to life in intertidal sediments. Helgoländer Meeresunters. 50: 37-68
- Zettlmeissl, G., Teschner, W., Rudolph, R., Jaenicke, R. und Gäde, G. (1984) Isolation, physicochemical properties, and folding of octopine dehydrogenase from *Pecten jacobaeus*. Eur. J. Biochem. 143: 401-407
- Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K. und Winans, S. C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. J. Bacteriol. 182: 3885-3895
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O. und Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. Plant J. 23: 11-28
- Zurburg, W. und De Zwaan, A. (1981) The role of amino acids in anaerobiosis and osmoregulation in bivalves. J. Exp. Zool. 215: 315-325
- Zurburg, W., Bont, A. M. T. de und De Zwaan, A. (1982) Recovery from exposure to air and the occurrence of strombine in different organs of the sea mussel *Mytilus edulis* L. Molecular Physiology 2: 135-147

8 Anhang

8.1 Primer

Tab. 7: Universelle Artbestimmungsprimer

Mit den angegebenen Universalprimern können zur Artidentifizierung geeignete Abschnitte der für die kleine ribosomale Untereinheit codierenden Gene aus Pro- und Eukaryonten amplifiziert werden (vgl. 2.3.3 und Berschick, 1997). Im Fall von *A. marina* und *S. nudus* wurde das Primerpaar mt12s1 plus ssu2, im Fall der Austern *C. gigas* und *O. edulis* die Primerkombination Lsu2_eco plus Lsu3 verwendet.

Name	Sequenz	Fragmentgröße	Annealingtemperatur
Lsu2_eco	5'-GGTCTGAATTCAGATCACGT-3'	≈ 500 bp	55°C
Lsu3	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'		
mt12s1	5'-GTGGATCCAGGATTAGATACCC-3'	≈ 400 bp	50 oder 55°C
ssu2	5'-ACTGGTACCTTGTTACGACTT-3'		

Tab. 8: Degenerierte Primer zur partiellen Amplifikation von OpDHs

Die aufgeführten Primer, die ausgehend von den angegebenen OpDH-Peptiden des Wattwurms (Am) bzw. der Pazifischen Auster (Cg) konstruiert wurden (vgl. Tab. 3, S. 71 und Tab. 4, S. 72), ermöglichten die Amplifikation interner OpDH-Teilstücke aus *A. marina*, *C. gigas*, *O. edulis* und *S. nudus*. Dem Primernamen kann jeweils entnommen werden, ob das Oligonukleotid an den Erst- (for) oder Zweitstrang (rev) bindet. Ari03_for und Ari03_rev kamen bei der Vervielfältigung von Spritzwurm-, Ari04_for und Ari04_rev bei der Amplifikation von Wattwurm-OpDHs zum Einsatz. Im Fall von *C. gigas* erwiesen sich die Primer Ari03_for und Cg02_rev, bei *O. edulis* die Oligonukleotide Cg01_for und Cg02_rev als erfolgreich.

Name	Sequenz	zugehöriges Peptid
Ari03_for	5'-GCGGAGGTGGAAATGGAGC-3'	Am_639,85_3+ (6)
Ari03_rev	5'-GCCCANGGNARNGAYTC-3'	Am_927,25_2+ (10)
Ari04_for	5'-AA YGGNGCNCA YGCNTAYGC-3'	Am_639,85_3+ (6)
Ari04_rev	5'-CANGCCCANGGNARRCTYTC-3'	Am_927,25_2+ (10)
Cg01_for	5'-TTYGCNGAYGARGCNGA-3'	Cg_623,31_2+ (8)
Cg02_rev	5'-CGTCNACACCTTGGTAG AATAG-3'	Cg_726,84_2+ (10)

Tab. 9: Primer für die 5'-RACE-PCRs

Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden zur Amplifikation der 5'-Enden von OpDH-codierenden mRNAs (cDNAs) aus *A. marina* (Am), *C. gigas* (Cg), *O. edulis* (Oe) und *S. nudus* (Sn) genutzt. Die Primer 5'_RACE (5'-GeneRacer™ Primer) und 5'_nested_RACE (5'-Nested GeneRacer™ Primer) sind homolog zum GeneRacer™ RNA-Oligonukleotid (5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3'), das bei der Herstellung RLM-RACE-fähiger cDNA an das 5'-Ende undegradierter mRNAs ligiert wurde (2.6.4). Bei den übrigen Oligonukleotiden handelt es sich um OpDH-spezifische Rückwärtsprimer. Sie sind komplementär zu dem durch die Ziffer in ihrem Namen bezeichneten OpDH-Fragment aus Tab. 14 bis Tab. 17. Mit den Austernprimern der 23er-Serie wurden keine spezifischen Amplifikate erzielt.

	Name	Sequenz
	5'_RACE	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'
	5'_nested_RACE	5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'
Am	rev_UH16	5'-GACGATGATGGTGCCGGGCTGGATGTAC-3'
	rev_nested_UH16	5'-AGTCGTGGTTCTCCATGGCATTG-3'
Cg	rev_UH23	5'-TCCGAGAGGGGTTTTCCGTTCCATTGAG-3'
	rev_nested_UH23	5'-TTCGCTGTCCATCTCTCTGCTTCATC-3'
	rev_UH23n	5'-GTACATTATTGGAGGATGGACAGTAGAATC-3'
	rev_nested_UH23n	5'-AAATTGGTCTGGTCTCAAAGCATTGCTC-3'
	rev_UH23n_long	5'-CCGTACATTATTGGAGGATGGACAGTAGAATC-3'
	rev_nested_UH23*	5'-CTGGAAGTCCAACAATGACGGTGTCTTTTC-3'
	rev_UH43	5'-GTAGCCGTATTTCTGTGGAGCCCTTGTG-3'
	rev_nested_UH43	5'-GCTCTGCCTGTCTCTCGTCGATTCATTG-3'
Oe	rev_UH24	5'-TCAGCGGTGGGTGGATGATTGACTTTGC-3'
	rev_nested_UH24	5'-GCACCTGTGACCGCTTCTTTTGGATTG-3'
Sn	rev_UH25	5'-CGCAAAAGCTGGAACAACGAACGCAATG-3'
	rev_nested_UH25	5'-GATCCGGGTATGAGGCGGCAGTTC-3'

Tab. 10: Primer für die 3'-RACE-PCRs

Diese Oligonukleotide wurden zur Amplifikation der 3'-Enden von OpDH-codierenden mRNAs (cDNAs) aus *A. marina* (Am), *C. gigas* (Cg), *O. edulis* (Oe) und *S. nudus* (Sn) eingesetzt. Die Primer 3'_RACE (3'-GeneRacer™ Primer) und 3'_nested_RACE (3'-Nested GeneRacer™ Primer) sind homolog zum GeneRacer™ Oligo dT Primer (5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₁₈-3'), der zur Erststrangsynthese RACE-fähiger cDNA verwendet wurde (2.6.4). Bei den übrigen Oligonukleotiden handelt es sich um OpDH-spezifische Vorwärtsprimer. Sie entsprechen einem Teilabschnitt des durch die Ziffer in ihrem Namen bezeichneten OpDH-Fragments aus Tab. 14 bis Tab. 17.

	Name	Sequenz
	3'_RACE	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'
	3'_nested_RACE	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'
Am	for_UH16	5'-CGTGGAGGTGCGCGTTCTGACGCTGTAC-3'
	for_nested_UH16	5'-GTACATCCAGCCCGGCACCATCATC-3'
Cg	for_UH23	5'-GTCCGAAACGACGACGGTAGCGAAAGT-3'

	for_nested_UH23	5'-GTGGTCTCAATGGAACGGAAAACC-3'
	for_UH62	5'-TGAAGCCATTGCTCCGTACATAGATGAC-3'
	for_nested_UH62	5'-GCTATAACTCTCATGGCAAAGCCCATAG-3'
	for_UH71	5'-CGGATCTTCTTGGAGAAAAGGCCAATGC-3'
	for_nested_UH71	5'-GCAATGTGACGCAATCTGTTTTAGAATTAC-3'
Oe	for_UH24	5'-GCGTTTGCGCACGAACAGTATTTAGAG-3'
	for_nested_UH24	5'-CACCGCTGATGTATGGGAAATGGTCAAC-3'
Sn	for_UH25	5'-GGGAACTGCCGCCTCATAACCCGGATCAG-3'
	for_nested_UH25	5'-GTTTCGTTGTTCCAGCTTTTGCGCATAGG-3'

Tab. 11: Primer zur 5'/3'-Amplifikation von OpDH-codierenden cDNAs

Mit Hilfe der angegebenen Oligonukleotide konnten OpDH-codierende mRNAs (cDNAs) aus *A. marina* (Am), *C. gigas* (Cg), *O. edulis* (Oe) und *S. nudus* (Sn) einschließlich des größten Teils ihrer 5'- und 3'-terminalen, untranslatierten Bereiche amplifiziert werden. Im Fall der Pazifischen Auster wurde neben zwei kompletten OpDHs (Cg1 und Cg2) eine weitere mit N-terminal unvollständigem ORF erhalten (Cg3). Die Primerkombinationen 5'_Am plus 3'_Am60 und 5'_Cg62 plus rev_UH43 lieferten nur partielle mRNAs

	Name	Sequenz
Am	5'_Am	5'-TGGTAGCCACCGTACGCTGACTGAG-3'
	3'_Am	5'-TACTATCACCGGGTAACAGCGGCAAG-3'
	3'_Am60	5'-ATTTGCAATGTCTCCTGTCGATTCTG-3'
Cg1	5'_Cg62	5'-GTTATCTAGCACCGGTTCTGTTTGTG-3'
	rev_UH43	5'-GTAGCCGTATTTCTGTGGAGCCCTTGTG-3'
	3'_Cg84	5'-ATCGTCAGGGAGGGAGGGTGGAAATATTG-3'
Cg2	5'_Cg71	5'-CTGACAGCGAGCATAGTGATGGATCGTA-3'
	3'_Cg90	5'-TAGTCTACAACAATGGCAGCGGGATCTC-3'
Cg3	for_UH23n	5'-GCTTGGCAGGGCTTGCCTCCTTAAAATC-3'
	3'_Cg43n	5'-GACTGTTCACTCAAGGTTGTTTCTGGATTG-3'
Oe	5'_Oe	5'-AACCACCGTCCCTCGGCCAAAACAC-3'
	3'_Oe	5'-ACAGTTAAAGGAAGCGCTGATATTG-3'
Sn	5'_Sp_neu	5'-CAGCAACGAAGCTCCTGTTGGCTCAG-3'
	3'_Sp53	5'-CGGCAGCATAATACTACCATTCATACACC-3'

Tab. 12: Primer zur Amplifikation und Klonierung von OpDH-ORFs

Die aufgelisteten Primer dienen zur Amplifikation der offenen Leseraster von OpDH-codierenden mRNAs (cDNAs) aus *A. marina* (Am), *C. gigas* (Cg1 und Cg2), *O. edulis* (Oe) und *S. nudus* (Sn). Sie wurden so konstruiert, daß die PCR-Produkte mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und so in den Vektor pET24d(+) (Novagen, Darmstadt) kloniert werden konnten, daß sich die OpDHs nachfolgend mit natürlichem N-Terminus und C-terminalem Fusionstag aus Leucin, Glutamat und sechs Histidinen in BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt) exprimieren ließen. Die Erkennungssequenzen der jeweiligen Restriktionsenzyme (RE) sind durch Unterstreichung, ihre Schnittstelle durch ↓ gekennzeichnet. Die Startcodons wurden durch Fettdruck hervorgehoben.

	Primername	Sequenz	RE
Am	Nterm_Am	5'-CTGG <u>CGTCTCC</u> ↓ <u>CATGGGT</u> GACTCCGATATC-3'	BsmBI
	Cterm_Am	5'-ATTTACC↓ <u>TCGAGG</u> TCGTATCCCAGGATTTG-3'	XhoI
Cg1	Nterm_Cg	5'-GCTGAAATCAGA↓ <u>CATGT</u> CTGGAAAAGT-3'	PciI
	Cterm_Cg101	5'-AACAA <u>CC</u> ↓ <u>TCGAG</u> TCGTGGAGTTACTTCGAAGCTC-3'	XhoI
Cg2	Nterm_Cg102	5'-CGGCAAC↓ <u>CATGG</u> ATGGTAAATTAGTAGTG-3'	NcoI
	Cterm_Cg102	5'-GTCGACATAC↓ <u>TCGAG</u> ATACCGGAATGAATTCAAG-3'	XhoI
Oe	Nterm_Oe	5'-ACACCTAC↓ <u>CATGG</u> GAAGTGGAGGATAG-3'	NcoI
	Cterm_Oe	5'-TCTGCTC↓ <u>TCGAG</u> AACGTCGAACAAGT-3'	XhoI
Sn	Nterm_Sp	5'-TACAGG↓ <u>GTCTC</u> ACATGGTGGTTCGCTCTTATATG-3'	Eco31I
	Cterm_Sp	5'-CAATGTC↓ <u>TCGAG</u> GTCACCTATTATTTCATC-3'	XhoI

Tab. 13: Sequenzierprimer

Die aufgeführten vektorspezifischen Standardprimer (pGEM[®]-T Easy: M13, M13_rev, T7 und SP6; pCR[®] 4-TOPO und pCR[®] 4Blunt-TOPO: M13, M13_rev, T7 und T3; pET24d(+): T7 und T7_Ter) und OpDH-spezifischen Oligonukleotide wurden zur Sequenzierung klonierter PCR-Produkte verwendet (Qiagen, Hilden). Bei OpDH-spezifischen Primern sind die Fragmente angegeben, zu deren Sequenzierung sie dienen (Bezeichnungen entsprechend Tab. 14 bis Tab. 17). Die Primer wurden auch zur PCR-analytischen Bestimmung der Insertgröße von Plasmidkonstrukten genutzt.

Name	Sequenz	Spezifität
M13	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Vektor
M3_rev	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	Vektor
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Vektor
T7_Ter	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	Vektor
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'	Vektor
T3	5'-CAATTAACCCTCACTAAAG-3'	Vektor
for_UH60	5'-GAATACCTCGTGGACTCTAC-3'	Am60, Am68, Am78
rev_UH60	5'-ACCCTATTAGCAACACTACTG-3'	Am60, Am68, Am78
Am_int1_for	5'-GCTTTGAGTTCGCCTGCTG-3'	Am78, Am100
Am_int2_for	5'-CAACTGGGAGCCTAACTTC-3'	Am78, Am100
Am_int4_rev	5'-GTTATGAGCAGAATCGACAG-3'	Am100
for_UH29	5'-CTACAACAAGCTGGAGGATC-3'	Cg42, Cg43

for_UH90	5'-GCTACTTAAGTGAGGATGTC-3'	Cg90, Cg102, Cg104
Cg_int2_for	5'-CTTGGGCATGTAGACTTATTG-3'	Cg101, Cg103
Cg_int5_for	5'-TCTCTTCCATTCGTTTGTAG-3'	Cg102, Cg104
for_UH35	5'-GTAGGATCAGAATTGTCTGG-3'	Oe35, Oe48, Oe81, Oe98
Oe_int1_for	5'-CAAAGAAACACTTGGTGCTTC-3'	Oe81, Oe98
for_UH38	5'-ATATGCGACTGGTACAAGC-3'	Sn38, Sn39, Sn53
rev_UH38	5'-CTTGCTATGGTACCCTTAC-3'	Sn38
for_UH52	5'-CTCACAAATGCAAGTACTTG-3'	Sn38
Sp_int0_for	5'-GATAGGTGCCATGCAGTTAG-3'	Sn99
Sp_int1_for	5'-ATTGGAGACACGTGGTCAC-3'	Sn82
Sp_int2_for	5'-CGCTGCCCAACAACACTATG-3'	Sn82, Sn99

8.2 Sequenzen

Tab. 14: Sequenzübersicht *A. marina*

Die Zusammenstellung umfaßt alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten OpDH-Fragmente aus *A. marina* (Int = interner Sequenzabschnitt, 5' = 5'-Terminus, 3' = 3'-Terminus, 5'/3' = OpDH codierende mRNA einschließlich 5'- und 3'-terminaler, untranslatierter Regionen, ORF = offenes Leseraster). Neben der Fragmentgröße (inklusive Primern) [bp] und den zur Amplifikation verwendeten PCR-Primern ist jeweils die gewählte Primeranlagerungstemperatur (T_A [°C]) angegeben. Bei den Primern ODH-9F (5'-GCYGACGARGCMGAGMGVTGG-3') und ODH-11R (5'-CGRCAVGCCCARGGRAGRGRWYWCRAA-3') handelt es sich um Universalprimer zur Amplifikation von Invertebraten-OpDHs (Kimura et al., 2004a). Sofern verschachtelte (nested) PCRs durchgeführt wurden, sind die Primerpaare und zugehörigen Annealingtemperaturen der Erst- und Zweit-PCR aufgelistet. Der Tierspalte kann entnommen werden, welche Sequenzen ausgehend von DNA oder RNA des gleichen Wattwurms erhalten wurden. Sequenzen unterschiedlicher Gruppen (A bis G) sind unabhängig in dem Sinne, daß sie aus separaten PCRs hervorgingen. Die Ziffern in der letzten Tabellenspalte verweisen auf gleichartige Sequenzen.

	Fragment	[bp]	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	T_A [°C]	Tier	äquivalent
A	Int_Am13	340	ODH-9F	ODH-11R	60°C	1	
	Int_Am16	412	AriO4_for	Ari_O4_rev	55	1	
B	5'_Am54	453	5'_RACE	rev_UH16	66	2	67, 75
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH16	57		
	5'_Am55	359	5'_RACE	rev_UH16	66	2	
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH16	57		
	5'_Am56	307	5'_RACE	rev_UH16	66	2	57
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH16	57		
	5'_Am57	307	5'_RACE	rev_UH16	66	2	56
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH16	57		
5'_Am67	450	5'_RACE	rev_UH16	66	2	54, 75	
		5'_nested_RACE	rev_nested_UH16	57			
5'_Am75	453	5'_RACE	rev_UH16	66	2	54, 67	
		5'_nested_RACE	rev_nested_UH16	57			

C	3'_Am60	2194	for_UH16 for_nested_UH16	3'_RACE 3'_nested_RACE	67 63	2	68
	3'_Am61	1385	for_UH16 for_nested_UH16	3'_RACE 3'_nested_RACE	67 63	2	69
	3'_Am68	2197	for_UH16 for_nested_UH16	3'_RACE 3'_nested_RACE	67 63	2	60
	3'_Am69	1384	for_UH16 for_nested_UH16	3'_RACE 3'_nested_RACE	67 63	2	61
D	5'/3'_Am78	2841	5'_Am	3'_Am	62	3	100
E	5'/3'_Am79	855	5'_Am	3'_Am60	67	3	
F	5'/3'_Am100	2841	5'_Am	3'_Am	64	3	78
G	ORF_Am91	1267	Nterm_Am	Cterm_Am	55	3	

Tab. 15: Sequenzübersicht *C. gigas*

Die Zusammenstellung umfaßt alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten OpDH-Fragmente aus *C. gigas* (Int = interner Sequenzabschnitt, 5' = 5'-Terminus, 3' = 3'-Terminus, 5'/3' = OpDH-codierende mRNA einschließlich 5'- und 3'-terminaler, untranslatierter Regionen, 5'/3'_{part} = partielle, an einem Ende unvollständige Sequenz wie vorstehend, ORF = offenes Leseraster, * = unvollständig sequenziert). Neben der Fragmentgröße (inklusive Primern) [bp] und den zur Amplifikation verwendeten PCR-Primern ist jeweils die gewählte Primeranlagerungstemperatur (T_A [°C]) angegeben. Sofern verschachtelte (nested) PCRs durchgeführt wurden, sind die Primerpaare und zugehörigen Annealingtemperaturen der Erst- und Zweit-PCR aufgelistet. Der Tierspalte kann entnommen werden, welche Sequenzen ausgehend von DNA oder RNA der gleichen Auster erhalten wurden. Sequenzen unterschiedlicher Gruppen (A bis N) sind unabhängig in dem Sinne, daß sie aus separaten PCRs hervorgingen. Die Ziffern in der letzten Tabellenspalte verweisen auf gleichartige Sequenzen. Fragmente, die zu einem gemeinsamen Contig assembliert wurden (vgl. 3.7), sind in derselben Farbe dargestellt.

	Fragment	[bp]	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	T _A [°C]	Tier	äquivalent
A	Int_Cg23	699	Ari03_for	Cg02_rev	55	1	
B	5'_Cg62	868	5'_RACE 5'_nested_RACE	rev_UH43 rev_nested_UH43	63 63	2	70
	5'_Cg70	892	5'_RACE 5'_nested_RACE	rev_UH43 rev_nested_UH43	63 63	2	62
	5'_Cg71	883	5'_RACE 5'_nested_RACE	rev_UH43 rev_nested_UH43	63 63	2	
C	3'_Cg29*	≈ 1300	for_UH23 for_nested_UH23	3'_RACE 3'_nested_RACE	63 57	2	42, 31
	3'_Cg42	1284	for_UH23 for_nested_UH23	3'_RACE 3'_nested_RACE	63 57	2	29, 31
D	3'_Cg30*	≈ 1400	for_UH23 for_nested_UH23	3'_RACE 3'_nested_RACE	60 57	2	43
	3'_Cg31*	≈ 1300	for_UH23 for_nested_UH23	3'_RACE 3'_nested_RACE	60 57	2	29, 42
	3'_Cg43	1384	for_UH23 for_nested_UH23	3'_RACE 3'_nested_RACE	60 57	2	30

E	3'_Cg84	1012	for_UH62	3'_RACE	60	5	
			for_nested_UH62	3'_nested_RACE	65		
	3'_Cg85	764	for_UH62	3'_RACE	60	5	
			for_nested_UH62	3'_nested_RACE	65		
F	3'_Cg89	826	for_UH71	3'_RACE	62	5	
			for_nested_UH71	3'_nested_RACE	63		
	3'_Cg90	1556	for_UH71	3'_RACE	62	5	
			for_nested_UH71	3'_nested_RACE	63		
G	5'/3' _{part} _Cg80	1282	5'_Cg62	rev_UH43	58	3, 4	
H	5'/3'_Cg101	1504	5'_Cg62	3'_Cg84	64	3, 4	103
I	5'/3'_Cg102	1959	5'_Cg71	3'_Cg90	62	3, 4	104
	ORF_Cg107	1252	Nterm_Cg102	Cterm_Cg102	52	3, 4	106
J	5'/3'_Cg103	1504	5'_Cg62	3'_Cg84	64	3, 4	101
K	5'/3'_Cg104	1958	5'_Cg71	3'_Cg90	62	3, 4	102
L	5'/3' _{part} _Cg109	1845	for_UH23n	3'_Cg43n	62	5	
M	ORF_Cg105	1252	Nterm_Cg	Cterm_Cg101	55	5	
N	ORF_Cg106	1252	Nterm_Cg102	Cterm_Cg102	52	5	107

Tab. 16: Sequenzübersicht *O. edulis*

Die Zusammenstellung umfaßt alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten OpDH-Fragmente aus *O. edulis* (Int = interner Sequenzabschnitt, 5' = 5'-Terminus, 3' = 3'-Terminus, 5'/3' = OpDH-codierende mRNA einschließlich 5'- und 3'-terminaler, untranslatierter Regionen, ORF = offenes Leseraster). Neben der Fragmentgröße (inklusive Primern) [bp] und den zur Amplifikation verwendeten PCR-Primern ist jeweils die gewählte Primeranlagerungstemperatur (T_A [°C]) angegeben. Sofern verschachtelte (nested) PCRs durchgeführt wurden, sind die Primerpaare und zugehörigen Annealingtemperaturen der Erst- und Zweit-PCR aufgelistet. Der Tierspalte kann entnommen werden, welche Sequenzen ausgehend von DNA oder RNA der gleichen Auster erhalten wurden. Sequenzen unterschiedlicher Gruppen (A bis H) sind unabhängig in dem Sinne, daß sie aus separaten PCRs hervorgingen. Die Ziffern in der letzten Tabellenspalte verweisen auf gleichartige Sequenzen.

	Fragment	[bp]	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	T_A [°C]	Tier	äquivalent
A	Int_Oe24	625	Cg01_for	Cg02_rev	50	2	
B	5'_Oe34	352	5'_RACE	rev_UH24	65	3	46
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH24	61		
	5'_Oe46	351	5'_RACE	rev_UH24	65	3	34
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH24	61		
C	5'_Oe47	409	5'_RACE	rev_UH24	63	3	74
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH24	57		
	5'_Oe74	409	5'_RACE	rev_UH24	63	3	47
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH24	57		
D	3'_Oe35	988	for_UH24	3'_RACE	60	3	48
			for_nested_UH24	3'_nested_RACE	61		
	3'_Oe48	955	for_UH24	3'_RACE	60	3	35
			for_nested_UH24	3'_nested_RACE	61		

Anhang

E	5'/3'_Oe81	1598	5'_Oe	3'_Oe	54	4	98
F	5'/3'_Oe98	1596	5'_Oe	3'_Oe	54	4	81
G	ORF_Oe92	1242	Nterm_Oe	Cterm_Oe	52	4	95, 96
	ORF_Oe95	1243	Nterm_Oe	Cterm_Oe	52	4	92, 96
H	ORF_Oe96	1243	Nterm_Oe	Cterm_Oe	52	4	92, 95

Tab. 17: Sequenzübersicht *S. nudus*

Die Zusammenstellung umfaßt alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten OpDH-Fragmente aus *S. nudus* (Int = interner Sequenzabschnitt, 5' = 5'-Terminus, 3' = 3'-Terminus, 5'/3' = OpDH-codierende mRNA einschließlich 5'- und 3'-terminaler untranslatierter Regionen, ORF = offenes Leseraster). Neben der Fragmentgröße (inklusive Primern) [bp] und den zur Amplifikation verwendeten PCR-Primern ist jeweils die gewählte Primeranlagerungstemperatur (T_A [°C]) angegeben. Sofern verschachtelte (nested) PCRs durchgeführt wurden, sind die Primerpaare und zugehörigen Annealingtemperaturen der Erst- und Zweit-PCR aufgelistet. Der Tierspalte kann entnommen werden, welche Sequenzen ausgehend von DNA oder RNA des gleichen Wattwurms erhalten wurden. Sequenzen unterschiedlicher Gruppen (A bis G) sind unabhängig in dem Sinne, daß sie aus separaten PCRs hervorgingen. Die Ziffern in der letzten Spalte verweisen auf gleichartige Sequenzen.

	Fragment	[bp]	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	T_A [°C]	Tier	äquivalent
A	Int_Sp25	418	Ari03_for	Ari03_rev	55	1	
B	5'_Sp49	165	5'_RACE	rev_UH25	62	2	66
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH25	63		
	5'_Sp66	163	5'_RACE	rev_UH25	62	2	49
			5'_nested_RACE	rev_nested_UH25	63		
C	3'_Sp38	2761	for_UH25	3'_RACE	69	2	
			for_nested_UH25	3'_nested_RACE	62		
	3'_Sp39	1799	for_UH25	3'_RACE	69	2	53
			for_nested_UH25	3'_nested_RACE	62		
	3'_Sp53	1799	for_UH25	3'_RACE	69	2	39
			for_nested_UH25	3'_nested_RACE	62		
D	5'/3'_Sp82	2026	5'_Sp_neu	3'_Sp53	58	2	99
	ORF_Sp108	1222	Nterm_Sp	Cterm_Sp	50	2	93, 97
E	5'/3'_Sp99	2026	5'_Sp_neu	3'_Sp53	58	2	82
F	ORF_Sp93	1222	Nterm_Sp	Cterm_Sp	50	2	97, 108
G	ORF_Sp97	1222	Nterm_Sp	Cterm_Sp	50	3	93, 108

ACGAAGGCCA	TGGCGGACAA	CGACTTCATA	GTGACCGTGC	AAAGCAAGGG	CAAGGCCACC	60
T K A M	A D N	D F I	V T V Q	S K G	K A T	20
GTGGAACTCA	AGGCCAAGCC	CACTGCCGTT	AGCAAGAAGG	CCGCTGACGT	CATGTCCGGC	120
V E L K	A K P	T A V	S K K A	A D V	M S G	40
GTGGACATCA	TATTGTTTCAT	GGTGCCGGCC	TTAGCGCACA	CAGGTTACCT	GGAGGAGCTG	180
V D I I	L F M	V P A	L A H T	G Y L	E E L	60
AAGCCCTATA	TCAAGCCCGG	GATAGTGCTG	GCCGGGTGTC	CCGGGCAGGC	GGGCTTCGAG	240
K P Y I	K P G	I V L	A G C P	G Q A	G F E	80
TTCGCCGTCA	GGGGCATCTG	GGGGGATATG	GCCCGCCATG	TGTCGCTGTT	GTC	293
F A V R	G I W	G D M	A R H V	S L L		97

Abb. 28: Partielles Gen einer (möglichen) StrDH aus *A. marina*

Unterhalb der Nukleotidsequenz (AM392361), die mit Hilfe eines von Kimura et al. (2004c) entwickelten Primerpaars zur universellen Amplifikation von Invertebraten-OpDHs erhalten wurde (dargestellte Sequenz ohne Primerbindungsregionen), ist die abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode angegeben. Die Wahl des Leserasters orientierte sich am Vergleich mit anderen tierischen OpDHs, der zugleich zeigte, daß es sich um ein 5'- und 3'-terminal unvollständiges OpDH-Homologes handelt. Obwohl das partielle Gen (Int-Am13) ausgehend von der gleichen Einzeltier-DNA amplifiziert wurde, aus der auch das interne AloDH-Fragment Int-Am16 resultierte (Tab. 14), stimmt es mit diesem bzw. der zugehörigen Wattwurm-AloDH (AJ810167, Abb. 16, S. 77) nur in 58 % der Nukleotide und 47 % der Aminosäuren überein (Angaben bezogen auf den Überlappungsbereich). Das legt die inzwischen auch durch Schäfer (2007) untermauerte Vermutung nahe, daß es für eine der Wattwurm-StrDHs codieren könnte, deren Existenz aufgrund der proteinbiochemischen Befunde der vorliegenden Arbeit postuliert wurde (3.4.2, 4.1.3, 4.1.4.1).

GTTATCTAGC	ACCGGTTCTG	TTTGTGCTGT	GCCCGGCTG	CGTTAGACTT	GTCCTCAAAA	60
	A	G	T			
GAAATTCCTT	TACCATTGAG	TCCGAGAGTG	TATTGCTGAA	ATCAGCGATG	TCTGGAAAAC	120
				M	S G K L	5
TGGTAGTATT	AACTTGTGGG	GGAGGAAATG	GCGCCATTG	TTTGGCTGGA	CTCGCCTCCG	180
V V L	T C G	G G N G	A H C	L A G	L A S V	25
TCAGACCGGA	CATCGAGAGC	CGGGTGCTGA	CAATGTATGC	CGATGAGGCG	GAGAGATGGG	240
R P D	I E S	R V L T	M Y A	D E A	E R W A	45
CAGCTAATTT	GGACTCAGGA	TTTATAATCA	CTGTACACAA	TGATGATGGA	AGCATAAAGT	300
A N L	D S G	F I I T	V H N	D D G	S I K S	65
CAATTTAAAC	CAAACCGTCT	CTGGTGACCA	AAGACCCCAA	AAAGGCCGTA	CCCGGAGTTG	360
I K T	K P S	L V T K	D P K	K A V	P G V D	85
ATTACATCTT	TATTGTTGTC	CCTGCTTTTG	CACATGCAAT	GTATTTTGAA	GCCATTGCTC	420
Y I F	I V V	P A F A	H A M	Y F E	A I A P	105
CGTACATAGA	TGACAACACC	GTTATTGTAG	GACTTCCGGG	CCAGGCTGGA	TTTGAATTTG	480
Y I D	D N T	V I V G	L P G	Q A G	F E F E	125
AATGCGTGAA	CTTACTTGGA	GACAAAGCAA	AGCGTTGTAC	AATGGTCACA	TTTGAATCGC	540
C V N	L L G	D K A K	R C T	M V T	F E S L	145
TTCCTTGGGC	ATGTAGACTT	GTTGAATTTCG	GAAAAAATGT	GGAAATTTTA	GGCTTTAAAG	600
P W A	C R L	V	E F G	K N V	E I L	G F K D
		I				165

ATACTCTGGG	TGCCTCATT	TTGAAAGGTA	AAGAGTGCAA	TTTGACGAAA	CCCATTATTG	660
T L G	A S L	L K G K	E C N	L T K	P I I E	185
AAACAACCCA	ATATATTCTC	GGAGAAAAAC	CGAAAGTTAG	ACACGTTCAA	AATTACATTG	720
T T Q	Y I L	G E K P	K V R	H V Q	N Y I A	205
		C				
CTATAACTCT	CATGGCAAAG	TCCATAGTTC	ATCCTCCAAT	AATGTATGGA	AAATGGTCTC	780
I T L	M A K	S I V H	P P I	M Y G	K W S Q	225
		P				
AATGGGACGG	AAAACCTCTC	TCAGAAAAAC	CACTGTTCTA	CCAAGGACTC	GATGAGAGAC	840
W D G	K P L	S E K P	L F Y	Q G L	D E R Q	245
AGGCAGAGCT	CTTGTCGGGA	GTAAGTGACG	AGTGTGTAGC	AACAGCGAAA	GCTATAGAGA	900
A E L	L S G	V S D E	C V A	T A K	A I E K	265
AGAAGGTCCC	TGGCCTGGAT	ATGTCTGACG	TCATCCATGT	TTTTGACTGG	TATCTGAATT	960
K V P	G L D	M S D V	I H V	F D W	Y L N Y	285
ACTACAGCGA	CCAAATTACA	GACAAAAGCA	ATCTCATGAT	GGCCATGAGA	ACCAACAAAAG	1020
Y S D	Q I T	D K S N	L M M	A M R	T N K A	305
CTTATGACGG	CTTAGTTCAC	CCAATGAAGG	AGATAGAACC	CGGAAAATAT	GTCCCAGACT	1080
Y D G	L V H	P M K E	I E P	G K Y	V P D F	325
TCACATATCG	CTACATGGCA	GAAGACGTTT	CCGAGGGAAT	AGTCCCAATG	AAAGGAATCG	1140
T Y R	Y M A	E D V P	E G I	V P M	K G I A	345
CTGAACTGGC	GGGCGTTTCC	ACGCCATATT	TGGACGAAGT	AATCACTTGG	TGTCAAGGCA	1200
E L A	G V S	T P Y L	D E V	I T W	C Q G K	365
		A			A	
AACTGAACAA	AGAATTCCTG	GTAGGTAACA	AGTTGACGGG	TAAGGACCTG	AAAGACACAC	1260
L N K	E F L	V G N K	L T G	K D L	K D T R	385
GGGCTCCACA	GAAATATGGC	TACAACAAGC	TGGAGGATCT	GTTCACTGGG	AGCTTCGAAG	1320
A P Q	K Y G	Y N K L	E D L	F T G	S F E V	405
TAACTCCACG	ATGATGAGTT	GTTAAAAAGA	AACGTTTGTA	GATCAGTACC	TCAAAAAAAG	1380
T P R	*					408
TAGACAATCT	AATCAGCGTA	ATATTCTTCT	GGAATCTTAA	TTTTCTACAT	GCATATATTT	1440
AAAAATAAAC	TTAAGTTTGA	TATATCTTTT	ACTATAACAA	TATTCCACCC	TCCCTCCCTG	1500
ACGA						1504

Abb. 29: mRNA der Alo/StrDH1 aus *C. gigas*

Unterhalb der Nukleotidsequenz (AJ810713), die ein 1227 bp umfassendes offenes Leseraster umfaßt, ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (CAH18004) im Einbuchstabencode angegeben. * markiert das Stopcodon, die punktierte Linie ein mögliches Polyadenylierungssignal. Die Sequenz wurde ausgehend von unabhängigen PCRs mehrfach verifiziert. Nukleotidpositionen, an denen mindestens zweimal unabhängig ein Basenaustausch nachgewiesen wurde, sind hellgrau unterlegt dargestellt, die entsprechenden Alternativbasen oberhalb der Sequenz aufgeführt. Sofern ein Nukleotidaustausch die Aminosäuresequenz tangiert, ist die betroffene Aminosäure dunkelgrau markiert und darunter die Austauschaminosäure angegeben.

(Da die Eingabemaske des EMBL die Festlegung auf eine einzelne EC-Nummer und eine eindeutige Namensgebung verlangte, wurde die *Crassostrea*-Alo/StrDH1, obwohl sie L-Alanin bei Standardexpressionsexperimenten in *E. coli* nur etwa 1,3-mal effizienter als Glycin umsetzte, im zugehörigen Datenbankeintrag abweichend vom Sprachgebrauch der vorliegenden Arbeit als AloDH1 bezeichnet.)

CTGACAGCGA	GCATAGTGAT	GGATCGTAGT	GCATTTAATA	TTTTATTAA	GTTTTGATAC	60
AATTGCTGAT	TTTTTTTTCA	ATCATAACAA	GTAGTTTTCT	TCCTTCGGCA	AAGATGGATG	120
					M D G	3
GTAATTAGT	AGTGTTAACA	TGTGGAGGAG	GAAATGGCGC	CCATTGTTTG	GCTGGACTCT	180
K L V	V L T	C G G G	N G A	H C L	A G L S	23
CCGCAATGAG	ACCCAAGATC	GAAAGTCGTG	TGCTGACACT	TTATTCTGAC	GAGGCAGAGA	240
A M R	P K I	E S R V	L T L	Y S D	E A E R	43
GGTGGGCAGT	TGAGTTAGAC	TCTGGTTTAC	TTATCACTGT	GCGAAACGAC	GATGGAAGCA	300
W A V	E L D	S G L L	I T V	R N D	D G S K	63
			G			
AAAGCCTCAT	AAAAACCAAA	CCATCAATGG	TAACTAAAGA	CCCCCAAAAA	GCCGTACCTG	360
S L I	K T K	P S M V	T K D	P Q K	A V P G	83
GGGCAATTA	CATCTTCTTT	GTTGTCCTTG	CGTTTGCCCA	TGCACAGTAT	TTGGAAGCCA	420
A N Y	I F F	V V P A	F A H	A Q Y	L E A I	103
TAGCTCCATA	CATAGAAGGC	AACACTGTCA	TTGTTGGACT	ACCTAGTCAT	GCAGGGTTTG	480
A P Y	I E G	N T V I	V G L	P S H	A G F E	223
AGTTTGAATG	CGCGGATCTT	CTTGGAGAAA	AGGCCAATGC	TTGTACAATT	GTTGCGTTTCG	540
F E C	A D L	L G E K	A N A	C T I	V A F E	143
AATCTCTTCC	ATTCGTTTGT	AGACTTATTG	AATTTGGAAA	AAATGTAGAA	ATCTTGGGCT	600
S L P	F V C	R L I E	F G K	N V E	I L G F	163
TTAAGGATAC	GCTGGGTGCA	TCAACGTTGA	AAGGTAAACG	GTGCAATGTG	ACGCAATCTG	660
K D T	L G A	S T L K	G K R	C N V	T Q S V	183
TTTTAGAATT	ACCGCAGTAC	ATTTTTGGAG	ATAGACCAAA	AGTACGAAGA	GTTCAAAACT	720
L E L	P Q Y	I F G D	R P K	V R R	V Q N Y	203
ATATTACTAC	CATTCTGATG	GCTAAATTCA	TAGTTCATCC	TTCTTTAATG	TATGGAAAAT	780
I T T	I L M	A K F I	V H P	S L M	Y G K W	223
GGTCTCAATG	GGACGGAAGA	CCCCTCTCCG	AAAAACCACT	GTTTTACCAA	GGAATCGATA	840
S Q W	D G R	P L S E	K P L	F Y Q	G I D K	243
AGAGGCAGGC	AGAGCTCTTG	TCCGGAGTTA	GCGACGAGTG	TGTAGCAACA	GCAAAGCTA	900
R Q A	E L L	S G V S	D E C	V A T	A K A I	263
				C		
TAGAGAAGAT	GGTACCTGGC	CTCGATATGT	CTGATGTCAT	TCATGTCCTT	GACTGGTATC	960
E K M	V P G	L D M S	D V I	H V F	D W Y L	283
		T				
TGAATTACTA	CGGTGAACAA	ATATCCGACA	AAAGCAATCT	CATGACGGCC	ATGAGAACCA	1020
N Y Y	G Q	I S D K	S N L	M T A	M R T N	303
	D					
ACAAAGCTTA	TGACGGCTTA	GATCAACCCA	TGAAGGAGAT	AGAACCAGGA	AAATATGTTC	1080
K A Y	D G L	D Q P M	K E I	E P G	K Y V P	323
CAGATTTTAC	GTATCGCTAC	TTAAGTGAGG	ATGTCCTTAT	GGGAATAGTC	CCAATGAAAG	1140
D F T	Y R Y	L S E D	V P M	G I V	P M K G	343
			A A	T		
GAATCGCTGA	ATTGGCGGGC	GTTTCCACGC	CTTTTTTAGA	CGAGGTGATC	ACGTGGTGTC	1200
I A E	L A G	V S T P	F L D	E V I	T W C Q	363
			Y	L		

AGAGCAAATT	AAACAAAGAA	TTCCTTGTGG	GTAACAAACT	GACGGGCAAG	GACTTGA ^A AAAG	1260
S K L	N K E	F L V G	N K L	T G K	D L K D	383
G						
ACACAAGGTC	TCCACAGAAG	TACGGCTACA	ATAAGCTGGA	GGATCTGTTC	AGTGGAAACT	1320
T R S	P Q K	Y G Y N	K L E	D L F	S G N L	403
A						
TGAATTCATT	CCGGTATTGA	GTTTATGTCTG	ACTAAATTGT	ATCAAAGATC	AGCGTTTTTAC	1380
N S F	R Y *					408
GATTGAAATA	TTTATTGCAA	ACATTTTGT	TTGTCAAAAA	GAATAAAAAGT	ACATGTGATA	1440
TGAAAACAAT	TTGACTATAC	AAATAAGAAA	TTATGACTAT	TTGTATTTAC	AAACGACAAC	1500
TTGTGAATAA	TGTACTTAAT	TTATAAGGTA	TAGTACATGT	ATTTAAGATT	TTTGTATCCC	1560
TGATATAAAC	TGAATTTCCG	CTAACCACGG	ATTTACGATC	CCATCCTCTG	CCCCACAGCG	1620
GTTGTGTGAG	AGGAGAGGAG	GAAATCATAA	ACCCTTGGCG	AACAAAGATG	TATAAACAGA	1680
GGCTCTTTCA	TATTCCTGGT	ACCACAACCT	TTATTTTCATC	CTCTAGCACT	CCATTTATTA	1740
CACCTTTCCG	GAACATCTGT	GTACTTTGAA	TTTGCAATAC	CTTTTATATT	TCCCGATTAA	1800
AGGGAATGCT	ATGAGAAAGG	TTGAGAGAAT	GGACGTAAAA	AAACCCAGAT	ATAGAATGTG	1860
ATTCAGATTT	GACATTTTCT	ATCTAATAGT	ATCTTAATTT	TTACGTTGTT	TTGGTTTTTTC	1920
ATATGACAGG	GAGATCCCGC	TGCCATTGTT	GTAGACTA			1958

Abb. 30: mRNA der ALoDH2 aus *C. gigas*

Unterhalb der Nukleotidsequenz (AJ879695), die ein 1227 bp umfassendes offenes Leseraster umfaßt, ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (CAI52505) im Einbuchstabencode angegeben. * markiert das Stopcodon, die punktierten Linien kennzeichnen mögliche Polyadenylierungssignale. Die Sequenz wurde ausgehend von unabhängigen PCRs mehrfach verifiziert. Nukleotidpositionen, an denen mindestens zweimal unabhängig ein Basenaustausch nachgewiesen wurde, sind hellgrau unterlegt, die entsprechenden Alternativbasen oberhalb der Sequenz aufgeführt. Sofern ein Nukleotidaustausch die Aminosäuresequenz tangiert, ist die betroffene Aminosäure dunkelgrau markiert und darunter die Austauschaminosäure angegeben.

>GCTTGGCAGG	GCTTGCCTCC	TTAAAATCCA	ACATAGAAAG	TCGAGTACTG	ACTCTATATT	60
L A G	L A S	L K S N	I E S	R V L	T L Y S	20
CTGATGAAGC	AGAGAGATGG	ACAGCGAAAT	TGGAATCGGG	TTTACTTATC	ACTGTCCGAA	120
D E A	E R W	T A K L	E S G	L L I	T V R N	40
ACGACGACGG	TAGCGAAAGT	CTTATACAAA	CCAAACCATC	AATGGTAACC	AAAGATCCAA	180
D D G	S E S	L I Q T	K P S	M V T	K D P K	60
AAGAGGCTGT	ATCCGGGGCT	CACTACATCT	TTATTGTCGT	CCCTGCCTTT	GCACATACCA	240
E A V	S G A	H Y I F	I V V	P A F	A H T S	80
GCTATCTTGA	TGCTATAAAT	CCTTACATGG	GAAAAAACAC	CGTCATCGTT	GGACTTCCAG	300
Y L D	A I N	P Y M G	K N T	V I V	G L P G	100
GCCAGGCAGG	ATTTGAATTT	GAATGCGTTG	ACTTACTTGG	AGACAAGGCC	AAGCACTGTA	360
Q A G	F E F	E C V D	L L G	D K A	K H C T	120

CAATTGTCAC	GTTCGAATCT	CTTCCTTGGG	CATGTAGACT	TATTGAGTTT	GGAAAAAATG	420
I V T F E S L P W A C R L I E F G K N V						140
TGGAGATTTT	AGGGATCAAA	GATACTTGTG	GTGCATCAGT	ATTGAAAGGT	GAGCAATGCT	480
E I L G I K D T L G A S V L K G E Q C F						160
TTGAGACCAG	ACCAATTTTA	GATCTTTCTC	AGTATATATT	CGGAGACAAA	CCAAAATTGA	540
E T R P I L D L S Q Y I F G D K P K L R						180
GATGCGTTCA	AAACTACATT	GCAATTACTT	TGATGGCAGA	TTCTACTGTC	CATCCTCCAA	600
C V Q N Y I A I T L M A D S T V H P P I						200
TAATGTACGG	AAAGTGGTCT	CAATGGAACG	GAATACCCT	CTCGGAAAAA	CCACTGTTTT	660
M Y G K W S Q W N G I P L S E K P L F Y						220
ATCAAGGAAT	CGACGAGAGA	CAGGCAGAGC	TCTTGTCCGG	AGTGAGCGAT	GAATGTTTGG	720
Q G I D E R Q A E L L S G V S D E C L A						240
CAACAGCAAA	AGCTATAAAG	AAGAAGGTCC	CGGGCCTCGA	TATGTCTGAC	GTTATCCACG	780
T A K A I K K K V P G L D M S D V I H V						260
TCTTTGACTG	GTATCTGAAA	CACTACAACA	GTCACATAAC	CAACAAAAGC	AATCTCATGA	840
F D W Y L K H Y N S H I T N K S N L M M						280
TGGCCATGAA	AACCAACAAA	GCTTATGACG	GCTTAGTTCA	CCCTATGAAG	GCAGTAGAAC	900
A M K T N K A Y D G L V H P M K A V E P						300
CCGAAAATA	TGTTCCAGAC	TTCACGTATC	GGTACATTCG	TGAGGATGTC	TCTATGGGAA	960
G K Y V P D F T Y R Y I R E D V S M G I						320
TAGTTCCAAT	AAAAGGAATC	GCTGAATTGG	CGGGCATTTC	CACACCATAT	TTGGACGAAG	1020
V P I K G I A E L A G I S T P Y L D E V						340
TAATCACATG	GTGTCAAGGC	AAACTGAACA	AAGAATTCCT	GGTAGGTAAC	AAGTTGACGG	1080
I T W C Q G K L N K E F L V G N K L T G						360
GTAAGGACCT	GAAAGACACA	AGGGCTCCAC	AGAAATACGG	CTACAACAAG	CTGGAGGATC	1140
K D L K D T R A P Q K Y G Y N K L E D L						380
TTTTCACTGG	GAACTATTCC	ATTTAGAACC	AGAGAATGCT	AATATTTTAA	CAAACCTTTTT	1200
F T G N Y S I *						387
AAGGAATCCC	ATATAATTAT	ATATCTTCAT	AGGAATTGGT	TTTGCATAAG	TGTATAAATT	1260
GTATTCAGTG	TACCTGTTTT	TGATTTAGTA	ATCAACGAGT	TCATGTGACT	TTTTCAAATG	1320
CCCGAACTA	ACAGTTTTCA	ACGAAACCAA	TGTACGAAAA	CAAAGCTGGA	TGCTGCATTT	1380
ATTCACCTGA	GCTATCGAAA	TATAGAAAGT	ATATTGTCAT	AATGTTTATT	GTTTTAGTTG	1440
TTAGTTATAG	AAATAGTGGA	TATCGAGGGT	TTTTGTTTGT	TGTTGTTTGT	TTTTTTTTTTG	1500
T TTTTTTTT TT TG GG G G IG						
GGGGGGGGG	GGTTATGTTT	TGTTGTTTTT	TTTTACAATT	GTACATCTTG	TTAGAGAAAT	1560
TGAAACTGA	TTTTATAATG	TAATTAGTAC	TATTTTTGAG	GCAAATTCGA	TTAAAAATAT	1620
TTTTAAAATT	GTGTTGATTA	AAAAATAAAT	TTAAATTATT	GAATTCAGTT	CATGTTTTTA	1680
AACAAAAGA	TTATCTCGGA	TTTTTTTAAAC	TGAATGAAAT	TTATGAATAA	AGACGTGGGT	1740

```

-----      G      G
TTTAAAATGT GTACTAGTAT ATCAAATGAA TATTATTTCT ACGGCAAATT ACAATCTTTGC 1800
TTGTAAGCTT GGTTC AATC CAGAAACAAC CTTGAGTGAA CAGTC 1845

```

Abb. 31: Partielle mRNA der Alo/StrDH3 aus *C. gigas*

Unterhalb der Nukleotidsequenz (AM392360), die neben einem am 5'-Ende unvollständigen offenen Leseraster auch einen 3'-untranslatierten Bereich umfaßt, ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (CAL35825) im Einbuchstabencode angegeben. Vergleiche mit den beiden anderen Alo/StrDHs aus *C. gigas* (Abb. 29 und Abb. 30) lassen vermuten, daß N-terminal etwa 18 Aminosäuren fehlen. * markiert das Stopcodon, die punktierten Linien kennzeichnen mögliche Polyadenylierungssignale. Nukleotidpositionen, an denen mindestens zweimal unabhängig ein Basenaustausch, Deletionen oder Insertionen nachgewiesen wurden, sind hellgrau unterlegt, die entsprechenden Alternativbasen oberhalb der Sequenz aufgeführt, Deletionen durch Auslassungsstriche veranschaulicht. Sofern eine Nukleotidsubstitution die Aminosäuresequenz tangiert, ist die betroffene Aminosäure dunkelgrau markiert und darunter die Austauschaminosäure angegeben. Der Basenaustausch in Position 666 (G666T) führt zu einer Unterbrechung des offenen Leserasters.

(Da die Eingabemaske des EMBL die Festlegung auf eine einzelne EC-Nummer und eine eindeutige Namensgebung verlangte, wurde die partielle *Crassostrea*-Alo/StrDH3 im zugehörigen Datenbankeintrag willkürlich als mögliche StrDH bezeichnet.)

```

AACCACCGTC CCTCGGCCAA AACACCAAGA AGGCATCGCA TACTCTGCAG ATTGCATTGT 60
AATATCCACA GGTTCCTTAC TTGTACCTAT AGAGTTTCTC CAAGGTGCGA TACTCCTACG 120
ATGGGAACTG AGGATAGGAC CAAAGTTTTG ATTTGCGGTG GAGGAAACGG TGCCCACTGT 180
M G T E D R T K V L I C G G G N G A H C 20
TTGGCGGGAT TATCAGCAAG TAATCCTGAA AATGAAACAC ATGTTCTTAC TTTATTCCGC 240
L A G L S A S N P E N E T H V L T L F A 40
GATGAGGCAG AGCGGTGGAC CAAAGTACTC CAATCCAACG ATTTGACAGT TACCATAGTG 300
D E A E R W T K V L Q S N D L T V T I V 60
AAAAATGACG GAGGGTCTGA GGAAATAAAA TCCAAACCAA CTTTGATTAC AAAGAACCCTCA 360
K N D G G S E E I K S K P T L I T K N P 80
AAAGAAGCGG TCACAGGTGC TGAAATCATA TTTTGTGATTG TTCCTGCGTT TGCGCACGAA 420
K E A V T G A E I I F L I V P A F A H E 100
CAGTATTTTA GAGAGATTTC ACCTTTTATT GGTGACAATA CCTTAATTGT TGGTCTTCCA 480
Q Y F R E I S P F I G D N T L I V G L P 120
GGCCAGGCAG GATTTGAATT TCAGTGCTTG CACATGCTTG GAGAAAAGGC TAAACACTGC 540
G Q A G F E F Q C L H M L G E K A K H C 140
ACTATAATGT CGACGGAATC CCTTCCGTGG GCATGCAGGA TTCTGGAATT TGGTCGTCTT 600
T I M S T E S L P W A C R I L E F G R L 160
GTTCAAATTC TGGGCTTCAA AGAAACACTT GGTGCTTCTA AACTTCAAGG AAGCATATCG 660
V Q I L G F K E T L G A S K L Q G S I S 180
AATCTGAAGC AATCTCCATT TGAGAGCGTT CAGAAAGTTT TAGGTCCCAA ACCAGTTTTG 720
N L K Q S P F E S V Q K V L G P K P V L 200
AGAGAAATTC AAAACTACAT TGCTGTAAAT CTGATGGCAA AATCAATCAT CCACCCACCG 780
R E I Q N Y I A V N L M A K S I I H P P 220

```

CTGATGTATG	^G GAAAATGGTC	^{AA} GGCATTTAAT	^T GAAGCGGCTC	CTTTGAAAGA	GAAGCCGCTG	840
L M Y G	K W S	^A F N	E A A P	L K E	K P L	240
TTTTACCAAG	GGGTAGACGA	^T AAAGCAGGCA	AGTCTGCTGT	CTAGCGTGAG	^C TAATGAATGT	900
F Y Q G	V D E	K Q A	S L L S	S V S	N E C	260
ATCGCCATTG	GAAAGGCAAT	TGAAAAACAA	ATTCCTGGAA	TTGACATGTC	GGAAGTTATT	960
I A I G	K A I	E K Q	I P G I	D M S	E V I	280
CATATATTAG	ACTGGTTCCT	CACTTACTAT	GCGGACCAGA	TTACTGACAA	GTCAAATCTG	1020
H I L D	W F L	T Y Y	A D Q I	T D K	S N L	300
ATGACAACCA	TGCAAACAAA	CAAAGCGTAC	GACGGTTTGC	TCCACCCCAT	GAAACAGGTG	1080
M T T M	Q T N	K A Y	D G L L	H P M	K Q V	320
^C GATGGTGGTC	AGTTTGTACC	GGACTTTAGC	TACAGGTACA	^T CGGCCGAGGA	CGTACCGTTC	1140
D G G Q	F V P	D F S	Y R Y T	A E D	V P F	340
GGGCTCGTCG	TTCTGAAAGG	GATCGGTCAG	CTGGCTGGAG	TGGACACACC	TGTGATGGAC	1200
G L V V	L K G	I G Q	L A G V	D T P	V M D	360
GAAATCATCA	CCTGGGCTCA	GGGCAAACCTC	AACCAGGAGT	ACCTTGTAGG	ATCAGAATTG	1260
E I I T	W A Q	G K L	N Q E Y	L V G	S E L	380
TCTGGAAAAG	ATTTGCCAAA	GACCAGGGCT	CCGCAGAGAT	TTGGATTTAA	AACTCTGCAG	1320
S G K D	L P K	T R A	P Q R F	G F K	T L Q	400
CAGTTGTTTCG	ACGTTTAAAT	AAGCAGACAT	TTCATAACAT	AGTTAGTAAT	ATGGGTATGT	1380
Q L F D	V *					405
AATACTTTGT	TAAATATCAG	^G TGTTAGTCTCCT	GTTCCACAGA	AGCTCTAGTT	TATCTCGATC	1440
^A AAGACTATGT	GGTATACTAG	TACACCAGTC	TTAATTGTAT	TCTCACATAT	TGATAAGAAT	1500
GTAACATGTA	GATCGTGTA	TATATTGCAG	ATCGTTAATA	^{.....} AAAATCATT	ATTTTCATTC	1560
ATGATGTTAA	ATACAATATC	AGCGCTTCCT	TTAACTGT			1598

Abb. 32: mRNA einer StrDH aus *O. edulis*

Unterhalb der Nukleotidsequenz (AJ810168), die ein 1218 bp umfassendes offenes Leseraster umfaßt, ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (CAH17651) im Einbuchstabencode angegeben. * markiert das Stop-codon, die punktierte Linie ein mögliches Polyadenylierungssignal. Die Sequenz wurde ausgehend von unabhängigen PCRs mehrfach verifiziert. Nukleotidpositionen, an denen mindestens zweimal unabhängig ein Basenaustausch nachgewiesen wurde, sind hellgrau unterlegt, die entsprechenden Alternativbasen oberhalb der Sequenz aufgeführt. Sofern ein Nukleotidaustausch die Aminosäuresequenz tangiert, ist die betroffene Aminosäure dunkelgrau markiert und darunter die Austauschaminosäure angegeben.

Anhang

CAGCAACGAA	GCTCCTGTTG	GCTCAGCTGG	TGCTGAAATC	ATTTTACAGT	TTGAAATATG	60
					M	1
GTGGTCGCTC	TTATATGCGG	AGGCGGAAAT	GGCGCCACG	TCATGGCGGG	AACTGCCGCC	120
V V A L	I C G	G G N	G A H V	M A G	T A A	21
	A					
TCATACCCGG	GTCAGGAGGT	ACGTGTGATG	ACTTTGTTTG	CGGACGAAGC	GGAGAGATGG	180
S Y P G	Q E V	R V M	T L F A	D E A	E R W	41
	D		C			
AGTAACGCAT	TGAAGGACCA	CGACTATAAC	ATCACGTTCT	ACTCTGGCGG	CAAAGAATCC	240
S N A L	K D H	D Y N	I T F Y	S G G	K E S	61
		T				
CACAGATGCA	CAAATAAACC	CAAAATGGTG	ACTAAAAACC	CGGCAGAGGC	AGTGCCCGGA	300
H R C T	N K P	K M V	T K N P	A E A	V P G	81
TGTGACATCA	TTGCGTTCGT	TGTTCCAGCT	TTTGCGCATA	GGCAATATTT	TGAAGCTATA	360
C D I I	A F V	V P A	F A H R	Q Y F	E A I	101
GAGCCTTATA	TTAAGCCAGG	AGTCGTGATT	GTTGGACTGC	CGGGACAACC	TGGATTTGAA	420
E P Y I	K P G	V V I	V G L P	G Q P	G F E	121
TTCGCTGTTA	GAGGTATTCT	CGGAGAAAAA	GCTAAGCAAT	GCACAATACT	GTCTTATGAA	480
F A V R	G I L	G E K	A K Q C	T I L	S Y E	141
	T					
TCGTTGCCAT	GGGCCTGCCG	CATAATAGAA	TTTGGACGTA	CAGCTGAAGT	TCTCGGAGTA	540
S L P W	A C R	I I E	F G R T	A E V	L G V	161
				T		
AAAAAACATA	TGATAGGTGC	CATGCAGTTA	GGTCATCCTC	AGCCGCCCAC	GGATGCAAAC	600
K K H M	I G A	M Q L	G H P Q	P P T	D A N	181
GTCATGGCAC	AAAATCTGCT	CGGGGAATTC	CCAAAATTGG	AGACACGTGG	TCACCTGGTT	660
V M A Q	N L L	G E F	P K L E	T R G	H L V	201
GCCATGACAT	TGATGGCCAC	GAACGCCATC	ATTCATCCAT	CTATTTTGTG	GGCAAAATGG	720
A M T L	M A T	N A I	I H P S	I L W	A K W	221
CACGAAAACG	ACGAACCGGT	AGCCAGCCAG	CCGTTATTTT	ACCAGGGTGC	CGACGACCTT	780
H E N D	E P V	A S Q	P L F Y	Q G A	D D L	241
GCCGCCGCGA	CGCTGTCAGG	TTTAAGCGAT	GACGTCATCG	CCATCGCCAA	GGGCATTAAG	840
A A A T	L S G	L S D	D V I A	I A K	G I K	261
			A			
GCCAAGCGAC	CCGACGCCGA	CATGTGACAG	GTTGTTTACA	TATGCGACTG	GTACAAGCGA	900
A K R P	D A D	M S T	V V H I	C D W	Y K R	281
					T	
GTGTACAAAG	GGGACATCGG	TGATGAAACA	AACCTCACGA	CAATACTACA	AACCAACAAC	960
V Y K G	D I G	D E T	N L T T	I L Q	T N N	301
			C			
GGATACAAGG	GTCTAAAACA	CCCGATGGAG	CCGGCTGGGG	ACGGACTCTT	TAAGGTAAAT	1020
G Y K G	L K H	P M E	P A G D	G L F	K V N	321
			A			
TATAATTACC	GTTACCTGAC	TGAAGATATA	CCGTACGGCT	TGGCGGTAAT	CCGAGGCATC	1080
Y N Y R	Y L T	E D I	P Y G L	A V I	R G I	341
		C		T		
GGTGAAGTGG	TGGGGTTAA	TACGCCTACC	ATTGACAAGG	TGATCACGTG	GTGCCAAGAC	1140
G E L V	G V N	T P T	I D K V	I T W	C Q D	361
					A	
AAGATGGGAA	GAGAATTCCT	GAAGGATGGA	AAGTTTGTAG	GAAAGGATTT	AGAGAAAGCA	1200
K M G R	E F L	K D G	K F V G	K D L	E K A	381

CGCTGCCAC	AACACTATGG	TTTGCATTCA	CTTGATGAAA	TAATAGGTGA	CTAAAGTACA	1260
R C P Q	H Y G	L H S	L D E I	I G D	*	398
TTGTACAAAC	CTTTCTGACA	ATATATAGTT	TCAGTACATC	ATAAGTGACA	AAAATACATA	1320
AACCATATGG	AGCATATATT	CAAGCAATTC	ACTCTTGCAT	CTAGATAACA	TCTATGGAAC	1380
ATTTTAAGAT	TTGTAGAAGA	AATCATTAA	GTTTATTTCA	TATCTTTAAC	GACTTAAGGG	1440
GATTTTTTAA	GGTAGAATTA	ATAGGTGCGA	AGATTAATTT	GGTAATGTCA	GAATATAGCC	1500
CTGGGATTCA	TGTCTTCAGC	TCAGTAGCTA	AAGGTTTTGA	CTTCACTCAC	AAATGCAAGT	1560
ACTTGCAATA	ATCGAATTTA	TCAAGGTTAA	GGTCTCCTTA	ACCCCAAGG	CAAATGCTTG	1620
CCTTTTGAGT	GATGCCCTTT	GATTTCAGAGA	GCGACCAAGT	CGTCTATTTT	ATGAGGTCAC	1680
GGACTGACAC	CTTTAGCCAT	GATTTACCGG	TACAAACACT	ACCCACCCGT	TAACTTTAGT	1740
AGCCTCGATT	ATCTTAACAT	GGATTGTCCT	TATATTAATT	TATCCGTATT	TCAATTCAGG	1800
ATATTTTATA	TTTCATTAAA	GTGTCTTTCA	TTCGAAAAAT	TTTCTTTTTT	CTGCGAACAT	1860
ATCGTCTGGA	GTGTTTGGAC	AATTGAGGCA	GTAATGTACA	TTGAAATCGC	GATAATGAAT	1920
ATTTACTGTG	ATACATTAAC	TGTTTATCAG	CGCCCCCTAA	TGTTTACTTC	CTGGGAGATG	1980
TACACCATT	AAAATTCGGT	GTATGAATGG	TAGTATTATG	CTGCCG		2026

Abb. 33: mRNA einer Alo/StrDH aus *S. nudus*

Unterhalb der Nukleotidsequenz (AJ810166), die ein 1197 bp umfassendes offenes Leseraster umfaßt, ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (CAH17649) im Einbuchstabencode angegeben. * markiert das Stop-codon, die punktierte Linie ein mögliches Polyadenylierungssignal. Die Sequenz wurde ausgehend von unabhängigen PCRs mehrfach verifiziert. Nukleotidpositionen, an denen mindestens zweimal unabhängig ein Basenaustausch gefunden wurde, sind hellgrau unterlegt dargestellt, die entsprechenden Alternativbasen oberhalb der Sequenz aufgeführt. Sofern ein Nukleotidaustausch die Aminosäuresequenz tangiert, ist die betroffene Aminosäure dunkelgrau markiert und darunter die Austauschaminosäure angegeben.

(Da die Eingabemaske des EMBL die Festlegung auf eine einzelne EC-Nummer und eine eindeutige Namensgebung verlangte, wurde die Spritzwurm-Alo/StrDH, obwohl sie Glycin bei Expressionsexperimenten in *E. coli* nur etwa 1,2-mal effizienter als L-Alanin umsetzte, im zugehörigen Datenbankeintrag abweichend vom Sprachgebrauch der vorliegenden Arbeit als StrDH bezeichnet.)

9 Danksagung

Während meiner Doktorarbeit standen mir zahlreiche Personen hilfreich zur Seite. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle danken.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Grieshaber, danke ich dafür, daß er mir als Staatsexamenskandidatin die Möglichkeit zur Promotion eingeräumt, meine Arbeit über viele Jahre unterstützt und mir zugleich viele Freiheiten gewährt hat. Seine Anregungen und sein Interesse an meinen Ergebnissen waren mir sehr wichtig. Herrn Professor Groth gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferats.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Zoophysiologie sei für die langjährige gute Zusammenarbeit, die Hilfe bei diversen größeren Wattwurm- und Austern-Präparationen sowie intensive fachliche Diskussionen gedankt. Vor allem an unsere gemeinsamen Exkursionen und die kulinarischen Höhepunkte unseres Institutslebens werde ich immer gern zurückdenken. Herrn Professor Bridges als stellvertretendem Institutsleiter danke ich für viele interessante Gespräche etwa über den Sinn und Unsinn des Unialltags, das gute Zusammenwirken in diversen Praktika und das Korrekturlesen der „Summary“.

Mein Dank richtet sich auch an unsere ehemaligen und gegenwärtigen technischen Angestellten Katja Laskowski, Silke Jakob und vor allem Barbara Bartosinska. Letztere hat mir speziell in der Endphase meiner Laborzeit mit großem Engagement zur Seite gestanden, unzählige Polyacrylamidgele gegossen, Enzymaktivitäten bestimmt, Proteinmessungen durchgeführt und es (fast) immer geschafft, im Dschungel der vielen Proben den Überblick zu behalten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die mehrjährige Förderung als Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“ und dessen ehemaligen Kollegiaten und Professoren für die vielen schönen Stunden insbesondere während der regelmäßigen gemeinsamen Wochenendseminare gedankt. Ich habe die durch das Graduiertenkolleg geknüpften instituts- und fächerübergreifenden Kontakte sehr zu schätzen gelernt und in akuten „Notlagen“ wie bei plötzlichem Zentrifugenversagen inmitten einer großen Proteinreinigung, aber auch bei sonstigen technischen oder fachlichen Schwierigkeiten von der Hilfsbereitschaft der „Grakos“ (sowie anderer Kollegen aus den umliegenden Instituten) profitiert.

Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Dr. Karsten Knorr aus dem ehemaligen Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Herrn Professor Wulff. Karsten leistete, als ich im

Rahmen meiner Arbeit vor dem Problem einer chemischen Alanopin- und Strombinsynthese stand, wertvolle Starthilfe für eine „verzweifelte“ Biologin, deren letztes Chemiepraktikum bereits etwas länger zurücklag. Zu danken habe ich außerdem Herrn Professor Bott aus dem Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich und seinem früheren Mitarbeiter Dr. Steffen Schaffer, der die MALDI-MS-Messungen der vorliegenden Dissertation durchführte.

Frau Dipl.-Ing. Schedding aus dem Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Münster danke ich dafür, daß sie sich trotz akuter Arbeitsüberlastung die Zeit genommen hat, mir den Aufbau für die N-terminale Proteinsequenzierung nach Edman zu zeigen. Dr. Markus Piotrowski vom Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum und Frau Dr. Metzger aus dem Biomedizinischen Zentrum der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf gilt mein Dank für die massenspektrometrischen Peptidsequenzierungen und hilfreiche Erklärungen zu dieser Methodik.

Den Kontakt nicht nur zu Dr. Markus Piotrowski, sondern auch zu Diplom-Biologen Christian Eßer verdanke ich Herrn Professor Martin aus dem Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie der Heinrich-Heine-Universität. Christian und Dr. Gabriel Gelius-Dietrich sei für das bereitwillige Beantworten diverser Fragen rund um phylogenetische Analysen und Neighbor-Netze gedankt. Letzterer ermöglichte mir den Zugriff auf seinen Linuxrechner mit dem Distanzberechnungsprogramm LDDist und leistete wertvolle Hilfestellungen bei diversen damit verbundenen Problemen. Dafür ein besonders herzliches Dankeschön! Ein solches richtet sich auch an Jens Dopke, der mir telefonisch die notwendige Starthilfe zur Verwendung des Perl-Skripts trans-Align verschaffte.

Frau Winkelmann von der niederländischen Firma „Zeeashandel Arenicola“ danke ich für ihrer Bereitschaft, Wattwürmer auch in kleineren Stückzahlen von wenigen Hundert an mich zu verkaufen und mir durch „konspirative“ Treffen an der Fähranlegestelle in Den Helder in der Regel das Übersetzen nach Texel zu ersparen. Mein Dank für zahlreiche Tierbeschaffungsfahrten nach Holland geht zudem an den Fahrer der Heinrich-Heine-Universität, Herrn Mittler. Waldemar Seidel und den übrigen Mitarbeitern der biologischen Zentralwerkstatt sei für das schnelle und unbürokratische Reparieren defekter Geräte, das Anfertigen etwa des tollen Gelschneidegeräts und das Aushelfen mit Werkzeugen verschiedenster Art gedankt. Mirjam Janßen, meiner Schwester Ute und Thomas Hankammer bin ich dankbar für das Korrekturlesen von Teilen der vorliegenden Arbeit.

Alexandra, Marion und Meike, der „kulinarischen Truppe“ und allen anderen Freunden danke ich für schöne Nachmittage oder Abende, geduldiges Zuhören und dafür, daß sie in den

Jahren meiner Doktorarbeit so manchen Frust aufgefangen haben. Es ist gut, zu wissen, daß man Freunde hat, die da sind, wenn man sie braucht. Dasselbe gilt auch und ganz besonders für meine Familie, an die sich mein letzter und größter Dank richtet. Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester einschließlich Sven dafür, daß sie meinen bisweilen ungebremsten Redeschwall auch dann aufmerksam haben über sich ergehen lassen, wenn er in fachliche Details abzurutschen drohte oder vom Ärger über die Widrigkeiten des Doktorandenalltags geprägt war. Sie haben immer ein offenes Ohr für all meine Sorgen und Probleme gehabt, bedingungslos hinter mir gestanden und uneingeschränkt darauf vertraut, daß ich die vorliegende Arbeit erfolgreich zu Ende führen würde. DANKE!