




Ulrike Hergert (Autor)
**Erkenntnisse zur Evolution von Invertebraten-
Opindehydrogenasen**

Ulrike Hergert

**Erkenntnisse zur Evolution von
Invertebraten-Opindehydrogenasen**

Reinigung, Sequenzierung und heterologe Expression ausgewählter
Alanopin- und Strombindehydrogenasen



 Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1578>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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