



Andre Müller (Autor)

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

Andre Müller

**Die Octopindehydrogenase
der Pilgermuschel *Pecten maximus*:**

**Neue Einblicke in die Struktur
und den Reaktionsmechanismus**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1896>

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

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

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

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

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.6.3 | 2D-Spektren von ¹⁵ N-markierter ODH..... | 89 |
| 3.6.4 | Reinigung dreifach-isotopen-markierter ODH..... | 91 |
| 3.6.5 | Versuche zur Denaturierung/Renaturierung der ODH..... | 93 |
| 3.6.6 | Titrationsexperimente..... | 95 |
| 3.7 | GERICHTETE MUTAGENESE UND CHARAKTERISIERUNG DER ODH-MUTANTEN..... | 99 |
| 3.7.1 | Herstellung der Mutanten..... | 100 |
| 3.7.2 | Expression und Reinigung der Mutanten..... | 100 |
| 3.7.3 | Auswahl der Aminosäurereste für die Mutagenese..... | 104 |
| 3.7.4 | Bedeutung der Aminosäuren Histidin 212, Arginin 324 und Aspartat 329..... | 105 |
| 3.7.4.1 | Kinetische Charakterisierung der ODH-Mutanten R324A, D329A und H212A..... | 106 |
| 3.7.5 | Bedeutung von Cystein-Resten..... | 109 |
| 3.7.5.1 | Bestimmung des Cysteingehaltes der ODH..... | 109 |
| 3.7.5.2 | Inhibition der ODH durch thiolmodifizierende Reagenzien..... | 110 |
| 3.7.6 | Mögliche Aminosäurebindestelle..... | 113 |
| 3.7.7 | Weitere Aminosäuren, die für die Mutagenese ausgewählt wurden..... | 115 |
| 4 | DISKUSSION..... | 119 |
| 4.1 | ISOENZYME DER ODH..... | 120 |
| 4.2 | REINIGUNG DER ODH..... | 122 |
| 4.3 | KRISTALLISATION DER ODH..... | 126 |
| 4.4 | NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN..... | 131 |
| 4.5 | DER REAKTIONSMCHANISMUS DER ODH..... | 135 |
| 4.5.1 | Kinetische Eigenschaften wildtypischer ODH-5His..... | 138 |
| 4.5.2 | Gerichtete Mutagenese von Cystein-Resten..... | 139 |
| 4.5.3 | Gerichtete Mutagenese weiterer Aminosäurereste..... | 141 |
| 4.5.4 | Die katalytische Triade..... | 143 |
| 4.5.5 | Aminosäurebindestelle..... | 146 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 150 |
| | SUMMARY..... | 152 |
| 6 | LITERATUR..... | 153 |
| 7 | ANHANG..... | 170 |
| 7.1 | PRIMERSEQUENZEN..... | 170 |
| 7.2 | SEQUENZVERGLEICH ZUR ARTBESTIMMUNG..... | 173 |
| 7.3 | EINZELTIER-PRÄPARATIONEN VON <i>PECTEN MAXIMUS</i> | 174 |
| 7.4 | SEQUENZVERGLEICHE DER <i>PECTEN MAXIMUS</i> ODH-ISOENZYME..... | 175 |
| 7.5 | PROTEINALIGNMENT VERSCHIEDENER OPINDEHYDROGENASEN..... | 178 |
| 7.6 | CRYSTAL SCREEN I (HAMPTON RESEARCH, USA)..... | 180 |
| 7.7 | CRYSTAL SCREEN II (HAMPTON RESEARCH, USA)..... | 181 |