




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>

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

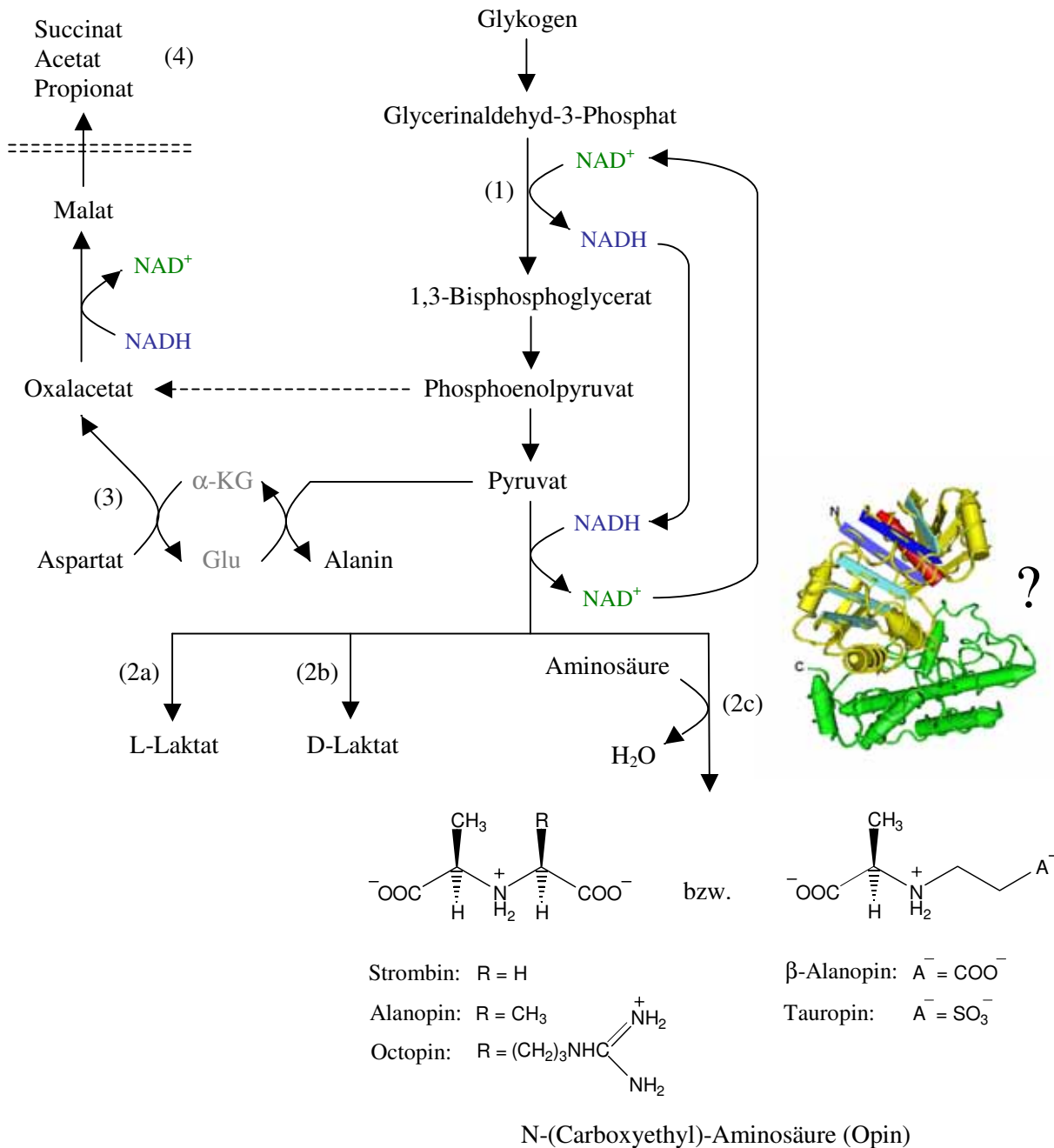


Abb. 1: Reaktionswege des anaeroben Glykogenstoffwechsels bei marinen Invertebraten

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 Opin bezeichneten N²-(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 Opin 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- (N²-(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 gewebspezifisch 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 zehnmal 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 Opinproduktion 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