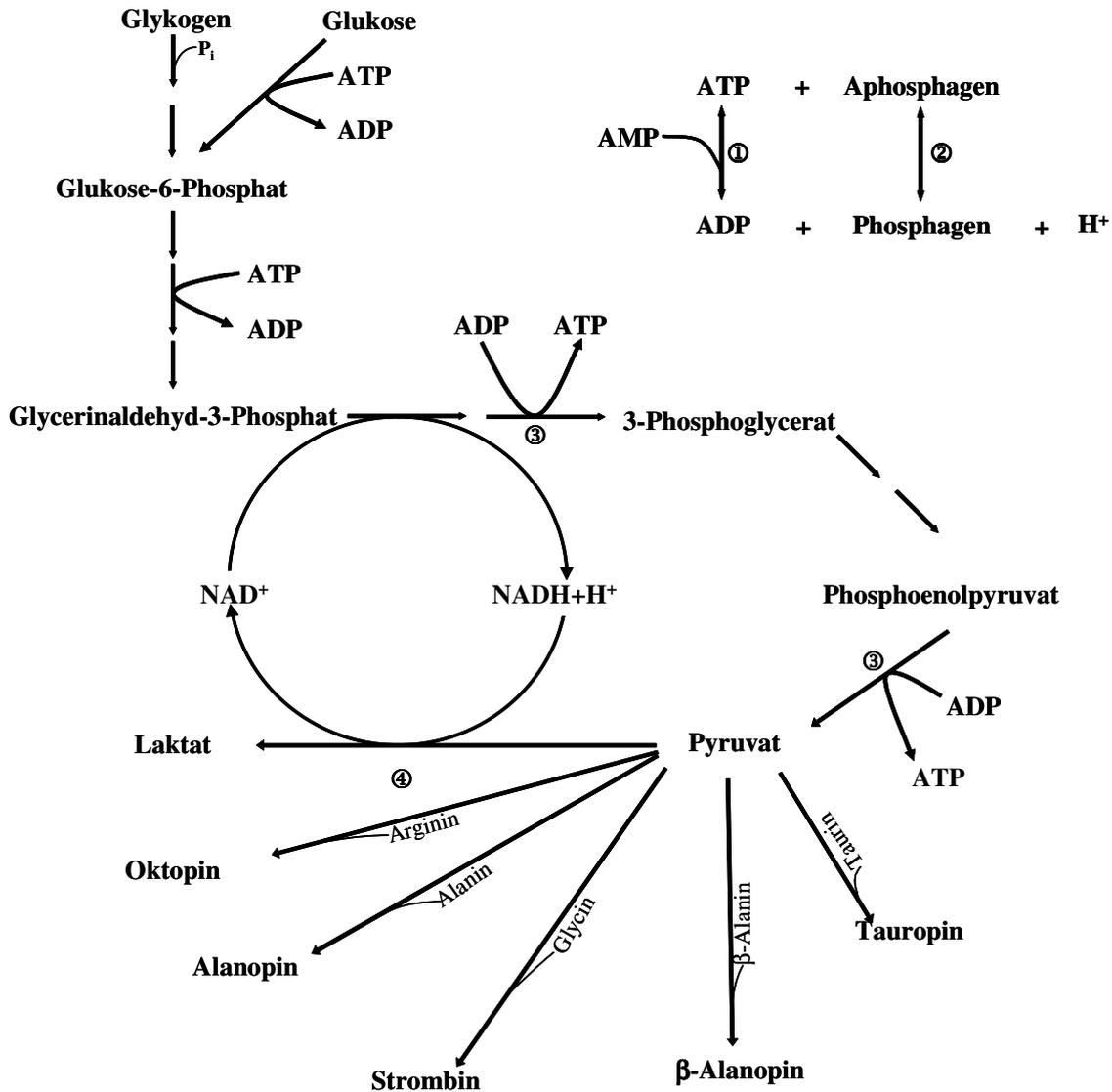


## 1 EINLEITUNG

Viele Tiere verfügen über anaerobe Stoffwechselwege, die ihnen bei Sauerstoffmangel eine Energieversorgung garantieren. In Situationen, in denen wenig Sauerstoff verfügbar ist, hängt der gesamte Stoffwechsel von solchen anaeroben Prozessen ab. Man unterscheidet zwischen zwei physiologischen Situationen des Sauerstoffmangels. Die funktionsbedingte Anaerobiose tritt auf, wenn der Energiebedarf ganz plötzlich größer als die mögliche Versorgung wird, wie z. B. bei intensiver Muskelbewegung während Kampf- und Fluchtreaktionen. Sind Tiere im Biotop langfristig einem Sauerstoffmangel ausgesetzt, spricht man von biotopbedingter Anaerobiose. In beiden Fällen kann ATP in nicht ausreichender Menge oder gar nicht über die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette bereitgestellt werden (Grieshaber *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zum biotopbedingten Sauerstoffmangel, während dem der Energieumsatz drastisch erniedrigt wird (Hand und Hardewig, 1996), ist bei der funktionsbedingten Anaerobiose der Energieverbrauch in der aktiven Muskulatur kurzfristig so stark erhöht, dass er nicht durch einen aeroben Metabolismus gedeckt werden kann. Dabei müssen die betroffenen Gewebe sich nicht zwangsläufig in einem Zustand akuter Hypoxie befinden. In den Mitochondrien reicht zum einen die Menge an Sauerstoff für die ATP-Bildung nicht aus, um den Energiebedarf des kontraktile Gewebes vollständig zu decken (Connett *et al.*, 1984, 1985); zum anderen können durch die mitochondrialen Carriermechanismen nicht genügend Reduktionsäquivalente in die Mitochondrien transportiert werden (Crabtree und Newsholme, 1972). Um diesen Energiemangel zumindest teilweise auszugleichen, verfügt der tierische Organismus über verschiedene Wege zur ATP-Gewinnung: die Phosphagenkinasereaktion, die Substratkettenphosphorylierungen der Glykolyse und die Adenylatkinasereaktion (Zebe *et al.*, 1980).

Am Anfang der funktionsbedingten Anaerobiose wird Energie durch die Phosphagenkinasereaktion bereitgestellt. Dabei wird die energiereiche Phosphatgruppe einer phosphorylierten Guanidiniumverbindung (Phosphagen) auf ADP übertragen. Bei Vertebraten dient Kreatinphosphat als energielieferndes Phosphagen; bei manchen Invertebraten, besonders bei Mollusken und Arthropoden, ist L-Argininphosphat weit verbreitet (Meyerhof, 1928; Grieshaber und Gäde, 1977). Die Phosphagenkinasen katalysieren bei funktionsbedingter Anaerobiose die Phosphorylgruppenübertragung auf ADP mit einer hohen Umsatzrate und stellen so benötigtes ATP schnell zur Verfügung (Ellington, 1989, 2001; Grieshaber *et al.*, 1994).



**Abb. 1.1: Stoffwechselforgänge bei funktionsbedingter Anaerobiose.** ① Adenylatkinasereaktion, ② Phosphagenkinasereaktion, ③ Substratkettenphosphorylierung, ④ Pyruvatoxidoreduktasen.

Durch die Transphosphorylierung kann der Energiebedarf allerdings nur kurzfristig gedeckt werden (Gäde und Grieshaber, 1986). Wird mehr ATP benötigt als durch die Phosphagenkinasereaktion bereitgestellt werden kann, wird es ausschließlich durch die Substratkettenphosphorylierungen in der anaeroben Glykolyse erzeugt. Spezies mit einer hohen Toleranz gegenüber Hypoxie oder Anoxie haben dementsprechend einen hohen Glykogengehalt im Gewebe. Bei der Miesmuschel, *Mytilus edulis*, oder der Pilgermuschel, *Pecten maximus*, kann Glykogen zwischen 5 bis 40 % des Trockengewichts ausmachen (de Zwaan und Wijsman, 1976; Grieshaber, persönliche Mitteilung).

Im Vergleich zur aeroben Energiegewinnung ist die ATP-Erzeugung durch die anaerobe Glykolyse während einer funktionsbedingten Hypoxie wesentlich geringer. Um einen konstanten ATP-Spiegel aufrechtzuerhalten, wird die Glykolyserate gesteigert (Pasteur-Effekt). Reguliert wird die Anpassung des glykolytischen Fluxes durch zwei Faktoren: dem Substratangebot aus der Glykogenolyse und die allosterische Aktivierung der Phosphofruktokinase durch AMP und  $\text{Ca}^{2+}$  (Stanley und Connett, 1991).

Durch die unter funktionsbedingter Hypoxie erhöhte glykolytische Fluxrate können die anfallenden Reduktionsäquivalente (NADH) nicht in dem Maße durch die Atmungskette reoxidiert werden, wie es für ein Fortschreiten des glykolytischen Fluxes notwendig wäre.  $\text{NAD}^+$  muss daher auf andere Weise regeneriert werden.

Die ersten Zellen, die sich im Laufe der Evolution entwickelt hatten, lebten in einer nahezu sauerstofflosen Atmosphäre. Sie mussten ihre Energie daher unter anaeroben Bedingungen gewinnen. Daher verfügten sie über die Fähigkeit anaerob kontinuierlich  $\text{NAD}^+$  zu regenerieren, indem sie, durch Elektronenübertragung von NADH auf organische Elektronenakzeptoren, reduzierte Endprodukte bildeten. Bei rezenten Tieren ist dieser Mechanismus für beide Formen einer Hypoxie notwendig und deshalb konserviert worden (Webster, 2003).

Als erstes Enzym, das die anaerobe Glykolyse mit der Elektronenübertragung von NADH auf einen organischen Elektronenakzeptor terminieren kann, wurde die Laktatdehydrogenase (**LDH**, D-, L-Laktat:NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.27) beschrieben (Straub, 1940). Sie katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat, wobei NADH zu  $\text{NAD}^+$  reoxidiert wird. Während die LDH vorwiegend bei Vertebraten, Crustaceen, Spinnen und Insekten zu finden ist, ließ sich bei manchen Invertebraten weder das Enzym, noch das Endprodukt Laktat nachweisen (Grieshaber und Kreutzer, 1986). Stattdessen terminieren hier andere Enzyme die anaerobe Glykolyse, die sogenannten Opindehydrogenasen, die in Gegenwart von NADH und  $\text{H}^+$ , die reduktive Kondensation einer Aminosäure mit Pyruvat oder einer anderen  $\alpha$ -Ketosäure zu einem Opin katalysieren (Zammit, 1976; Livingstone *et al.*, 1983; Gäde und Grieshaber, 1986; Livingstone *et al.*, 1990; Hammen und Bullock, 1991; Hammen und Fielding, 1993). Die verschiedenen Opindehydrogenasen unterscheiden sich dabei durch die Aminosäure, die als Substrat verwertet wird und damit auch durch das entstehende Produkt, einem Opin.

Das erste Opin wurde bereits 1927 von Morizawa aus dem Cephalopoden *Octopus octopodia* isoliert und folglich Oktopin genannt. Isoliert wurde die erste Opindehydrogenase 1969 aus dem Adduktormuskel der Pilgermuschel, *Pecten maximus* (van Thoai *et al.*, 1969). Abgeleitet vom Namen des Endprodukts der von ihr katalysierten Reaktion, wurde sie als Ok-

topindehydrogenase (**ODH**, N<sup>2</sup>-(1-carboxyethyl)-L-Arginin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase, EC 1.5.1.11) bezeichnet. Neben der Oktopindehydrogenase gelang es in den folgenden Jahren vier weitere Opindehydrogenasen in marinen Invertebraten nachzuweisen und teilweise aus ihren Geweben zu isolieren (Grieshaber und Kreutzer, 1986; Grieshaber *et al.*, 1994). Im Adduktormuskel der Auster, *Crassostrea gigas*, entdeckte Fields (1980) die enzymatischen Aktivitäten einer Strombin- und einer Alanopindehydrogenase (EC 1.5.1.22, EC 1.5.1.17); die Tauropindehydrogenase (EC 1.5.1.23) wurde 1986 von Sato und Gäde, die  $\beta$ -Alanopindehydrogenase (EC 1.5.1.26) 1987 von Sato *et al.* nachgewiesen.

Es stellt sich nun die Frage, warum sich im Laufe der Evolution, eine solche Bandbreite an verschiedenen Pyruvatoxidoreduktasen entwickelt hat?

Bisher ist über die phylogenetische Entwicklung der verschiedenen Pyruvatoxidoreduktasen nur wenig bekannt. Während die Laktatdehydrogenase bei Vertretern sämtlicher Tierstämme zu finden ist, scheinen die Opindehydrogenasen charakteristisch für Vertreter niederer und ‚mittlerer‘ Stämme zu sein (Livingstone *et al.*, 1983). Aufgrund der phylogenetischen Verteilung der verschiedenen terminalen Dehydrogenasen, gehen Livingstone *et al.* (1983) davon aus, dass in den frühen Stadien der Metazoenentwicklung alle Pyruvatoxidoreduktasen vorhanden waren. Infolge eines selektiven Drucks gingen bei verschiedenen Stämmen einige oder alle Opindehydrogenasen verloren, wobei womöglich die Verfügbarkeit freier Aminosäuren eine Rolle spielte.

In den Geweben mariner Lebewesen kommen freie Aminosäuren oft in hohen Konzentrationen vor, da sie diese für ihre Osmoregulation benötigen (Schoffeniels, 1976). Land- und süßwasserlebende Organismen benötigen für die Osmoregulation keine freien Aminosäuren, folglich sind deren Konzentrationen im Gewebe gering. Das Fehlen der Aminosäuren könnte somit einen selektiven Faktor dargestellt haben. Er alleine kann aber nicht maßgebend gewesen sein, da man bei einigen Süßwassermuscheln, wie z. B. der Teichmuschel, *Anodonta cygnea*, trotz niedriger L-Argininkonzentrationen eine Oktopindehydrogenaseaktivität findet (Gäde, 1973; Gäde und Grieshaber, 1975). Auch die Abwesenheit der Opindehydrogenasen in marinen Vertretern der Arthropoden und Vertebraten kann mit einer geringen Aminosäurekonzentration im Gewebe als selektivem Faktor nicht erklärt werden. Vielmehr könnte bei ihnen die Energieeffizienz der unterschiedlichen Stoffwechselwege eine Rolle gespielt haben. Laktat- und Opinbildung liefern zwar die gleiche Menge ATP (3 ATP pro Glykosyleinheit), doch ist die maximale Energieausbeute bei der Laktatbildung höher. Während diese nur von

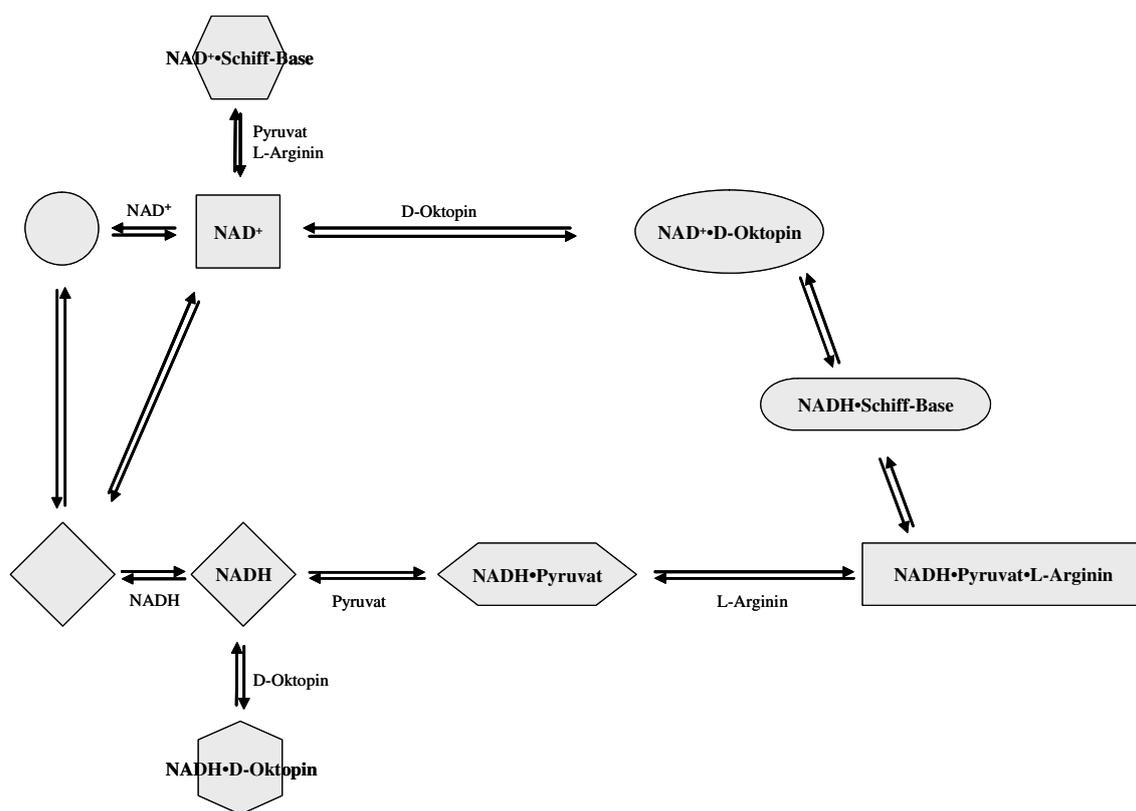
der Pyruvatkonzentration, also vom Glykogengehalt abhängig ist, stellt für die Opininbildung die Verfügbarkeit der Aminosäuren einen limitierenden Faktor dar (Livingstone *et al.*, 1983).

Des Weiteren kommen molekulare Aspekte hinzu. Tierische Opindehydrogenasen liegen ausschließlich in monomerer Form vor. Im Gegensatz dazu, bildet die bei Mollusken und Polychäten vorkommende D-LDH zumeist Dimere, die bei Chordaten, Echinodermaten und Crustaceen vorkommende L-LDH Tetramere (Long, 1976). Der Aufbau aus mehreren Unter-einheiten erlaubt dabei eine Anpassung an den Bedarf verschiedener Gewebe durch die Bildung unterschiedlicher Isoformen (Livingstone, 1991).

Aufgrund der oben genannten Faktoren nimmt die Effizienz der unterschiedlichen energieliefernden Stoffwechselwege in der Reihenfolge Laktat > Oktopin > restliche Opine ab (Livingstone *et al.*, 1983). Die Annahme die Energieproduktion bei der Oktopininbildung sei effizienter als die Bildung anderer Opine begründet sich in der Tatsache, dass der Oktopinweg und das Vorhandensein von L-Argininphosphat als Phosphagen meistens assoziiert sind. Durch die Transphosphorylierung von L-Argininphosphat wird die augenblickliche Verfügbarkeit von freiem L-Arginin für die reduktive Kondensation mit Pyruvat gegenüber anderen Aminosäuren erhöht und somit die Reaktion begünstigt, die sich in der Zelle nahe ihrem chemischen Gleichgewicht befindet (Livingstone *et al.*, 1983).

Um die Frage nach einem möglichen Selektionsvorteil durch den Besitz alternativer Pyruvatoxidoreduktasen für die verschiedenen marinen Invertebraten zumindest teilweise beantworten zu können, ist es notwendig, die molekularen und biochemischen Eigenschaften der Opindehydrogenasen genauer zu analysieren. Zur Aufklärung der Struktur und des molekularen Reaktionsmechanismus der alternativen Pyruvatoxidoreduktasen erwies sich die Oktopindehydrogenase als besonders geeignet, da sie verhältnismäßig leicht aus dem großen Schalenadduktor der Pilgermuschel, *Pecten maximus*, gereinigt werden kann (van Thoai *et al.*, 1969). Das monomere Enzym (Gäde und Grieshaber, 1986) gilt mit einem Molekulargewicht von 43,3 kDa (Janßen, 2000) als eine der kleinsten NADH-abhängigen Dehydrogenasen. Obwohl die ODH biochemisch bereits gut charakterisiert ist und einige Arbeiten über den Reaktionsmechanismus und die Substratspezifität der ODH publiziert wurden (Thomé-Beau *et al.*, 1971; Oriol *et al.*, 1972; Thomé-Beau und Olomucki, 1973; Luisi *et al.*, 1973; Baici *et al.*, 1974; Doublet *et al.*, 1975a & b; Monneuse-Doublet *et al.*, 1980; Olomucki, 1981; Schrimsher und Taylor, 1984; Zettelmeissl *et al.*, 1984; Thomé *et al.*, 1985; Sheik und Katiyar, 1993a & b), gibt es über den Reaktionsmechanismus widersprüchliche Informationen.

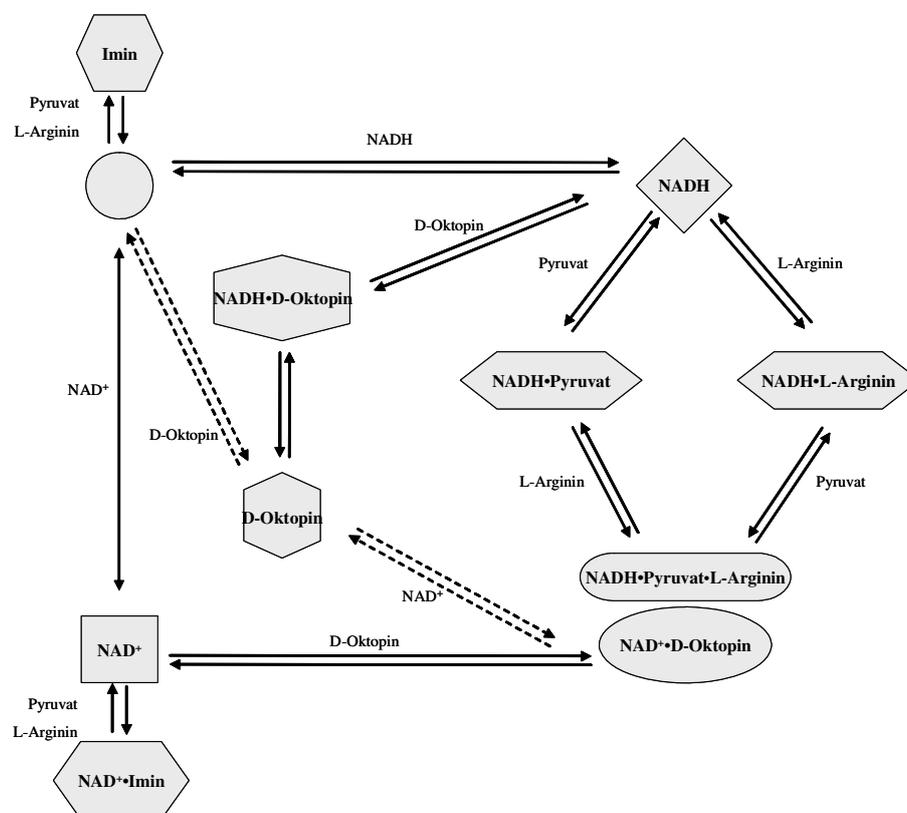
Untersuchungen zur Substratbindung an die ODH mittels kinetischer Analysen ließen es zu, einen kinetischen Mechanismus für die ODH-katalysierte Reaktion zu entwickeln (Doublet und Olomucki, 1975a & b; Monneuse-Doublet *et al.*, 1977; Schrimsher und Taylor, 1984). So postulierten Monneuse-Doublet *et al.* (1977) für die Substratbindung an ODH einen geordnet-sequenziellen Mechanismus. Demnach bindet im aktiven Zentrum zuerst das Coenzym, NADH, und bildet mit dem Enzym einen binären Komplex. An diesen bindet als erstes Substrat Pyruvat, wodurch die anschließende L-Arginin-Bindung erst ermöglicht wird. Die beiden Substrate reagieren unter Dehydratisierung zur Schiff-Base. Erst in einem weiteren Reaktionsschritt wird das Hydrid-Ion des NADHs auf die Schiff-Base übertragen, wodurch das intermediäre Zwischenprodukt zu D-Oktopin reduziert wird. Damit wurde die bisher vertretene Theorie widerlegt, dass eine vorab aus einer chemischen Reaktion hervorgegangene Schiff-Base an die ODH gebunden wird (van Thoai *et al.*, 1969).



**Abb. 1.2: Kinetischer Mechanismus der ODH-katalysierten Reaktion nach Monneuse-Doublet *et al.* (1977).** Die Substratbindung erfolgt in einer geordneten Reihenfolge. Als erstes bindet das Coenzym, gefolgt von Pyruvat und L-Arginin. Die durch die Reaktion von Pyruvat und L-Arginin entstehende Schiff-Base bildet einen vorübergehenden Übergangszustand und wird durch die Übertragung des Hydrid-Ions von NADH zu D-Oktopin reduziert. Sowohl die Schiff-Base, als auch das D-Oktopin wirken als Inhibitoren des ODH•NAD<sup>+</sup>-Komplexes bzw. des ODH•NADH-Komplexes. Das Apoenzym kommt in zwei Konformationen vor, an die NAD<sup>+</sup> kooperativ bindet. Die geometrischen Formen stellen die verschiedenen Konformationen des Enzyms und die unterschiedlichen Enzym-Substrat-Komplexe dar.

Auch die Bildung sogenannter ‚*dead end*‘-Komplexe wurde postuliert, aber nicht nachgewiesen. Solche ‚*dead end*‘-Komplexe könnten gebildet werden, wenn einerseits D-Oktopin an den ODH•NADH-Komplex und andererseits Pyruvat sowie L-Arginin an den ODH•NAD<sup>+</sup>-Komplex binden. Folglich kann das Enzym durch einen Substratüberschuss gehemmt werden: Ein Überschuss von D-Oktopin hemmt die Regeneration von NAD<sup>+</sup>, wohingegen hohe Konzentrationen von L-Arginin und/oder Pyruvat die Reaktion in Richtung der NADH-Bildung hemmen (Monneuse-Doublet *et al.*, 1977).

In dem 1984 von Schrimsher und Taylor entworfenen Modell erfolgt die Substratbindung an die Oktopindehydrogenase dagegen nach einem zufällig-sequenziellen Mechanismus.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der ODH-katalysierten Reaktion nach Schrimsher und Taylor (1984).** Nach der Bindung des Coenzym binden Pyruvat und L-Arginin in zufälliger Reihenfolge. Das aus Pyruvat und L-Arginin gebildete Imin sowie D-Oktopin wirken als Inhibitoren des ODH•NAD<sup>+</sup>- bzw. des ODH•NADH-Komplexes. Sowohl das Imin als auch D-Oktopin sind in der Lage auch an das Apoenzym zu binden. Die geometrischen Formen repräsentieren das freie Enzym und die verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexe. Die gestrichelten Linien stellen alternative Wege dar.

Wie schon in dem älteren Modell von Monneuse-Doublet *et al.* (1977) postuliert, gehen auch Schrimsher und Taylor (1984) davon aus, dass zunächst ODH und NADH einen binären Komplex bilden. Die anschließende Bindung von L-Arginin und Pyruvat erfolgt jedoch in ei-

ner zufälligen Reihenfolge. Auch in diesem Modell wird eine Bildung der oben beschriebenen ‚dead end‘-Komplexe angenommen. Darüber hinaus vermuteten die Autoren, dass sowohl D-Oktopin als auch Pyruvat und L-Arginin in Abwesenheit des Coenzym binden können. Die Bindung der Substrate an das Apoenzym soll allerdings schwächer sein als die Bindung an den binären Komplex und ist daher nur bei hohen Substratkonzentrationen möglich. Pyruvat und L-Arginin können dabei nicht einzeln an das Enzym binden, was die Hypothese unterstützt, dass nur ein zuvor gebildetes Imin (Schiff-Base) an das Apoenzym binden kann. Strukturell soll dieses Imin sowohl dem D-Oktopin als auch einem vermeintlichen Übergangszustand ähneln. Beide Modelle liefern zwar einen denkbaren kinetischen Mechanismus, doch konnte bis heute keines der beiden Modelle experimentell verifiziert werden.

Heutzutage lassen sich Enzym-Substrat-Wechselwirkungen mittels moderner Verfahren, wie z. B. der ‚Dynamischen Differenzkalorimetrie‘ (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) oder der ‚Isothermalen Titrationskalorimetrie‘ (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) untersuchen (O’Brien *et al.*, 2001). Einen umfassenden Einblick in die Thermodynamik der Ligandenbindung und damit auch in den Ablauf einer Reaktion gewährt die isothermale Titrationskalorimetrie (Holdgate, 2001). Bei dieser Methode wird ein Ligand bei konstanter Temperatur schrittweise zu einem in gepufferter Lösung vorgelegten Makromolekül titriert und die bei der Komplexbildung auftretende Wärmetönung ( $\Delta H^0$ ) bestimmt. Aus dem Kurvenverlauf der Titrationskurve kann die Bindungskonstante ( $K_b$ ) berechnet werden, welche die Stärke der Wechselwirkung zwischen Makromolekül und Ligand beschreibt. Darüber hinaus erlaubt es die Methode die Stöchiometrie ( $n$ ) der Ligand-Makromolekül-Bindung zu erfassen. Sind diese Parameter bekannt, so lassen sich die Entropie ( $\Delta S^0$ ) und die freie Energie der Ligandenbindung ( $\Delta G^0$ ) durch die Gleichung

$$(1.1) \quad \Delta G^0 = -RT \ln K_b = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

bestimmen, wobei  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin und  $R$  die allgemeine Gaskonstante beschreibt (Wiseman *et al.*, 1989; Freire *et al.*, 1990; Ladbury und Chowdry, 1996). Solche direkt ermittelten thermodynamischen Größen sind wichtige Ergänzungen zu Daten, die nur auf indirektem Wege, z. B. durch optische Absorption, Zirkulardichroismus oder NMR-Spektroskopie zugänglich sind.

Eine Voraussetzung für die isothermale Titrationskalorimetrie ist die Verfügbarkeit hinreichend großer Enzymmengen. Bisher scheiterte die Anwendung dieser Methode, weil die Gewinnung homogener Oktopindehydrogenase aus dem Adduktormuskel von *P. maximus* zu arbeitsintensiv war. Nachdem jedoch die ODH heterolog überexprimiert worden war (Jansen, 2000), konnte die Beantwortung der Frage nach dem Reaktionsmechanismus der ODH mittels isothermaler Titrationskalorimetrie erneut aufgegriffen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Einblicke in den kinetischen Mechanismus der Oktopindehydrogenase aus der Pilgermuschel, *Pecten maximus*, zu erhalten. Durch die Untersuchung der Ligandenbindung sollte die Bindungsreihenfolge der Substrate NADH, Pyruvat und L-Arginin an das aktive Zentrum des Enzyms ermittelt werden, die wiederum Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus zulässt.

Durch einen Vergleich der thermodynamischen Parameter der Substratbindung an die Oktopindehydrogenase aus der Pilgermuschel und der Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel, sollte gezeigt werden, inwiefern sich die Reaktionsmechanismen dieser funktionell homologen Enzyme unterscheiden. Da eine eindeutige Erklärung für die Existenz alternativer Pyruvatoxidoreduktasen in marinen Invertebraten gegenüber einem einheitlichen Auftreten der L-Laktatdehydrogenase bei Vertebraten bisher nicht gefunden wurde, sollte der Vergleich der thermodynamischen Parameter für die Substratbindung an ODH und LDH Hinweise auf die Frage geben, welchen Selektionsvorteil die verschiedenen marinen Invertebraten durch den Besitz alternativer Pyruvatoxidoreduktasen haben.