



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>

1 Einleitung

Sauerstoff spielt für die Energieversorgung der überwiegenden Mehrzahl der rezenten tierischen Organismen eine entscheidende Rolle. Substrate für eine aerobe Energiegewinnung sind vor allem Glukose oder ihre Speicherform, das Glykogen. Während Glukose zuerst durch die Hexokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert werden muss, kann Glykogen direkt in den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) eintreten. In der Glykolyse können ausgehend von einer Glykosyleinheit zwei bzw. drei Moleküle ATP gewonnen werden. Endprodukte der Glykolyse sind Pyruvat, NADH und Wasser. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat im Krebs-Zyklus innerhalb der Mitochondrien weiter oxidiert. Die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen werden zuerst auf Reduktionsäquivalente (NADH, FADH₂) und schließlich auf Sauerstoff übertragen. Sauerstoff sorgt für einen kontinuierlichen Elektronenfluss über die Komplexe der Atmungskette und somit für den Aufbau eines Protonengradienten, der für die Energiekonservierung mit Hilfe der ATPsynthase genutzt werden kann. Bei der vollständigen Oxidation der Glukose können 29.5 Moleküle ATP aus einer Glykosyleinheit gewonnen werden. Werden die Elektronen des cytosolischen NADH über den Malat-Aspartat-Shuttle in die Mitochondrien transportiert, so können pro Mol Glukose sogar 31 Mol ATP gewonnen werden (Hinkle *et al.*, 1991).

Funktionsbedingte Anaerobiose

Obwohl der Sauerstoffanteil an der Zusammensetzung der heutigen Atmosphäre ca. 21 % beträgt, können Organismen kurz- oder längerfristigen Sauerstoffmangelsituationen ausgesetzt sein. Nach Zebe *et al.* (1980) kann man zwei Arten des Sauerstoffmangels unterscheiden: Während starker körperlicher Anstrengungen, z.B. bei der Flucht vor Fressfeinden (Flight and Fight-Reaktion) oder beim Eingraben ins Sediment kann es in bestimmten Geweben zu einer funktionsbedingten Anaerobiose kommen (Gäde *et al.*, 1978; Zebe *et al.*, 1980). Beispiele für eine solche funktionsbedingte Anaerobiose sind die Fluchtreaktionen der Pilgermuschel *Pecten maximus* oder der Wellhornschnecke *Buccinum undatum*. Beide versuchen Fressfeinden, wie z.B. dem Seestern *Astropecten aurantiacus*, zu entkommen. Kontraktionen des Adduktormuskels der Pilgermuschel führen zu einem schnellen Öffnen und Schließen der Schale, was zu heftigen Spring- und Schwimmbewegungen führt (Thomas und Gruffydd, 1971). Die Wellhornschnecke versucht, sich durch Rotationen der Schale um den Eingeweidessack, die durch den Columellarmuskel angetrieben werden, dem Fressfeind zu entwinden

(Feder, 1963). Der Spritzwurm *Sipunculus nudus* oder der Wattwurm *Arenicola marina* können durch starken Wellengang ausgespült werden und müssen sich wieder ins Sediment eingraben um vor Fressfeinden geschützt zu sein (Pörtner *et al.*, 1984; Siegmund *et al.*, 1985).

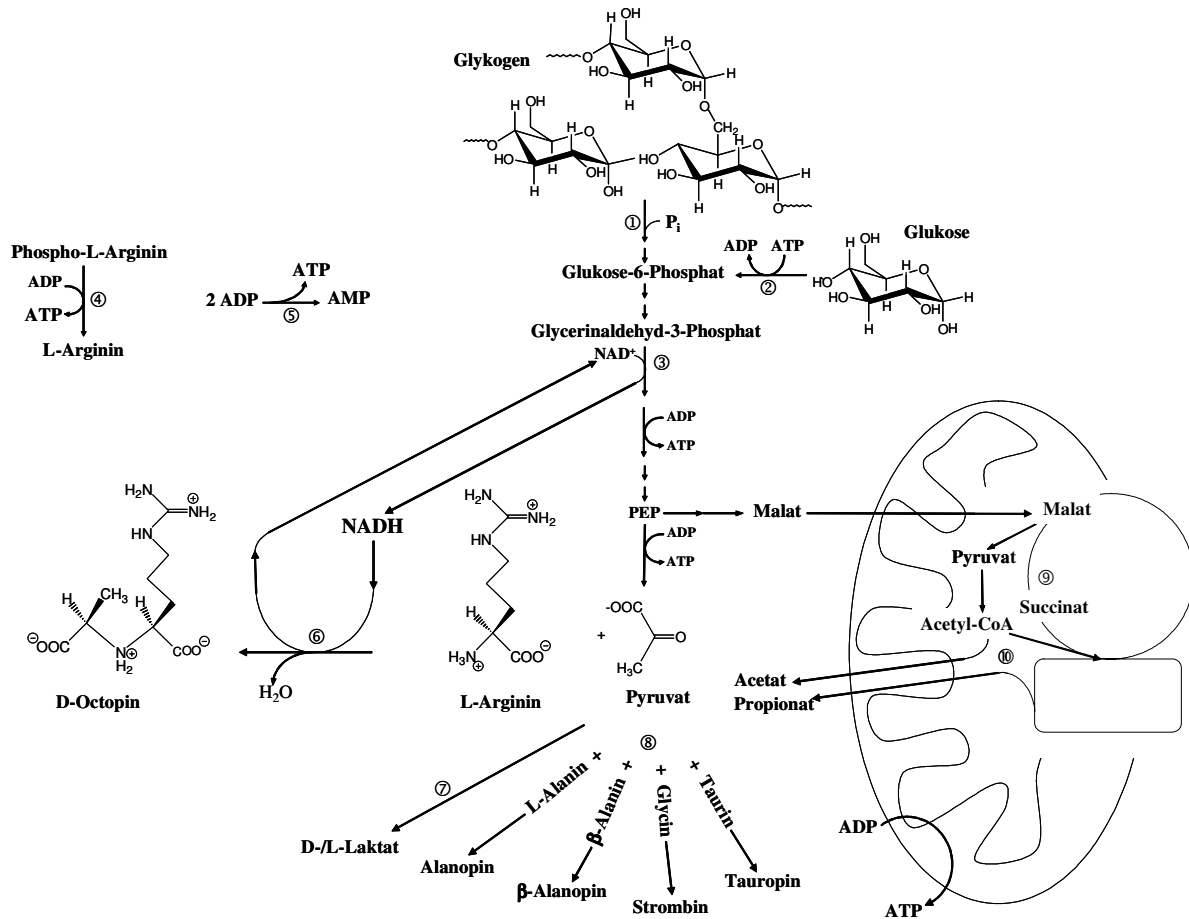


Abb. 1 Überblick über die verschiedenen anaeroben Stoffwechselforgänge in marinen Invertebraten.
 ① Phosphorylase ② Hexokinase ③ Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) ④ Argininkinase
 ⑤ Myokinase ⑥ Octopindehydrogenase (ODH) ⑦ Laktatdehydrogenase (LDH) ⑧ verschiedene Opiindehydrogenasen (Pyruvatoxidoreduktasen; s. Erläuterung im Text) ⑨ Fumaratreduktase-Komplex (Succinatgärung)
 ⑩ Acetat- /Propionatgärung (verändert nach Grieshaber *et al.*, 1994).

Bis zu 20 % der für die „Flight and Fight“-Reaktionen benötigten Energie kann aus dem ATP-Vorrat der Zelle geschöpft werden. Die restlichen 70-80 % werden durch Transphosphorylierung von Phosphagen bereitgestellt. Phosphagene sind phosphorylierte Guanidiniumverbindungen. Ihre energiereiche Phosphorylgruppe kann katalysiert durch Phosphagenkinasen auf ADP übertragen werden. Kreatinphosphat ist das einzige Phosphagen der Vertebraten. Bei Invertebraten wurden sieben weitere Phosphagene und die zugehörigen Phosphotransferasen gefunden (Roche *et al.*, 1960; Ellington, 1989; Ellington, 2001). In vielen Spezies können gleichzeitig mehrere Phosphagene, wenn auch oft in unterschiedlichen Kon-

zentrationen, detektiert werden. L-Argininphosphat, das Phosphagen der Mollusken und Arthropoden, ist bei den Invertebraten am weitesten verbreitet (Meyerhof, 1928; Meyerhof und Lohmann, 1928; Grieshaber, 1978; Gäde *et al.*, 1978). Im Adduktormuskel der ruhenden Pilgermuschel wurde mit 52 μmol pro Gramm Muskel eine hohe L-Argininphosphat-Konzentration gemessen (Beis und Newsholme, 1975). Während einer heftigen Fluchtreaktion nimmt die Konzentration fast vollständig ab (Grieshaber und Gäde, 1977; Gäde *et al.*, 1978). Vergleiche der Phosphagenkonzentrationen im Gewebe verschiedener Spezies haben gezeigt, dass der Phosphagengehalt mobiler Tiere größer ist als in sessilen Spezies. Entsprechend der Phosphagenkonzentration im Gewebe können unterschiedlich lange Perioden erhöhter Aktivität bewältigt werden. Jedes Phosphagen benötigt für die Übertragung der Phosphorylgruppe auf ADP eine eigene Phosphagenkinase. Die L-Arginininkinase stellt wahrscheinlich den ursprünglichsten Vertreter dieser Enzymfamilie dar, aus dem sich die Vielzahl der Phosphagenkinasen entwickelt haben soll (van Thoai und Roche, 1964; Suzuki und Furukohri, 1994; Suzuki *et al.*, 1998). Bei den Mollusken arbeitet die L-Arginininkinase (Abb.1, ④) *in vivo* nahe ihres Gleichgewichts und sorgt, z.B. bei der Fluchtreaktion, für eine schnelle Bereitstellung von ATP (van Thoai und Roche, 1964; Beis und Newsholme, 1975; Graham *et al.*, 1986). Eine weitere Möglichkeit der ATP-Synthese wird von der Myokinase (Abb.1, ⑤) katalysiert, die zwei ADP in ATP und AMP umwandelt.

Anaerobe Glykolyse

Wird mehr ATP benötigt als durch Phosphagene bereitgestellt werden kann, so wird dieses durch die anaerobe Glykolyse gewonnen. Glykogen ist die hauptsächliche Energiequelle unter funktionsbedingter Anaerobiose und daher auch in hohen Konzentrationen im Muskelgewebe enthalten. Bei der Miesmuschel *Mytilus edulis* macht Glykogen zwischen 10 und 30 % des Trockengewichts aus (de Zwaan und Zandee, 1972; de Zwaan und Wijsman, 1976). Hohe Aktivitäten der Phosphorylase (Abb.1, ①) und im Vergleich geringe Aktivitäten der Hexokinase (Abb.1, ②) wurden z.B. in der Adduktormuskulatur von *Pecten maximus* und in der Mantelmuskulatur des schnell schwimmenden Kalmars *Loligo vulgaris* gefunden (Zammit und Newsholme, 1976).

Allerdings lässt sich durch anaerobe Glykolyse, verglichen mit einer vollständigen Oxidation der Glukose, nur wenig Energie gewinnen. Die Ausbeute liegt lediglich bei 10 %. Zum Ausgleich kann die glykolytische Fluxrate erhöht werden (Pasteur-Effekt) (de Zwaan *et al.*, 1980; Thompson *et al.*, 1980; Pörtner *et al.*, 1984; Stanley und Connet, 1991). Allosteri-

sche Kontrolle von Schlüsselenzymen, kovalente Protein-Modifikationen z.B. der Glykogenphosphorylase (Ebberink und Salismans, 1982) und Phosphofruktokinase (Ebberink, 1982; Storey, 1984) sowie die Kompartimentierung von Enzymgruppen spielen bei der Regulation der anaeroben Glykolyse eine wichtige Rolle (Clarke und Masters, 1974a und b; Plaxton und Storey, 1986; Masters *et al.*, 1987; Srivastava, 1991). Durch eine erhöhte Glykolyserate häufen sich jedoch Reduktionsäquivalente an, die nicht alle in der Atmungskette oxidiert werden können, da zum einen die Transportkapazität für die Reduktionsäquivalente ins Mitochondrium erschöpft ist und zum anderen die Fluxrate des Krebszyklus einen limitierenden Faktor darstellt (Crabtree und Newsholme, 1972; Zammit und Newsholme, 1976; Grieshaber *et al.*, 1994). Obwohl in der stark arbeitenden Muskulatur Energie überwiegend durch die anaerobe Glykolyse gewonnen wird, müssen die Mitochondrien nicht zwingend einem Sauerstoffmangel ausgesetzt sein. Die O₂-Konzentration in den Mitochondrien kann ausreichend sein, um ATP zu produzieren, allerdings ist die Rate zu gering, um den erhöhten Energiebedarf im kontrahierenden Muskel sicherzustellen (Connet *et al.*, 1983, 1984 und 1985; Katz und Sahlin, 1988). Damit die anaerobe Glykolyse nicht zum Erliegen kommt, müssen die bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Abb.1, ③) gebildeten Reduktionsäquivalente reoxidiert werden.

Terminale Pyruvatoxidoreduktasen

Verschiedene terminale Pyruvatoxidoreduktasen katalysieren die Oxidation von NADH. Der bekannteste Vertreter dieser Enzymklasse ist die Laktat-Dehydrogenase (Abb.1, ⑦; L-Laktat: NAD⁺ Oxidoreduktase, EC 1.1.1.27; LDH). Dieses Enzym katalysiert die Übertragung eines Hydridions vom NADH auf Pyruvat. Endprodukte dieser Reaktion sind Laktat und NAD⁺ (Meyerhof, 1924; Straub, 1940; Crabtree und Newsholme, 1972). Die LDH hält somit vorwiegend bei Vertebraten aber auch bei Crustaceen, Spinnen und Insekten den Redoxzustand der Zellen bei funktionsbedingter Anaerobiose aufrecht (Livingstone *et al.*, 1983). Laktat als Endprodukt einer anaeroben Glykolyse lässt sich leicht in ihren Geweben nachweisen (Fletcher und Hopkins, 1907; Meyerhof, 1924; Bennett, 1978).

In der Muskulatur der Coelenteraten, Nemertinen, Cnidariern und Mollusken konnte allerdings auch nach extensiver Muskelarbeit kein oder nur wenig Laktat gefunden werden (Glaister und Kerly, 1936; Zebe, 1975). Weiterhin war eine LDH gar nicht oder nur in sehr geringer Aktivität nachweisbar. Lange Zeit war unklar, ob auch diese Organismen überhaupt Energie über eine anaerobe Glykolyse gewinnen können (Dales, 1958; Surholt, 1980).

Heute weiß man, dass anstelle der LDH so genannte Opindehydrogenasen (Abb.1, ⑥ und ⑧) in diesen Tieren die anaerobe Glykolyse terminieren (Zammit und Newsholme, 1976; Baldwin und Opie, 1978; Gäde, 1980; Livingstone *et al.*, 1983; Pörtner *et al.*, 1984; Siegmund *et al.*, 1985; Gäde und Grieshaber, 1986; Livingstone *et al.*, 1990; Hammen und Bullock, 1991; Hammen und Fielding, 1993). Die Opindehydrogenasen katalysieren die reversible, reduktive Kondensation von Pyruvat oder einer anderen α -Ketosäure mit einer Aminosäure in Gegenwart von NADH. Endprodukte dieser Reaktion sind N-(Carboxyalkyl)-Aminosäuren, die als Opine bezeichnet werden (Tempé, 1983) und NAD⁺. Bereits 1928 isolierte Morizawa aus der Mantelmuskulatur des Cephalopoden *Octopus octopodia* eine „ungewöhnliche“ Aminosäure, die später als Octopin bezeichnet wurde (Morizawa, 1928; Moore und Willson, 1937a und b). Ausgehend von Pyruvat, L-Arginin und Muskelextrakten aus verschiedenen marinen Invertebraten wurde Octopin 1959 von van Thoai und Robin *in vitro* synthetisiert (van Thoai und Robin, 1959a und b). Die Kondensation von Pyruvat mit der Aminosäure L-Arginin wird von einem Enzym katalysiert, das den Namen Octopindehydrogenase (Abb.1, ⑥; ODH, EC 1.5.1.11, N²-(1-carboxyethyl)-L-Arginin: NAD⁺ Oxidoreduktase) erhielt (van Thoai *et al.* 1961). Isoliert wurde dieses Enzym zum ersten Mal 1969 aus dem Adduktormuskel der Pilgermuschel *Pecten maximus* (van Thoai *et al.*, 1969). Später wurde ODH in einer Vielzahl anderer mariner bzw. limnischer Invertebraten nachgewiesen und aus ihnen gereinigt, z.B. aus dem Anneliden *Sipunculus nudus* (Haas *et al.*, 1973), aus der Teichmuschel *Anodonta cygnea* (Gäde und Grieshaber, 1975), aus *Pecten jacobaeus* (Grieshaber und Gäde, 1977) sowie aus dem Kalmar *Loligo vulgaris* (Grieshaber *et al.*, 1978) und dem Nemertinen *Cerebratulus lacteus* (Gäde und Carlsson, 1984).

Im Adduktormuskel einer flüchtenden Pilgermuschel steigt der Gehalt an L-Arginin durch die Transphosphorylierung von Argininphosphat (Abb.1, ④) stark an. Freigewordenes L-Arginin wird während der nachfolgenden Erholungsphase ODH-katalysiert mit Pyruvat zu D-Octopin umgesetzt (Grieshaber und Gäde, 1977; Gäde *et al.*, 1978). Bei dieser Reaktion werden ebenfalls die bei der Reaktion der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Abb.1, ③) anfallenden Reduktionsäquivalente reoxidiert, so dass die ODH bei den marinen Invertebraten den Redoxzustand des sauerstoffverarmten Muskelgewebes konstant hält (Fields *et al.*, 1976b und c; Fields und Quinn, 1981; Fields, 1983). Bei anderen Vertretern mariner Invertebraten übernehmen andere Opindehydrogenasen diese Reaktion.

Bis heute sind vier weitere Opindehydrogenasen in marinen Invertebraten entdeckt und teilweise auch gereinigt worden (Gäde und Grieshaber, 1986; Grieshaber und Kreutzer, 1986; Kreutzer *et al.*, 1986; Grieshaber *et al.*, 1994). Die Strombin-/ Alanopindehydrogenase (Glycin bzw. Alanin als Aminosäuresubstrat; EC 1.5.1.22, EC 1.5.1.17) wurde von Fields (1976a) im Adduktormuskel der Auster *Crassostrea gigas* nachgewiesen. Die Tauropindehydrogenase, die Taurin neben Pyruvat als Substrat verwendet, ist 1986 von Sato entdeckt worden (Sato und Gäde, 1986), der auch die β -Alanopindehydrogenase (Aminosäuresubstrat β -Alanin) aus der Trogmuschel *Scarpharca broughtonii* isolierte (Sato *et al.*, 1987). Oft findet man jedoch in einem Organismus bzw. Gewebe mehr als eine Opindehydrogenaseaktivität. Teilweise ließen sich die verschiedenen Aktivitäten unterschiedlichen Enzymen zuordnen (Kreutzer *et al.*, 1989). Es lassen sich jedoch auch Opindehydrogenasen finden, die ein breites Substratspektrum bezüglich der Aminosäure aufweisen (Ellington, 1980; Storey und Dando, 1982; Gäde und Grieshaber, 1986). Weiterhin wird in der Literatur auch von Enzym polymorphismen und gewebespezifischen Isoenzymen berichtet (Storey, 1977; Storey und Storey, 1979a und b; Dando *et al.*, 1981; Kanno *et al.*, 1996; Manchenko *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2000).

Biotopbedingte Anaerobiose

Neben einer funktionsbedingten Anaerobiose können tierische Organismen auch einer biotopbedingten Anaerobiose ausgesetzt sein, die sich durch die Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) in ihrem Habitat unter einen kritischen Wert (p_c) auszeichnet (Zebe *et al.*, 1980). Dieser hypoxische Zustand kann zeitlich begrenzt sein oder aber fortwährend bestehen. Bewohner des intertidalen Sediments zum Beispiel sind durch den periodischen Wechsel von Ebbe und Flut zeitweilig hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, da sie ihren Bau bei Niedrigwasser nicht mehr mit O_2 -reichem Wasser irrigieren können. In limnischen und marinen Habitaten kommt es durch starke Besiedlung mit Tieren und Pflanzen zu diurnalen Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks. Parasiten, die im Verdauungstrakt von Vertebraten leben, sind hingegen vollständig von atmosphärischem Sauerstoff abgeschlossen. Zur Energieversorgung sind Lebewesen in diesen Habitaten mitunter auf eine anaerobe Energiegewinnung angewiesen.

Zu Beginn einer biotopbedingten Anaerobiose wird Energie ebenfalls überwiegend durch die Transphosphorylierung von Phosphagenen gewonnen. Im Gegensatz zum Phosphokreatin der Vertebraten sind die Phosphagene der Invertebraten thermodynamisch stabiler und damit hervorragend geeignet, Energie auch über einen längeren Zeitraum bei einem sehr nie-

drigen [ATP]/[ADP]-Verhältnis im Gewebe bereitzustellen (Schöttler *et al.*, 1984a und b; Graham und Ellington, 1985; Graham *et al.*, 1985; Ellington, 1989; Ellington, 2001). Weiterhin lässt sich durch Substratkettenphosphorylierung während der anaeroben Glykolyse und durch die Reduktion von Fumarat zu Succinat (Abb.1, ⑨) Energie gewinnen (Kmetec und Bueding, 1961; Schroff und Schöttler, 1977; Holwerda und de Zwaan, 1979 und 1980). Zusätzlich wird der Metabolismus drastisch reduziert und die Glykolyserate bis auf 5 bis 10 % der normoxischen Rate herabgesetzt (Meinardus-Hager *et al.*, 1989; Hardewig *et al.*, 1991a und b). Die Reoxidation von glykolytischem NADH allerdings wird auch bei biotopbedingter Anaerobiose durch die Laktat- bzw. durch die Opindehydrogenasen ermöglicht.

Bei länger andauernder Anaerobiose wird auch das mitochondriale Kompartiment in die Energiegewinnung mit einbezogen. Die Ausnutzung des Fumaratreduktase-Komplexes (Abb.1, ⑨) und des Acetat-Propionat-Weges (Abb.1, ⑩; Schroff und Zebe, 1980; Schöttler, 1983; Hardewig *et al.*, 1994) erhöhen die ATP-Ausbeute von 3 Mol auf 7 Mol ATP pro Glykosyleinheit (Grieshaber *et al.*, 1994).

Dualismus der Opinbildung

Opindehydrogenasen sind also sowohl bei funktionsbedingter, als auch bei biotopbedingter Anaerobiose entscheidend an der Energieversorgung der Invertebraten beteiligt. Allerdings werden oft unterschiedliche Endprodukte nach funktions- bzw. biotopbedingter Anaerobiose akkumuliert (Kreutzer *et al.*, 1989). Im Hautmuskelschlauch des Wattwurms *Arenicola marina* z.B. findet man nach starker Grabaktivität überwiegend Alanopin, wohingegen bei einer stickstoffinduzierten Anaerobiose vorwiegend Strombin akkumuliert (Siegmond *et al.*, 1985). In der Herzmuschel *Cardium tuberculatum* und der amerikanischen Schwertmuschel *Ensis directus* konnte nach starker Muskelaktivität vornehmlich Octopin, nach einer Hypoxie überwiegend D-Laktat nachgewiesen werden (Meinardus-Hager und Gäde, 1986a und b; Schiedek und Zebe, 1987). Der Spritzwurm *Sipunculus nudus* akkumuliert ebenfalls Octopin bei funktionsbedingter Anaerobiose, allerdings wird in seinem Hautmuskelschlauch bei biotopbedingter Hypoxie Strombin gebildet (Pörtner *et al.*, 1984). Dieser Dualismus der Opinbildung ließ sich durch vergleichende Untersuchungen zum Aminosäure- und Opingehalt in mehr als 20 Spezies, die sowohl funktionsbedingter-, als auch biotopbedingter Anaerobiose unterworfen wurden, physiologisch erklären. Biotopbedingte Anaerobiose ist durch einen niedrigen glykolytischen Flux gekennzeichnet. Hierbei arbeiten alle Opindehydrogenasen eines Gewebes nahe ihres Gleichgewichts und die am höchsten konzentrierte Aminosäure bestimmt

das bevorzugt gebildete Endprodukt. Bei einem hohen glykolytischem Flux, wie er für die funktionsbedingte Anaerobiose charakteristisch ist, arbeiten nur diejenigen Opindehydrogenasen nahe ihres Gleichgewichts, die in ausreichend hoher Aktivität im entsprechenden Gewebe vorhanden sind. Die Kapazität dieser Enzyme bestimmt, welche Endprodukte vornehmlich gebildet werden (Pörtner *et al.*, 1984; Kreuzer *et al.*, 1989).

Verbreitung von Opindehydrogenasen

In Arbeiten von Livingstone (1983 und 1990), Hammen und Bullock (1991), Hammen und Fielding (1993) sowie von Sato (1993a) wird die Verbreitung von Opin- und Laktatdehydrogenasen in mehr als 160 Spezies aus 17 Tierstämmen eingehend behandelt. Opindehydrogenasen wurden jedoch nicht nur bei Invertebraten gefunden. Sato und Mitarbeiter reinigten 1993 eine Tauropindehydrogenase aus der marinen Rotalge *Rhodoglossum japonicum* (Sato *et al.*, 1993b). Weiterhin wurden auch in Wurzelhalsgallen dikotyler Pflanzen Opindehydrogenasen nachgewiesen (Smith und Townsend, 1907; Chilton *et al.*, 1977; Moore *et al.*, 1979; Schell *et al.*, 1979). Wurzelhalsgallen entstehen durch Infektion der Pflanzen mit pathogenen Agrobakterien, z.B. mit *Agrobacterium tumefaciens*. Die Agrobakterien enthalten so genannte Ti-Plasmide (tumor inducing plasmids), welche neben den Oncogenen auch Gene für die Synthese und den Abbau von Opinen enthalten (van Larebeke *et al.*, 1973 und 1974; Watson *et al.*, 1975; van Montagu *et al.*, 1980; Messens *et al.*, 1985). Der Einbau eines Abschnitts dieses Plasmids in das Pflanzengenom (Chilton *et al.*, 1977; Willmitzer *et al.*, 1980; Deblaere *et al.*, 1985) führt zu einer tumorösen Veränderung des Pflanzengewebes und veranlasst die Pflanze, Opine zu produzieren, die wiederum den Bakterien als Kohlen- und Stickstoffquelle dienen. Die benötigten Opinpermeasen und Opinoxidasen sind ebenfalls Ti-Plasmid kodiert. Allerdings unterscheiden sich die Opinoxidasen sowohl katalytisch als auch strukturell von den Opinsynthesen (Nester, 1981; Tempé und Petit, 1983; Chang *et al.*, 1983; Chilton *et al.*, 1984; Firmin *et al.*, 1985; Thompson und Donkersloot, 1992). Weiterhin wurden Opindehydrogenasen auch bei Pseudomonaden (Beaulieu *et al.*, 1983; Rossignol und Dion, 1985; Boivin *et al.*, 1987), Rhizobiaceen (Beauchamp *et al.*, 1991) und Coryneformen, z.B. bei *Arthrobacter sp.*, nachgewiesen (Tremblay *et al.*, 1987a und b; Asano *et al.*, 1989). Zusätzlich konnte auch in Pilzen der Gattungen *Cylindrocarpon* und *Fusarium* ein Opinkatabolismus nachgewiesen werden (Beauchamp *et al.*, 1990).

Biochemische Charakterisierung der Opindehydrogenasen

Neben ihren physiologischen Eigenschaften sind einzelne Opindehydrogenasen auch biochemisch bereits gut charakterisiert worden. Besonders die als erstes isolierte Octopindehydrogenase der Pilgermuschel *Pecten maximus* war in der Vergangenheit ein beliebtes Versuchsobjekt, da sie sich verhältnismäßig leicht aus dem Adduktormuskel reinigen ließ. Als monomeres Enzym mit einem Molekulargewicht von 43.3 kDa hält man sie für eine der kleinsten NADH-abhängigen Dehydrogenasen (Olomucki *et al.*, 1972; Gäde und Grieshaber, 1986; Janßen, 2000).

Die Ligandenbindung an ODH wurde mit kinetischen Techniken eingehend von Monneuse-Doulet und Olomucki (1975 a & b, Monneuse-Doulet *et al.*, 1978) sowie von Schrimsher und Taylor (1984) untersucht, wobei jedoch beide Gruppen zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Monneuse-Doulet und Olomucki (1975 a & b) postulieren für die Ligandenbindung an ODH eine geordnete Reihenfolge. Zuerst bindet das Coenzym NADH, dann Pyruvat und schließlich L-Arginin. Pyruvat reagiert mit L-Arginin unter Dehydratisierung zu einer Schiffbase. Auf diesen Übergangszustand erfolgt schließlich der Hydridtransfer vom NADH, wodurch D-Octopin entsteht. Anscheinend besitzt die ODH zwei unterschiedliche Bindestellen für die Substrate Pyruvat und L-Arginin. Die bis dahin vorherrschende Meinung, dass die Schiffbase an das Enzym gebunden wird (van Thoai *et al.*, 1969), wurde von diesen Autoren widerlegt. Auch Schrimsher und Taylor (1984) gehen davon aus, dass zuerst das Coenzym an das Enzym bindet. Die nachfolgende Bindung der Substrate soll jedoch ungeordnet erfolgen, selbst die Bindung einer Schiffbase wird von ihnen nicht ausgeschlossen. Pho (1970), sowie Oriol und Olomucki (1972) konnten durch spektrophotometrische und spektropolarometrische Untersuchungen feststellen, dass sich bei der Bindung des Coenzym die Proteinstruktur ändern muss. Weiterhin wurde die ODH auch benutzt, um die Faltung einfacher, monomerer Proteine zu untersuchen (Zettlmeissel *et al.*, 1984; Teschner *et al.*, 1987).

Durch die Aufklärung der Primärstruktur der Octopindehydrogenasen aus *Pecten maximus*, *Loligo vulgaris*, *Loligo opalescens* und *Sepia officinalis* von Janßen (2000) sowie durch die Arbeiten einer japanischer Gruppe (Kimura *et al.*, 2004; Kan-No *et al.* 2005) sind heute Sequenzen verschiedener Octopin- und Tauropindehydrogenasen mariner Invertebraten in Datenbanken verfügbar und ermöglichen Sequenzvergleiche z.B. mit anderen NADH-abhängigen Dehydrogenasen. Die coenzymbindenden Domänen dieser Dehydrogenasen sind topologisch sehr ähnlich aufgebaut und bestehen aus einem konservierten β - α - β - α - β -Motiv