

Vergleichende thermodynamische Analyse der
Substratbindung an die rekombinante
Oktopindehydrogenase aus der Pilgermuschel, *Pecten
maximus*, und an die Laktatdehydrogenase aus dem
Schweinemuskel

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nadine van Os

aus Kamp-Lintfort

Düsseldorf, 2006

Aus dem Institut für Zoophysiologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. M. K. Grieshaber

Korreferent: Prof. Dr. G. Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2007

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGEN	3
EIN- UND DREIBUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN	4
1 EINLEITUNG	5
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 CHEMIKALIEN	14
2.2 ÜBERPRODUKTION UND REINIGUNG DER ODH.....	14
2.2.1 <i>Sterilisation der erforderlichen GefäÙe, Lösungen und Medien</i>	14
2.2.2 <i>Herstellung elektrokompetenter ER2566-Zellen</i>	14
2.2.3 <i>Transformation der E. coli-Zellen durch Elektroporation</i>	15
2.2.4 <i>Anzuchtbedingungen des E. coli-Stammes für die Überproduktion der heterolog exprimierten ODH</i>	15
2.2.5 <i>Präparation der ODH</i>	16
2.2.6 <i>Reinigung durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie</i>	16
2.2.6.1 <i>Regenerierung des Ni-NTA-Superflowmaterials</i>	17
2.2.7 <i>Reinigung durch Größenausschlusschromatographie</i>	17
2.2.8 <i>Aktivitätsbestimmung</i>	18
2.2.9 <i>Proteinbestimmung</i>	18
2.2.10 <i>SDS-Gelelektrophorese</i>	18
2.2.11 <i>Nachweis der Proteine im Gel</i>	19
2.2.11.1 <i>Coomassie-Färbung</i>	19
2.2.11.2 <i>Silberfärbung</i>	19
2.3 OKTOPINSYNTHESE	20
2.3.1 <i>Durchführung</i>	20
2.3.2 <i>Dünnschichtchromatographie</i>	21
2.3.3 <i>Bestimmung der Reinheit</i>	22
2.3.4 <i>Ausbeute</i>	22
2.4 MIKROKALORIMETRISCHE MESSUNGEN.....	22
2.4.1 <i>Messprinzip</i>	22
2.4.2 <i>Theoretische Grundlagen der isothermalen Titrationskalorimetrie</i>	24
2.4.3 <i>Datenanalyse</i>	27
2.4.4 <i>Durchführung eines ITC-Experimentes</i>	29
2.4.4.1 <i>Probenvorbereitung</i>	29
2.4.4.2 <i>Durchführung der Messung</i>	30
2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG	31
3 ERGEBNISSE	32
3.1 REINIGUNG DER REKOMBINANTEN OKTOPINDEHYDROGENASE.....	32

3.2	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE REKOMBINANTE	
	OKTOPINDEHYDROGENASE AUS <i>PECTEN MAXIMUS</i>	34
3.2.1	<i>Coenzym-Bindung</i>	35
3.2.2	<i>L-Arginin-Bindung</i>	36
3.2.3	<i>Pyruvat-Bindung</i>	39
3.2.4	<i>Bindungsverhalten bei gleichzeitiger L-Arginin- und Pyruvatinjektion</i>	41
	3.2.4.1 Vergleich der thermodynamischen Parameter bei gleichzeitiger und unabhängiger L-Arginin- und Pyruvattitration	42
3.2.5	<i>D-Oktopin-Bindung</i>	43
	3.2.5.1 D-Oktopin-Bindung vs. L-Arginin- und Pyruvat-Bindung	44
3.3	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE LAKTATDEHYDROGENASE AUS DEM SCHWEINEMUSKEL.....	46
3.3.1	<i>Coenzym-Bindung</i>	46
3.3.2	<i>Pyruvat-Bindung</i>	48
3.3.3	<i>L-Laktat-Bindung</i>	50
3.4	VERGLEICH DER SUBSTRATBINDUNG AN ODH UND LDH	53
4	DISKUSSION	56
4.1	REINIGUNG DER REKOMBINANTEN OKTOPINDEHYDROGENASE.....	57
4.2	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE REKOMBINANTE OKTOPINDEHYDROGENASE.....	57
4.2.1	<i>Coenzym-Bindung</i>	58
4.2.2	<i>L-Arginin- und Pyruvat-Bindung</i>	59
4.2.3	<i>D-Oktopin-Bindung</i>	63
4.3	UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE LAKTATDEHYDROGENASE AUS DEM SCHWEINEMUSKEL.....	64
4.3.1	<i>Coenzym-Bindung</i>	65
4.3.2	<i>Pyruvat- und L-Laktat-Bindung</i>	66
4.4	VERGLEICH DER SUBSTRATBINDUNG AN ODH UND LDH	69
4.5	KINETISCHER MECHANISMUS DER ODH-REAKTION.....	72
4.6	WELCHEN VORTEIL HAT ES, EINE OKTOPINDEHYDROGENASE ZU BESITZEN?.....	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	LITERATUR	79

ABKÜRZUNGEN

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
CENDH	<i>N</i> -(1-D-carboxylethyl)-L-norvalindehydrogenase
DC	Dünnschichtchromatographie
DSC	dynamische Differenzkalorimetrie
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IMAC	immobilisierte Metall-Ionen Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie
K_b	Bindungskonstante
K_d	Dissoziationskonstante
K_i	Inhibitionskonstante
LB	Luria Broth
LDH	Laktatdehydrogenase
MWCO	molecular weight cut-off
$NAD^+/NADH$	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert/reduziert)
NMR	nuclear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ODH	Oktopindehydrogenase
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

ABKÜRZUNGEN

rpm	rotations per minutes (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TRA	Triethanolaminhydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, $\mu\text{mol min}^{-1}$
ÜNK	Übernachtskultur

EIN- UND DREIBUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

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 kontraktiven 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).

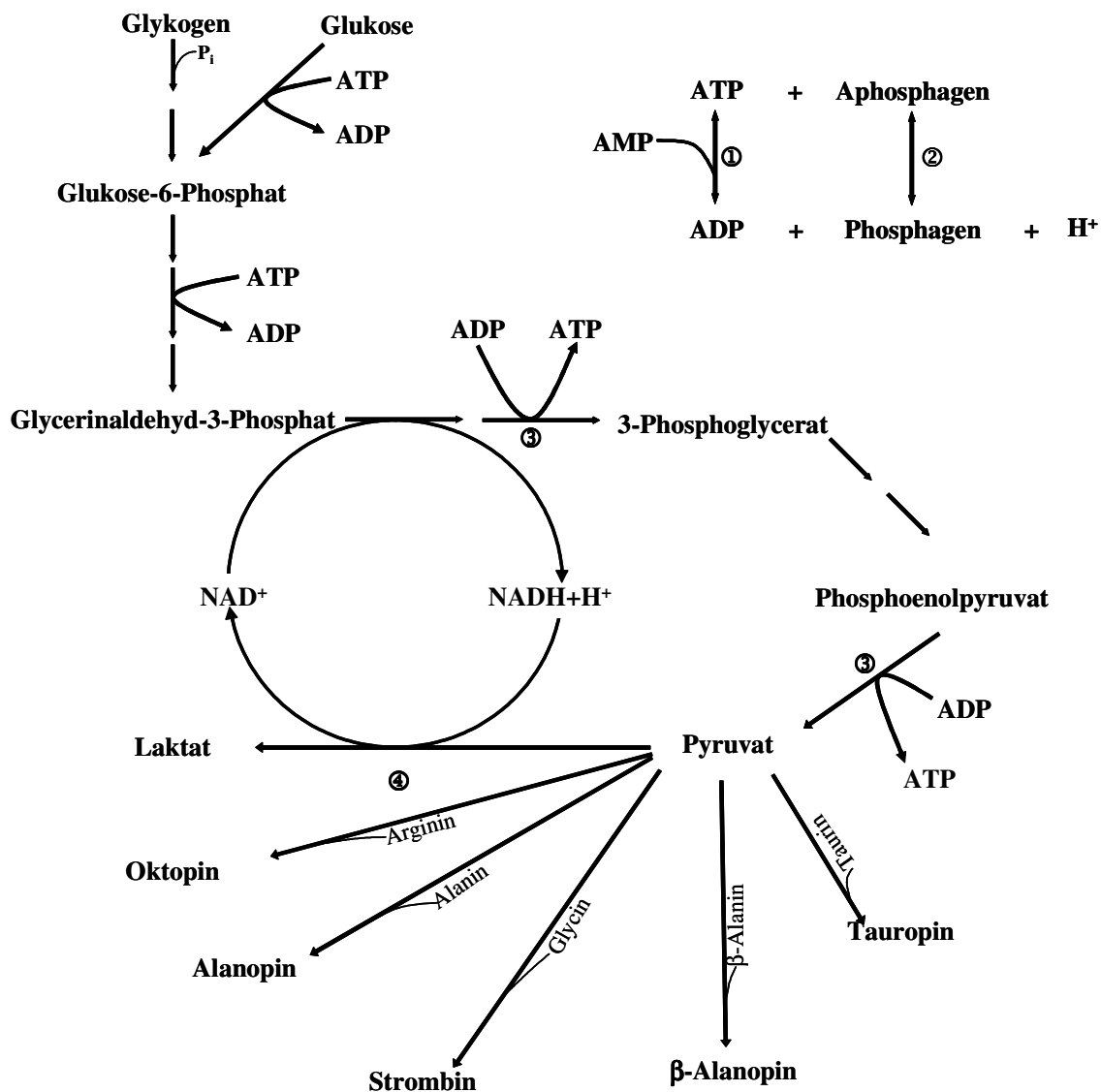


Abb. 1.1: Stoffwechselforgänge bei funktionsbedingter Anaerobiose. ① Adenylatkinasereaktion, ② Phosphagenkinasereaktion, ③ Substratkettenphosphorylierung, ④ Pyruvatoxidoreduktasen.

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 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. 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 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 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 H^+ , die reduktive Kondensation einer Aminosäure mit Pyruvat oder einer anderen α -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, N²-(1-carboxyethyl)-L-Arginin:NAD⁺-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 β -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 Untereinheiten 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).

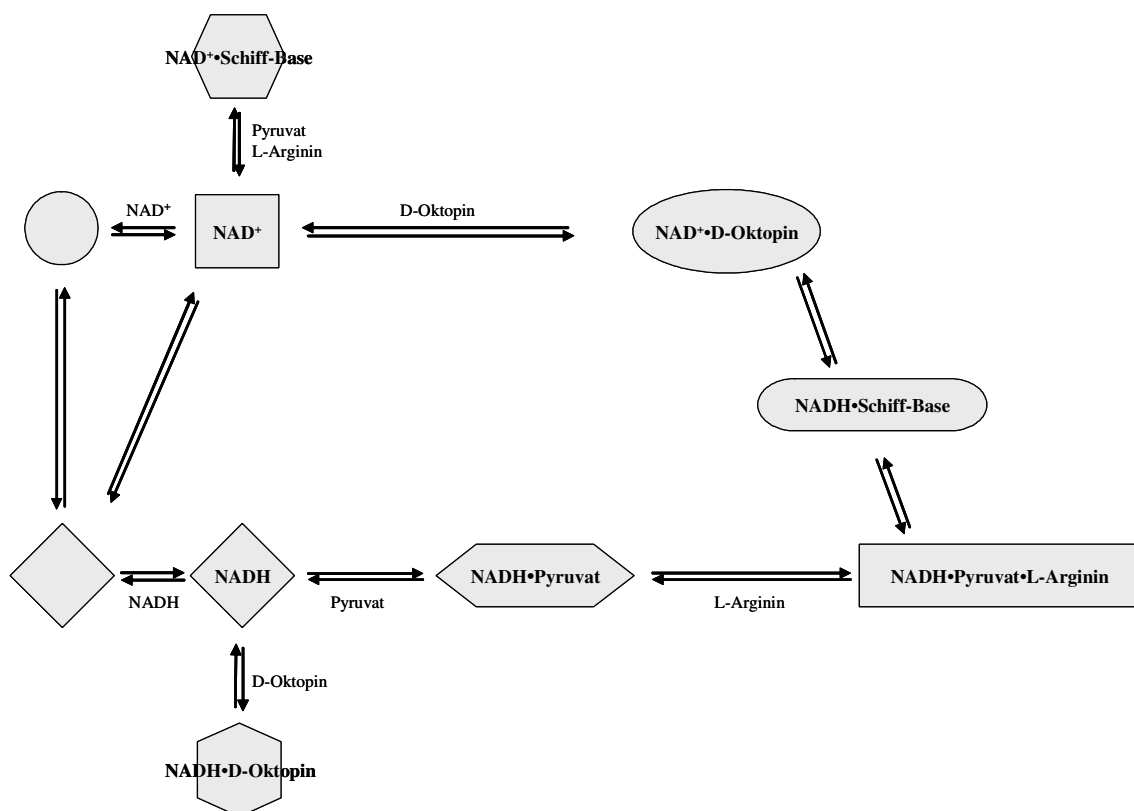


Abb. 1.2: Kinetischer Mechanismus der ODH-katalysierten Reaktion nach Monneuse-Doublet *et al.* (1977). Die Substratbindung erfolgt in einer geordneten Reihenfolge. Als erstes bindet das Coenzym, gefolgt von Pyruvat und L-Arginin. Die durch die Reaktion von Pyruvat und L-Arginin entstehende Schiff-Base 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⁺-Komplexes bzw. des ODH•NADH-Komplexes. Das Apoenzym kommt in zwei Konformationen vor, an die NAD⁺ 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⁺-Komplex binden. Folglich kann das Enzym durch einen Substratüberschuss gehemmt werden: Ein Überschuss von D-Oktopin hemmt die Regeneration von NAD⁺, 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.

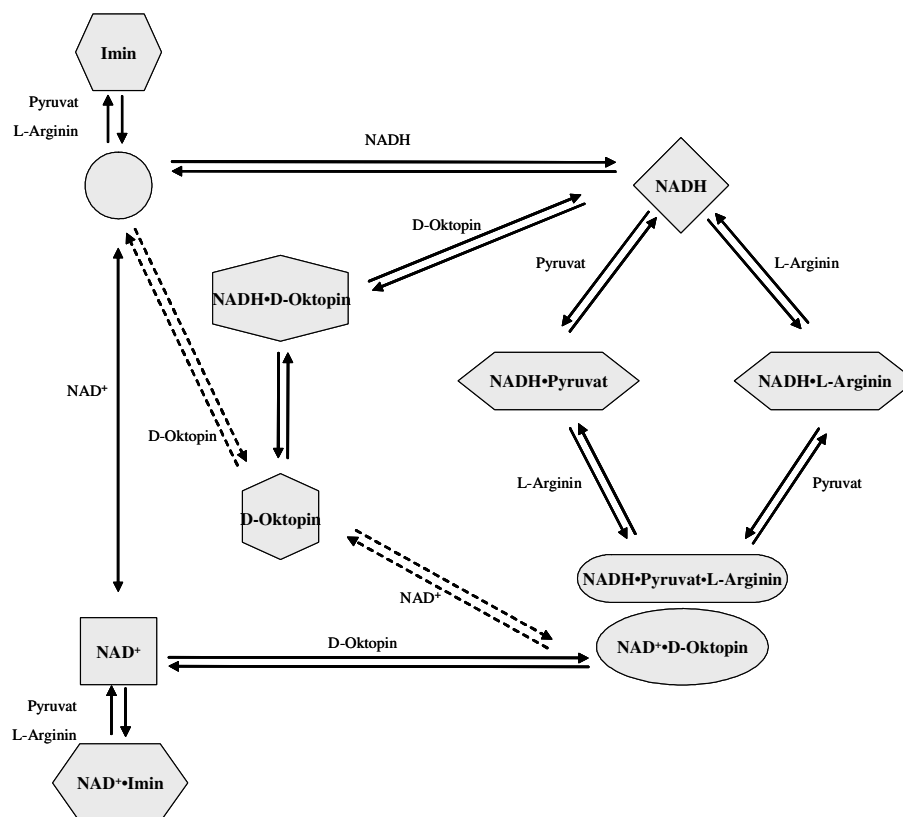


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der ODH-katalysierten Reaktion nach Schrimsher und Taylor (1984). Nach der Bindung des Coenzym binden Pyruvat und L-Arginin in zufälliger Reihenfolge. Das aus Pyruvat und L-Arginin gebildete Imin sowie D-Oktopin wirken als Inhibitoren des ODH•NAD⁺- bzw. des ODH•NADH-Komplexes. 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 (ΔH^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 (ΔS^0) und die freie Energie der Ligandenbindung (ΔG^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.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN

Alle verwendeten Chemikalien wurden mit dem erforderlichen Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen: Amersham-Pharmacia Biotech bzw. GE HealthCare (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Fluka (Neu-Ulm), J. T. Baker (Deventer, Niederlande), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), NEB (Frankfurt), Normapur (Leuven, Belgien), Novagen (Groningen, Niederlande), Qiagen (Hilden), Riedel de Haen (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

2.2 ÜBERPRODUKTION UND REINIGUNG DER ODH

2.2.1 *Sterilisation der erforderlichen Gefäße, Lösungen und Medien*

Die für die Anzucht und Kultur der Bakterien benutzten Glasgefäße und Medien wurden 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. War dies nicht möglich, wurden die Lösungen unter Verwendung von 0,22 µm Einwegfiltern (Pall Gelmann Laboratory, Ann Arbor, USA) sterilfiltriert.

2.2.2 *Herstellung elektrokompenter ER2566-Zellen*

Für die Herstellung der elektrokompenten Zellen wurden bei -80 °C gelagerte Zellen des Stammes ER2566 (NEB, Frankfurt) mit Hilfe einer sterilen Inokulationsöse auf einer LB-Agarplatte (0,5 % (w/v) Servabacter[®] Hefeextrakt, 1 % (w/v) Peptone (pankreatisch verdaut), 1 % (w/v) NaCl, 2 % Agar Agar, pH 7,0) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurden 4 mL LB-Medium (0,5 % (w/v) Servabacter[®] Hefeextrakt, pH 7,0, 1 % (w/v) Caseinhydrolysat (Peptone), 1 % (w/v) NaCl) mit einer Einzelkolonie angeimpft und die Bakterien über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad (Stufe 5,5, Gyrotory[®] Water Bath Shaker G76, New Brunswick Scientific, NJ, USA) angezogen. Am folgenden Tag wurden 200 mL LB-Medium mit 3 mL der ÜNK versetzt und 3,5 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Es folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 3.000 g und 4 °C (Zentrifuge Sorvall[®] RC5C Plus, Sorvall[®] Rotor F16/250). Das Bakterienpellet wurde anschließend in 0,5 Volumen eiskaltem entionisierten Wasser resuspendiert. Durch sechsmali-

ges Wiederholen des Waschschrilles wurden nahezu alle Elektrolyte aus der Suspension entfernt. Abschließend wurden die Zellen in 0,125 Volumen 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 30 μL Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3 *Transformation der E. coli-Zellen durch Elektroporation*

Für die Transformation wurden 30 μL elektrokompetente Zellen des Stammes ER 2566 mit dem Vektor versetzt und für etwa eine Minute auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels eines Spannungspulses von 2.500 V (Electroporator 2510, Eppendorf, Hamburg) in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (Equibio, Kent, GB). Anschließend wurden die Zellen in 1 mL LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg). Der Transformationsansatz wurde auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausplattiert und die Bakterien bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht angezogen.

2.2.4 *Anzuchtbedingungen des E. coli-Stammes für die Überproduktion der heterolog exprimierten ODH*

Zur Anzucht von Übernachtskulturen wurden 20 mL LB-Medium mit $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin versetzt. Anschließend wurde von einer LB-Agarplatte mit einer sterilen Öse eine einzelne Kolonie in das Medium überführt. Es folgte eine mindestens 15stündige Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 130 rpm im Inkubator (New Brunswick Scientific Co., No. 3.002.895, Edison, NJ, USA).

Für die Überexpression wurden acht 2 L-Kolben, deren Wände mit Schikanen versehen waren, mit 1000 mL LB-Medium gefüllt. Es wurde eine Ampicillinkonzentration von $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ eingestellt, die Ansätze mit je 2 mL Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur angeimpft und dann bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 inkubiert. Anschließend wurde mit $0,35\text{ mmol L}^{-1}$ IPTG die Expression der ODH induziert. Es folgte eine weitere Inkubation für 24 h bei $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 130 rpm. Nach der Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 20 min bei 5.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert (Zentrifuge Kontron Hermle ZK 400, Rotor Hermle A 6.9, St. Leon-Rot) und mit einem Ultraturax (IKA Labortechnik, Staufen) in Lysepuffer (50 mmol L^{-1} Na-Phosphatpuffer, pH 8,0, 300 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} Imidazol) resuspendiert. Die resuspendierten Zellpellets wurden bis zur Weiterverarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.5 Präparation der ODH

Das zuvor bei -20 °C gelagerte Bakterienpellet wurde nach dem Auftauen weiter mit Lysepuffer verdünnt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschall. Dazu wurden die Bakterien in einer Rosettenzelle mit einer Intensität von 25 % beschallt (Sonoplus HD2200, Titanteller TT13, Bandelin, Berlin). Die Beschallung erfolgte in sechs Intervallen von je 15 Sekunden mit jeweils 60 Sekunden Pause. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden für eine Stunde bei 88.500 g (Zentrifuge Sorvall[®] Ultra Pro 80, Rotor Sorvall[®] T-865) abgetrennt. Der ODH-haltige Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Das entstandene Pellet wurde ein weiteres Mal in Lysepuffer resuspendiert und per Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss erfolgte in bei -20 °C vorgekühlten Metallbechern in sechs Intervallen von je 15 Sekunden, dazwischen lag jeweils eine Pause von 45 Sekunden. Nach einer anschließenden einstündigen Zentrifugation bei 88.500 g (Zentrifuge Sorvall[®] Ultra Pro 80, Rotor Sorvall[®] T-865) wurden die Überstände beider Arbeitsschritte vereinigt.

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C oder auf Eis.

2.2.6 Reinigung durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie

In einem ersten chromatographischen Schritt wurde die ODH durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden) gereinigt. Hierbei wurden zwei Säulen (XK 26/20, Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet, die mit 55 mL bzw. 40 mL Ni-NTA Superflow gefüllt und an einen ÄKTA[™]explorer 100 (Pharmacia, Freiburg) angeschlossen waren. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Unicorn 3.0.

Vor der Probenapplikation wurde die Säule mit mindestens zwei Säulenvolumen Lysepuffer äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte mit einer Flussrate von $0,5\text{ mL min}^{-1}$. Nach der Probenapplikation wurde die Geschwindigkeit auf 1 mL min^{-1} erhöht und die Säule mit Lysepuffer gewaschen, bis ein Volumen von 500 mL erreicht worden war. Danach wurde der Fluss auf 2 mL min^{-1} erhöht und die Säule mit 500 mL Waschpuffer (50 mmol L^{-1} Na-Phosphatpuffer, pH 8,0, 300 mmol L^{-1} NaCl, 20 mmol L^{-1} Imidazol) gespült. Die Elution der ODH erfolgte innerhalb eines linearen, 500 mL langen Gradienten, in dessen Verlauf die Imidazolkonzentration von 20 auf 250 mmol L^{-1} gesteigert wurde.

Während des Laufes wurden 10 mL Fraktionen gesammelt und deren ODH-Aktivität bestimmt (s. 2.3.5). Die Fraktionen mit den höchsten ODH-Aktivitäten wurden anschließend

vereinigt und durch Druckfiltration in einer Amicon-Zelle (Model 52, Amicon Corp., Lexington, MA, USA) mit einer YM-10-Filtrationsmembran (10 kDa MWCO, Millipore, Eschborn) eingeengt.

Anstatt die Probe nach der Konzentrierung gegen Gelfiltrationspuffer zur Verringerung der Imidazolkonzentration zu dialysieren, wurde die Probe während des Einengens durch Druckfiltration umgepuffert. Nachdem das Volumen auf nur wenige Milliliter reduziert worden war, wurde mit circa 30 mL Laufpuffer für die Gelfiltration aufgefüllt und anschließend auf ein Endvolumen von circa 10 mL eingeengt. Abschließend wurde die Probe bei 43.800 g (Sorvall[®] RC M120EX, Rotor Sorvall[®] RP80 AT-136) und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert.

2.2.6.1 Regenerierung des Ni-NTA-Superflowmaterials

Das gepackte Säulenmaterial wurde nach je zwei Läufen gemäß Herstellerangaben regeneriert. Zwischen zwei Läufen wurde die verwendete Säule mit zwei Volumen entionisiertem Wasser gespült. Anschließend wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen 100 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0 gewaschen. Nachdem die Säule abermals mit zwei Volumen entionisiertem Wasser gespült worden war, konnte sie durch zwei Säulenvolumen 100 mmol L⁻¹ Nickelsulfat wieder mit Ni²⁺-Ionen beladen werden. Nach abschließendem Spülen mit Wasser wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen Lysepuffer äquilibriert.

2.2.7 Reinigung durch Größenausschlusschromatographie

Im zweiten chromatographischen Schritt wurde die ODH über eine Sephadex G-100 Gelfiltrationssäule (Ø 8 cm, Höhe 150 cm, Gelvolumen 7.500 mL) gereinigt. Die Säule war an eine Kolbenpumpe des Typs P-500 (Pharmacia, Freiburg) angeschlossen. Des weiteren umfasste das Chromatographiesystem einen Fraktionssammler (Foxy, Modell 2200, Colora Messtechnik GmbH, Ratingen) und einen Schreiber (Kipp und Zonen B.V., Delft, Niederlande).

Auf die mit Laufpuffer (50 mmol L⁻¹ K-Phosphatpuffer, pH 7,5, mit 2 mmol L⁻¹ EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 % 2-Mercaptoethanol) äquilibrierte Säule wurden zwischen 8 und 10 mL Probe aufgetragen. Die Flussrate betrug während des gesamten Laufs 1 mL min⁻¹. Es wurden 20 mL Fraktionen gesammelt und deren ODH-Aktivitäten bestimmt. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt und in einer Amicon-Zelle (Model 402, Amicon Corp., Lexington, MA, USA) mit einer YM-10-Filtrationsmembran (10 kDa MWCO) auf ein Volumen zwischen 8 und 15 mL eingeengt.

2.2.8 *Aktivitätsbestimmung*

Für die Bestimmung der ODH-Aktivitäten wurde der optisch-enzymatische Test nach Warburg und Christian (1936) verwendet, bei dem die Abnahme der NADH-Konzentration im zeitlichen Verlauf bei einer Wellenlänge von 339 nm gemessen wurde (Fields, 1976).

Der Reaktionsansatz enthielt 50 mmol L⁻¹ TRA, pH 7,5, 3 mmol L⁻¹ Pyruvat und 0,16 mmol L⁻¹ NADH sowie definierte Volumina der Enzymprobe unbekannter Aktivität. Nach einem Vorlauf zur Prüfung unspezifischer Dehydrogenase-Aktivitäten wurde die Reaktion durch Zugabe von L-Arginin (5,5 mmol L⁻¹) gestartet.

Die Messungen wurden an einem Uvikon 810 Spektralphotometer (BioTek, Neufahrn) bzw. einem Pharmacia Ultrospec 200-Photometer (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die Testtemperatur betrug 25 °C.

2.2.9 *Proteinbestimmung*

Die Durchführung der Proteinbestimmungen erfolgte nach Bradford (1976). Mittels BSA-Standards wurde zunächst eine Kalibrierungsgerade erstellt. Anschließend wurden je 800 µl der zu untersuchenden Proben mit 200 µL BioRad Reagenz (BioRad, München) versetzt und gemischt. Die Proben waren zuvor so mit entionisiertem Wasser verdünnt worden, dass ihre Proteinkonzentrationen im Bereich der Kalibrierungsgeraden lagen. Nach 20 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm an einem PharmaSpec UV 1700 Photometer (Shimadzu, Duisburg) gemessen.

2.2.10 *SDS-Gelelektrophorese*

Zur Kontrolle des Reinigungsverlaufs wurden während der einzelnen Reinigungsschritte entnommene Proben mittels einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Dabei wurden die Proteine zuerst in einem Sammelgel nach dem Prinzip der Isotachophorese konzentriert und dann in einem Trenngel nach dem Prinzip der Zonenelektrophorese getrennt (Davis, 1964; Ornstein, 1964). Die Proteine konnten anschließend durch verschiedene Verfahren im Gel sichtbar gemacht werden (s. 2.2.11).

Die Trennung erfolgte in einem Multiphor II-Elektrophoresesystem der Firma Pharmacia (Freiburg). Trenn- und Sammelgele wurden mittels gebrauchsfertiger Acryl- und Bisacrylamidlösungen (Roth, Karlsruhe) hergestellt und auf einen Trägerfilm (Gelbond PAG-Film, Pharmacia, Freiburg) gegossen.

Die bei der SDS-PAGE benutzten Sammelgele (4 %ig, Quervernetzung 3 %) enthielten $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ Tris/HCl, pH 6,8, 17,4 % (v/v) Glycerin und 0,1 % (w/v) SDS. Die 12 %igen Trenngele (Quervernetzung 3 %) enthielten $0,375 \text{ mol L}^{-1}$ Tris/HCl, pH 8,3, 3,5 % (v/v) Glycerin und 0,1 % (w/v) SDS. Als Laufpuffer diente 25 mmol L^{-1} Tris/HCl, pH 8,3, 192 mmol L^{-1} Glycin und 0,1 % SDS. Die zuvor mit Laufpuffer verdünnten Proben wurden im Verhältnis 1:3 mit Probenpuffer ($62,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Tris/HCl, pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS) versehen, für 3 min bei $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert und anschließend mit $0,13 \text{ mol L}^{-1}$ DTT versetzt. Jeweils $10 \mu\text{l}$ der Proben wurden auf das Gel aufgetragen.

Als molekularer Größenmarker wurde ein Gemisch aus β -Galaktosidase (116 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), LDH (35 kDa), Bsp981 (25 kDa), β -Laktoglobulin (18,4 kDa) und Lysozym (14,4 kDa) der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

Die Trennung der Proben erfolgte für circa eineinhalb bis zwei Stunden bei $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer maximalen Stromstärke von 50 mA, wobei die Spannung auf 600 V und die Leistung auf 30 W limitiert waren.

2.2.11 Nachweis der Proteine im Gel

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch verschiedene Verfahren im Gel sichtbar gemacht.

2.2.11.1 Coomassie-Färbung

In nativen Gelen und SDS-Gelen lassen sich getrennte Proteine nachweisen, indem sie mit Coomassie Brilliant-Blue gefärbt werden.

Zunächst wurden die Proteine mit 20 % (w/v) TCA im Gel gefällt und anschließend mit circa $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ warmer Coomassie-Lösung (0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blue R350, 10 % (v/v) Essigsäure) für 45-60 Minuten angefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

2.2.11.2 Silberfärbung

Einige Gele wurden zusätzlich zur Coomassie- einer Silberfärbung unterzogen. Hierfür wurde das SilverXpress[®] Kit (Novagen, Groningen, Niederlande) verwendet. Es wurde nach den Herstellerangaben verfahren.

2.3 OKTOPINSYNTHESE

2.3.1 Durchführung

Die Synthese des in die ITC-Experimente eingesetzten D-Oktopins erfolgte nach Tempé (1983). Es wurden 0,128 Mol L-Argininhydrochlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 600 mL entionisiertem Wasser bei 37 °C gelöst. Anschließend wurden 0,211 Mol Bariumhydroxid-Octahydrat hinzugegeben. Nachdem sich dieses gelöst hatte, wurden 0,137 Mol L-2-Brompropionsäure hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für circa 70 Stunden bei 37 °C gerührt. Danach wurden die im Ansatz befindlichen Bariumionen mit 9 N Schwefelsäure gefällt, bis ein pH-Wert von circa eins erreicht worden war. Das dabei entstandene unlösliche Bariumsulfat wurde durch eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4.700 g (Zentrifuge Kontron Hermle ZK 400, Rotor A 6.14) aus dem Reaktionsansatz entfernt.

Das entstandene D-Oktopin wurde über eine mit etwa 200 mL Dowex 50WX8 (H⁺-Form) gefüllte Säule von den übrigen im Reaktionsansatz befindlichen Substanzen gereinigt. Die mit einer Masterflex Pumpe (Cole-Parmer Instrument Company, USA) betriebene Säule wurde vor der Probenapplikation mit zwei Säulenvolumen 1 N HCL und anschließend mit dem zehnfachen Säulenvolumen entionisiertem Wasser gespült. Die Flussrate betrug durchgehend 2 mL min⁻¹.

Nachdem die Probe aufgetragen worden war, wurde die Säule mit Wasser gewaschen, bis in den Fraktionen (Fraktionssammler Foxy, Modell 2200, Colora Messtechnik GmbH, Ratingen) ein pH-Wert von vier gemessen wurde (pH-Meter PHM 92, Radiometer, Kopenhagen). Die folgende Umstellung auf 10 % (v/v) Ammoniumhydroxid als Laufmittel führte zu einem starken Anstieg des pH-Wertes in den Fraktionen. Mit der einsetzenden Elution des D-Oktopins ging wiederum ein rapides Absinken des pH-Wertes einher (Abb. 2.1).

Die sauren Fraktionen wurden vereinigt und unter Vakuum im Rotationsverdampfer (Rotavapor EL130, Büchi, Schweiz) eingengt. Der dadurch erhaltene weiße Feststoff wurde anschließend für zwei Tage im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet und dort bis zum Umkristallisieren unter Vakuum aufbewahrt.

Um die Reinheit des Oktopins zu erhöhen, sollte das Reaktionsprodukt zweimal umkristallisiert werden. Hierzu wurde der weiße Feststoff durch langsame Zugabe von Wasser unter Sieden gelöst und anschließend durch die Zugabe von 5 Volumen absoluten Ethanol präzipitiert. Die resultierende Lösung wurde über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Die Kristalle wurden abfiltriert und es wurde ein zweiter Kristallisationsschritt durchgeführt. Das Produkt

wurde anschließend über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet und dort bis zum Gebrauch unter Vakuum aufbewahrt.

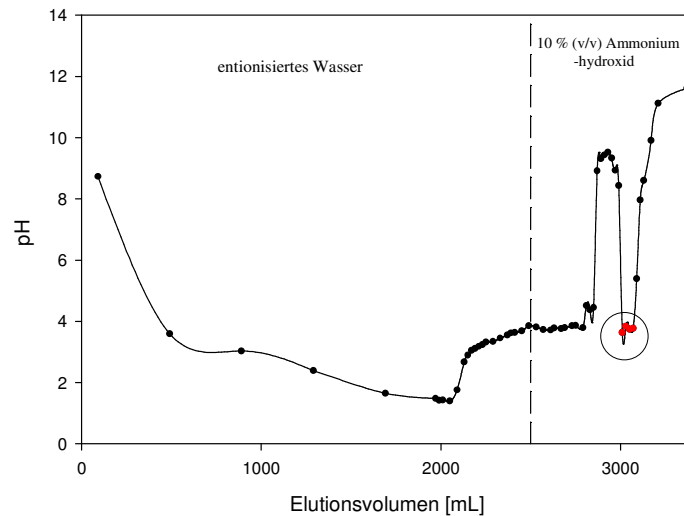


Abb. 2.1: pH-abhängiger Verlauf der Oktopin-Reinigung über einen Kationenaustauscher (Dowex 50WX8). Aufgetragen ist der pH-Wert der einzelnen Fraktionen in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen. Nach der Probenapplikation wurde die Dowex-Säule mit Wasser gewaschen, bis ein weitgehend konstanter pH-Wert von vier im Eluat erreicht worden war. Danach wurde auf 10 % (v/v) Ammoniumhydroxid als Laufmittel umgestellt (gestrichelte Linie), was zu einem kurzfristigen Anstieg des pH-Wertes führte. Die Elution des Oktopins ging mit einem Absinken des pH-Wertes einher. Die sauren Fraktionen (rot) sollten laut Literatur (Tempé, 1983) fast reines D-Oktopin enthalten. Es wurden 20 mL Fraktionen gesammelt.

2.3.2 Dünnschichtchromatographie

Der Verlauf der Oktopinsynthese wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Dem Reaktionsansatz wurden in unregelmäßigen Abständen Proben entnommen und auf Kieselgel-Platten (DC-Alufolien, Kieselgel 60 F254, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Um die im Reaktionsansatz enthaltenen Substanzen zu identifizieren, wurden zusätzlich L-Arginin (50 mmol L^{-1})-, L-Laktat (100 mmol L^{-1})- und D-Oktopin (50 mmol L^{-1})-Standards auf die DC-Platten aufgetragen. Die Platten wurden anschließend im kalten Luftstrom getrocknet und in mit Laufmittel (Butanol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 2:1:1) äquilibrierte DC-Kammern überführt.

Die Aminosäuren wurden durch Besprühen der DC-Platten mit einer 85 %igen (v/v in Ethanol) Ninhydrin-Lösung sichtbar gemacht (Ruhemann, 1911).

2.3.3 Bestimmung der Reinheit

Die Reinheit des Oktopins wurde mittels eines optisch-enzymatischen Tests bestimmt (Grieshaber, 1976). Hierbei wurde die Zunahme der NADH-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit bei einer Wellenlänge von 339 nm und einer Temperatur von 25 °C gemessen (Photometer Uvikon 810, BioTek, Neufahrn). Der Reaktionsansatz enthielt 20 mmol L⁻¹ Tris/HCl, 0,7 mmol L⁻¹ EDTA, 0,5 mol L⁻¹ Hydrazin, pH 9,0 und 2 mmol L⁻¹ NAD⁺ sowie definierte Volumina der D-Oktopin-Probe unbekannter Konzentration. Nach einem Vorlauf wurde die Reaktion durch Zugabe von ODH (70 U mL⁻¹) gestartet.

2.3.4 Ausbeute

Es wurden 3,2 g (13 mmol) einer weißen, kristallinen Substanz erhalten, deren enzymatisch bestimmter D-Oktopingehalt 99 % betrug.

2.4 MIKROKALORIMETRISCHE MESSUNGEN

Enzym-Substrat-Wechselwirkungen lassen sich heutzutage 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). Um einen umfassenden Einblick in die Thermodynamik der Ligandenbindung zu erhalten, bietet sich vor allem die isothermale Titrationskalorimetrie an (Holdgate, 2001). Jede chemische und biochemische Reaktion ist mit einer Enthalpieänderung (ΔH^0) verbunden, d. h. Wärme wird an die Umgebung abgegeben oder von ihr aufgenommen. Mittels Kalorimetrie kann diese Wärme direkt erfasst und somit auch die abgeleiteten Größen wie die Änderung der Entropie (ΔS^0) und der freien Energie (ΔG^0) berechnet werden. Als charakteristische Größe erhält man bei der isothermalen Titrationskalorimetrie die Bindungskonstante (K_b). Sie beschreibt die Stärke der Wechselwirkung zwischen einem Makromolekül und einem Liganden. Weiterhin ermöglicht es die Methode, die Anzahl der Bindungsplätze (n) des Makromoleküls für den Liganden zu bestimmen (Wiseman *et al.*, 1989; Freire *et al.*, 1990; Ladbury und Chowdry, 1996).

2.4.1 Messprinzip

Wichtig für das Verständnis der isothermalen Titrationskalorimetrie sind der Aufbau und das Prinzip eines Titrationskalorimeters (s. Abb. 2.2). Das Kalorimeter besteht aus zwei

identischen Zellen, einer Proben- und einer Referenzzelle, die in einen adiabatischen Mantel eingelassen sind. Zwischen diesen beiden Zellen besteht eine sehr kleine, genau messbare Temperaturdifferenz.

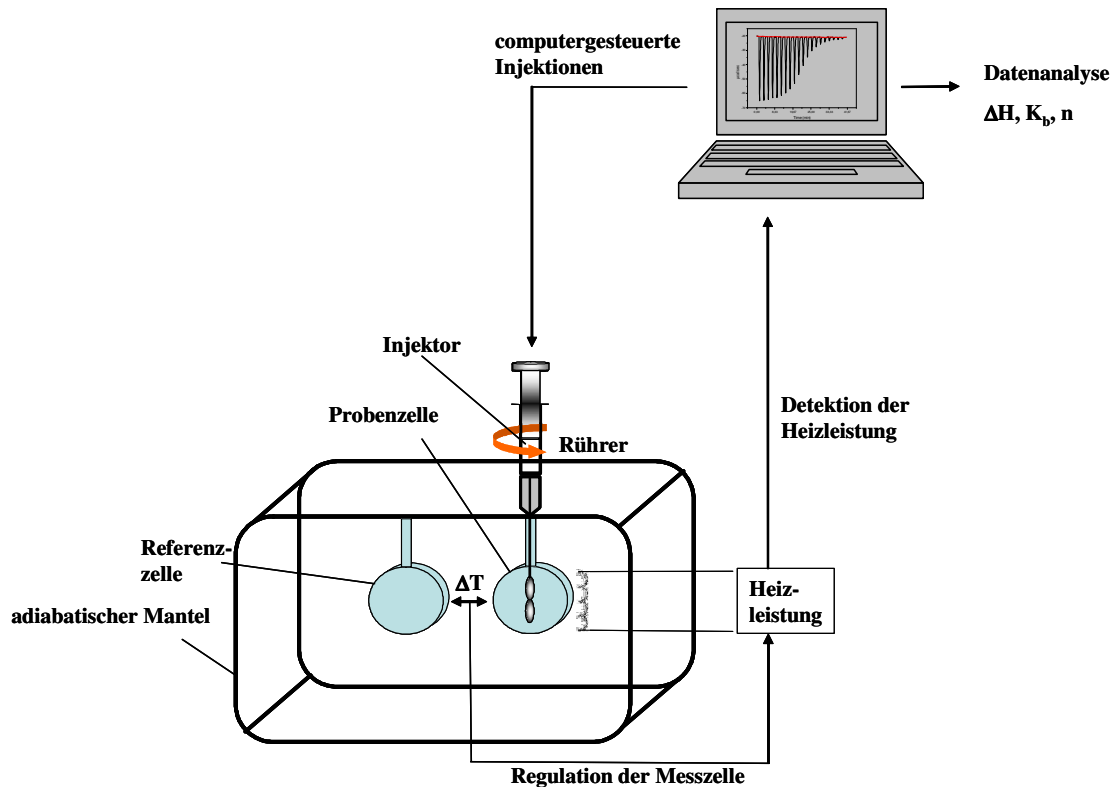


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters. Proben- und Referenzzelle sind in einen adiabatischen Mantel eingelassen. Während einer Messung werden beide Zellen jeweils mit einem kontrollier- und messbaren Heizstrom versorgt, um ihre Temperatur konstant (isotherm) zu halten. Geht die bei der Injektion eines Liganden ablaufende Reaktion mit einer Wärmeänderung einher, muss der Probenzelle eine entsprechend höhere oder geringere Wärmemenge zugeführt werden, um die Temperatur in der Probenzelle absolut konstant zu halten. Als Messsignal dient bei der isothermalen Titrationskalorimetrie der Heizstrom, welcher der Probenzelle zugeführt werden muss, um die Temperaturdifferenz (ΔT) zur Referenzzelle auszugleichen.

Während eines ITC-Experiments wird ein Bindungspartner (der Ligand, L) mittels einer computergesteuerten Dosiereinrichtung in eine Lösung eines anderen Bindungspartners (das Makromolekül, M) titriert, die sich in der Probenzelle des Kalorimeters befindet. Nach jeder Injektion wird die in der Probenzelle freiwerdende oder absorbierte Wärme im Vergleich zur Referenzzelle gemessen. Die gemessene Wärmedifferenz ist der Energiebetrag, der benötigt wird, um die beiden Zellen isotherm zu halten. Sie wird in Wärmeenergie pro Zeiteinheit ($\mu\text{cal s}^{-1}$) angegeben. Als Messsignal dient bei der isothermalen Titrationskalorimetrie

der Heizstrom, welcher der Probenzelle zugeführt werden muss, um die Temperaturdifferenz (ΔT) zur Referenzzelle wieder auszugleichen.

2.4.2 Theoretische Grundlagen der isothermalen Titrationskalorimetrie

Wie lässt sich nun aus den gemessenen Wärmeänderungen eine Bindungskonstante bestimmen? Die reversible Bindung eines Liganden, L , an ein Makromolekül, M , zu einem Protein-Liganden-Komplex, ML , lässt sich durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben:

$$(2.1) \quad K_b = \frac{[ML]}{[M][L]}.$$

Die Bindungskonstante, K_b , wird dabei durch drei Unbekannte dargestellt - $[M]$, $[L]$ und $[ML]$ - die nicht messbar sind. Es gilt daher, die Zahl der Unbekannten zu reduzieren.

Da die Gesamtkonzentration des Makromoleküls

$$(2.2) \quad [M]_{tot} = [M] + [ML]$$

und die Gesamtkonzentration des Liganden

$$(2.3) \quad [L]_{tot} = [L] + [ML]$$

bekannt sind, können die Konzentrationen des ungebundenen Proteins und des ungebundenen Liganden durch Auflösen der beiden Gleichungen 2.2 und 2.3 nach $[M]$ bzw. $[L]$ bestimmt und in das Massenwirkungsgesetz (2.1) eingesetzt werden. Dadurch ergibt sich eine quadratische Gleichung mit nur zwei Unbekannten: $[ML]$ und K_b

$$(2.4) \quad K_b = \frac{[ML]}{[M]_{tot}[L]_{tot} - ([L]_{tot} + [M]_{tot})[ML] + [ML]^2}.$$

Durch Auflösen der quadratischen Gleichung 2.4 nach $[ML]$ ergibt sich eine Funktion mit der Variablen K_b (2.5). Die Konzentration des Makromolekül-Liganden-Komplexes $[ML]$ ist sowohl von $[M]_{tot}$ und $[L]_{tot}$, als auch von der Bindungskonstante K_b abhängig:

$$([M]_{tot}[L]_{tot} - ([L]_{tot} + [M]_{tot})[ML] + [ML]^2) - \frac{[ML]}{K_b} = 0$$

$$[ML]^2 - ([L]_{tot} + [M]_{tot} + \frac{1}{K_b})[ML] + [M]_{tot}[L]_{tot} = 0.$$

Nach ziehen der Wurzel ergibt sich folgender Term für die Konzentration des Makromolekül-Liganden-Komplexes:

$$(2.5) \quad [ML] = \frac{[L]_{tot} + [M]_{tot} + \frac{1}{K_b} - \sqrt{([L]_{tot} + [M]_{tot} + \frac{1}{K_b})^2 - 4[M]_{tot}[L]_{tot}}}{2}$$

Während einer Titration wird die Wärmemenge gemessen, die bei jeder Erhöhung von $[L]_{tot}$ frei oder aufgenommen wird. Ausdrücken lässt sich dieses, in dem Gleichung 2.5 nach der Gesamtkonzentration des Liganden abgeleitet wird, wodurch sich folgender Ausdruck ergibt:

$$(2.6) \quad \frac{d[ML]}{d[L]_{tot}} = \frac{1}{2} + \frac{[M]_{tot} - \left(\frac{[L]_{tot} + [M]_{tot} + \frac{1}{K_b}}{2}\right)}{\sqrt{([L]_{tot} + [M]_{tot} + \frac{1}{K_b})^2 - 4[M]_{tot}[L]_{tot}}}$$

Zu der während des Versuchs aufgenommenen oder freigesetzten Wärmemenge wird der Ausdruck 2.6 durch die Gleichung

$$(2.7) \quad dq = \Delta H^0_{bind} \cdot d[ML] \cdot V_{cell}$$

in Beziehung gesetzt, wobei dq die Wärme ist, die bei der Bildung des Protein-Liganden-Komplexes frei wird. ΔH^0_{bind} ist die Bindungsenthalpie und V_{cell} beschreibt das Volumen der Kalorimeterzelle.

Die Wärmeänderung die bei der Bindung eines Liganden an ein Makromolekül stattfindet, lässt sich nach Einsetzen von $d[ML]$ in Gleichung 2.7 durch die sogenannte Wiseman-Isotherme (2.8) ausdrücken:

$$(2.8) \quad \frac{1}{V_{cell}} \cdot \frac{dq}{d[L]_{tot}} = \Delta H^0_{bind} \left(\frac{1}{2} + \frac{[M]_{tot} - \left(\frac{[L]_{tot} + [M]_{tot} + \frac{1}{K_b}}{2}\right)}{\sqrt{([L]_{tot} + [M]_{tot} + \frac{1}{K_b})^2 - 4[M]_{tot}[L]_{tot}}} \right)$$

In einem ITC-Experiment wird der Term $dq/d[L]_{tot}$ ermittelt. Dabei ist $dq/d[L]_{tot}$ nicht abhängig von der absoluten Konzentration des Makromoleküls $[M]_{tot}$ in der Zelle, sondern nur von dem Wert relativ zur Bindungskonstanten K_b und zur Gesamtkonzentration des Liganden

$[L]_{tot}$ in der Messzelle (Herleitung nach Wiseman *et al.*, 1989). Das bedeutet, dass der Verlauf einer solchen Bindungsisothermen für ein einfaches Bindungsmodell (*non interacting one site*-Modell) sich entsprechend zum Produkt aus Bindungskonstante, K_b , und Makromolekülkonzentration, $[M]_{tot}$, ändert. Das Produkt aus Bindungskonstante, K_b , und Makromolekülkonzentration, $[M]_{tot}$, wird auch als c -Wert bezeichnet

$$(2.9) \quad c = n \cdot K_b \cdot [M]_{tot}$$

wobei n die Anzahl der Bindungsplätze am Makromolekül beschreibt. In Abbildung 2.3 wird der Zusammenhang zwischen der Größe des c -Wertes und der Kurvenform der Bindungsisothermen verdeutlicht. Liegt der c -Wert zwischen 1 und 1000 ist eine Bestimmung der Bindungskonstante prinzipiell möglich (Wiseman *et al.*, 1989), wobei sich c -Werte zwischen 10 und 100 als optimal erwiesen haben (Sigurskjold, 1999).

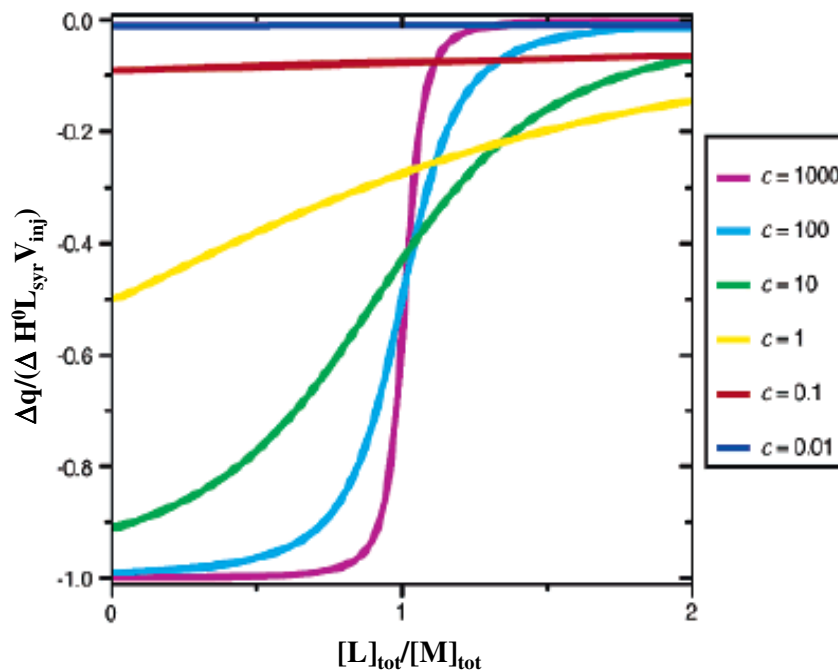


Abb. 2.3: Bindungsisothermen für verschiedene c -Werte. Der Verlauf einer Bindungsisothermen variiert mit c , dem Produkt aus Makromolekülkonzentration, $[M]_{tot}$, und Bindungskonstanten, K_b . Aufgetragen ist die Wärmerelaxation pro Injektion gegen das molare Verhältnis von Ligandenkonzentration zu Makromolekülkonzentration (Abbildung aus Turnbull und Daranas, 2003).

Bei einer starken Bindung des Liganden an das Makromolekül ($c > 500$) nähert sich die Bindungsisotherme einer Stufenfunktion an, die eine akkurate Bestimmung von K_b nicht

zulässt. Soll bei einer solch starken Bindung der c -Wert zwischen 10 und 100 liegen, darf nur mit geringen Makromolekülkonzentrationen gearbeitet werden. Dabei ist zu bedenken, dass mit abnehmenden Konzentrationen auch die Wärmetönungen abnehmen und das Detektionslimit des Kalorimeters schnell unterschritten wird.

Bei der Untersuchung schwacher Bindungen ($c < 10$) werden die Kurven zunehmend flacher und damit die Kurvenanpassungen fehlerhaft. Es werden auch bei den ersten Injektionen nicht alle Ligandenmoleküle gebunden, da das Gleichgewicht nicht völlig auf Seiten des Komplexes liegt. In diesem Fall ist die Kurvenanpassung fehlerbehaftet und die erhaltenen Informationen nicht brauchbar. Um auswertbare Bindungsisothermen zu bekommen, sind in der Regel hohe Proteinmengen erforderlich.

Turnbull und Daranas (2003) haben jedoch gezeigt, dass es auch für Systeme mit geringer Affinität ($c \ll 1$) möglich ist, ITC-Experimente mit entsprechendem Informationsgehalt zu konzipieren. Voraussetzung ist, dass der Ligand, L , im Überschuss eingesetzt wird. Nur dies garantiert eine schrittweise Sättigung der Bindungsplätze während der Titration. Des Weiteren sollte die Stöchiometrie der Komplexbildung bekannt sein. Aufgrund der einfacheren Form der Bindungsisothermen ist eine Bestimmung der Anzahl der Bindungsplätze nicht möglich (s. 2.4.3).

2.4.3 Datenanalyse

Bei der Titrationskalorimetrie wird die Bindungsisotherme aus der Reaktionswärme der beobachteten Reaktion ermittelt. Das Messsignal ist dabei der Heizstrom, der benötigt wird, um während einer Messung die Temperatur von Proben- und Referenzzelle isotherm zu halten. Die erhaltene Wärmetönung, aufgezeichnet in $\mu\text{cal s}^{-1}$, wird integriert und gegen das Verhältnis von Liganden- zu Makromolekülkonzentration aufgetragen. Abbildung 2.4 zeigt ein typisches ITC-Ergebnis. Die anschließende Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Marquardt Algorithmus) liefert die Werte für die Bindungskonstante, K_b , die Änderung der Bindungsenthalpie, ΔH^0 , die Änderung der Entropie, ΔS^0 , und die Anzahl der Bindungsplätze, n .

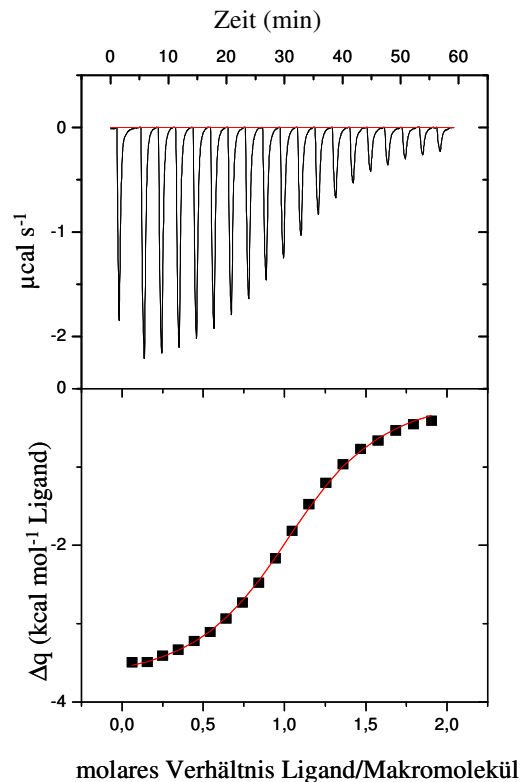


Abb. 2.4: Ergebnis eines ITC-Experiments. Die obere Hälfte der Abbildung zeigt anhand eines Beispiels die Rohdaten einer ITC-Messung. Jeder Peak zeigt die Wärmetönung ($\mu\text{cal s}^{-1}$), die bei der Injektion des Liganden in die Makromolekül-Lösung entsteht. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die integrierten Messsignale, wobei jeder Punkt das Integral eines Peaks darstellt. Die durch die Punkte gelegte Kurve ist das Ergebnis der Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Der Achsenabschnitt auf der Ordinate repräsentiert die Bindungsenthalpie, ΔH^0 . Aus dem Kurvenverlauf lässt sich die Bindungskonstante, K_b , und somit die Änderung der freien Energie, ΔG^0 , bestimmen.

Durch die Bestimmung der Bindungskonstanten und der Bindungsenthalpie lassen sich die Änderung der freien Energie und der Entropie ermitteln. Die freie Energie ist mit der Bindungskonstante durch die Beziehung

$$(2.10) \quad \Delta G^0 = -RT \ln K_b$$

verknüpft, wobei R für die allgemeine Gaskonstante in $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ und T für die absolute Temperatur in Kelvin steht. Die Bestimmung der Bindungskonstanten erlaubt es daher ΔG^0 zu berechnen. Ist ΔG^0 einmal bekannt, kann die Änderung der Entropie, ΔS^0 , mittels der Gibbs-Helmholtz-Gleichung

$$(2.11) \quad \Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

ermittelt werden (Wiseman *et al.*, 1989).

Zusätzlich zu den thermodynamischen Daten lässt sich durch eine ITC-Messung auch eine Aussage über die Stöchiometrie der beobachteten Reaktion machen. Die Stöchiometrie ist direkt aus der Bindungsisothermen abzulesen. Möglich ist dies aber nur, wenn innerhalb des experimentellen ‚c-Fensters‘ gemessen wird und am Ende eines Titrationsexperimentes die Gesamtkonzentration des Liganden höher ist als die Gesamtkonzentration des Makromoleküls. Nur dann ist der zur Bestimmung des Äquivalenzpunktes benötigte Sprung in der Titrationskurve deutlich zu erkennen.

Die Auswertung der ITC-Daten erfolgte mit Hilfe der Software Origin 7.0 (MicroCal Inc., Northampton, USA) unter Verwendung des ‚One Set of Sites‘-Modells, für gleiche, unabhängige Bindungsstellen.

Dabei ist zu erwähnen, dass bei der hier beschriebenen Kurvenanpassung das jeweils erste Integral nicht berücksichtigt wurde, da die erste Injektion stark fehlerbehaftet ist. Da es sich dabei um einen systematischen Fehler handelt (Mizoue und Tellinghuisen, 2003), wurde vor jeder Kurvenanpassung der erste Datenpunkt gelöscht.

2.4.4 Durchführung eines ITC-Experimentes

2.4.4.1 Probenvorbereitung

Vor dem Einsatz in ein ITC-Experiment wurde die isolierte ODH-5His über Nacht bei 4 °C gegen 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0 dialysiert. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration wurde das Volumen des Dialysats durch Ultrafiltration in Ultrafree-15 Zentrifugen-Filtereinheiten (NMGG 10 kDa, Millipore, Eschborn) reduziert. Anschließend wurde für 1 h bei 43.800 g und 4 °C zentrifugiert (Sorvall[®] RC M120EX, Rotor Sorvall[®] RP80 AT-136) und die Proteinkonzentration der ODH-Lösung nach Bradford (s. 2.3.6) bestimmt. Die im jeweiligen Experiment verwendeten Liganden und Substrate zur Sättigung des Enzyms wurden in dem Puffer angesetzt, gegen den zuvor dialysiert wurde.

Die LDH aus dem Schweinemuskel wurde von der Firma Roche (Mannheim) als Suspension in 3,2 mol L⁻¹ Ammoniumsulfat bezogen. Fünfzehn Milliliter dieser Suspension wurden für 72 h gegen drei mal einen Liter 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0 dialysiert. Nach Beenden der Dialyse wurde das Dialysat für 1 h bei 65.000 g und 4 °C (Zentrifuge Sorvall[®] Ultra Pro 80, Rotor Sorvall[®] T-865) zentrifugiert. Um die Proteinkonzentration der LDH-Lösung zu erhöhen, wurde diese durch Ultrafiltration in Ultrafree-15 Zentrifugen-Filtereinheiten (NMGG 30 kDa, Millipore, Eschborn) konzentriert. Anschließend wurde die LDH-Aktivität, wie in 2.2.7 beschrieben, bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt abweichend davon

50 mmol L⁻¹ Tris/HCl, pH 7,2 und 0,2 mmol L⁻¹ NADH sowie definierte Volumina der Enzymprobe unbekannter Aktivität. Nach einem Vorlauf zur Prüfung unspezifischer Dehydrogenase-Aktivitäten wurde die Reaktion durch Zugabe von Pyruvat (2 mmol L⁻¹) gestartet.

Sollte die Bindung eines Liganden an einen Enzym-Substrat-Komplex untersucht werden, wurde die Enzymlösung vor der Messung mit einer entsprechend konzentrierten Substratlösung versetzt. Bei Titrationsexperimenten mit ODH wurde jeweils eine zur Proteinmenge fünffache Substratkonzentration gewählt. Die LDH wurde hingegen mit einer zwanzigfachen Substratmenge versetzt.

Da die Sättigung eines Proteins mit einem Liganden aber nicht nur von der Konzentration beider Reaktanten, sondern auch von der Bindungskonstante abhängt, wurde die Konzentration des letztendlich vorliegenden Makromolekül-Liganden-Komplexes mit der Formel

$$(2.12) \quad [ML] = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{K_b} + [M]_{tot} + [L]_{tot} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \left(\frac{1}{K_b} + [M]_{tot} + [L]_{tot} \right)^2 - [L]_{tot} [M]_{tot}}$$

(Meyer und Peters, 2003) berechnet und nur diese Konzentration wurde bei der computergestützten Auswertung der Titrationsexperimente berücksichtigt.

Unmittelbar vor dem Einsatz in den Versuch wurden Protein- und Ligandenlösung durch Rühren unter Vakuum vollständig entgast (ThermoVac, MicroCal Inc., Northampton, USA), um so im Experiment störende Luftblasen vollständig zu entfernen.

2.4.4.2 Durchführung der Messung

Im Titrationsexperiment wurden 25 Aliquots der Ligandenlösung mit einem vorher festgelegten Volumen (10 µL) mittels eines 250 µL Injektors in die Messzelle injiziert, in der die ODH- bzw. LDH-Lösung vorgelegt wurde. Der Injektor rotierte zur Durchmischung der Liganden mit einer Geschwindigkeit von 310 rpm. In Abhängigkeit von der Stärke des Wärmesignals lag das Intervall zwischen zwei Injektionen bei 250 bis 360 Sekunden. Die Titrationsexperimente wurden bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt.

Die experimentell ermittelten Wärmesignale wurden integriert und anschließend um die Verdünnungswärmen korrigiert. Die Verdünnungswärmen wurden durch die Injektion des jeweiligen Liganden in Puffer oder in Substratlösung ermittelt. Um die Wärmesignale zu korrigieren, sollten zusätzlich die Verdünnungswärmen, die bei der Injektion von Puffer in Proteinlösung bzw. bei der Titration von Puffer in Puffer entstehen, bestimmt werden. Die dabei

entstehenden Wärmesignale sind jedoch gewöhnlich sehr klein und wurden daher in Anbetracht der zur Verfügung stehenden Proteinmenge vernachlässigt (O'Brien *et al.*, 2001).

2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der ITC-Messungen erfolgte mittels des Programms SigmaStat 3.1 (SPSS Inc., Chicago, USA). Jedes Titrationsexperiment wurde dreimal wiederholt. Die integrierten Daten wurden mittels eines Kruskal-Wallis ,*One Way Analysis of Variance on Ranks*'-Tests auf eine signifikante Abweichung überprüft, um Fehler bei der Probenvorbereitung auszuschließen. Nullwerte, d. h. Läufe, bei denen keine Ligandenbindung zu erkennen war, wurden jeweils zweimal durchgeführt und mittels eines t-Tests auf signifikante Abweichungen überprüft.

3 ERGEBNISSE

Mittels isothermaler Titrationskalorimetrie sollte die Bindungsreihenfolge der Substrate Pyruvat und L-Arginin an das aktive Zentrum der Oktopindehydrogenase aus *Pecten maximus* ermittelt werden. Des Weiteren wurde die Substratbindung der aus dem Schweinemuskel isolierten Laktatdehydrogenase untersucht. Der Vergleich der thermodynamischen Parameter der Substratbindung an ODH und LDH, sollte eine Aussage ermöglichen, warum gerade die LDH im Tierreich am weitesten verbreitet ist, wohingegen die ODH hauptsächlich bei marinen Invertebraten gefunden wird.

3.1 REINIGUNG DER REKOMBINANTEN OKTOPINDEHYDROGENASE

Eine Untersuchung der Substratbindung an die rekombinante Oktopindehydrogenase mittels isothermaler Titrationskalorimetrie erfordert es, das Enzym in höchstmöglicher Reinheit in die Experimente einzusetzen. Für die heterolog exprimierte ODH verlangte dieser Qualitätsanspruch nur zwei chromatographische Schritte. Der Verlauf einer solchen Reinigung wird im folgenden beispielhaft dargestellt.

Zunächst wurden 200 mL Rohextrakt, der aus einer acht Liter *E. coli*-Kultur erhalten wurde und eine Aktivität von 211.600 U sowie einen Proteingehalt von 2.090 mg aufwies, auf eine mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA Superflow-Säule aufgetragen. Die Elution der ODH erfolgte während eines linearen Imidazolgradienten von 20 auf 250 mmol L⁻¹ bei einer Imidazolkonzentration von ca. 40 mmol L⁻¹ (s. Abb 3.1 A). Die Fraktionen mit den höchsten ODH-Aktivitäten wurden vereinigt. Es resultierten 90 mL ODH-Lösung, deren Aktivität, mit einem Wert von 101.250 U, noch 48 % der aufgetragenen Aktivität entsprach. Der Proteingehalt der ODH-Lösung betrug 164 mg, womit dieser um 92 % gegenüber dem Proteingehalt des Rohextraktes gesunken war.

Die vereinigten Ni-Fraktionen wurden anschließend in einer Amicon-Zelle konzentriert. Nach diesem Schritt befanden sich 47 % der ursprünglichen Aktivität und 8 % des ursprünglichen Proteingehaltes in der Probe.

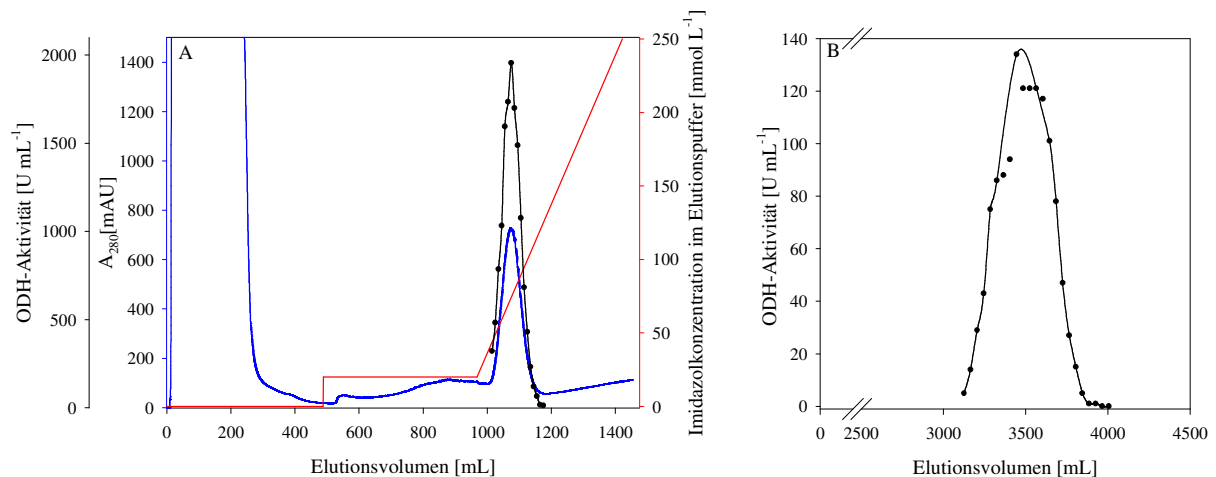


Abb. 3.1: ODH-Reinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie. (A) Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow. Aufgetragen sind die ODH-Aktivität [U mL⁻¹], die Absorption bei 280 nm [mAU] und die Imidazolkonzentration im Elutionspuffer [mmol L⁻¹] gegen das Elutionsvolumen [mL]. Appliziert wurden 200 mL Rohextrakt mit einer Gesamtaktivität von 211.600 U und einem Proteingehalt von 2.090 mg. Die Elution der ODH erfolgte innerhalb eines linearen, 500 mL langen Gradienten, durch den die Imidazolkonzentration von 20 auf 250 mmol L⁻¹ gesteigert wurde. Es wurden 10 mL Fraktionen gesammelt. (B) Größenausschlusschromatographie über Sephadex G-100. Dargestellt ist die ODH-Aktivität [U mL⁻¹] in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen [mL]. Es wurden 9,5 mL Probe mit einer Gesamtaktivität von 100.387 U und einem Proteingehalt von 157 mg aufgetragen. Die Fraktionsgröße betrug 20 mL.

Die weitere Reinigung der ODH erfolgte durch Größenausschlusschromatographie über Sephadex G-100. Es wurde ein Probenvolumen von 9,5 mL aufgetragen. Ab einem Elutionsvolumen von circa 3.100 mL begann die ODH zu eluieren. Dabei nahm die Aktivität in den einzelnen Fraktionen kontinuierlich zu. Bei einem Elutionsvolumen von knapp 3.500 mL wurde ein Aktivitätsmaximum von 134 U mL⁻¹ erreicht. Danach fiel die ODH-Aktivität in den Fraktionen wieder stetig ab. Das Elutionsprofil der Reinigung über Sephadex G-100 zeigt Abbildung 3.1 B. Wiederum wurden die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten vereinigt. Nach diesem Reinigungsschritt konnten eine Gesamtaktivität von 77.700 U und ein Proteingehalt von 120 mg bestimmt werden.

Das Volumen der ODH-Lösung wurde anschließend durch Ultrafiltration reduziert, wonach noch 28 % der ursprünglichen Aktivität und 4 % des ursprünglichen Proteingehalts vorhanden waren. Es resultierte ein Endprodukt mit einer Gesamtaktivität von 59.783 U und einem Proteingehalt von 91 mg, woraus sich eine spezifische Aktivität von 658 U mg⁻¹ ergab. Der Reinigungsfaktor betrug 6,5.

Der Verlauf der ODH-5-His-Reinigung aus *E. coli* wird nochmals in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1: Reinigungsprotokoll einer ODH-5-His-Reinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie

Reinigungsschritt	Volumen [mL]	Aktivität [U mL ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	200	1.058	211.600	100	10,5	2.090	100	101	1,0
Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Superflow	90	1.125	101.250	48	1,8	164	8	618	6,1
Ni-NTA Fraktionen vereinigt und konzentriert	9,5	10.567	100.387	47	16,5	157	8	640	6,3
Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-100	420	185	77.700	37	0,3	120	6	649	6,4
konzentriertes Endprodukt	11	5.314	59.783	28	8,1	91	4	658	6,5

Durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde die Reinheit der ODH überprüft. In der SDS-PAGE zeigte sich nach Coomassie- bzw. Silberfärbung eine distinkte Bande einer Größe von knapp unter 45 kDa.

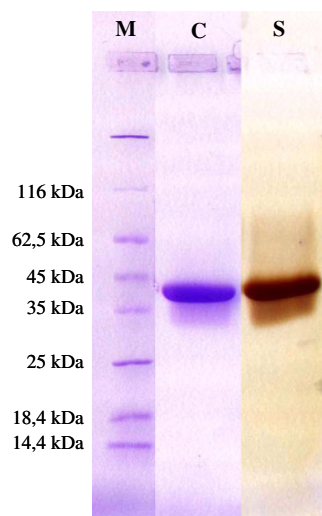


Abb. 3.2: Gelelektrophoretische Kontrolle der ODH-Reinheit. Elektrophoretisiert wurde konzentrierte ODH-Lösung nach IMAC und Größenausschlusschromatographie. Es wurden 4,1 ng Protein aufgetragen. Die Detektion der Proteine im Gel erfolgte durch Coomassie- (C) bzw. Silberfärbung (S). (M) bezeichnet den molekularen Größenmarker.

3.2 UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE REKOMBINANTE OKTOPIN-DEHYDROGENASE AUS *PECTEN MAXIMUS*

Für die Bestimmung der Bindungsreihenfolge der verschiedenen Substrate an die ODH, wurden diese oder deren Analoga zu substratfreiem Enzym und zu verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexen titriert.

Die erhaltenen Bindungsisothermen wurden unter Verwendung des einfachsten Bindungsmodells (*One Set of Sites*) ausgewertet. Die Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Marquardt Algorithmus) lieferte Werte für die Bindungskonstante, K_b , die Änderung der Bindungsenthalpie, ΔH^0 , und der Entropie, ΔS^0 , wodurch sich auch die freie Energie der Bindung, ΔG^0 , berechnen ließ. Die Anzahl der Bindungsplätze konnte nur für die Coenzym-Bindung bestimmt werden, da es nur in diesem Fall möglich war, im sogenannten ‚c-Fenster‘ zu arbeiten. In allen anderen Fällen wurde von einer 1:1 Stöchiometrie ausgegangen und die Anzahl der Bindungsplätze auf $n = 1$ festgelegt (s. Kap. 2.4.2 und 2.4.3).

3.2.1 Coenzym-Bindung

Die Untersuchung der Coenzym-Bindung an die rekombinante Oktopindehydrogenase erfolgte durch die Titration einer NADH- bzw. NAD⁺-Lösung zu substratfreier ODH-Lösung. Die daraus resultierenden Bindungsisothermen sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen wurden in beiden Fällen drei sigmoide Kurven erhalten.

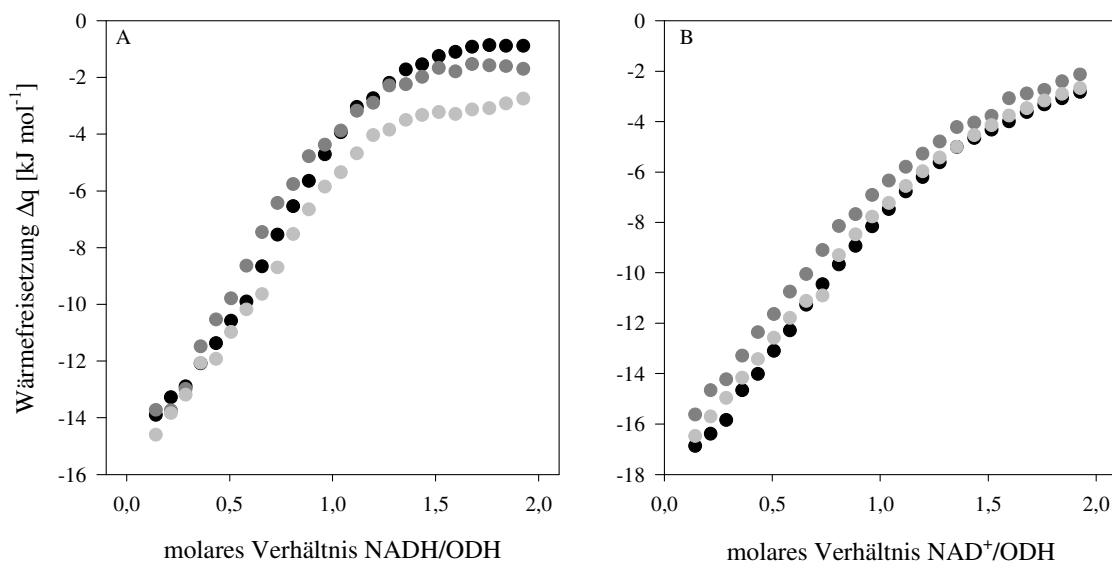


Abb. 3.3: Wärmefreisetzung Δq [kJ mol^{-1} Ligand] beim Titrieren von NADH (A) und NAD⁺ (B) zu rekombinanter ODH aus *Pecten maximus*. Gezeigt sind die integrierten Signale von 25 Injektionen à 10 μL einer 1,75 mmol L^{-1} NADH-Lösung in eine 0,175 mmol L^{-1} ODH-Lösung (A) sowie von 25 Injektionen à 10 μL einer 5 mmol L^{-1} NAD⁺-Lösung in eine 0,5 mmol L^{-1} ODH-Lösung (B). Es wurden jeweils drei Titrationsexperimente in 100 mmol L^{-1} HEPES, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt.

Die Auswertung der Bindungsisothermen für die NADH-Titrationen lieferte eine Bindungskonstante, K_b , mit einem Wert von $7 \cdot 10^4 \pm 3,3 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Für die NAD⁺-Bindung wurde eine um den Faktor 13 geringere Bindungskonstante von $5,5 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$

ermittelt. Beide Formen des Coenzym zeigen eine unterschiedlich starke Wärmetönung bei der Bindung an das Enzym, die mit einem ΔH^0 -Wert von $-15,0 \pm 1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die NADH-Bindung und von $-24,7 \pm 0,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die NAD^+ -Bindung, beide exotherm sind (s. Abb. 3.4). Der entropische Beitrag zur NADH-Bindung fällt mit $\Delta S^0 = 41,7 \pm 8,7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ positiv aus, wohingegen die Entropieänderung bei der NAD^+ -Bindung mit $\Delta S^0 = -11,1 \pm 2,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ negativ ist. In der Abbildung 3.4 ist für beide Bindungen der entropische Term, $-T\Delta S$, in kJ mol^{-1} dargestellt, wobei für die NADH-Bindung ein Wert von $-12,4 \pm 2,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für die NAD^+ -Bindung ein Wert von $3,3 \pm 0,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet werden konnte. Aus diesen Angaben ließ sich für die NADH-Bindung eine Änderung der freien Energie (ΔG^0) von $-27,5 \pm 1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnen. Der ΔG^0 -Wert für die NAD^+ -Bindung entsprach einem Wert von $-23,1 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Für die Anzahl der Bindungsplätze (n) ergab sich für NADH ein Wert von $n = 0,8 \pm 0,07$ und für NAD^+ ein Wert von $n = 0,9 \pm 0,04$. Da davon ausgegangen wird, dass sowohl bei der Hin- als auch bei der Rückreaktion das Coenzym als erstes Substrat bindet (Doublet und Olomucki, 1975a & b; Monneuse-Doublet *et al.*, 1977; Schrimsher und Taylor, 1984), wurden zur NADH- bzw. NAD^+ -Bindung keine weiteren Experimente durchgeführt.

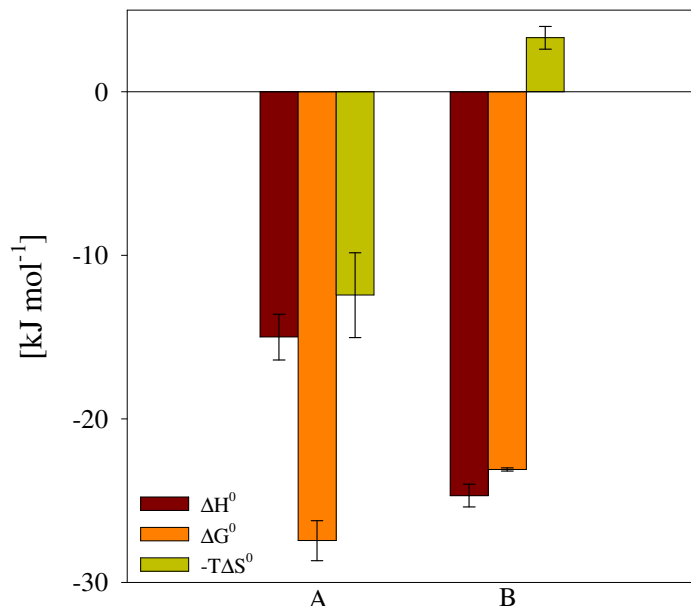


Abb. 3.4: Thermodynamische Parameter der Bindung von NADH (A) und NAD^+ (B) an ODH. Gezeigt werden die Werte für ΔG^0 , ΔH^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol^{-1} bei 25 °C und pH 7,0. Der entropische Term, $-T\Delta S^0$, beschreibt dabei die Differenz aus der freien Energie, ΔG^0 , und der Bindungsenthalpie, ΔH^0 . Die eingezeichneten Fehler sind die Standardabweichungen aus drei Experimenten.

3.2.2 L-Arginin-Bindung

Um das Bindungsverhalten von L-Arginin an die ODH zu untersuchen, wurde dieses sowohl zu substratfreier ODH als auch zu verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexen titriert. Bei der Titration von L-Arginin zu substratfreier ODH (s. Abb. 3.5 A) war keine für eine Bin-

dungsreaktion typische Änderung der Wärmetönung zu beobachten. Eine Bestimmung der thermodynamischen Parameter ließ sich deshalb nicht durchführen. Die Titration von L-Arginin zum ODH•NADH-Komplex zeichnete sich durch exotherme Wärmesignale aus. In der Abbildung 3.5 B sind die integrierten Wärmesignale Δq in kJ mol^{-1} L-Arginin gegen das molare Verhältnis von L-Arginin zum ODH•NADH-Komplex aufgetragen. Es resultierten hyperbole Bindungsisothermen. Die Mittelwerte der thermodynamischen Parameter für die L-Arginin-Bindung an den ODH•NADH-Komplex bei 25 °C und pH 7,0 aus drei unabhängigen Titrationsexperimenten sind: $K_b = 181 \pm 22 \text{ L mol}^{-1}$, $\Delta H^0 = -12,5 \pm 1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 1,1 \pm 4,6 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und $\Delta G^0 = -12,9 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Anzahl der Bindestellen wurde bei der Kurvenanpassung auf eins festgesetzt, da der c -Wert für dieses Experiment lediglich bei 0,05 lag.

Bei der Titration von L-Arginin zum ODH•NAD⁺-Komplex (s. Abb. 3.5 C) konnten hingegen nur kleine Wärmesignale beobachtet werden. Aufgrund der geringen Enthalpieänderung war eine Kurvenanpassung nicht möglich.

Befand sich neben ODH und NAD⁺ jedoch Pyruvat mit in der Messzelle (s. Abb. 3.5 D), führte jede Injektion eines Aliquots L-Arginin zu einem exothermen Wärmesignal. Die Integration der Wärmesignale ergab eine hyperbole Kurve. Während der Anpassungsroutine wurde aufgrund der schwachen Bindung von L-Arginin an den ODH•NAD⁺-Komplex die Anzahl der Bindungsplätze wiederum auf eins fixiert. Unter den gegebenen Bedingungen wurde für die Bindungskonstante ein Wert von $K_b = 314 \pm 31 \text{ L mol}^{-1}$ erhalten. Die Berechnung von ΔG^0 ergab einen Wert von $-14,2 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Für die Änderung der Bindungsenthalpie (ΔH^0) wurde durch die Kurvenanpassung ein Wert von $-29,7 \pm 1,9 \text{ kJ mol}^{-1}$, für die Änderung der Entropie (ΔS^0) ein Wert von $-52,0 \pm 5,5 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bestimmt.

Zur weiteren Charakterisierung der L-Arginin-Bindung wurde L-Arginin zu einer ODH-Lösung titriert, die zuvor mit NADH und Oxamat versetzt worden war (s. Abb. 3.5 E). Oxamat, das Halbamid-Salz der Oxalsäure, hemmt die Laktatdehydrogenase-Aktivität kompetitiv zu Pyruvat (Wilkinson und Walter, 1974). Daher sollte hier mit Hilfe des Oxamats ein ternärer Komplex ODH•NADH•Pyruvat simuliert, der Ablauf der enzymatischen Reaktion bei der Arginin-Bindung jedoch verhindert werden. Die Enthalpieänderung betrug bei dieser Reaktion $-18,6 \pm 1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Als Bindungskonstante ergab sich ein Wert von $138 \pm 4 \text{ L mol}^{-1}$. Die daraus abgeleiteten Werte für die Änderung der freien Energie und der Entropie betragen $\Delta G^0 = -12,2 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S^0 = -21,5 \pm 14,4 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter erfolgte unter der Bedingung, dass $n = 1$ ist, da das Produkt aus K_b , n , und der Proteinkonzentration $[M]_{tot}$ zu gering war ($c = 0,04$).

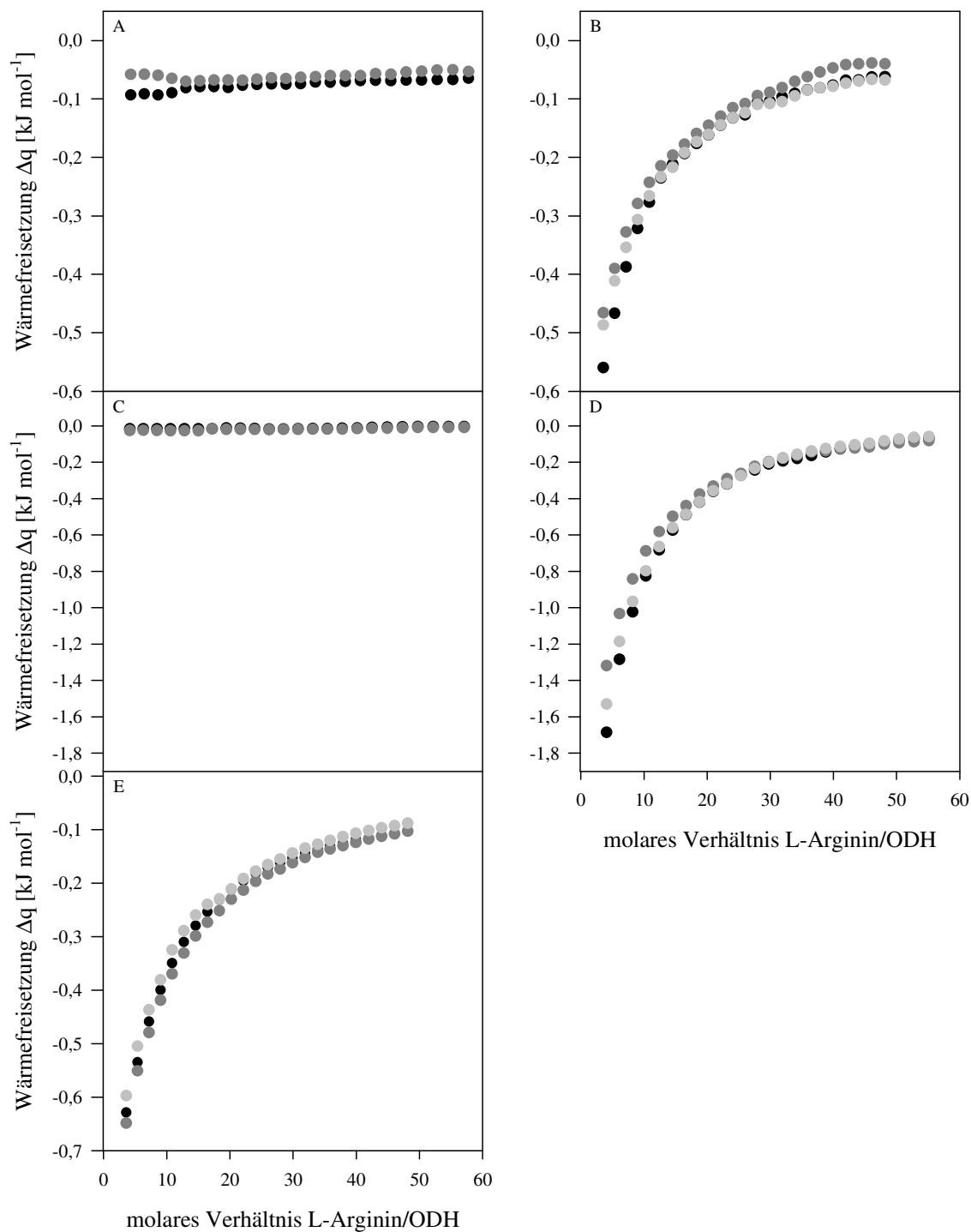
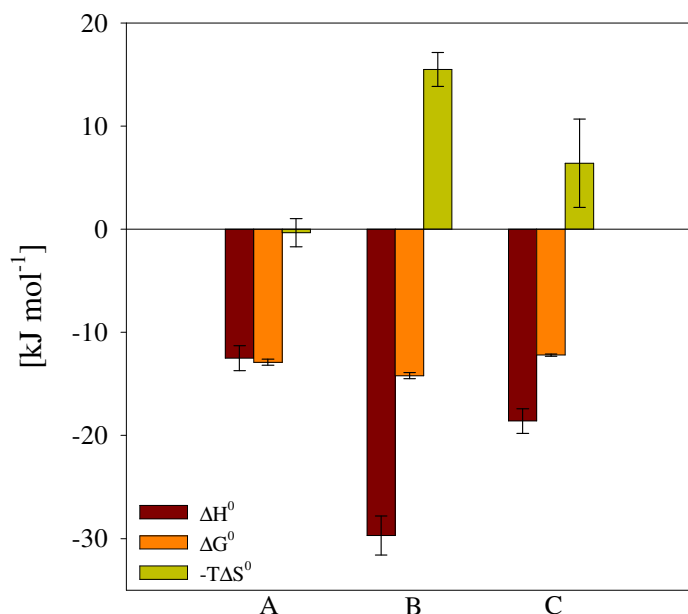


Abb. 3.5: L-Arginin-Bindung an ODH. Alle Versuche wurden in 100 mmol L⁻¹ HEPES-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt. Jede Titration umfasste 25 Injektionen. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL, die Zeit zwischen jeder Injektion 240 s. Gezeigt sind die integrierten Signale für folgende Titrationen (A) 150 mmol L⁻¹ L-Arginin in 0,5 mmol L⁻¹ ODH, (B) 75 mmol L⁻¹ L-Arginin in 0,3 mmol L⁻¹ ODH mit einer NADH-Konzentration von 1,5 mmol L⁻¹, (C) 150 mmol L⁻¹ L-Arginin in 0,5 mmol L⁻¹ ODH in Anwesenheit von 2,5 mmol L⁻¹ NAD⁺, (D) 75 mmol L⁻¹ L-Arginin in 0,3 mmol L⁻¹ ODH mit 1,5 mmol L⁻¹ NAD⁺ und 1,5 mmol L⁻¹ Pyruvat bzw. (E) mit 1,5 mmol L⁻¹ NADH und 1,5 mmol L⁻¹ Oxamat.

Ein Vergleich der thermodynamischen Parameter für die L-Arginin-Bindung an verschiedene Enzym-Substrat-Komplexe zeigt, dass die freien Energien, ΔG^0 , aller Reaktionen, mit Werten zwischen $-12,2 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $-14,2 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$, ähnlich sind. Jedoch spalten sie sich in unterschiedliche entropische ($-T\Delta S^0$) und enthalpische (ΔH^0) Anteile auf (s. Abb. 3.6). Während für die Bindung von L-Arginin an ODH in Gegenwart von NAD^+ und Pyruvat ein ΔH^0 von $-29,7 \pm 1,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden konnte, war die Wärmeänderung (ΔH^0) für die L-Arginin-Bindung an ODH in Anwesenheit von NADH bzw. in Anwesenheit von NADH und Oxamat mit $-12,5 \pm 1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $-18,6 \pm 1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ kleiner. Dementsprechend ließ sich für die L-Arginin-Bindung an ODH in Gegenwart von NAD^+ und Pyruvat, mit einem ΔS^0 von $15,0 \pm 1,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ der positivste entropische Term berechnen.

Abb. 3.6: Vergleich der thermodynamischen Parameter für die L-Arginin-Bindung an verschiedene Enzym-Substrat-Komplexe. Dargestellt sind ΔH^0 , ΔG^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol^{-1} für die Bindung von L-Arginin an ODH in Anwesenheit von (A) NADH, (B) NAD^+ und Pyruvat (C) NADH und Oxamat. Die Versuche wurden in 100 mmol L^{-1} HEPES-Puffer, pH 7,0 bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die eingezeichneten Fehler sind die Standardabweichungen aus je drei Experimenten.



3.2.3 Pyruvat-Bindung

Zur Bestimmung der Reihenfolge der Substratbindung wurde die Bindung von Pyruvat an substratfreie ODH und an einige mögliche Enzym-Substrat-Komplexe untersucht. Sowohl die Titrations von Pyruvat zu substratfreier ODH als auch zum ODH•NADH-Komplex bzw. zum ODH• NAD^+ -Komplex (s. Abb. 3.7 A, B und C) lieferten keine auf eine typische Bindungsreaktion hindeutenden Wärmesignale. Demzufolge war auch eine Kurvenanpassung zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter nicht möglich.

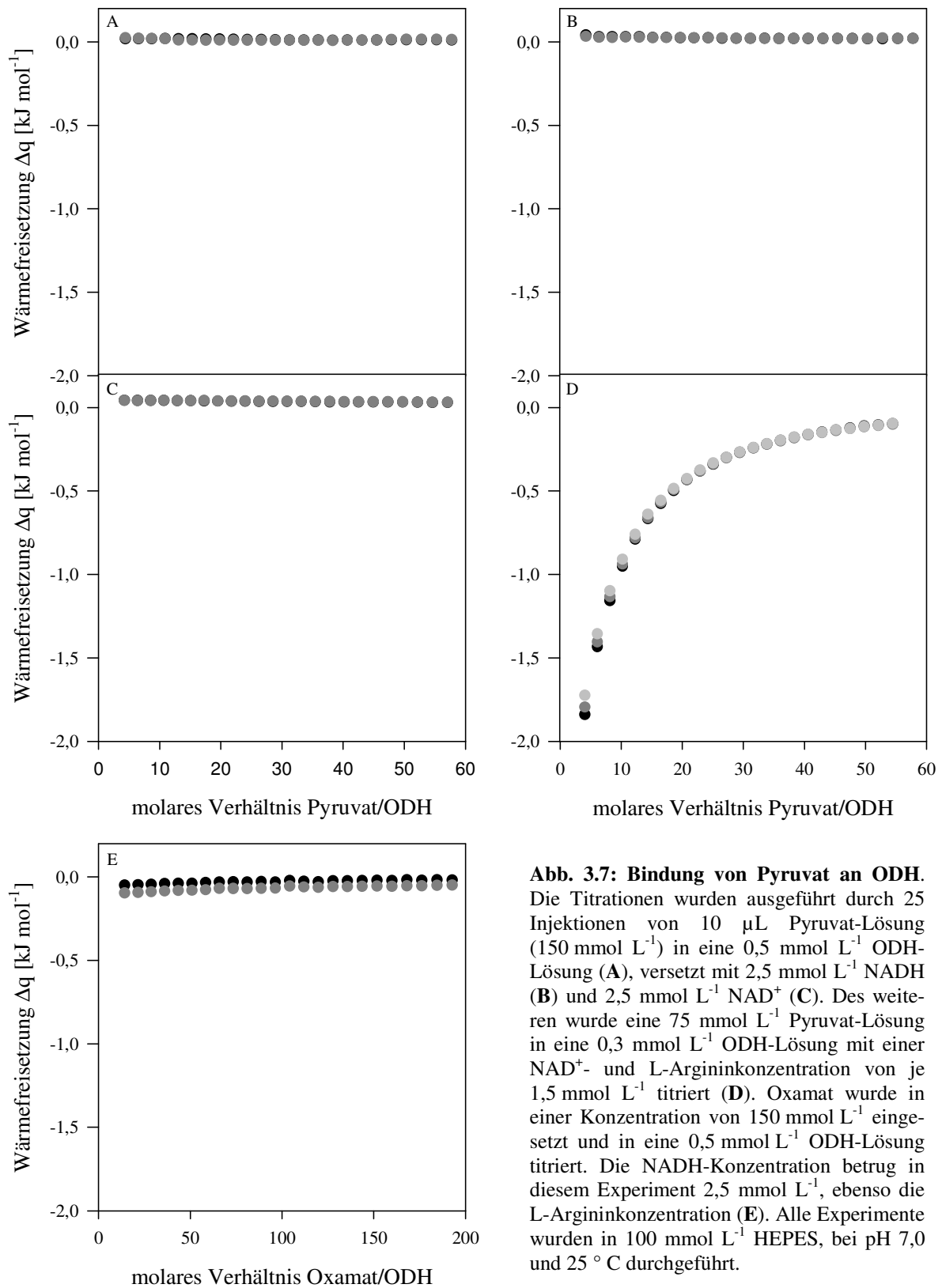


Abb. 3.7: Bindung von Pyruvat an ODH. Die Titrations wurden ausgeführt durch 25 Injektionen von 10 μ L Pyruvat-Lösung (150 mmol L^{-1}) in eine $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ODH-Lösung (**A**), versetzt mit $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NADH (**B**) und $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NAD⁺ (**C**). Des weiteren wurde eine 75 mmol L^{-1} Pyruvat-Lösung in eine $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ ODH-Lösung mit einer NAD⁺- und L-Argininkonzentration von je $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ titriert (**D**). Oxamat wurde in einer Konzentration von 150 mmol L^{-1} eingesetzt und in eine $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ODH-Lösung titriert. Die NADH-Konzentration betrug in diesem Experiment $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, ebenso die L-Argininkonzentration (**E**). Alle Experimente wurden in 100 mmol L^{-1} HEPES, bei pH 7,0 und $25 \text{ }^\circ \text{C}$ durchgeführt.

Lediglich die Titration von Pyruvat in eine ODH-Lösung, die zuvor mit NAD^+ und mit L-Arginin versetzt wurde (s. Abb. 3.7 D), lieferte auswertbare, hyperbole Bindungsisothermen. Die Anpassungsroutine wurde unter der Annahme durchgeführt, dass die Anzahl der Bindungsplätze (n) gleich eins ist. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen wurde eine Bindungskonstante von $K_b = 282 \pm 35 \text{ L mol}^{-1}$ ermittelt, wodurch für die freie Energie ein Wert von $\Delta G^0 = -14,0 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet werden konnte. Die Änderung der Bindungsenthalpie (ΔH^0) betrug $-38,1 \pm 2,7 \text{ kJ mol}^{-1}$. Der Entropieänderung (ΔS^0) entsprach einem Wert von $-80,8 \pm 10,1 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Die Titration des Pyruvatanalogs Oxamat zu einem ternären Komplex ODH•NADH•L-Arginin (s. Abb. 3.7 E) lieferte keine auswertbaren Wärmesignale.

3.2.4 Bindungsverhalten bei gleichzeitiger L-Arginin- und Pyruvatinjektion

Einen weiteren Einblick in den kinetischen Mechanismus der ODH-Reaktion sollte die simultane Injektion von L-Arginin und Pyruvat gewähren. Abbildung 3.8 A zeigt das Ergebnis einer simultanen Injektion von Pyruvat und L-Arginin in substratfreie ODH-Lösung. Es war keine für eine Bindungsreaktion übliche Änderung der Wärmetönung zu beobachten. Abbildung 3.8 B zeigt hingegen das Resultat einer simultanen Injektion von Pyruvat und L-Arginin zum ODH•NAD⁺-Komplex. In diesem Fall ließ sich eine exotherme Änderung der Wärmetönung nachweisen. Mit der Akkumulation von Pyruvat und L-Arginin in der Messzelle sank die Wärmefreisetzung mit der fortschreitenden Sättigung des binären Komplexes. Es resultierte eine annähernd hyperbole Bindungsisotherme. Obwohl es sich bei der betrachteten Titration um eine simultane Injektion einer 1:1 Mischung zweier Substrate handelte, wurde die Kurvenanpassung mit dem einfachsten Bindungsmodell durchgeführt, da beide Substrate in diesem Fall als ein Ligand behandelt werden können (Perozzo *et al.*, 2000). Die Mittelwerte der thermodynamischen Parameter bei 25 °C und pH 7,0 aus drei unabhängigen Titrationsexperimenten sind: $K_b = 327 \pm 55 \text{ L mol}^{-1}$, $\Delta H^0 = -47,5 \pm 4,9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = -134,9 \pm 20,1 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und $\Delta G^0 = -14,3 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Anzahl der Bindestellen wurde bei der Kurvenanpassung auf eins festgesetzt, da der c -Wert für dieses Experiment lediglich bei 0,09 lag.

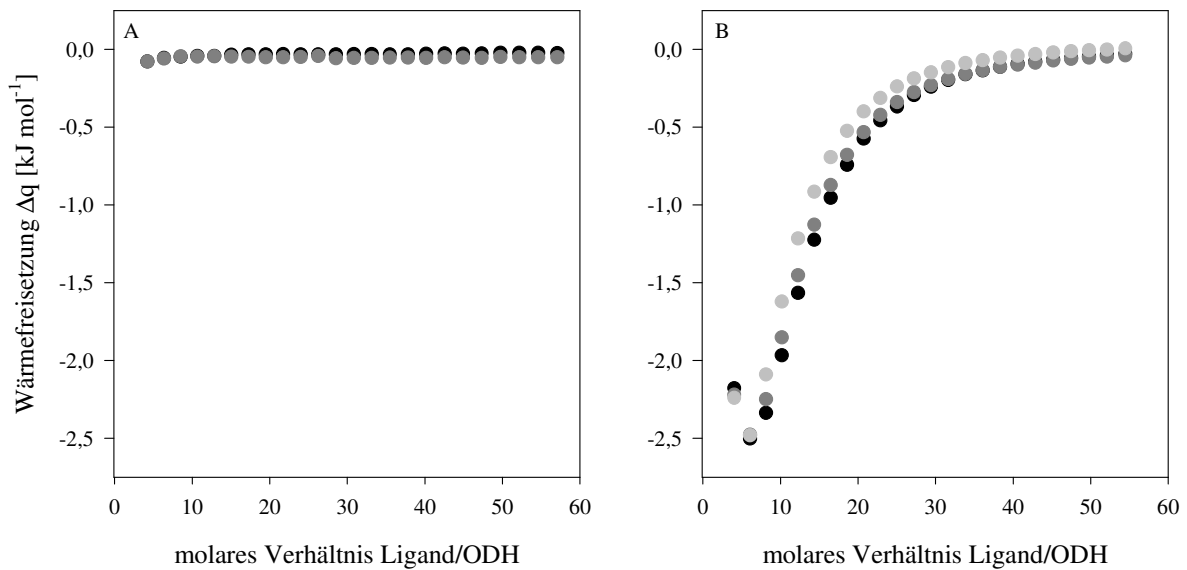


Abb. 3.8: Simultane Injektion von L-Arginin und Pyruvat. Dargestellt ist die Wärmefreisetzung Δq [kJ mol⁻¹ Ligand] beim Titrieren von 150 mmol L⁻¹ Pyruvat und 150 mmol L⁻¹ L-Arginin zu einer 0,5 mmol L⁻¹ ODH-Lösung (A) und von 75 mmol L⁻¹ Pyruvat und 75 mmol L⁻¹ L-Arginin zum ODH•NAD⁺-Komplex (0,26 mmol L⁻¹) (B). Gezeigt sind die integrierten Signale von 25 Injektionen à 10 μ L, im Abstand von 240 s. Die Titrationsen erfolgten in 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0 bei 25 °C.

3.2.4.1 Vergleich der thermodynamischen Parameter bei gleichzeitiger und unabhängiger L-Arginin- und Pyruvattitration

An dieser Stelle bietet es sich an, die thermodynamischen Parameter zu vergleichen, die durch simultane sowie unabhängige L-Arginin- und Pyruvattitrationsen bestimmt wurden (s. Abb. 3.9).

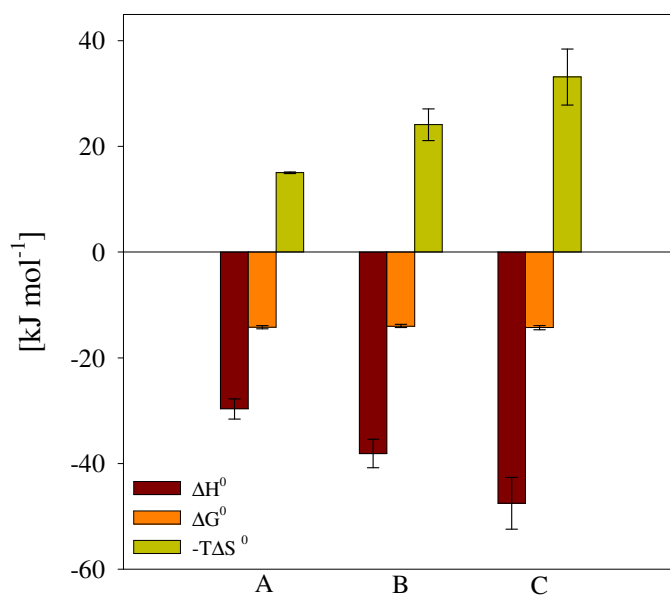


Abb. 3.9: Thermodynamische Parameter für die Bindung von L-Arginin und Pyruvat an ODH. Alle thermodynamischen Parameter wurden durch Kurvenanpassung mit dem ‚One Set of Sites‘-Modell für identische, unabhängige Bindestellen erhalten. Die Anzahl der Bindungsplätze wurde dabei auf $n = 1$ festgelegt. Dargestellt sind die thermodynamischen Parameter ΔH^0 , ΔG^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol⁻¹ für (A) die Bindung von L-Arginin an ODH in Anwesenheit von NAD⁺ und Pyruvat, (B) die Bindung von Pyruvat an ODH in Anwesenheit von NAD⁺ und L-Arginin sowie für (C) die Bindung von L-Arginin und Pyruvat an ODH in Anwesenheit von NAD⁺. Alle Versuche wurden in 100 mmol L⁻¹ HEPES-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt. Die eingezeichneten Fehler sind die Standardabweichungen aus je drei Experimenten.

Dabei wird deutlich, dass die freien Energien, ΔG^0 , für alle drei Bindungen nahezu gleich sind und in einem Bereich von $-14,2 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ liegen. Die freien Energien spalten sich jedoch für jede Bindung in unterschiedliche enthalpische und entropische Anteile auf. Während für die L-Arginin-Bindung in Anwesenheit von NAD^+ und Pyruvat ein ΔH^0 von $-29,7 \pm 1,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden konnte, ließ sich für die Pyruvat-Bindung in Gegenwart von NAD^+ und L-Arginin ein negativeres ΔH^0 von $-38,1 \pm 2,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmen. Nach gleichzeitiger L-Arginin- und Pyruvatinjektion konnte ein wiederum negativeres ΔH^0 von $-47,5 \pm 4,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ ermittelt werden. Dementsprechend wirkte sich dieses auf den entropischen Term aus.

3.2.5 D-Oktopin-Bindung

Letztendlich sollte die Untersuchung der D-Oktopin-Bindung weiteren Aufschluss über die Reihenfolge der Substratbindung geben. Dazu wurde D-Oktopin, das Substrat der Rückreaktion, sowohl zu substratfreier ODH als auch zum binären Komplex aus ODH und NADH titriert. Wie bei allen anderen Substraten, waren bei der Titration zur substratfreien ODH keine nennenswerten Wärmesignale zu beobachten (s. Abb. 3.10 A).

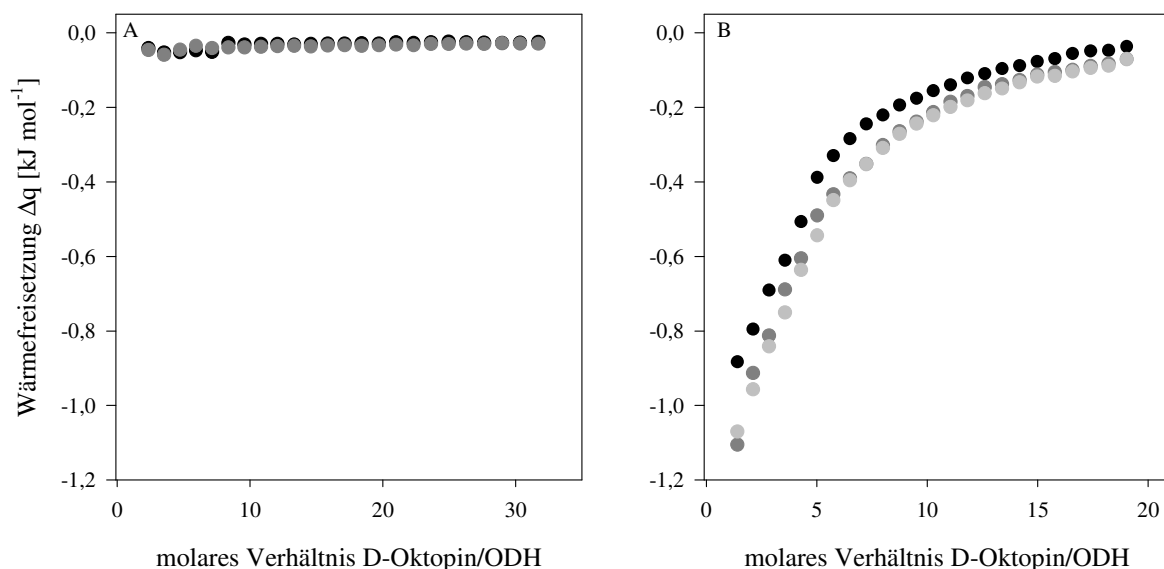


Abb. 3.10: Wärmefreisetzung Δq [kJ mol^{-1}] bei der Titration von D-Oktopin zu rekombinanter ODH aus *Pecten maximus*. Gezeigt sind die integrierten Signale von 25 Injektionen à $10 \mu\text{L}$ einer 50 mmol L^{-1} D-Oktopin-Lösung in eine $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ ODH-Lösung (A) sowie von 25 Injektionen à $10 \mu\text{L}$ einer 15 mmol L^{-1} D-Oktopin-Lösung in eine $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ ODH-Lösung in Anwesenheit von $0,75 \text{ mmol L}^{-1}$ NADH (B). Es wurden jeweils drei Titrationsexperimente in 100 mmol L^{-1} HEPES, pH 7,0 bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

In Anwesenheit des Coenzym NADH konnte jedoch eine exotherme Reaktion beobachtet werden (s. Abb. 3.10 B). Unter den gegebenen Bedingungen wurde wiederum eine hyperbole Bindungsisotherme erhalten, deren Analyse die thermodynamischen Parameter $K_b = 1,3 \cdot 10^3 \pm 1,4 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$, $\Delta H^0 = -9 \pm 1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 29,3 \pm 5,7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und $\Delta G^0 = -17,3 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ lieferte.

3.2.5.1 D-Oktopin-Bindung vs. L-Arginin- und Pyruvat-Bindung

Ein Vergleich der komplementären Bindungsreaktionen von D-Oktopin an den binären Komplex ODH•NADH sowie von L-Arginin und Pyruvat an den binären Komplex ODH•NAD⁺ zeigt, dass sie sich hinsichtlich ihrer thermodynamischen Parameter deutlich unterscheiden. Die Werte für die freie Energie (ΔG^0) zeigen mit $-17,3 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die D-Oktopin-Bindung und $-14,3 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die simultane L-Arginin- und Pyruvat-Bindung eine vergleichsweise geringe Differenz, während sich die Werte für die Bindungsenthalpien (ΔH^0) mit $-9 \pm 1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die D-Oktopin-Bindung und $-47,5 \pm 4,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die L-Arginin- und Pyruvat-Bindung jedoch erheblich unterscheiden. Entsprechend wirkt sich dieses auf den entropischen Term ($-T\Delta S^0$) aus, der für die D-Oktopin-Bindung bei $-8,7 \pm 1,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für die L-Arginin- und Pyruvat-Bindung jedoch bei $33,15 \pm 5,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ liegt (s. Abb. 3.11).

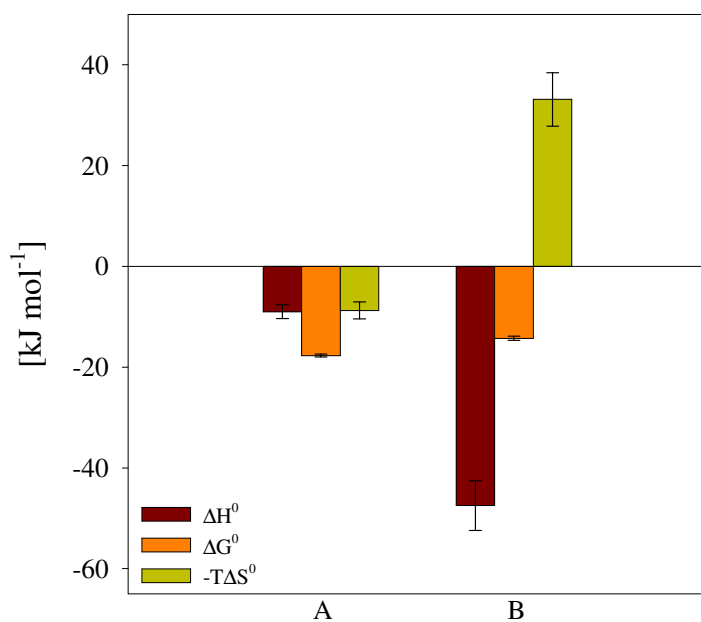


Abb. 3.11: D-Oktopin-Bindung vs. L-Arginin- und Pyruvat-Bindung. Gezeigt werden die thermodynamischen Parameter (ΔH^0 , ΔG^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol^{-1}) für die komplementären Bindungsreaktionen von D-Oktopin an den binären Komplex ODH•NADH (A) und von L-Arginin und Pyruvat an den binären Komplex ODH•NAD⁺ (B). Alle thermodynamischen Parameter wurden durch Kurvenanpassung mit dem ‚One Set of Sites‘-Modell für identische, unabhängige Bindestellen erhalten. Die Anzahl der Bindungsplätze wurde dabei auf $n = 1$ festgelegt. Die Versuche wurden in 100 mmol L^{-1} HEPES-Puffer, pH 7,0 bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die eingezeichneten Fehler sind die Standardabweichungen aus je drei Experimenten.

Die Tabelle 3.2 fasst die thermodynamischen Parameter der Substratbindung an die rekombinante Oktopindehydrogenase aus *Pecten maximus* zusammen.

Tab. 3.2: Apparente thermodynamische Parameter der Substratbindung an ODH bei 25 °C in 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0. Die freie Energie, ΔG^0 , wurde durch die Formel $\Delta G^0 = -RT \ln K_b$ berechnet, wobei K_b der mittels ITC bestimmten Bindungskonstante entspricht. Der entropische Term, $-T\Delta S^0$, beschreibt dabei die Differenz aus der freien Energie, ΔG^0 , und der Bindungsenthalpie, ΔH^0 . Dargestellt sind Mittelwerte aus n = 3 Messung \pm Standardabweichung.

Titrationsexperiment	K_b [L mol ⁻¹]	ΔG^0 [kJ mol ⁻¹]	ΔH^0 [kJ mol ⁻¹]	$-T\Delta S^0$ [kJ mol ⁻¹]
NADH in ODH	$7,0 \cdot 10^4 \pm 3,2 \cdot 10^4$	$-27,5 \pm 1,2$	$-15,0 \pm 1,4$	$-12,4 \pm 2,6$
NAD ⁺ in ODH	$5,5 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^2$	$-23,1 \pm 0,1$	$-24,7 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,7$
L-Arginin in ODH	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
L-Arginin in ODH + NADH	181 \pm 22	$-12,9 \pm 0,3$	$-12,5 \pm 1,2$	$-0,3 \pm 1,4$
L-Arginin in ODH + NAD ⁺	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
L-Arginin in ODH + NAD ⁺ + Pyruvat	314 \pm 31	$-14,2 \pm 0,3$	$-29,7 \pm 1,9$	15,0 \pm 1,6
L-Arginin in ODH + NADH + Oxamat	138 \pm 4	$-12,2 \pm 0,1$	$-18,6 \pm 1,2$	6,4 \pm 4,3
Pyruvat in ODH	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Pyruvat in ODH + NADH	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Pyruvat in ODH + NAD ⁺	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Pyruvat in ODH + NAD ⁺ + L-Arginin	282 \pm 35	$-14,0 \pm 0,3$	$-38,1 \pm 2,7$	24,1 \pm 3,01
Oxamat in ODH + NADH + L-Arginin	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
L-Arginin + Pyruvat in ODH + NAD ⁺	327 \pm 55	$-14,3 \pm 0,4$	$-47,5 \pm 4,9$	33,15 \pm 5,3
D-Oktopin in ODH	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D-Oktopin in ODH + NADH	$1,3 \cdot 10^3 \pm 1,4 \cdot 10^2$	$-17,7 \pm 0,3$	$-9,0 \pm 1,4$	$-8,7 \pm 1,7$

n.b.: Unter den gegebenen Messbedingungen waren die thermodynamischen Parameter der betrachteten Reaktion aufgrund des geringen enthalpischen Beitrags nicht bestimmbar.

3.3 UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE LAKTATDEHYDROGENASE AUS DEM SCHWEINEMUSKEL

Die Substratbindung an die Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel ist in der Vergangenheit schon ausführlich untersucht worden (u. a. Sugrobova *et al.*, 1974; Burgner und Ray, 1978; Wenzel und Trommer, 1979; Deng *et al.*, 1992; McClendon *et al.*, 2005a & b). Obwohl sich darunter auch thermodynamische Untersuchungen befinden (Hinz und Jänicke, 1973, 1975; Schmid *et al.*, 1976; Hinz *et al.*, 1977a & b, 1978), sind Bindungsstudien mittels isothermaler Titrationskalorimetrie noch nicht bekannt. Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Substratbindung an ODH und LDH mit der selben Methode sorgt für eine bessere Vergleichbarkeit der thermodynamischen Daten.

Auch bei der Untersuchung der LDH wurden die erhaltenen Bindungsisothermen mit dem Modell für identische, unabhängige Bindungsplätze (*One Set of Sites*) ausgewertet. Eine Kuvenanpassung war auch hier aufgrund eines zu geringen *c*-Wertes in vielen Fällen nicht möglich, ohne die Anzahl der Bindungsplätze festzulegen, wobei von $n = 4$ Bindestellen ausgegangen wurde (s. Kap. 2.4.2 und 2.4.3).

3.3.1 Coenzym-Bindung

Wie bei der Untersuchung der Coenzym-Bindung an die Oktopindehydrogenase, erfolgte auch hier eine Titration einer NADH- bzw. NAD⁺-Lösung in substratfreie Enzymlösung.

Die Auswertung der sigmoiden Bindungsisothermen für die NADH-Bindung an LDH (s. Abb. 3.12 A) durch die Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ergab für die Bindungskonstante, K_b , einen Wert von $3,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Daraus ließ sich für die freie Energie ein ΔG^0 -Wert von $-31,4 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ermitteln. Die Bindungsenthalpie, ΔH^0 , änderte sich um $-35,6 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$, die Entropie (ΔS^0) um $-14,1 \pm 2,2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, woraus sich ein entropischer Term, $-T\Delta S$, von $4,2 \pm 0,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ergibt (s. Abb. 3.13). Die Anzahl der Bindungsstellen wurde auf $n = 3,21 \pm 0,03$ bestimmt.

Bei der Titration von NAD⁺ zu substratfreier LDH ergaben sich hyperbole Kurven (s. Abb. 3.12 B). Die Bindungskonstante für die Bindung von NAD⁺ an LDH wurde auf $5,5 \cdot 10^3 \pm 4,5 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ bestimmt.

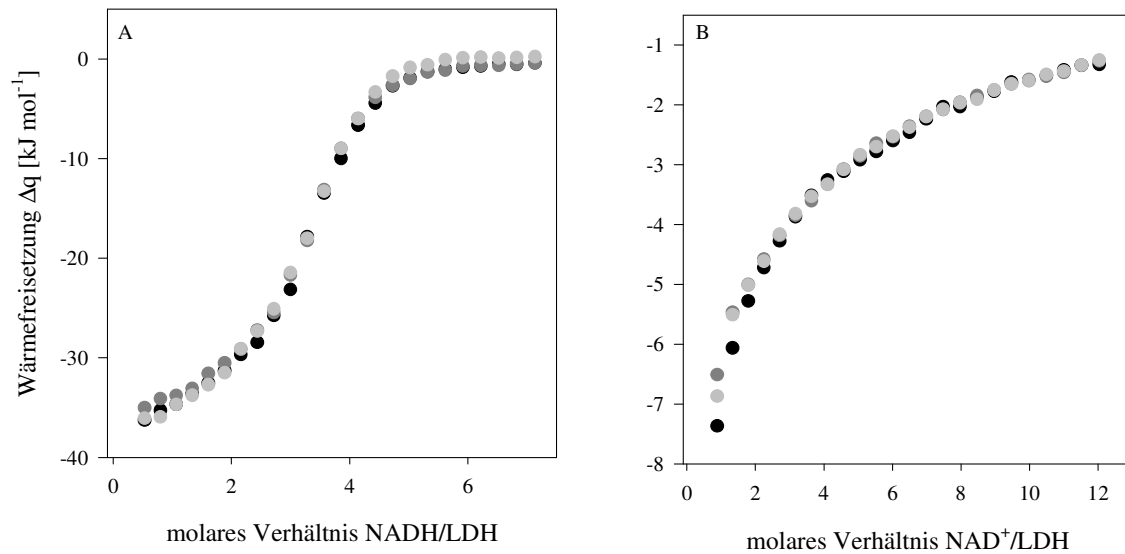


Abb. 3.12: Bindung von NADH (A) und NAD⁺ (B) an die Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel. Gezeigt sind die integrierten Signale von je 25 10 μL-Injektionen einer 1,5 mmol L⁻¹ NADH-Lösung in eine 0,04 mmol L⁻¹ LDH-Lösung (A) und einer 2,5 mmol L⁻¹ NAD⁺-Lösung in eine 0,04 mmol L⁻¹ LDH-Lösung (B). Die Titrationsexperimente wurden in 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt.

Für die freie Energie, ΔG^0 , konnte ein Wert von $-21,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ermittelt werden. Dieser Wert setzte sich zusammen aus einer Bindungsenthalpie, ΔH^0 , von $-13,8 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ und einer positiven Entropie, ΔS^0 , von $25,4 \pm 0,8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, was einem entropischen Term von $-7,6 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ entspricht (s. Abb. 3.13). Die Anzahl der Bindungsplätze wurde auf $n = 4$ fixiert, da für c lediglich ein Wert von 0,22 erreicht wurde.

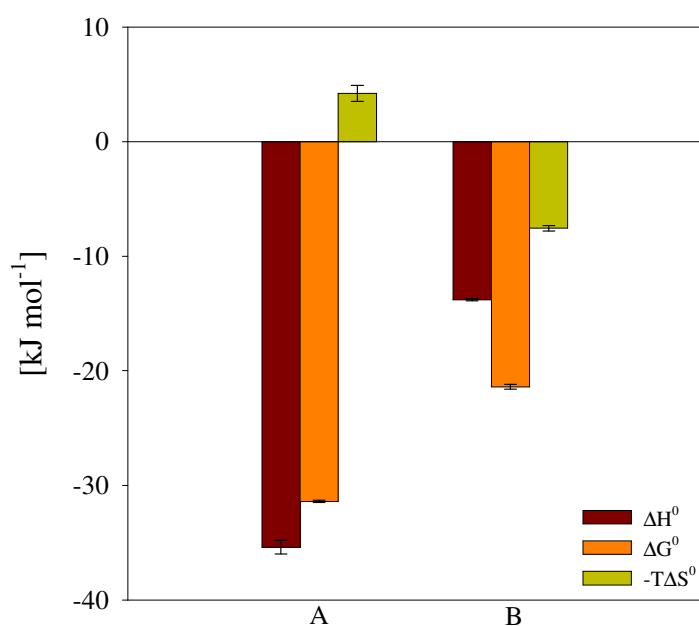


Abb. 3.13: Thermodynamische Parameter für die Bindung von NADH (A) und NAD⁺ (B) an LDH. Alle thermodynamischen Parameter wurden durch Kurvenanpassung mit dem ‚One Set of Sites‘-Modell für identische, unabhängige Bindestellen erhalten. Dargestellt sind die thermodynamischen Parameter ΔH^0 , ΔG^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol^{-1} für (A) die Bindung von NADH an LDH und (B) die Bindung von NAD⁺ an LDH. Die Experimente wurden in 100 mmol L⁻¹ HEPES-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt. Die eingezeichneten Fehler sind die Standardabweichungen aus je drei Experimenten.

3.3.2 Pyruvat-Bindung

Um das Bindungsverhalten von Pyruvat an die LDH zu untersuchen, wurde dieses sowohl zu substratfreier LDH als auch zum binären Komplex LDH•NAD⁺ titriert. Zusätzlich wurde die Bindung von Oxamat an den LDH•NADH-Komplex untersucht. Wie bereits erwähnt, hemmt Oxamat die LDH kompetitiv zu Pyruvat.

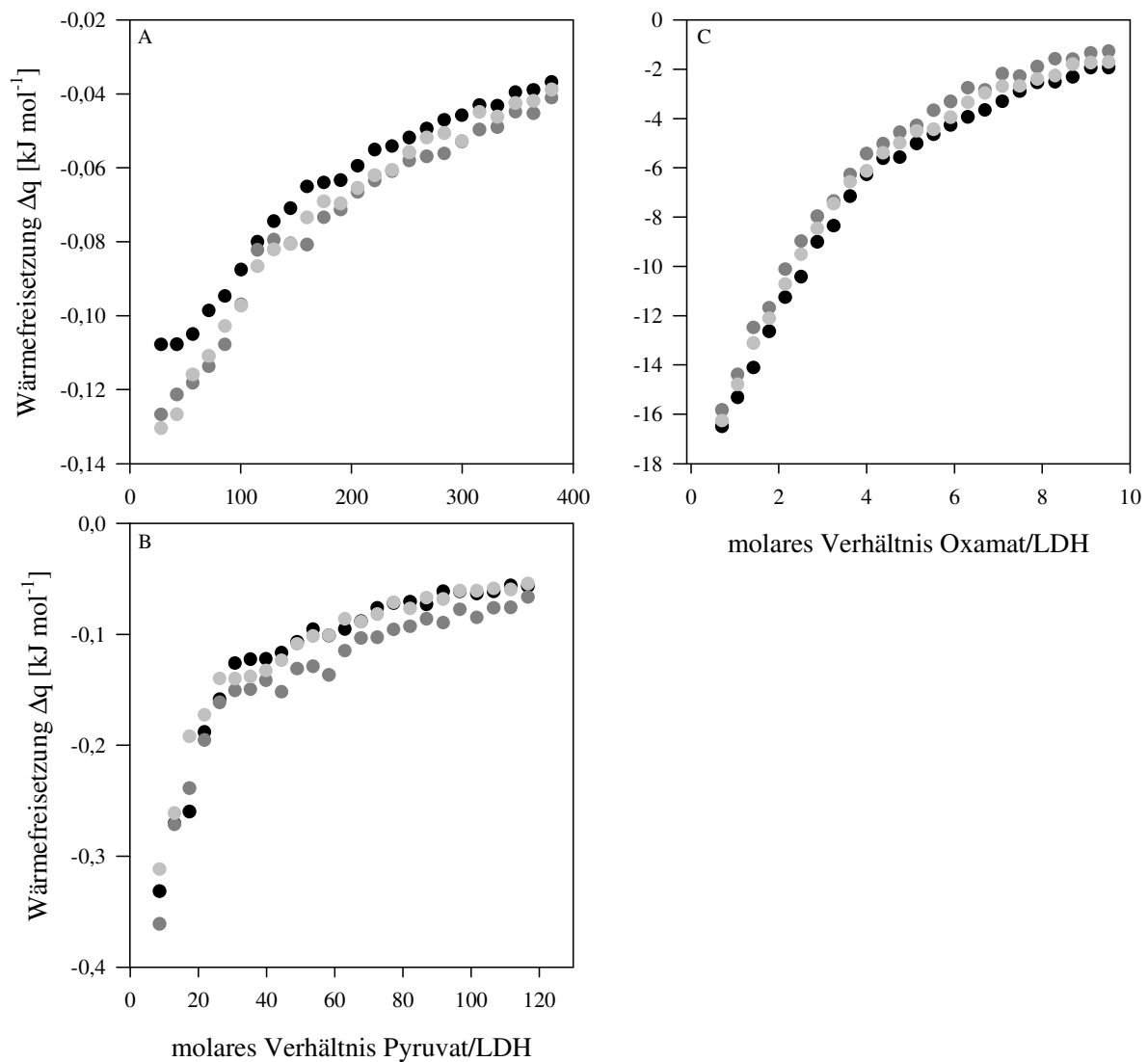


Abb. 3.14: Pyruvat-Bindung an LDH. Die Pyruvat-Bindung wurde durch die Titration einer 80 mmol L⁻¹ Pyruvat-Lösung in eine 0,04 mmol L⁻¹ LDH-Lösung untersucht (A). Außerdem wurde eine 20 mmol L⁻¹ Pyruvat-Lösung in eine 0,04 mmol L⁻¹ LDH-Lösung mit einer NAD⁺-Konzentration von 0,8 mmol L⁻¹ titriert (B). Oxamat wurde in einer Konzentration von 0,5 mmol L⁻¹ eingesetzt und in eine 0,01 mmol L⁻¹ LDH-Lösung in Anwesenheit von 0,2 mmol L⁻¹ NADH titriert (C). Die Experimente umfassten 25 Injektionen à 10 µL. Sie wurden in 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0 bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt.

Bei der Titration von Pyruvat zu substratfreier LDH (s. Abb. 3.14 A) waren leicht exotherme Wärmesignale zu beobachten. Eine Bestimmung der thermodynamischen Parameter, unter der Voraussetzung, dass die Anzahl der Bindungsplätze n= 4 war, ergab eine Bindungs-

konstante von $46,1 \pm 3,81 \text{ L mol}^{-1}$. Die sich daraus ableitende freie Energie der Bindung, ΔG^0 , hatte einen Wert von $-9,49 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Der enthalpische Anteil an dieser Bindung betrug $-18,79 \pm 1,29 \text{ kJ mol}^{-1}$, der entropische Anteil $-31,18 \pm 4,64 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Die Titration von Pyruvat zum LDH•NAD⁺-Komplex zeichnete sich durch exotherme Wärmesignale aus. In der Abbildung 3.14 B sind die integrierten Wärmesignale Δq in kJ mol^{-1} Pyruvat gegen das molare Verhältnis von Pyruvat zum LDH•NAD⁺-Komplex aufgetragen. Es resultierten annähernd hyperbole Bindungsisothermen. Die Mittelwerte der thermodynamischen Parameter aus drei unabhängigen Titrationsexperimenten bei 25 °C, in 100 mmol L^{-1} HEPES, pH 7,0 sind: $K_b = 465 \pm 97 \text{ L mol}^{-1}$, $\Delta H^0 = -6,3 \pm 1,1 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 29,8 \pm 0,5 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und $\Delta G^0 = -15,2 \pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Anzahl der Bindestellen (n) wurde bei der Kurvenanpassung auf vier festgesetzt, da der c -Wert für die Experimente bei $c = 0,02$ lag.

Die Reaktion von Oxamat mit dem LDH•NADH-Komplex war, im Vergleich zur Reaktion von Pyruvat mit dem LDH•NAD⁺-Komplex, wesentlich exothermer. In der Abbildung 3.14 C sind die integrierten Wärmesignale Δq in kJ mol^{-1} Oxamat gegen das molare Verhältnis von Oxamat zum binären Komplex LDH•NADH aufgetragen. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen wurden hyperbole Bindungsisothermen erhalten (s. Abb. 3.14 C). Die Enthalpieänderung betrug bei dieser Reaktion $-18,6 \pm 1,7 \text{ kJ mol}^{-1}$. Als Bindungskonstante ergab sich ein Wert von $9,6 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Die daraus abgeleiteten Werte für die Änderung der freien Energie und der Entropie betragen $\Delta G^0 = -28,4 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S^0 = 32,9 \pm 7,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter erfolgte unter der Bedingung, dass $n = 4$ ist, da das Produkt aus K_b , n , und der Proteinkonzentration $[M]_{tot}$ zu gering war ($c = 0,96$).

Vergleicht man die Bindung von Pyruvat an das Apoenzym mit der Bindung an den binären Komplex LDH•NAD⁺ (s. Abb. 3.15 A und B), so weichen die ΔG^0 -Werte, mit $-9,5 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Bindung an das Apoenzym und $-15,2 \pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Bindung an den LDH•NAD⁺-Komplex, voneinander ab. Auch der Vergleich der Bindungsenthalpien und des entropischen Terms lässt keine Übereinstimmung in einem der beiden Parameter erkennen. Ebenso weichen die freien Energien für die Bindung von Pyruvat an den LDH•NAD⁺-Komplex und für die Bindung von Oxamat an den LDH•NADH-Komplex, für die ein ΔG^0 von $-28,4 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden konnte, deutlich voneinander ab (s. Abb. 3.15 B und C). Dieser Unterschied spiegelt sich auch in den enthalpischen Beiträgen wider. Der entropische Term hingegen ist für beide betrachteten Bindungsreaktionen mit $-T\Delta S^0 = -8,9 \pm 1,6$

kJ mol^{-1} für die Pyruvat-Bindung an den LDH•NAD⁺-Komplex und mit $-T\Delta S^0 = -9,8 \pm 2,2$ kJ mol^{-1} für die Oxamat-Bindung an den LDH•NADH-Komplex, annähernd gleich (s. Abb 3.15).

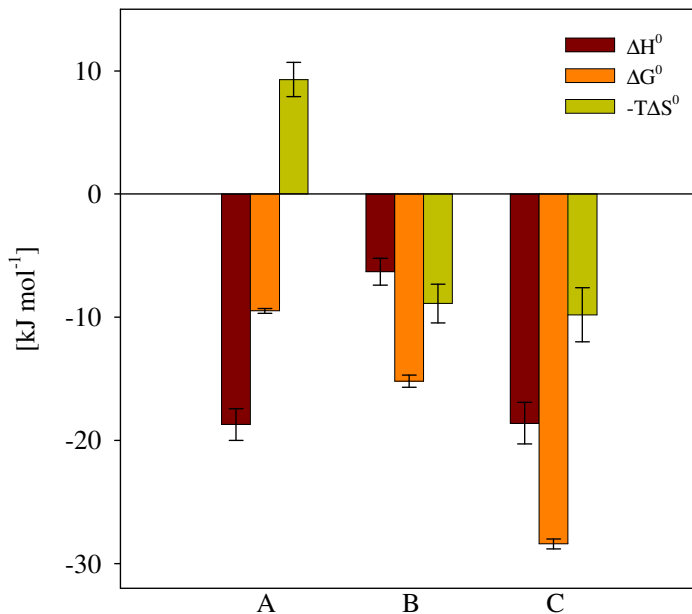


Abb. 3.15: Vergleich der thermodynamischen Parameter der Pyruvat- und Oxamat-Bindung an LDH. Dargestellt sind ΔH^0 , ΔG^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol^{-1} für die Bindung von Pyruvat an LDH (A) und an LDH in Anwesenheit von NAD⁺ (B) sowie für die Bindung von Oxamat an LDH in Anwesenheit von NADH (C). Für beide Liganden wurden die Titrations in 100 mmol L^{-1} HEPES-Puffer, pH 7,0 durchgeführt. Die Versuchstemperatur betrug $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Die eingezeichneten Fehler sind die Standardabweichungen aus je drei Experimenten.

3.3.3 L-Laktat-Bindung

Des weiteren wurde die L-Laktat-Bindung an substratfreie LDH sowie an den LDH•NADH-Komplex untersucht. Darüber hinaus wurde die Bindung von Oxalat an den LDH•NAD⁺-Komplex gemessen. Das Salz der Oxalsäure dient dabei als Substratanalogen von L-Laktat (Emerson *et al.*, 1964) und ermöglicht es, die Bildung des ternären Komplexes zu untersuchen, da die enzymatische Umsetzung unterbunden wird.

Bei der Titration von L-Laktat in LDH-Lösung kam es zu keinen nennenswerten Wärmesignalen (s. Abb. 3.16 A). Es war daher keine Auswertung der thermodynamischen Parameter möglich.

Wurde die LDH-Lösung allerdings vor dem Experiment mit der zwanzigfachen NADH-Konzentration versetzt, ließ sich während der Titration mit L-Laktat das Freiwerden geringer Wärmemengen beobachten, aus denen hyperbole Bindungskurven resultierten (s. Abb. 3.16 B). Die durchgeführten Titrations lieferten nach der Kurvenanpassung für die Bindungskonstante, K_b , einen Wert von $42 \pm 7,0 \text{ L mol}^{-1}$ sowie einen Wert von $-9,2 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die freie Energie der Bindung, ΔG^0 . Für die Änderung Bindungsenthalpie, ΔH^0 , wurde ein Wert von $-24,7 \pm 0,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt. Die Entropieänderung betrug $\Delta S^0 = -51,8 \pm 3,8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Während der Anpassungsroutine wurde aufgrund der schwa-

chen Bindung von L-Laktat an den LDH•NADH-Komplex die Anzahl der Bindungsplätze wiederum auf 4 fixiert.

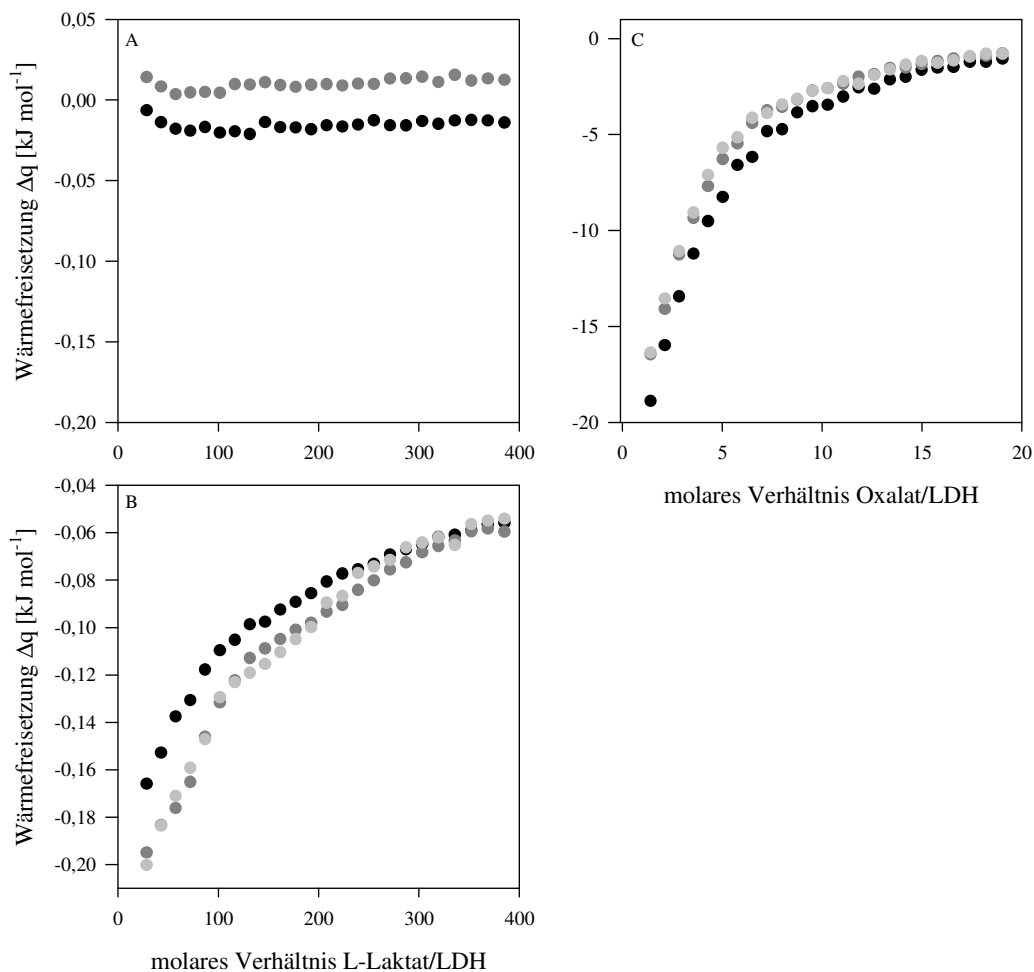


Abb. 3.16: Wärmefreisetzung Δq [kJ mol⁻¹] bei der Titration von L-Laktat bzw. Oxalat zu Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel. Gezeigt sind die integrierten Signale von 25 Injektionen à 10 μ L in 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0 bei 25 °C. Es wurden 100 mmol L⁻¹ L-Laktat in 0,05 mmol L⁻¹ LDH titriert (A). Die L-Laktat-Bindung an den LDH•NADH-Komplex wurde durch die Injektion von 100 mmol L⁻¹ L-Laktat in 0,05 mmol L⁻¹ LDH und 1 mmol L⁻¹ NADH untersucht (B). Ferner wurden 0,5 mmol L⁻¹ Oxalat in 0,01 mmol L⁻¹ LDH und 0,2 mmol L⁻¹ NAD⁺ titriert (C).

Die Titration von Oxalat zum LDH•NADH-Komplex (s. Abb. 3.16 C) lieferte wesentlich exothermere Wärmesignale als die Titration von L-Laktat zum LDH•NAD⁺-Komplex. Unter Verwendung des einfachsten Bindungsmodells wurde für die betrachtete Reaktion eine Bindungskonstante von $K_b = 1,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ bestimmt.

Für die freie Energie, ΔG^0 , wurde hier ein Wert von $-28,7 \pm 0,3$ kJ mol⁻¹ bestimmt. Dieser Wert setzte sich zusammen aus einer Bindungsenthalpie, ΔH^0 , von $-26,4 \pm 3,0$ kJ mol⁻¹ und einer Entropie, ΔS^0 , von $7,7 \pm 10,9$ J mol⁻¹ K⁻¹.

Die in Abbildung 3.17 dargestellten Werte für ΔG^0 , ΔH^0 und ΔS^0 zeigen, dass die freien Energien und die Änderung der Entropie für die Bindung von Pyruvat an den LDH•NADH-Komplex und für die Bindung von Oxamat an den LDH•NAD⁺-Komplex deutlich voneinander abweichen. Bei beiden Bindungsreaktionen wird jedoch eine ähnliche Wärmemenge frei (s. Abb. 3.17).

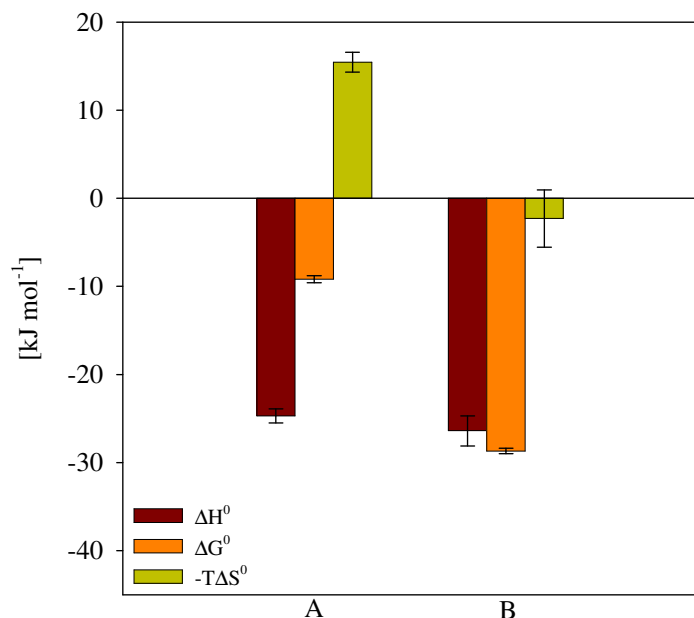


Abb. 3.17: Thermodynamische Parameter der Bindung von L-Laktat (A) und Oxalat (B) an LDH. Gezeigt werden die Werte für ΔG^0 , ΔH^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol⁻¹ bei 25 °C und pH 7,0. Der entropische Term $-T\Delta S^0$ beschreibt dabei die Differenz aus der freien Energie, ΔG^0 , und der Bindungsenthalpie, ΔH^0 . Die eingezeichneten Fehler sind die Standardabweichungen aus drei Experimenten. Es wurde die Bindung für L-Laktat an den binären Komplex LDH•NADH (A) und für Oxalat an den binären Komplex LDH•NAD⁺ (B) untersucht. Für beide Liganden wurden die Titrations in 100 mmol L⁻¹ HEPES-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt.

Die Tabelle 3.3 fasst die thermodynamischen Parameter der Substratbindung an die Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel zusammen.

Tab. 3.3: Apparente thermodynamische Parameter der Substratbindung an LDH bei 25 °C in 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0. Die freie Energie, ΔG^0 , wurde durch die Formel $\Delta G^0 = -RT \ln K_b$ berechnet, wobei K_b der mittels ITC bestimmten Bindungskonstante entspricht. Der entropische Term, $-T\Delta S^0$, beschreibt dabei die Differenz aus der freien Energie, ΔG^0 , und der Bindungsenthalpie, ΔH^0 . Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Titrationsexperiment	K_b [L mol ⁻¹]	ΔG^0 [kJ mol ⁻¹]	ΔH^0 [kJ mol ⁻¹]	$-T\Delta S^0$ [kJ mol ⁻¹]
NADH in LDH	$3,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^4$	$-31,4 \pm 0,1$	$-35,4 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,7$
NAD ⁺ in LDH	$5,7 \cdot 10^3 \pm 4,5 \cdot 10^2$	$-21,4 \pm 0,2$	$-13,8 \pm 0,1$	$-7,6 \pm 0,2$
Pyruvat in LDH	$46,1 \pm 4$	$-9,5 \pm 0,2$	$-18,8 \pm 1,3$	$9,29 \pm 1,3$
Pyruvat in LDH + NAD ⁺	465 ± 97	$-15,2 \pm 0,5$	$-6,3 \pm 1,1$	$-8,9 \pm 1,6$
Oxamat in LDH + NADH	$9,6 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^4$	$-28,4 \pm 0,4$	$-18,6 \pm 1,7$	$-9,8 \pm 2,2$
L-Laktat in LDH	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
L-Laktat in LDH + NADH	42 ± 7	$-9,2 \pm 0,4$	$-24,7 \pm 0,8$	$15,4 \pm 1,1$
Oxalat in LDH + NAD ⁺	$1,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^4$	$-28,7 \pm 0,3$	$-26,4 \pm 1,7$	$-2,3 \pm 3,3$

n.b.: Unter den gegebenen Messbedingungen waren die thermodynamischen Parameter der betrachteten Reaktion aufgrund des geringen enthalpischen Beitrags nicht bestimmbar

3.4 VERGLEICH DER SUBSTRATBINDUNG AN ODH UND LDH

Ein Vergleich der thermodynamischen Parameter der Substratbindung an ODH und LDH soll zeigen, inwiefern sich die beiden Enzyme bei der Bindung des gleichen oder eines äquivalenten Substrates unterscheiden.

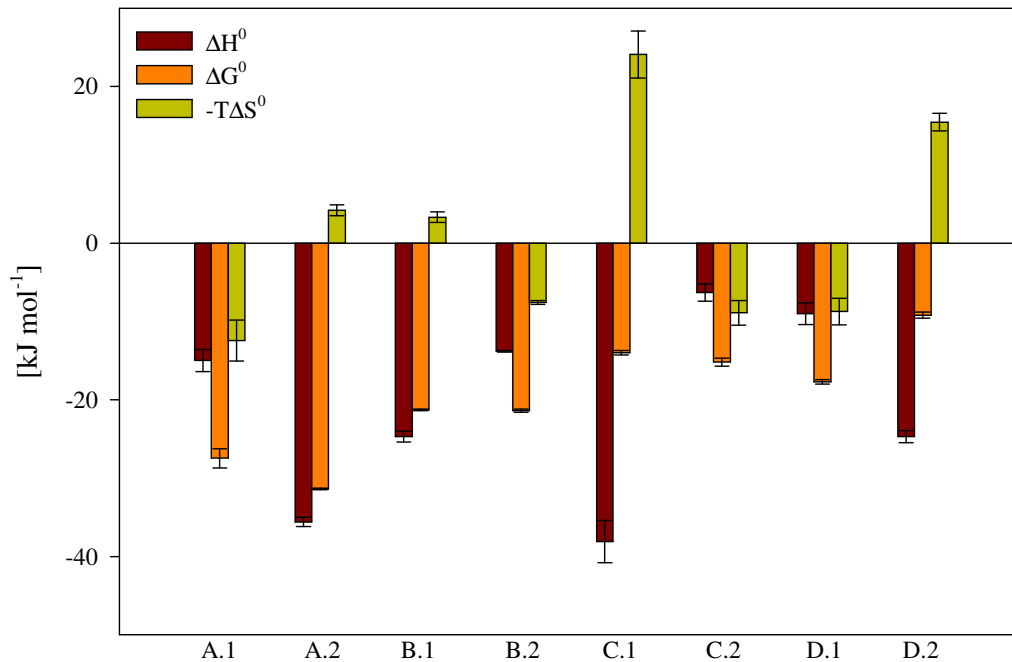


Abb. 3.18: Vergleich der thermodynamischen Parameter für die Substratbindungen an ODH aus *Pecten maximus* und LDH aus dem Schweinemuskel. Gezeigt werden die Werte für ΔG^0 , ΔH^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol⁻¹ bei 25 °C, in 100 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,0. Der entropische Term, $-T\Delta S^0$, beschreibt die Differenz aus der freien Energie, ΔG^0 , und der Bindungsenthalpie, ΔH^0 . Die eingezeichneten Fehler sind die Standardabweichungen aus drei Experimenten. Dargestellt werden die thermodynamischen Parameter für die Bindung von NADH an ODH (A.1) und LDH (A.2) und NAD⁺ an ODH (B.1) sowie LDH (B.2). Ferner lassen sich die Bindung von Pyruvat an den ODH•NAD⁺•L-Arginin-Komplex (C.1) und an den LDH•NAD⁺-Komplex (C.2) vergleichen. Zudem werden die thermodynamischen Parameter für die Bindung von D-Oktopin an den ODH•NADH-Komplex (D.1) und L-Laktat an den LDH•NADH-Komplex (D.2) verglichen, da es sich bei beiden um die Substrate der Rückreaktion handelt.

Bei der NADH-Bindung fällt auf, dass die Bindungskonstante, K_b , für die Coenzym-Bindung an LDH mit einem Wert von $3,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ um den Faktor vier größer ist als für die Coenzym-Bindung an ODH, für die eine Bindungskonstante von $K_b = 7 \cdot 10^4 \pm 3,2 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ bestimmt wurde. Die ΔG^0 -Werte zeigen mit $-27,5 \pm 1,2$ kJ mol⁻¹ für die Bindung an ODH und $-31,4 \pm 0,1$ kJ mol⁻¹ für die Bindung an LDH, eine vergleichsweise kleine Differenz, während sich die Werte für die Bindungsenthalpien jedoch deutlich unterscheiden ($-15,0 \pm 1,4$ kJ mol⁻¹ für ODH und $-35,6 \pm 0,6$ kJ mol⁻¹ für LDH). Dieses wirkt sich dement-

sprechend auch auf den entropischen Term, $-T\Delta S^0$, aus, der für die NADH-Bindung an ODH negativ, für die NADH-Bindung an LDH hingegen positiv ist.

Für die NAD^+ -Bindung hingegen sind die Bindungskonstanten, mit $K_b = 5,5 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ für die Bindung an ODH und $K_b = 5,7 \cdot 10^3 \pm 4,5 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ für die Bindung an LDH, sehr ähnlich. Das gleiche trifft auch für die ΔG^0 -Werte beider Bindungen zu. Für die Bindung an ODH konnte ein ΔG^0 -Wert von $-21,3 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für die Bindung an LDH ein ΔG^0 -Wert von $-21,4 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden. Die freien Energien beider Bindungsreaktionen spalten sich aber in unterschiedliche enthalpische und entropische Anteile auf.

Des weiteren lassen sich die Bindungen von Pyruvat an ODH in Gegenwart von NAD^+ und L-Arginin und an LDH in Gegenwart von NAD^+ vergleichen. Mit Bindungskonstanten von $K_b = 282 \pm 35 \text{ L mol}^{-1}$ für die Bindung von Pyruvat an den $\text{ODH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplex und von $K_b = 465 \pm 97 \text{ L mol}^{-1}$ für die Bindung an den $\text{LDH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplex wurden hier Werte der gleichen Größenordnung bestimmt. Das spiegelt sich auch in den ähnlichen ΔG^0 -Werten von $-14,0 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Bindung an den ternären ODH-Komplex und $-15,2 \pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Bindung an den binären LDH-Komplex wider. Auch bei diesen Bindungsreaktionen sind die Werte für die Enthalpieänderung, ΔH^0 , und den entropischen Term, $-T\Delta S^0$, sehr unterschiedlich.

Tab. 3.4: Vergleich der thermodynamischen Parameter ΔH^0 , ΔG^0 und $-T\Delta S^0$ in kJ mol^{-1} und K_b in L mol^{-1} für die Bindung verschiedener Substrate an ODH und LDH. Die freie Energie, ΔG^0 , wurde durch die Formel $\Delta G^0 = -RT \ln K_b$ berechnet, wobei K_b der durch ITC bestimmten Bindungskonstante entspricht. Der entropische Term, $-T\Delta S^0$, beschreibt dabei die Differenz aus der freien Energie, ΔG^0 , und der Bindungsenthalpie, ΔH^0 . Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Titrationsexperiment	K_b [L mol^{-1}]	ΔG^0 [kJ mol^{-1}]	ΔH^0 [kJ mol^{-1}]	$-T\Delta S^0$ [kJ mol^{-1}]
NADH in ODH	$7 \cdot 10^4 \pm 3,2 \cdot 10^4$	$-27,5 \pm 1,2$	$-15,0 \pm 1,4$	$-12,4 \pm 2,6$
NADH in LDH	$3,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^4$	$-31,4 \pm 0,1$	$-35,6 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,7$
NAD^+ in ODH	$5,5 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^2$	$-21,3 \pm 0,1$	$-24,7 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,7$
NAD^+ in LDH	$5,7 \cdot 10^3 \pm 4,5 \cdot 10^2$	$-21,4 \pm 0,2$	$-13,8 \pm 0,1$	$-7,6 \pm 0,2$
Pyruvat in ODH + NAD^+ + L-Arginin	282 ± 35	$-14,0 \pm 0,3$	$-38,1 \pm 2,7$	$24,1 \pm 3,01$
Pyruvat in LDH + NAD^+	465 ± 97	$-15,2 \pm 0,5$	$-6,3 \pm 1,1$	$-8,9 \pm 1,6$
D-Oktopin in ODH + NADH	$1,3 \cdot 10^3 \pm 1,4 \cdot 10^2$	$-17,7 \pm 0,3$	$-9,0 \pm 1,4$	$-8,7 \pm 1,7$
L-Laktat in LDH + NADH	$42 \pm 7,0$	$-9,2 \pm 0,4$	$-24,7 \pm 0,8$	$15,4 \pm 1,1$

Ferner lassen sich die Bindungen von D-Oktopin und L-Laktat als Substrate der Rückreaktion an den jeweiligen Enzym•NADH-Komplex vergleichen. Da die Bindungskonstanten für beide Liganden sehr unterschiedlich sind, für die D-Oktopin-Bindung wurde eine Bindungskonstante von $1,3 \cdot 10^3 \pm 1,4 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ und für die L-Laktat-Bindung eine Bindungskonstante von $42 \pm 7,0 \text{ L mol}^{-1}$ gemessen, weichen auch die freien Energien deutlich voneinander ab. Ebenso unterscheiden sich die Werte für die Bindungsenthalpie und den entropischen Term.

Den Vergleich der thermodynamischen Parameter für die Substratbindung an ODH und LDH fasst abschließend Tabelle 3.4 zusammen.

4 DISKUSSION

Proteine übernehmen in biologischen Systemen bei der Immunabwehr, der Regulation biologischer Prozesse, beim Transport anderer Moleküle oder bei der enzymatischen Katalyse chemischer Reaktionen eine Reihe von Aufgaben. Um diese zu erfüllen, sind Interaktionen mit anderen Molekülen notwendig. Kenntnisse über die Art solcher Protein-Interaktionen erlangt man durch die Aufklärung der 3D-Struktur eines Proteins mittels Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie. Ergänzende Informationen über Protein-Liganden-Wechselwirkungen können thermodynamische Daten liefern. Durch eine Kombination dieser Methoden lassen sich Einblicke in die molekularen Mechanismen gewinnen und diese auf atomarer Ebene erklären (Meyer und Schomburg, 1998).

Kalorimetrische Methoden liefern Informationen über thermodynamische Parameter und Bindungskonstanten eines Makromolekül-Liganden-Komplexes. Deshalb werden Bindungsreaktionen oft durch isothermale Titrationskalorimetrie untersucht, die es ermöglicht, die Enthalpiedifferenz (ΔH^0), die Bindungskonstante (K_b), die freie Energie der Bindung (ΔG^0), die Entropieänderung (ΔS^0) und die Stöchiometrie der betrachteten Reaktion direkt und in nur einer Messung zu ermitteln (Wiseman et al., 1989; Freire et al., 1990; Ladbury und Chowdry, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde die isothermale Titrationskalorimetrie gewählt, um den kinetischen Mechanismus der Oktopindehydrogenase (ODH) genauer zu charakterisieren, deren monomere Struktur und geringe Größe (Monneuse-Doublet *et al.*, 1980; Gäde und Grieshaber, 1986) diese Untersuchung erleichtert. Mit einem Molekulargewicht von 43,3 kDa gilt die ODH als eine der kleinsten Dehydrogenasen (Janßen, 2000). Im Gegensatz zu den oft dimeren, tetrameren oder oligomeren Dehydrogenasen eignet sie sich daher besonders, um den Reaktionsmechanismus dieser Enzyme genauer zu untersuchen (Oriol und Olomucki, 1972; Luisi *et al.*, 1973; Zettelmeissl *et al.*, 1984).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Substratbindung an die ODH thermodynamisch untersucht und Rückschlüsse auf den katalytischen Mechanismus der ODH-Reaktion gezogen werden. Denn mittels kinetischer Analysen war es bisher nicht möglich, eindeutige Aussagen über den Ablauf der ODH-Reaktion zu machen (Doublet und Olomucki, 1975a & b; Schrimsher und Taylor, 1984).

Zudem sollte eine vergleichende thermodynamische Analyse der Substratbindung an die Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel die Klärung der Frage ermöglichen, wa-

rum gerade die LDH im Tierreich am weitesten verbreitet ist, während die ODH hauptsächlich bei marinen Invertebraten gefunden wird.

4.1 REINIGUNG DER REKOMBINANTEN OKTOPINDEHYDROGENASE

Um die thermodynamischen Parameter der Substratbindung an die ODH zu bestimmen, war es notwendig, die ODH in entsprechenden Konzentrationen und höchstmöglicher Reinheit zu gewinnen. Gewährleistet wurde dies durch die heterologe Expression des Muschelenzyms in *E. coli* und einer Reinigung in nur zwei chromatographischen Schritten.

In einem ersten Reinigungsschritt wurde das Enzym aus einem *E. coli*-Rohextrakt durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow gereinigt (s. Abb. 3.1 A, S. 33). Nach Konzentration der resultierenden Proteinlösung durch Druckfiltration folgte als zweiter chromatographischer Schritt eine Größenausschlusschromatographie über Sephadex G-100 (s. Abb. 3.1 B, S. 33). Das resultierende Endprodukt verfügte noch über 28 % der ODH-Aktivität und 4 % des Proteingehaltes des Rohextraktes. Die spezifische Aktivität des homogenen Enzyms betrug 658 U mg^{-1} . Das entspricht, verglichen mit der spezifischen Aktivität des Rohextraktes, einem Reinigungsfaktor von 6,5 (s. Tab. 3.1, S. 34).

Der Erfolg der Reinigung wurde durch eine SDS-PAGE überprüft (s. Abb. 3.2, S. 34). In der Coomassie- und in der Silberfärbung war dabei eine distinkte Bande knapp unterhalb der 45 kDa-Bande des Markers erkennbar, was mit dem von Janßen (2000) durch MALDI-TOF bestimmten Molekulargewicht von 43,3 kDa gut übereinstimmt. Das Endprodukt lag somit nach nur zwei Reinigungsschritten silberrein vor und wurde für die ITC-Experimente verwendet.

4.2 UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE REKOMBINANTE OKTOPINDEHYDROGENASE

Obwohl die Oktopindehydrogenase in der Vergangenheit biochemisch bereits gut charakterisiert worden ist (Thomé-Beau *et al.*, 1971; Oriol *et al.*, 1972; Luisi *et al.*, 1973; Thomé-Beau und Olomucki, 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), sind ihr molekularer Aufbau und kinetischer Mechanismus nur unvollständig bekannt.

Monneuse-Doulet *et al.* (1977) vermuteten für die ODH-Reaktion einen geordnet-sequenziellen Mechanismus (s. Abb. 1.2, S. 10). Fast zehn Jahre später widersprachen Schrimsher und Taylor (1984) dieser Hypothese und postulierten für die ODH-Reaktion einen zufällig-sequenziellen Mechanismus (s. Abb. 1.3, S. 11). Mit der thermodynamischen Untersuchung der Substratbindung an die ODH sollte die Frage nach dem kinetischen Mechanismus der ODH-Reaktion erneut aufgegriffen werden.

4.2.1 Coenzym-Bindung

Die Gruppe der Dehydrogenasen eignet sich gut für thermodynamische Untersuchungen, da schon viel über ihre strukturellen und kinetischen Eigenschaften bekannt ist (Holbrook *et al.*, 1975; Rossmann *et al.*, 1975). Besonders die Coenzym-Bindung war dabei Gegenstand zahlreicher Analysen (Hinz, 1983).

Ein Vergleich der freien Energien, ΔG^0 , für die Bindung der reduzierten Form des Coenzym, NADH, an verschiedene Dehydrogenasen hat gezeigt, dass der Wert hierfür in einem Bereich von $-31 \pm 6 \text{ kJ mol}^{-1}$ liegt (Hinz, 1983). Die ODH fügt sich mit einem ΔG^0 -Wert von $-27,5 \pm 1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ damit gut in das allgemeine Bild der Dehydrogenasen ein.

Der ΔG^0 -Wert für die Bindung des oxidierten Coenzym, NAD^+ , ist mit $\Delta G^0 = -21,3 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ kleiner als für die Bindung der reduzierten Form. Auch für die NAD^+ -Bindung an verschiedene Dehydrogenasen schwanken die freien Energien um einen Wert, der bei $-18,4 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}$ liegt (Hinz, 1983). Der ΔG^0 -Wert für die NAD^+ -Bindung an ODH weicht hiervon nur geringfügig ab.

Die Ähnlichkeit von ΔG^0 bei der Coenzym-Bindung ergibt sich aus der Tatsache, dass die Bindedomäne der Dehydrogenasen hochkonserviert ist (Rossmann *et al.*, 1975); die konstante freie Energie spiegelt die Konservierung der Tertiärstruktur wider (Hinz, 1983).

Da sich die ΔG^0 -Werte für die Bindung von NADH und NAD^+ an ODH unterscheiden, differieren folglich auch ihre Affinitäten zum Enzym. Für NADH wurde eine Bindungskonstante von $7 \cdot 10^4 \pm 3,2 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ gemessen, die Bindungskonstante für NAD^+ war mit $5,5 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ um einen Faktor 13 geringer. Beide Werte stimmen gut mit den 1974 von Luisi *et al.* bestimmten Werten überein. Mittels Fluoreszenstechniken konnten diese Autoren für NADH eine Bindungskonstante von $5 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ und für NAD^+ eine Bindungskonstante von $4 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ bestimmen (bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ in 100 mmol L^{-1} Phosphatpuffer, pH 7,0). Auch die mittels NMR-Spektroskopie erhaltenen Bindungskonstanten liegen mit etwa $1,6 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ für die NADH-Bindung und $2,5 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ für die NAD^+ -Bindung

(Müller, persönliche Mitteilung) in der gleichen Größenordnung wie die kalorimetrisch bestimmten Werte.

Schon aus früheren Arbeiten über die ODH aus *Pecten maximus* ist bekannt, dass sich die Bindestelle des Coenzym in einer hydrophoben Umgebung befinden muss (Luisi *et al.*, 1973; Baici *et al.*, 1974, Janßen, 2000). Diese Tatsache erklärt die stärkere Bindung des neutralen NADH gegenüber dem geladenen NAD⁺. Das Fehlen der positiven Ladung verleiht dem Nikotinamidring einen unpolaren Charakter und ermöglicht so optimale hydrophobe Wechselwirkungen mit der Nikotinamid-Bindestelle. Da hydrophobe Wechselwirkungen in der Regel mit großen, positiven Entropieänderungen einhergehen, ist die NADH-Bindung gegenüber der NAD⁺-Bindung entropisch begünstigt (Subramanian, 1979), was auch durch die mikrokalorimetrischen Messungen bestätigt werden konnte (s. Abb. 3.4, S. 36 und Tab. 3.2, S. 45).

4.2.2 L-Arginin- und Pyruvat-Bindung

Durch die Untersuchung der L-Arginin- und Pyruvat-Bindung an die Oktopindehydrogenase sollte letztendlich eine definitive Aussage über die Reihenfolge der Substratbindung gemacht werden. Dazu wurden die Substrate sowohl zu substratfreier ODH als auch zu verschiedenen binären und ternären Komplexen titriert. In Abwesenheit des Coenzym konnte dabei weder eine Bindung von Pyruvat noch von L-Arginin nachgewiesen werden. Auch die gleichzeitige Injektion beider Substrate führte zu keinen messbaren Wärmesignalen (s. Abb. 3.8 A, S. 42). Wie schon zuvor vermutet, muss erst das Coenzym binden, damit eine Bindung der anderen Substrate überhaupt möglich wird (Monneuse-Doublet *et al.*, 1977; Schrimsher und Taylor, 1984; van Os, 2001).

Diese Vermutung bestätigte sich, da bei der Titration von L-Arginin zum ODH•NADH-Komplex auswertbare Wärmesignale erhalten wurden (s. Abb. 3.5 B, S. 38). Die Affinität des L-Arginins zum binären Komplex, die durch eine Bindungskonstante von $181 \pm 22 \text{ L mol}^{-1}$ beschrieben wird ($K_d = 1/K_b = 5,5 \text{ mmol L}^{-1}$), ist dabei relativ gering. Die Bindungskonstante liegt in der gleichen Größenordnung wie die mittels NMR bestimmte Bindungskonstante (Müller, persönliche Mitteilung).

Die L-Arginin-Bindung ist mit einem ΔH^0 von $-12,5 \pm 1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ und einem ΔS^0 von $1,1 \pm 4,6 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ enthalpisch aber nur wenig entropisch begünstigt (s. Tab. 3.2, S. 45). Da bei der Bindung von L-Arginin an das Enzym elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle spielen, hätte man bei dem betrachteten Bindungsvorgang mit einer stärkeren Erhöhung

der Entropie rechnen können, denn elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ligand und Makromolekül sind entropiegetrieben, da dabei Hydratationswasser frei wird (Eftink und Biltonen, 1980). Ergebnisse NMR-spektroskopischer Untersuchungen zeigten aber, dass mit der Bindung von L-Arginin offensichtlich eine Konformationsänderung einhergeht (Müller, persönliche Mitteilung). Die Bewegungsfähigkeit des Proteins wird durch die Liganden-induzierte Konformationsänderung sehr wahrscheinlich eingeschränkt und das führt zu einer Verringerung des entropischen Beitrags (Eftink und Biltonen, 1980).

Jedoch wurden keine für eine Bindungsreaktion typischen Wärmesignale erhalten, wenn Pyruvat zum binären ODH•NADH-Komplex titriert wurde (s. Abb. 3.7 B, S. 40). Das lässt darauf schließen, dass Pyruvat nicht an den ODH•NADH-Komplex bindet. Es besteht aber die Möglichkeit, dass die Pyruvat-Bindung ausschließlich entropiegetrieben und damit mittels isothermaler Titrationskalorimetrie nicht detektierbar ist. Durch die Titrationsen bei verschiedenen Temperaturen (Ergebnisse nicht dargestellt) und durch die Untersuchung der Pyruvat-Bindung mittels NMR-Spektroskopie (Müller, persönliche Mitteilung) konnte aber eine entropiegetriebene Bindung ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, dass Pyruvat trotz der Anwesenheit von NADH nicht an das Enzym bindet, legt die Vermutung nahe, dass L-Arginin als erstes der beiden Substrate binden muss und erst dadurch die Bindung des Pyruvats ermöglicht wird. Eine Untersuchung der Pyruvat-Bindung an einen ternären Komplex ODH•NADH•L-Arginin hätte diese Vermutung wahrscheinlich bestätigt. Allerdings war die Durchführung eines solchen Experimentes nicht möglich. Aufgrund der Anwesenheit aller drei Substrate der Hinreaktion wäre, zusätzlich zur Wärmetönung der Pyruvat-Bindung, auch die Wärme der enzymatischen Umsetzung gemessen worden.

Es musste also eine Möglichkeit gefunden werden, den Ablauf der Reaktion zu unterbinden. Da für die ODH-katalysierte Reaktion keine Inhibitoren bekannt sind, wurde die enzymatische Umsetzung verhindert, indem nicht NADH, sondern NAD^+ , in das Titrationsexperiment eingesetzt wurde. Übernommen wurde diese Methode von Mulcahy und O'Flaherty (2001), die auf diese Weise NAD(P)^+ -abhängige Dehydrogenasen mittels Affinitätschromatographie an NAD^+ reinigten.

Mit Hilfe dieser Strategie konnte die Bindung von Pyruvat an einen vermeintlichen ODH• NAD^+ •L-Arginin-Komplex nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7 D, S. 40). Zur Aufklärung der Funktion von L-Arginin in einem ternären ODH• NAD^+ •L-Arginin-Komplex, wurde in einem weiteren Experiment Pyruvat zum binären ODH• NAD^+ -Komplex titriert. Da in die-

sem Fall kein Wärmesignal beobachtet werden konnte, ist auszuschließen, dass Pyruvat in Abwesenheit von L-Arginin an diesen binären Komplex bindet (s. Abb. 3.7 C, S. 40). Zur Charakterisierung der L-Arginin-Bindung an den ODH•NAD⁺-Komplex wurde in einem weiteren Titrationsexperiment L-Arginin zum ODH•NAD⁺-Komplex titriert (s. Abb. 3.7 C, S. 40). Durch diese Titration konnte gezeigt werden, dass L-Arginin an diesen Komplex ebenfalls nicht bindet. Ein ternärer Komplex ODH•NAD⁺•L-Arginin existiert offenbar nicht (s. Abb. 3.5 C, S. 38), es sei denn die L-Arginin-Bindung an den ODH•NAD⁺-Komplex wäre ausschließlich entropiegetrieben. War jedoch im Experiment, neben ODH und NAD⁺, Pyruvat anwesend, so wurden auch bei der Titration mit L-Arginin exotherme, auswertbare Wärmesignale erhalten (s. Abb. 3.5 D, S. 38). L-Arginin und Pyruvat können folglich nur gemeinsam an einen binären Komplex ODH•NAD⁺ binden.

Der Vergleich der thermodynamischen Parameter, die durch die Titration von Pyruvat zu ODH, NAD⁺ und L-Arginin sowie durch die Titration von L-Arginin zu ODH, NAD⁺ und Pyruvat bestimmt wurden, zeigt, dass die Bindungskonstanten und somit auch die ΔG^0 -Werte beider Reaktionen sehr ähnlich sind. Auch die simultane Injektion beider Substrate zu einem ODH•NAD⁺-Komplex lieferte ähnliche Werte. Für die Bindungskonstanten wurden, in allen drei Fällen, Werte in einem Bereich von $282 \pm 35 \text{ L mol}^{-1}$ und $327 \pm 55 \text{ L mol}^{-1}$ bestimmt. Die korrespondierenden ΔG^0 -Werte bewegen sich zwischen $-14,0 \pm 0,3$ und $-14,3 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Sie zeigen damit kaum einen Unterschied, spalten sich aber in unterschiedliche enthalpische und entropische Anteile auf (s. Abb. 3.9, S. 42 und Tab. 3.2, S. 45).

Am besten lässt sich diese Beobachtung durch das Phänomen der Entropie-Enthalpie-Kompensation erklären. Die durch verschiedene experimentelle Bedingungen hervorgerufenen Änderungen von ΔH^0 und ΔS^0 korrelieren oft und führen dann zu einer vergleichsweise geringen Änderung in ΔG^0 (Cooper, 1999; Cooper *et al.*, 2001). Im vorliegenden Fall wurde jeweils die selbe Reaktion unter verschiedenen Versuchsbedingungen gemessen, da bei allen drei Titrationen eine unterschiedliche Verfügbarkeit der verschiedenen Liganden vorlag.

Bei der Titration von L-Arginin zu ODH mit NAD⁺ und Pyruvat ist die Pyruvatkonzentration limitierend. Während der Titration wird durch die Erhöhung der L-Argininkonzentration das Gleichgewicht solange auf die Seite der Komplexbildung verschoben, bis die Pyruvatkonzentration nicht mehr ausreichend ist. L-Arginin liegt letztendlich im Überschuss vor. Umgekehrt sind die Verhältnisse bei der Titration von Pyruvat zu ODH mit NAD⁺ und L-Arginin.

Bei der gleichzeitigen Titration von L-Arginin und Pyruvat ist hingegen die Konzentration des $\text{ODH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplexes limitierend. Im Laufe des Experimentes wird die L-Arginin- ebenso wie die Pyruvatkonzentration erhöht. Beide Liganden binden so lange, bis kein binärer Komplex mehr vorhanden ist. Daher zeigt dieses System die größte Ordnung und somit den schlechtesten Wert für die Entropie. Bei der Titration von Pyruvat kommt es im Verlauf der Titration zu einem Pyruvatüberschuß. Die Pyruvat-Bindung an den binären Komplex ist nicht mehr möglich, da kein L-Arginin mehr zur Verfügung steht. Aufgrund des überschüssigen Pyruvats ist der Entropiewert erhöht. Gleiches gilt für die Titration von L-Arginin. Allerdings ist hier zu beobachten, dass der Entropiewert, verglichen mit der Pyruvattitration, weniger negativ ist. Wahrscheinlich spielen hier unspezifische Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein eine Rolle. Das kleinere Pyruvat kann sich besser an die hydrophile Oberfläche des Proteins anlagern als das große L-Arginin, was vermutlich insgesamt zu einer größeren Ordnung im System führt.

Wie bereits erwähnt, wurde in allen drei Titrationsexperimenten die gleiche Reaktion verfolgt. Da die beiden Substrate L-Arginin und Pyruvat alleine nicht an den $\text{ODH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplex binden können, kommt eine Bindung vermutlich nur zustande, wenn sich L-Arginin und Pyruvat zufällig in der richtigen räumlichen Anordnung zueinander befinden. Daher konnten bei diesen Titrationsexperimenten auch nur relativ kleine Bindungskonstanten bestimmt werden. Das Resultat einer solchen Reaktion wäre ein ‚*dead end*‘-Komplex $\text{ODH}\cdot\text{NAD}^+\cdot[\text{L-Arginin}\cdot\text{Pyruvat}]$, wie er ähnlich schon durch Monneuse-Doulet (1977) und Schrimsher und Taylor (1984) beschrieben wurde (s. Abb. 1.2, S. 10 und Abb. 1.3, S. 11).

Weiterhin wurde das Pyruvat analogon Oxamat zur Untersuchung der Pyruvat-Bindung an die ODH eingesetzt. Die Ergebnisse der Titration von Oxamat zu einem ternären Komplex $\text{ODH}\cdot\text{NADH}\cdot\text{L-Arginin}$ deuten darauf hin, dass Oxamat entweder an einen solchen Komplex nicht bindet oder die Oxamat-Bindung an den ternären Komplex rein entropiegetrieben ist (s. Abb. 3.7 E, S. 40). Es wurde außerdem untersucht, ob die Anwesenheit von Oxamat die L-Arginin-Bindung an den $\text{ODH}\cdot\text{NADH}$ -Komplex beeinflusst (s. Abb. 3.5 E, S. 38), um daraus gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Pyruvat-Bindung ziehen zu können. Offenbar wirkt sich die Präsenz des Oxamats nur geringfügig auf die L-Arginin-Bindung an den $\text{ODH}\cdot\text{NADH}$ -Komplex aus, da sich die Bindungskonstante und damit auch ΔG^0 für die L-Arginin-Bindung an den $\text{ODH}\cdot\text{NADH}$ -Komplex in Anwesenheit von Oxamat nur wenig von den in Abwesenheit von Oxamat bestimmten Werten unterscheiden. Während für die L-Arginin-Bindung in

Abwesenheit von Oxamat eine Bindungskonstante von $181 \pm 22 \text{ L mol}^{-1}$ und ein daraus resultierendes ΔG^0 von $-12,9 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden konnte, wurde die Bindungskonstante für die L-Arginin-Bindung in Anwesenheit von Oxamat auf $138 \pm 4 \text{ L mol}^{-1}$ bestimmt. Daraus ergab sich ein ΔG^0 -Wert von $-12,2 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ (s. Abb. 3.6, S. 39 und Tab. 3.2, S. 45). Es ist denkbar, dass durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Oxamat und entsprechenden funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms die Affinität des L-Arginins etwas herabgesetzt wird. Ebenso sind Wechselwirkungen zwischen der Guanidinium-Funktion des L-Arginins und der Carboxylgruppe des Oxamats nicht auszuschließen. Beides trägt vermutlich zu dem geringfügig veränderten Bindungsverhalten von L-Arginin in Anwesenheit von Oxamat bei. Oxamat ist also kein Inhibitor der ODH-Reaktion, da es anscheinend nicht an das Enzym bzw. seine Komplexe bindet.

4.2.3 D-Oktopin-Bindung

Auch für D-Oktopin bestätigte sich die Vermutung, dass es nicht an das Apoenzym binden kann, es sei denn, seine Bindung wäre lediglich entropiegetrieben. Erst in Anwesenheit des Coenzym wurden auswertbare Wärmesignale erhalten. Dabei wurde die D-Oktopin-Bindung an den binären Komplex ODH•NADH untersucht, um so den Ablauf der Katalyse zu unterbinden (s. Abb. 3.10, S. 43).

D-Oktopin zeigte, mit einer Bindungskonstante von $1,3 \cdot 10^3 \pm 1,4 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$, eine relativ hohe Affinität zum ODH•NADH-Komplex. Die Affinität von Pyruvat und L-Arginin zum entsprechenden komplementären binären Komplex war deutlich geringer. Selbst die Affinität des L-Arginins zum ODH•NADH-Komplex ist um den Faktor 7 kleiner, obwohl sich D-Oktopin von L-Arginin in erster Linie nur durch seinen Pyruvatanteil unterscheidet. Für die L-Arginin-Bindung konnte ein ΔG^0 -Wert von $-12,9 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden, wobei die Bindung des L-Arginins an den binären Komplex fast ausschließlich enthalpiegetrieben war. Die D-Oktopin-Bindung ist hingegen enthalpisch und entropisch begünstigt. Der ΔG^0 -Wert konnte hier auf $-17,7 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden (s. Tab. 3.2, S. 45). Die hohe Affinität des D-Oktopins zum komplementären binären Komplex begründet sich wahrscheinlich in seiner Struktur. D-Oktopin ist dem Übergangszustand, bei dem es sich um ein aus Pyruvat und L-Arginin gebildetes Imin handelt, strukturell ähnlicher als die einzelnen Substrate L-Arginin und Pyruvat. Da, laut Pauling (1946), um eine Reaktion wirksam katalysieren zu können, die Bindung des Übergangszustandes stärker sein sollte, als die Bindung der Substrate, erklärt sich somit auch die relativ starke Bindung des D-Oktopins.

4.3 UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATBINDUNG AN DIE LAKTATDEHYDROGENASE AUS DEM SCHWEINEMUSKEL

Die Substratbindung an die Laktatdehydrogenase ist bis heute schon vielfach charakterisiert worden. Sie erfolgt nach einem geordnet-sequenziellen Mechanismus, bei dem die Substrate an einen binären LDH•Coenzym-Komplex binden (Holbrook, *et al.* 1975).

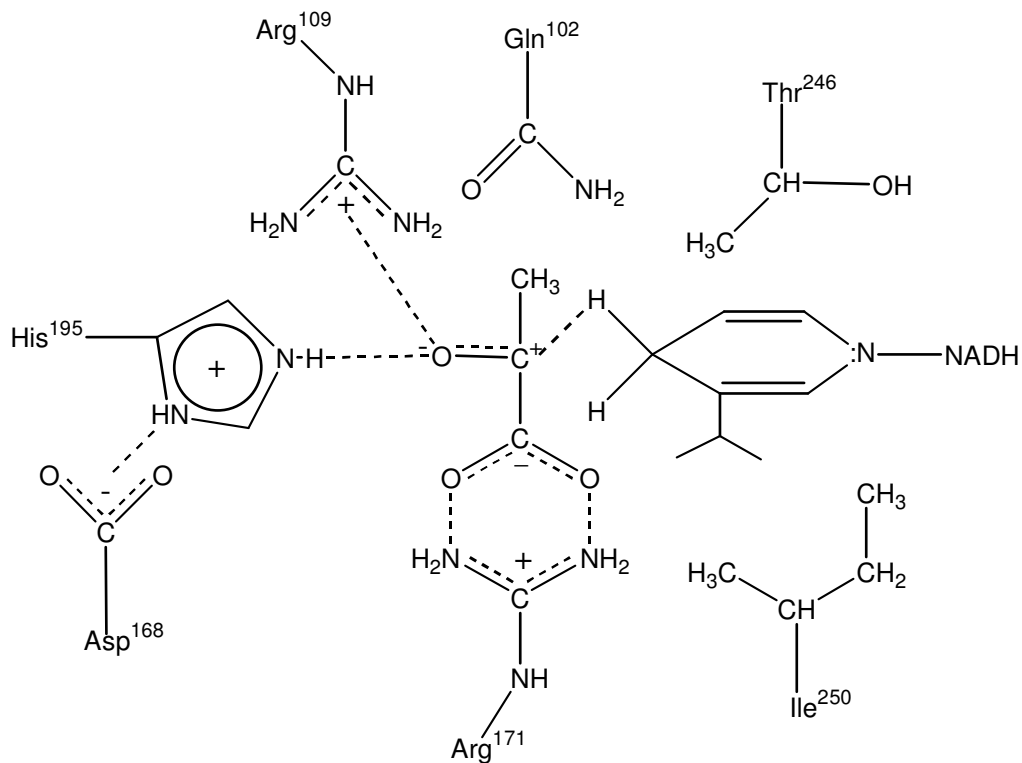


Abb. 4.1: Katalytische Triade der Laktatdehydrogenase. Eine doppelte Salzbrücke zwischen der Carboxylgruppe des Pyruvats und der Guanidiniumgruppe des Arg¹⁷¹ fixiert das Substrat und gewährleistet seine richtige Orientierung. His¹⁹⁵ dient als Protonendonator bzw. -akzeptor bei der Redoxreaktion. Sind die Substrate gebunden, interagiert das Asp¹⁶⁸ mit dem His¹⁹⁵ und stabilisiert seine protonierte Form. Ile²⁵⁰ schafft eine hydrophobe Umgebung, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und dem Arg¹⁷¹ verstärkt. Arg¹⁰⁹ polarisiert die α -Ketosäure und begünstigt den Hydridtransfer. Gln¹⁰² und Thr²⁴⁶ sind teilweise verantwortlich für die Substratspezifität (Aminosäurenummerierung aus *Bacillus stearothermophilus*; Clarke *et al.*, 1989a & b).

Die Substratbindestelle liegt tief im Inneren des Proteins verborgen (Holbrook *et al.*, 1975; Griffith und Rossmann, 1987). Dort befindet sich die an der Katalyse beteiligte Aminosäure His¹⁹⁵ (*Bacillus stearothermophilus*-Nummerierung) und das für die Substratbindung verantwortliche Arg¹⁷¹ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung) (s. Abb. 4.1) (Deng *et al.*, 1994). Sobald ein Pyruvatmolekül an das Arg¹⁷¹ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung) gebunden wird, verschließt ein flexibler ‚Loop‘ der Polypeptidkette (Aminosäurereste 98-110; *B. stearothermophilus*-Nummerierung) den Zugang zum aktiven Zentrum. Der für die Kataly-

se wichtige Aminosäurerest Arg¹⁰⁹ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung) nähert sich dadurch dem aktiven Zentrum und kommt in engen Kontakt mit dem Substrat. Wasser wird aus der Bindungstasche verdrängt. Durch eine Konformationsänderung werden das Substrat und NADH so zueinander ausgerichtet, dass ein Hydridtransfer stattfinden kann (Burgner und Ray, 1984; Deng *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2002).

4.3.1 Coenzym-Bindung

Schon Hinz *et al.* haben 1977 die Substratbindung an die Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel kalorimetrisch untersucht. Die dabei bestimmte freie Energie, ΔG^0 , für die NADH-Bindung weicht mit einem Wert von $-28,9 \pm 0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ (in 200 mmol L^{-1} Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0; $25 \text{ }^\circ\text{C}$) nur wenig von dem mikrokalorimetrisch bestimmten Wert von $-31,4 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ (100 mmol L^{-1} HEPES, pH 7,0; $25 \text{ }^\circ\text{C}$) ab. Auch die mikrokalorimetrisch bestimmte Änderung der Bindungsenthalpie und der Entropie stimmen gut mit den Literaturdaten überein. In beiden Untersuchungen wird die NADH-Bindung lediglich enthalpisch ($\Delta H^0 < 0$), nicht aber entropisch ($\Delta S^0 < 0$) begünstigt (s. Abb. 3.13, S. 47 und Tab. 3.3, S. 52).

Die treibende Kraft für die Bindung des Coenzym an die LDH sind hydrophobe Wechselwirkungen. Die Bindung des Coenzym sollte daher eigentlich mit einer beträchtlichen positiven Entropieänderung und einer nur kleinen Änderung der Bindungsenthalpie einhergehen (Subramanian, 1979). Bei dieser Aussage wurde wahrscheinlich die Konformationsänderung, die mit der Bindung des Coenzym an die LDH einhergeht, außer Betracht gelassen (Holbrook *et al.*, 1975; Hinz *et al.*, 1977; Jaenicke *et al.*, 1979, Deng *et al.*, 2001). Die LDH kontrahiert bei der NADH-Bindung, was dazu führt, dass weniger hydrophobe Gruppen Kontakt mit den Lösungsmittelmolekülen haben. Hinzu kommt ein Verlust an Freiheitsgraden, wovon sowohl das Protein als auch der Ligand betroffen ist (Hinz *et al.*, 1977). Alle diese Prozesse tragen ebenfalls zur Thermodynamik des Bindungsprozesses bei (Cooper, 1999).

Die Affinität der reduzierten Form des Coenzym, NADH, ist mit einer Bindungskonstante von $3,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ höher als die der oxidierten Form, NAD^+ , für die eine Bindungskonstante von $5,7 \cdot 10^3 \pm 4,5 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ bestimmt werden konnte. Wie schon zuvor bei der Coenzym-Bindung an die ODH erwähnt, ist diese Tatsache auf das Einführen der positiven Ladung des NAD^+ in die hydrophobe Bindungstasche zurückzuführen (Subramanian, 1979; Clarke, 1989a). Die NADH-Bindung sollte daher entropisch günstiger sein als die NAD^+ -Bindung. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ist allerdings

die NAD^+ -Bindung nicht nur enthalpisch, sondern auch entropisch begünstigt, was durch die Literaturwerte (Hinz *et al.*, 1977) nicht bestätigt werden kann. Obwohl der mikrokalorimetrisch bestimmte ΔG^0 -Wert von $-21,4 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ gut mit dem von Hinz *et al.* (1977) bestimmten Wert von $-18,8 \pm 1,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ übereinstimmt, weichen die für ΔH^0 und ΔS^0 bestimmten Werte von den Literaturwerten ab. Während in dieser Arbeit für die Bindungsenthalpie (ΔH^0) ein Wert von $-13,8 \pm 0,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für die Entropieänderung (ΔS^0) ein Wert von $25,4 \pm 0,8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bestimmt wurde, ermittelten Hinz *et al.* für ΔS^0 einen Wert von $-29,3 \pm 13,4 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und für ΔH^0 einen Wert von $-27,6 \pm 2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Abweichung dieser beiden thermodynamischen Parameter ist wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme zurückzuführen. Dabei unterscheiden sich das in dieser Arbeit (100 mmol L^{-1} HEPES, pH 7,0) und das von Hinz *et al.* (1977) verwendete Puffersystem (200 mmol L^{-1} Kaliumphosphat, pH 7,0) in ihren Ionisierungsenthalpien (Phosphatpuffer: $5,12 \text{ kJ mol}^{-1}$; HEPES: $21,07 \text{ kJ mol}^{-1}$; Fukuda und Takahashi, 1998). Werden gleichzeitig mit der eigentlichen Bindungsreaktion Protonen vom beobachteten System aufgenommen oder abgegeben, so ist die Enthalpie, die auf diese Protonierungsreaktionen zurückzuführen ist, ein Teil der gemessenen Gesamtenthalpie. Die auf eine solche Protonierungsreaktion zurückzuführende Enthalpie hängt dabei von der Ionisierungsenthalpie des verwendeten Puffersystems ab (Gomez und Freire, 1995; Leavitt und Freire, 2001, O'Brien *et al.*, 2001).

Eine Begründung für die entropisch günstige NAD^+ -Bindung könnte die mit der Coenzym-Bindung einhergehende Konformationsänderung sein. Der Literatur zu Folge induziert die reduzierte Form des Coenzym eine stärkere Konformationsänderung als die oxidierte Form (Hinz, 1983). Durch die Änderung der Konformation eines Proteins bei der Ligandenbindung wird auch seine Bewegungsfähigkeit beeinflusst. Verluste in der Dynamik eines Proteins tragen einen Teil zur Thermodynamik des Bindungsprozesses bei (Cooper, 1999). Geht man davon aus, dass bei der LDH die Bindung von NAD^+ zu einer weniger starken Konformationsänderung führt, wie die Bindung von NADH, so ist es vorstellbar, dass auch nach NAD^+ -Bindung noch ein Teil der Bewegungsfähigkeit erhalten bleibt, was zu einem geringeren Entropieverlust bei der NAD^+ -Bindung führen könnte.

4.3.2 Pyruvat- und L-Laktat-Bindung

Obwohl die Substratbindung an die Laktatdehydrogenase bekanntlich nach einem geordnet-sequenziellen Mechanismus erfolgt (Holbrook *et al.*, 1975), konnte bei der Titration von Pyruvat auch in Abwesenheit des Coenzym eine schwache Bindung mit einer Bindungs-

konstante von $K_b = 46,1 \pm 4 \text{ L mol}^{-1}$ detektiert werden. Dieser Wert entspricht einer Dissoziationskonstante (K_d) von 22 mmol L^{-1} . Da der K_m -Wert der Laktatdehydrogenase aus dem Schweinemuskel für Pyruvat mit $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ (Roche, 2005/2006) mehr als 100mal kleiner ist als die Dissoziationskonstante, ist die Wechselwirkung des Pyruvats mit dem Apoenzym für die Katalyse nicht relevant (Takena und Schwert, 1955; Holbrook und Stinson, 1970).

Eine L-Laktat-Bindung an die Apoform konnte hingegen nicht festgestellt werden. Nach Südi (1970) ist die Bindungskonstante für die Bindung von L-Laktat an die Laktatdehydrogenase in Abwesenheit von NAD^+ kleiner als 10 L mol^{-1} . So waren die in das Titrationsexperiment eingesetzten Protein- und Substratkonzentrationen anscheinend zu gering, um diese schwache Bindung messen zu können.

Da bei der Untersuchung der Substratbindung an die binären Komplexe der Ablauf der Katalyse verhindert werden sollte, wurde die Pyruvat- und L-Laktat-Bindung an den jeweils komplementären binären Komplex untersucht. Außerdem wurde zur weiteren Charakterisierung der Pyruvat-Bindung dessen Substratanalogen Oxamat zum $\text{LDH}\cdot\text{NADH}$ -Komplex titriert und die L-Laktat-Bindung durch die Titration von Oxalat zum $\text{LDH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplex untersucht.

Pyruvat bindet an den binären $\text{LDH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplex 10 mal stärker als L-Laktat an den binären $\text{LDH}\cdot\text{NADH}$ -Komplex. Während für die Pyruvat-Bindung an den $\text{LDH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplex eine Bindungskonstante von $465 \pm 97 \text{ L mol}^{-1}$ bestimmt werden konnte, lag die Bindungskonstante für die L-Laktat-Bindung an den $\text{LDH}\cdot\text{NADH}$ -Komplex lediglich bei $42 \pm 7 \text{ L mol}^{-1}$. Da die Laktatdehydrogenase durch hohe Pyruvatkonzentrationen gehemmt wird, durch L-Laktat aber jedoch kaum, war ein solches Ergebnis zu erwarten.

Die Substrathemmung durch Pyruvat ist die Folge einer Adduktbildung zwischen Pyruvat und NAD^+ (Fromm, 1961; Gutfreund *et al.*, 1968; Coulson und Rabin, 1969). Die LDH katalysiert die Bildung dieses Addukts, das dann mit hoher Affinität an das aktive Zentrum des Enzyms bindet und dieses blockiert (Everse *et al.*, 1971). Aufgrund der Adduktbildung ist die bei den Titrationsexperimenten gemessene Wärmetönung wahrscheinlich nicht vollständig auf die Bindung des Pyruvats an den binären Komplex zurückzuführen, da nach der Pyruvat-Bindung dieses mit NAD^+ zum Addukt reagieren kann. Dennoch liegt die für die Pyruvat-Bindung an den $\text{LDH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplex bestimmte Dissoziationskonstante ($K_d = 1/K_b$) mit $2,2 \text{ mmol L}^{-1}$ in der gleichen Größenordnung wie die für die humane M_4 -Isoform bestimmte Inhibitionskonstante (K_i) von $3,9 \text{ mmol L}^{-1}$ (Hewitt *et al.*, 1999).

Die Bindung von Pyruvat an den $\text{LDH}\cdot\text{NAD}^+$ -Komplex und die Bindung seines Substratanalogons Oxamat an den $\text{LDH}\cdot\text{NADH}$ -Komplex sind sowohl enthalpisch als auch entropisch

pisch begünstigt (s. Abb. 3.15, S. 50 und Tab 3.3, S. 52). Der entropische Beitrag zur freien Energie liegt für beide Bindungsreaktionen in der gleichen Größenordnung. Der enthalpische Beitrag zur freien Energie der Oxamat-Bindung ist jedoch dreimal höher als der enthalpische Beitrag zur freien Energie der Pyruvat-Bindung. Darin begründet sich auch die rund 200fach höhere Affinität des Oxamats an den LDH•NADH-Komplex (s. Abb. 3.15, S. 50; Tab. 3.3, S. 52).

Eine entropisch und enthalpisch begünstigte Oxamat-Bindung an den LDH•NADH-Komplex wird in der Literatur jedoch nicht bestätigt. Zwar stimmt der von Hinz *et al.* (1977) gemessene ΔG^0 -Wert von $-25,2 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ gut mit dem in dieser Arbeit bestimmten Wert von $-28,4 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ überein, jedoch weichen die für ΔH^0 und ΔS^0 bestimmten Werte von den Literaturwerten ab. Während mittels isothermaler Titrationskalorimetrie ein ΔH^0 -Wert von $-18,6 \pm 1,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für ΔS^0 ein Wert von $32,9 \pm 7,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bestimmt wurde, ermittelten Hinz *et al.* für ΔS^0 einen Wert von $-93,7 \pm 7,9 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und für ΔH^0 einen Wert von $-53,1 \pm 2,1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Abweichung dieser beiden thermodynamischen Parameter ist wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme und eventuell auf mit der Bindungsreaktion assoziierten Protonierungsreaktionen zurückzuführen.

Die für die Oxalat-Bindung an den LDH•NAD⁺-Komplex gemessenen Werte stimmen für ΔG^0 sowie für ΔH^0 und ΔS^0 gut mit der Literatur (Hinz *et al.*, 1977) überein. Die Reaktion ist sowohl enthalpisch als auch entropisch begünstigt, wie es auch schon von Hinz (1977) zuvor beschrieben wurde.

Die L-Laktat-Bindung an den LDH•NADH-Komplex ist hingegen nur enthalpiegetrieben. Der für die Bindungsenthalpie bestimmte Wert liegt dabei in der gleichen Größenordnung wie das ΔH^0 der Oxalat-Bindung an den LDH•NAD⁺-Komplex (s. Abb. 3.17, S. 52 und Tab. 3.3, S. 52). Die geringe Affinität des L-Laktats zum LDH•NADH-Komplex ist demzufolge auf eine extrem ungünstige Entropie zurückzuführen.

Wie schon zuvor erwähnt, bindet L-Laktat an seinen komplementären binären Komplex wesentlich schwächer als Pyruvat. Demzufolge wird die LDH erst bei sehr hohen Laktatkonzentrationen gehemmt. Stambaugh und Post haben 1966 für die Hemmung der LDH durch L-Laktat einen K_i von 26 mmol L^{-1} für die H₄-Isoform und einen K_i von 130 mmol L^{-1} für die M₄-Isoform aus dem Kaninchenmuskel ermittelt. Mikrokalorimetrisch konnte für die M₄-Isoform aus dem Schweinemuskel eine Dissoziationskonstante ($K_d = 1/K_b$) von 23 mmol L^{-1} ermittelt werden.

Obwohl es in den ein oder anderen thermodynamischen Parametern der in dieser Arbeit betrachteten Bindungsreaktionen Übereinstimmungen gibt, ist es nicht möglich, diese Parameter bestimmten Bindungsvorgängen zuzuordnen. Bei thermodynamischen Parametern handelt es sich immer um Energiedifferenzen zwischen dem Zustand, in dem Ligand und Protein getrennt in Lösung vorliegen und dem Zustand nach der Bindung, in dem beide im Komplex miteinander wechselwirken. Zu diesen Energiedifferenzen tragen z. B. elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und van-der-Waalskräfte bei, die bei der Bindung eines Liganden an ein Makromolekül aufgebrochen und ausgebildet werden. Ebenso tragen Liganden-induzierte Konformationsänderungen zu diesen Energiedifferenzen bei.

4.4 VERGLEICH DER SUBSTRATBINDUNG AN ODH UND LDH

Laktatdehydrogenase und Oktopindehydrogenase sind funktionell homologe Enzyme. Sie terminieren die anaerobe Glykolyse, indem sie Elektronen von NADH auf einen organischen Elektronenakzeptor übertragen. Während die LDH Pyruvat zu L-Laktat reduziert, katalysiert die ODH die reduktive Kondensation von Pyruvat mit der Aminosäure L-Arginin. In beiden Fällen wird NADH zu NAD^+ reoxidiert. Ein Vergleich der thermodynamischen Parameter der Substratbindung an ODH und LDH sollte zeigen, inwiefern sich die beiden Enzyme bei der Bindung des gleichen oder eines äquivalenten Substrates unterscheiden.

Dehydrogenasen zeigen eine große Ähnlichkeit im Aufbau der Dinukleotid-Bindestelle (Rossmann *et al.*, 1974). Diese ist charakterisiert durch die sogenannte Rossmannfalte, eine circa 30 Aminosäuren umfassende $\beta\alpha\beta$ -Sekundärstruktur, in deren Bereich sich die ADP-Bindestelle des NADH befindet (Rossmann *et al.*, 1974). Diese Sekundärstruktur konnten Britton *et al.* (1998) für die *N*-(1-D-carboxylethyl)-L-norvalindehydrogenase (CENDH) aus *Arthrobacter spec.* durch Röntgenstrukturanalysen im N-terminalen Bereich des Enzyms identifizieren. Die tierischen Oktopindehydrogenasen weisen in der Primärsequenz auch Ähnlichkeiten in diesem Bereich auf. Für die Dinukleotid-Bindestelle der ODH aus *Pecten maximus* ließ sich ebenfalls eine $\beta\alpha\beta$ -Sekundärstruktur vorhersagen (Janßen, 2000).

Die bei der Untersuchung der Coenzym-Bindung an die ODH und LDH ermittelten freien Energien unterstreichen die strukturellen Ähnlichkeiten. Die für die NADH-Bindung sowohl an ODH als auch an LDH bestimmten freien Energien liegen in einem für die NADH-Bindung an Dehydrogenasen charakteristischen Bereich von $-31 \pm 6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Hinz, 1983). Dabei ist die NADH-Bindung an die Laktatdehydrogenase lediglich enthalpiegetrieben, wo-

hingegen die Bindung des Coenzym an die ODH enthalpisch und entropisch begünstigt ist (s. Abb. 3.18, S. 53 und Tab. 3.4, S. 54).

Auch die freien Energien für die Bindung von NAD^+ unterscheiden sich für beide Dehydrogenasen kaum (s. Tab. 3.4, S. 54). Während die NAD^+ -Bindung an die LDH sowohl enthalpisch als auch entropisch begünstigt ist, erweist sich die NAD^+ -Bindung an die ODH jedoch nur als enthalpiegetrieben (s. Abb. 3.18, S. 53 und Tab. 3.4, S.54).

Für die ODH wird, wie für andere NADH -abhängige Dehydrogenasen auch (Rossmann *et al.*, 1975), eine Liganden-induzierte Konformationsänderung bei der Coenzym-Bindung vermutet (van Os, 2001). Im Gegensatz zur LDH, bei der die NADH -Bindung zu einer stärkeren Konformationsänderung führt als die NAD^+ -Bindung (Hinz *et al.*, 1977; Hinz, 1983), ist es für die ODH denkbar, dass hier die NAD^+ -Bindung zu einer stärkeren Konformationsänderung führt als die NADH -Bindung. Die thermodynamischen Parameter für beide Bindungsvorgänge unterstützen diese Vermutung (s. Tab. 3.4, S. 54). Nach der NADH -Bindung muss ein Teil der Flexibilität des Proteins erhalten bleiben, da mit der anschließenden L-Arginin-Bindung eine weitere Konformationsänderung einhergeht. Im Unterschied zur LDH besitzt die ODH anscheinend erst danach die Konformation, die eine Pyruvat-Bindung überhaupt ermöglicht.

Wie bei der LDH (Clark *et al.*, 1989) ist offenbar auch bei der ODH eine His-Asp-Arg-Triade (s. Abb. 4.1) sowohl an der Pyruvat-Bindung als auch an der Katalyse maßgeblich beteiligt (Janßen, 2000; Müller, persönliche Mitteilung). Ein DXXR-Motiv, wie es sich im aktiven Zentrum der Laktat- und der Malatdehydrogenase befindet (Monneuse und Rouzé, 1987; Clarke *et al.*, 1988; Goward und Nicholls, 1994), konnte bislang in tierischen Opindehydrogenasen nicht gefunden werden. In der bakteriellen CENDH aus *Arthrobacter spec.* konnten Monneuse und Rouzé (1987) dagegen ein DXXR-Motiv identifizieren, dessen Beteiligung am Reaktionsmechanismus jedoch durch Röntgenkristall-Untersuchungen ausgeschlossen werden konnte (Britton *et al.*, 1998).

Durch Sequenzvergleiche mit der Nopalin- und Lysin-dehydrogenase aus *Agrobacterium tumefaciens* konnten jedoch sechs konservierte Aminosäuren (Asn^{198} , His^{202} , Arg^{292} , Tyr^{293} , Glu^{296} , Asp^{297}) identifiziert werden, die im Spalt zwischen den beiden Domänen in der Nähe der Nukleotidbindestelle lokalisiert sind. Die konservierten Aminosäuren Aspartat und Arginin reichen wie zwei Finger in diesen Spalt hinein und weisen dabei in Richtung der NADH -Bindestelle (Britton *et al.*, 1998).

In der LDH wird Pyruvat durch eine doppelte Salzbrücke zwischen dessen Carboxylgruppe und der Guanidiniumgruppe des Arg¹⁷¹ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung) im aktiven Zentrum des Enzyms fixiert. Zusätzlich gewährleistet diese starke Bindung die richtige Orientierung des Substrats und verhindert eine Wechselwirkung mit dem konservierten Arg¹⁰⁹ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung), das bei der Stabilisierung des Übergangszustandes eine wichtige Rolle einnimmt. Pyruvat kann zwar auch in Abwesenheit von NADH binden, aber erst durch die NADH-induzierte Konformationsänderung ist eine Bindung des Pyruvats mit hoher Affinität möglich.

Obwohl bei der ODH die gleichen konservierten Aminosäuren an der Substratbindung und der Katalyse beteiligt zu sein scheinen, konnte keine Pyruvat-Bindung an den binären ODH•NADH-Komplex detektiert werden. Wahrscheinlich liegt die ODH erst nach erfolgter L-Arginin-Bindung in einer Konformation vor, die eine Pyruvat-Bindung erlaubt.

Bei der dimeren CENDH ragen die katalytisch aktiven Reste in den Spalt zwischen der Substrat- und der Nukleotidbindedomäne, während bei der LDH die Substratbindestelle im hydrophoben Inneren des Proteins liegt. Für die LDH hat sich diese hydrophobe Umgebung der Substratbindestelle als äußerst wichtig für die Substratbindung erwiesen, denn nur durch sie ist die starke Wechselwirkung zwischen dem Arg¹⁷¹ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung) und dem Pyruvat überhaupt erst möglich (Clarke *et al.*, 1989a). Geht man davon aus, dass in der ODH die katalytisch aktiven Aminosäurereste ähnlich positioniert sind wie in der CENDH, ist wahrscheinlich aufgrund der fehlenden hydrophoben Umgebung eine Wechselwirkung zwischen dem Pyruvat und dem konservierten Arg³²⁴ (*Pecten*-Nummerierung) nicht möglich. Erst durch die L-Arginin-induzierte Konformationsänderung werden die katalytisch aktiven Aminosäurereste in eine hydrophobe Umgebung gebracht und eine starke Wechselwirkung des Substratcarboxyls mit dem Arg³²⁴ (*Pecten*-Nummerierung) ermöglicht.

Die Bindung des Pyruvats induziert in der LDH eine Konformationsänderung, die das Substrat und NADH so zueinander ausrichtet, dass die Laktatbildung stattfinden kann (Burgner und Ray, 1984; Deng *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2002). Ein flexibler ‚Loop‘, der den Aminosäurerest Arg¹⁰⁹ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung) enthält, verschließt gleichzeitig das aktive Zentrum des Enzyms. Durch Arg¹⁰⁹ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung) wird das Carbonyl-C-Atom des Pyruvats polarisiert und so der Hydridtransfer begünstigt (Clarke *et al.*, 1989a). His¹⁹⁵ (*B. stearothermophilus*-Nummerierung) dient dabei als Protonendonator und überträgt ein Proton auf das Substrat.

Für die ODH ist hingegen ein anderer Mechanismus denkbar. Während oder sofort nach der Bindung des Pyruvats erfolgt ein nukleophiler Angriff durch die α -Aminogruppe des L-Arginins auf das Carbonyl-C-Atom des Pyruvats. Dadurch wird Pyruvat zusätzlich im aktiven Zentrum des Enzyms fixiert. Das konservierte His²¹² (*Pecten*-Nummerierung) überträgt dann ein Proton auf den Carbonyl-Sauerstoff. Nach einer Deprotonierung des L-Arginins und einer Reprotonierung am Carbonyl-Sauerstoff des Pyruvats kann Wasser abgespalten werden. Als Übergangszustand entsteht ein Imin, auf das dann das Hydrid übertragen wird.

Ebenso wie die LDH kann auch die ODH in Anwesenheit von L-Arginin durch hohe Pyruvatkonzentrationen gehemmt werden (Müller, persönliche Mitteilung). Die Bindungskonstante von Pyruvat an den LDH•NAD⁺-Komplex ($K_b = 465 \pm 97 \text{ L mol}^{-1}$) und von Pyruvat an den ODH•NAD⁺-Komplex in Anwesenheit von L-Arginin ($K_b = 282 \pm 35 \text{ L mol}^{-1}$) liegen dabei in der gleichen Größenordnung. Die Laktatdehydrogenase wird letztendlich durch ein Pyruvat-NAD⁺-Addukt gehemmt, das mit hoher Affinität an das Enzym bindet (Fromm, 1961; Gutfreund *et al.*, 1968; Coulson und Rabin, 1969; Everse *et al.*, 1971). Ob es zu solch einer Adduktbildung auch bei der ODH kommt, lässt sich mit Hilfe der Titrationsexperimente nicht sagen, ist aber keinesfalls auszuschließen. Es ist außerdem fraglich, ob ein solches Addukt mit ebenso hoher Affinität an die ODH binden würde, wie es an die LDH bindet. Weiterhin ist unklar, welche Rolle das L-Arginin im Falle einer Adduktbildung spielen könnte.

L-Laktat spielt im Gegensatz zu Pyruvat bei der Hemmung der LDH keine entscheidende Rolle. Aufgrund der geringen Affinität des L-Laktats zum binären LDH•NADH-Komplex ($K_b = 42 \pm 7 \text{ L mol}^{-1}$) wird die LDH erst bei sehr hohen L-Laktatkonzentrationen gehemmt. D-Oktopin hingegen bindet gut an den ODH•NADH-Komplex ($K_b = 1,3 \cdot 10^3 \pm 1,4 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1}$) und scheint bei der Substrathemmung der ODH von größerer Bedeutung zu sein als Pyruvat und L-Arginin.

4.5 KINETISCHER MECHANISMUS DER ODH-REAKTION

Die Substratbindung an die Oktopindehydrogenase verläuft nach einem geordnet-sequenziellen Mechanismus. An das freie Enzym bindet zuerst die reduzierte Form des Coenzyms, NADH, wodurch eine Konformationsänderung hervorgerufen wird, welche die Bindung des Substrats L-Arginin erst ermöglicht. Wahrscheinlich bringt die Arginin-induzierte

Konformationsänderung die für die Pyruvat-Bindung wichtigen Aminosäurereste in eine hydrophobe Umgebung, die sich schon bei der Pyruvat-Bindung an die LDH als essentiell erwiesen hat. Tritt Pyruvat in das aktive Zentrum ein, erfolgt sofort der nukleophile Angriff durch die α -Aminogruppe des L-Arginins. Anschließend wird es durch einen konservierten Histidylrest protoniert. Dabei wird die Carboxylgruppe des Pyruvats durch ein konserviertes Arginin im aktiven Zentrum des Enzyms stabilisiert (Janßen, 2000; Müller, persönliche Mitteilung). Zusätzlich wird das Pyruvat durch die schnelle Reaktion mit dem L-Arginin im aktiven Zentrum fixiert.

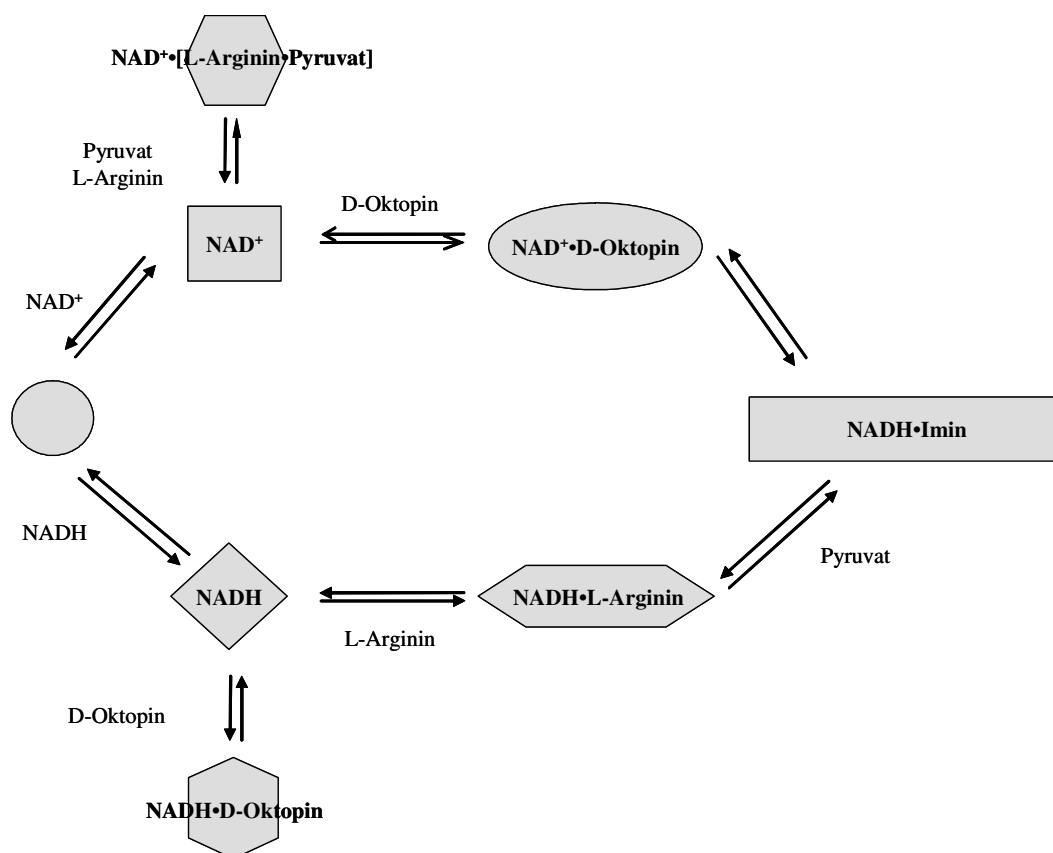


Abb. 4.2: Kinetischer Mechanismus der ODH-Reaktion. Die Substratbindung erfolgt in einer geordneten Reihenfolge. Als erstes bindet das Coenzym, gefolgt von L-Arginin und Pyruvat. Durch die Reaktion von L-Arginin und Pyruvat entsteht ein Imin als Übergangszustand, der durch die Übertragung des Hydrid-Ions von NADH zu D-Oktopin reduziert wird. Sowohl D-Oktopin als auch L-Arginin und Pyruvat wirken als Inhibitoren des ODH•NADH- bzw. des ODH•NAD⁺-Komplexes. Die geometrischen Formen stellen die verschiedenen Konformationen des Enzyms und die unterschiedlichen Enzym-Substrat-Komplexe dar.

Des Weiteren werden durch eine Konformationsänderung bei der L-Arginin-Bindung die Substrate erst in die räumliche Nähe des Nikotinamidrings gebracht, wie es z. B. auch für die CENDH aus *Arthrobacter spec.* vermutet wird (Britton *et al.*, 1998). Erst dadurch ist der

Hydridtransfer auf den Übergangszustand, dem aus Pyruvat und L-Arginin gebildeten Imin, möglich. Die Bindung des L-Arginins als erstes Substrat ist grundlegend notwendig, da die damit einhergehende Konformationsänderung die Entstehung von L-Laktat in einem putativen ODH•NADH•Pyruvat-Komplex verhindert.

Durch den Hydridtransfer von NADH auf den Übergangszustand entstehen D-Oktopin und NAD^+ , die dann in geordneter Reihenfolge aus dem aktiven Zentrum entlassen werden. Der Austritt von NAD^+ und wahrscheinlich auch der des D-Oktopins aus dem aktiven Zentrum gehen dabei wiederum mit Konformationsänderungen einher.

Neben diesem Reaktionsweg können noch zwei Nebenwege eingeschlagen werden, die allerdings in einer Sackgasse enden. Sowohl D-Oktopin als auch L-Arginin und Pyruvat können an den jeweils komplementären binären Komplex binden. Da in beiden Fällen kein Hydridtransfer erfolgen kann, entstehen sogenannte ‚*dead-end*‘-Komplexe, die womöglich eine Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität spielen. Dabei bindet D-Oktopin mit einer rund fünfmal höheren Affinität an den entsprechenden komplementären Komplex als Pyruvat und L-Arginin.

Die thermodynamische Analyse der Substratbindung an die rekombinante Oktopindehydrogenase zeigt, dass die bisherigen Modelle (s. Abb. 1.2, S. 10 und Abb. 1.3, S. 11) dem kinetischen Mechanismus der ODH-Reaktion nicht gerecht werden. Dennoch gibt es einige Schnittpunkte mit den älteren Modellen, wie z. B. die Bindung des Coenzym als Voraussetzung für die nachfolgende Substratbindung, sowie die Bildung der beiden ‚*dead end*‘-Komplexe. Jedoch erlauben beide Modelle eine Bindung von Pyruvat an den ODH•NADH-Komplex, wodurch die Entstehung von L-Laktat begünstigt würde. Der Mechanismus der ODH ist aber gerade darauf ausgelegt, die Entstehung von L-Laktat zu verhindern.

4.6 WELCHEN VORTEIL HAT ES, EINE OKTOPINDEHYDROGENASE ZU BESITZEN?

In den Geweben mariner Lebewesen kommen freie Aminosäuren oft in hohen Konzentrationen vor, da sie diese für die Osmoregulation benötigen. Hohe L-Argininkonzentrationen haben sich dabei als ungünstig für den Organismus erwiesen. Aufgrund seiner positiven Nettoladung geht L-Arginin vielfach Wechselwirkungen mit den verschiedensten Metaboliten ein und hemmt Enzymaktivitäten. Oktopin zeigt diesen Effekt jedoch nicht (Bowlus und

Somero, 1979). Durch die Bildung von D-Oktopin könnte demnach störendes L-Arginin beseitigt werden.

Während des Fluchtschwimmens gewinnt die Pilgermuschel, *Pecten maximus*, ihre Energie ausschließlich durch die Transphosphorylierung des L-Argininphosphats, wodurch es zu einer Erhöhung der L-Argininkonzentration im Muskelgewebe kommt. Währenddessen lässt sich nur ein geringer Anstieg der D-Oktopinkonzentration beobachten, da der glykolytische Flux durch die Hemmung der Phosphofruktokinase via L-Argininphosphat reduziert ist. Zu diesem Zeitpunkt sind daher die NADH- und Pyruvatkonzentrationen limitierend. Ein deutlicher Anstieg der D-Oktopinkonzentration ist erst während der Erholungsphase zu beobachten, wenn der L-Argininphosphat-Pool erschöpft ist. Denn dann wird der glykolytische Flux, wahrscheinlich durch die Aktivierung der Phosphofruktokinase durch AMP und durch die niedrige L-Argininphosphatkonzentration, erhöht (Gäde *et al.*, 1978). Durch die erhöhte Glykolyserate kommt es zu einem Anstieg der NADH- und Pyruvatkonzentrationen und L-Arginin kann durch die reduktive Kondensation mit Pyruvat aus dem Gewebe entfernt werden. Die Katalyse dieser Reaktion durch die Oktopindehydrogenase erfolgt dabei nach einem geordnet-sequenziellen Mechanismus, bei dem, nach der Bindung des NADHs, L-Arginin als erstes Substrat binden muss. Würde Pyruvat vor dem L-Arginin an das Enzym binden und zu L-Laktat reduziert werden, so würde es aus dem Gleichgewicht entfernt werden und die Vermeidung hoher L-Argininkonzentrationen im Gewebe durch die ODH-Reaktion wäre somit nur wenig effizient. Durch diese hohen L-Argininkonzentrationen erklärt sich auch die relativ geringe Affinität des Arginins zum ODH•NADH-Komplex ($K_d = 1/K_b = 5,5 \text{ mmol L}^{-1}$).

Das Produkt der ODH-Reaktion, D-Oktopin, bindet hingegen mit einer circa siebenmal höheren Affinität an den ODH•NADH-Komplex ($K_d = 1/K_b = 0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) als L-Arginin. Sollte die Hemmung durch D-Oktopin eine regulative Bedeutung haben, ist eine hohe Affinität des D-Oktopins zum komplementären binären Komplex sinnvoll, da nur etwa 27 % des freigesetzten L-Arginins zu D-Oktopin umgesetzt werden (Gäde *et al.*, 1978). Wahrscheinlich wird durch die hohe Affinität des D-Oktopins zum ODH•NADH-Komplex die Rückreaktion reguliert. D-Oktopin wird nicht, wie z. B. L-Laktat, aus dem Muskelgewebe entfernt und ins Blut abgegeben, sondern es akkumuliert im Gewebe. Würde bei hohen Oktopinkonzentrationen sofort eine Rückreaktion stattfinden, so würden sowohl die L-Arginin- als auch die NADH- und Pyruvatkonzentrationen schlagartig erhöht, so dass der Organismus durch die Oktopinbildung keinen Vorteil hätte. Die Bildung eines abortiven ODH•NADH•D-Oktopin-Komplexes sorgt dafür, dass die Rückreaktion nur dosiert stattfinden kann, da sie D-Oktopin aus dem Gleichgewicht entfernt. Währenddessen kann

freies L-Arginin wieder phosphoryliert und dessen Konzentration verringert werden, bevor durch die ODH-Rückreaktion neues L-Arginin freigesetzt wird.

Die Oktopindehydrogenase scheint gegenüber der Laktatdehydrogenase den Vorteil zu haben, dass neben der Regenerierung von Reduktionsäquivalenten während starker Muskelaktivität auch hohe, störende L-Argininkonzentrationen vermieden werden können. Auch die Hemmung durch das Produkt Oktopin trägt vermutlich zur Regulierung der L-Argininkonzentration bei. Es lässt sich daher mutmaßen, dass die Oktopindehydrogenase die ursprünglichste alternative Pyruvatoxidoreduktase war, da der Oktopinweg und L-Argininphosphat, das ursprünglichste der Phosphagene, meistens assoziiert sind. Mit dem Auftreten anderer Phosphagene blieb bei starker Muskelaktivität eine Erhöhung der Argininkonzentration allerdings aus. Dennoch musste NAD^+ regeneriert werden. Anstatt des L-Arginins diente nun vielleicht diejenige Aminosäure als Substrat, deren Konzentration in dem jeweiligen Organismus am höchsten ist. Daraus könnten sich im Laufe der Evolution die unterschiedlichen Aminosäurespezifitäten der verschiedenen Opindehydrogenasen entwickelt haben, deren Funktion sich aber lediglich darauf beschränkt Reduktionsäquivalente zu regenerieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Opindehydrogenasen terminieren im Energiestoffwechsel verschiedener mariner Invertebraten die anaerobe Glykolyse, indem sie die reduktive Kondensation einer Aminosäure mit Pyruvat oder einer anderen α -Ketosäure zu einem Opin und Wasser katalysieren, wobei NADH zu NAD^+ reoxidiert wird. Bei Vertebraten sowie bei Crustaceen, Spinnen und Insekten übernimmt die Laktatdehydrogenase diese Aufgabe. Wie bei diesen Tieren die LDH, stellt bei vielen Mollusken die Oktopindehydrogenase einen adaptiven Mechanismus in Flucht- und Kampfreaktionen dar.

Zur Aufklärung der Struktur und des molekularen Reaktionsmechanismus der alternativen Pyruvatoxidoreduktasen erwies sich die Oktopindehydrogenase als besonders geeignet, da nach Aufklärung der Primärstruktur und heterologer Expression in *E. coli* das Enzym in ausreichender Menge und homogen zur Verfügung stand (Janßen, 2000). Obwohl biochemisch bereits gut charakterisiert, gibt es über den Reaktionsmechanismus der ODH jedoch widersprüchliche Informationen.

Durch einen Vergleich der thermodynamischen Parameter für die Substratbindung an ODH und LDH sollten einerseits der kinetische Mechanismus der ODH-Reaktion identifiziert und andererseits die Frage nach einem Selektionsvorteil durch den Besitz alternativer Pyruvatoxidoreduktasen für die verschiedenen marinen Invertebraten zumindest ansatzweise geklärt werden.

Die thermodynamische Analyse der Substratbindung an die rekombinante Oktopindehydrogenase hat gezeigt, dass diese nach einem geordnet-sequenziellen Mechanismus erfolgt. An das freie Enzym bindet zuerst die reduzierte Form des Coenzym, NADH, wodurch eine Konformationsänderung hervorgerufen wird, welche die Bindung des ersten Substrats, L-Arginin, ermöglicht. Durch die Bindung des L-Arginins wird wiederum eine Konformationsänderung induziert, welche die Bindung des zweiten Substrats, Pyruvat, gestattet. Dadurch werden die Substrate in die räumliche Nähe des Nikotinamidrings gebracht. Erst dann ist der Hydridtransfer auf den Übergangszustand möglich, dem aus Pyruvat und L-Arginin gebildeten Imin. Sowohl die Substrate L-Arginin und Pyruvat als auch D-Oktopin können mit dem jeweils komplementären binären Komplex sogenannte ‚dead-end‘-Komplexe bilden, die womöglich eine Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität spielen.

Sowohl bei der LDH (Clark *et al.*, 1989) als auch bei der ODH ist eine His-Asp-Arg-Triade an der Pyruvat-Bindung und an der Katalyse maßgeblich beteiligt (Janßen, 2000; Müller, persönliche Mitteilung). Trotzdem unterscheiden sich beide Dehydrogenasen in ihrer

Affinität zum Substrat Pyruvat. Während Pyruvat mit einer hohen Affinität an einen binären LDH•NADH-Komplex bindet, war eine Bindung an einen ODH•NADH-Komplex nicht detektierbar. Es ist wahrscheinlich die L-Arginin-induzierte Konformationsänderung, welche die katalytische Triade in die für die Pyruvat-Bindung essentielle hydrophobe Umgebung bringt. Der kinetische Mechanismus der ODH-Reaktion ist also darauf ausgelegt, die Entstehung von L-Laktat in einem putativen ODH•NADH•Pyruvat-Komplex zu verhindern.

Neben der Regenerierung von Reduktionsäquivalenten wird durch die ODH-Reaktion auch die Konzentration freien L-Arginins verringert. In den Geweben mariner Lebewesen kommen freie Aminosäuren oft in hohen Konzentrationen vor, da sie diese für die Osmoregulation benötigen. Hohe Argininkonzentrationen haben sich dabei als ungünstig für den Organismus erwiesen. Aufgrund seiner positiven Nettoladung geht L-Arginin vielfach Wechselwirkungen mit den verschiedensten Metaboliten ein und hemmt Enzymaktivitäten. D-Oktopin hingegen zeigt diesen Effekt nicht (Bowlus und Somero, 1979). Durch die Bildung von D-Oktopin könnten demnach, neben der Regenerierung von Reduktionsäquivalenten während starker Muskelaktivität, auch störende, hohe L-Argininkonzentrationen im Organismus vermieden werden. Offenbar scheint dieses für marine Invertebraten der einzige Vorteil der Oktopindehydrogenase gegenüber der Laktatdehydrogenase zu sein.

6 LITERATUR

- Baici A, Luisi PL, Olomucki A, Doublet MO, Klincak J (1974) Influence of ligands on the coenzyme dissociation constants in octopine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem* 46, 59-66.
- Bowlus RD und Somero GN (1979) Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *J. Exp. Zool.* 208(2), 137-151.
- Bradford MM (1976) A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54.
- Britton KL, Asano Y, Rice DW (1998) Crystal structure and active site location of N-(1-D-carboxylethyl)-L-norvaline dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* 5(7), 593-601.
- Burgner JW und Ray Jr. WJ (1978) Mechanistic study of the addition of pyruvate to NAD⁺ catalyzed by lactate dehydrogenase. *Biochemistry* 17(9), 1654-1661.
- Burgner JW und Ray WJ (1984) Acceleration of the NAD-cyanide adduct reaction by lactate dehydrogenase: the equilibrium binding effect as a measure of the activation of bound NAD. *Biochemistry* 23, 3620–3626.
- Chen YQ, van Beek J, Deng H, Burgner J and Callender R (2002) Vibrational structure of NAD(P) cofactors bound to several NAD(P)-linked enzymes: an investigation of ground state activation. *J. Phys. Chem.* 106, 10733–10740.
- Clarke AR, Atkinson T, Holbrook JJ (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I. *Trends Biochem. Sci.* 14(3), 101-105.
- Clarke AR, Atkinson T, Holbrook JJ (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part II. *Trends Biochem. Sci.* 14(4), 145-148.
- Clarke AR, Wilks HM, Barstow DA, Atkinson T, Chia WN, Holbrook JJ (1988) An investigation of the contribution made by the carboxylate group of an active site histidine-aspartate couple to binding and catalysis in lactate dehydrogenase. *Biochemistry* 27(5), 1617-1622.
- Connett RJ, Gayeski TE, Honig CR (1984) Lactate accumulation in fully aerobic, working, dog gracilis muscle. *Am. J. Physiol.* 246(1Pt2), H120-H128.
- Connett RJ, Gayeski TE, Honig CR (1985) Energy sources in fully aerobic rest-work transitions: a new role for glycolysis. *Am. J. Physiol.* 248(6Pt2), H922-H929.
- Cooper A (1999) Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(5), 557-563.
- Cooper A und Johnson CM (1994) Introduction to microcalorimetry and biomolecular energetics. *Methods Mol. Biol.* 22, 109-124.
- Cooper A, Johnson CM, Lakey JH, Nöllmann M (2001) Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophys. Chem.* 93, 215-230.

Coulson CJ und Rabin BR (1969) Inhibition of lactate dehydrogenase by high concentrations of pyruvate: the nature and removal of the inhibitor. *FEBS Lett.* 3, 333-337.

Crabtree B und Newsholme EA (1972) The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 126(1), 49-58.

Davis BJ (1964) Disc Electrophoresis - 2: Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* 121, 404-427.

Deng H, Brugner JW, Callender R (1992) Raman spectroscopic studies of the effects of substrate binding on coenzymes bound to lactate dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7997-8003.

Deng H, Zheng J, Clarke A, Holbrook JJ, Callender R, Burgner JW (1994) Source of catalysis in the lactate dehydrogenase system: ground state interactions in the enzyme-substrate complex. *Biochemistry* 33, 2297-2305.

Deng H, Zhadin N, Callender R (2001) Dynamics of protein ligand binding on multiple time scales: NADH binding to lactate dehydrogenase. *Biochemistry* 40(13), 3767-3773.

Doublet MO und Olomucki A (1975a) Investigations on the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. 1. Steady-state kinetics. *Eur. J. Biochem.* 59, 175-183.

Doublet MO, Olomucki A, Baici A, Luisi PL (1975b) Investigations on the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. 2. Location of the rate-limiting step for enzyme turnover. *Eur. J. Biochem.* 59, 185-191.

Doyle ML, Louie G, Dal Monte PR, Sokoloski TD (1995) Tight binding affinities determined from thermodynamic linkage to protons by titration calorimetry. *Methods Enzymol.* 259, 183-194.

Eftink M und Biltonen R (1980) Thermodynamics of interacting biological systems. In: *Biological Microcalorimetry*, ed. Beezer A, London: Academic Press, 343-412.

Eklund H, Nordstrom B, Zeppezauer E, Soderlund G, Ohlsson I, Boiwe T, Soderberg BO, Tapia O, Branden CI, Akeson A (1976) Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2-4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 102(1), 27-59.

Emerson PM, Wilkinson JH, Withycombe WA (1964) Effect of oxalate on the activity of lactate dehydrogenase. *Nature* 202, 1337-1338.

Everse J, Barnett RE, Thorne CJ, Kaplan NO (1971) The formation of ternary complexes by diphosphopyridine nucleotide-dependent dehydrogenases. *Bioorg. Chem.* 1, 207-233.

Fields JH (1976a) A dehydrogenase requiring alanine and pyruvate as substrates from oyster adductor muscle. *Fed. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biol.* 37, 1687.

Fields JH, Guderley H, Storey KB, Hochaka PW (1976b) The pyruvate branch point in squid brain: competition between octopine dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Can. J. Zool.* 54, 879-885.

- Fields JHA, Eng AK, Ramsden WD, Hochachka PW, Weinstein B (1980) Alanopine and strombine are novel amino acids produced by a dehydrogenase found in the adductor muscle of the oyster, *Crassostrea gigas*. Arch. Biochem. Biophys. 201, 110-114.
- Freire E, Mayorga OL, Straume M (1990) Isothermal titration calorimetry. Analyt. Chem. 62, 950-959.
- Fromm HJ (1961) Evidence for ternary-complex formation with rabbit-muscle lactic acid dehydrogenase, diphosphopyridine nucleotide and pyruvic acid. Biochem. Biophys. Acta 52, 199-200.
- Fukuda H und Takahashi K (1998) Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 potassium chloride. Proteins 33, 159-166.
- Gäde G (1974) Octopine dehydrogenase in fresh-water bivalve, *Anodonta-Cygneta*. Comp. Biochem. Physiol. 48B, 513-517.
- Gäde G und Grieshaber M (1975) Partial-purification and properties of octopine dehydrogenase and formation of octopine in *Anodonta-Cygneta* l. J. Comp. Physiol. 102, 149-158.
- Gäde G und Grieshaber MK (1986) Pyruvate reductases catalyse the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 83B, No.2, 255-272.
- Gomez J und Freire E (1995) Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiapepsin. J. Mol. Biol. 252, 337-350.
- Goward CR und Nicholls DJ (1994) Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. Protein Sci. 3(10), 1883-1888.
- Grieshaber M (1976) An enzymatic method for the estimation of octopine. Anal. Biochem. 74(2), 660-663.
- Grieshaber MK und Gäde G (1977) Energy supply and the formation of octopine in the adductor muscle of the scallop *Pecten jacobaeus* (Lamarck). Comp. Biochem. Physiol. 58B, 249-353.
- Grieshaber MK und Kreutzer U (1986) Opine formation in marine invertebrates. Zool. Beitr. N F 30, 205-229.
- Grieshaber MK, Hardewig I, Kreutzer U, Pörtner HO (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 125, 44-147.
- Griffith JP und Rossmann MG (1987) M4 Lactate dehydrogenase ternary complex with NAD and oxamate. Brookhaven Data Bank 1LDM.
- Gutfreund H, Cantwell R, McMurray CH, Criddle RS, Hathaway G (1968) The kinetics of the reversible inhibition of heart lactate dehydrogenase through the formation of the enzyme-oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide-pyruvate compounds. Biochem. J. 106(3): 683-687.
- Hammen CS und Bullock RC (1991) Opine oxidoreductases in brachiopods, bryozoans, phoronids and molluscs. Biochem. Syst. Ecol. 19, No. 4. 263-269.

Hammen CS und Fielding C (1993) Opine oxidoreductases in marine worms of five phyla. *J. Comp. Physiol.* 106B, No. 4, 989-992.

Hand SC und Hardewig I (1996) Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu.Rev.Physiol.* 58, 539-563.

Hewitt CO, Eszes CM, Sessions RB, Moreton KM, Dafforn TR, Takei J, Dempsey CE, Clarke AR, Holbrook JJ (1999) A general method for relieving substrate inhibition in lactate dehydrogenases. *Protein Eng.* 12(6), 491-496.

Hinz HJ (1983) Thermodynamics of protein-ligand interactions: calorimetric approaches. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 12, 285-317.

Hinz HJ und Jaenicke R (1973) Calorimetric investigation of binding of NADH to pig muscle lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54(4), 1432-1436.

Hinz HJ und Jaenicke R (1975) Thermodynamics of complex formation between nicotinamide adenine dinucleotide and pig skeletal muscle lactate dehydrogenase. *Biochemistry* 14(1),24-27.

Hinz HJ, Schmidt R, Scheurmann W, Jaenicke R (1977) Thermodynamic studies of binary and ternary complexes of pig-skeletal-muscle lactate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 80(2), 543-550.

Hinz HJ, Steininger G, Schmid F, Jaenicke R (1977) Studies on an energy structure-function relationship of dehydrogenases. II. Calorimetric investigations on the interaction of coenzyme fragments with pig skeletal muscle lactate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 87(1), 83-86.

Holbrook JJ und Stinson RA (1970) Reactivity of the essential thiol group of lactate dehydrogenase and substrate binding. *Biochem. J.* 120(2), 289-297.

Holbrook JJ, Liljas A, Steindel SJ, Rossmann MG (1975) Lactate dehydrogenase. In: *The Enzymes*, ed. Boyer PD, 3rd ed., Academic Press, New York, 191-293.

Holdgate GA (2001) Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotechniques* 31, 164-168.

Jaenicke R, Gregori E, Laepple M (1979) Conformational effects of coenzyme binding to porcine lactic dehydrogenase. *Biophys. Struct. Mech.* 6(1), 57-65.

Janßen F (2000) Klonierung, Struktur und Evolution einiger Octopindehydrogenasen aus marinen Invertebraten. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ladbury JE und Chowdhry BZ (1996) Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem. Biol.* 3, 791-801.

Leavitt S und Freire J (2001) Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(5), 560-566.

Livingstone DR (1982/3) Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. *J. Geol. Soc. London* 140(1), 27-37.

- Livingstone DR (1991) Origin and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. *Amer. Zool.* 31, 522-534.
- Livingstone DR, de Zwaan A, Leopold M, Marteiijn E (1983) Studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductases. *Biochem. Syst. Ecol.* 11, No. 4, 415-425.
- Livingstone DR, Stickle WB, Kapper MA, Wang S, Zurburg W (1990) Further more studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B, No. 4, 661-666.
- Long GL (1976) The stereospecific distribution and evolutionary significance of invertebrate lactate dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.* 55B, 77-83.
- Luisi PL, Olomucki A, Baici A, Karlovic D (1973) Fluorescence properties of octopine dehydrogenase. *Biochemistry* 12, 4100-4106.
- McClendon S, Zhadin N, Callender R (2005) The approach to the michaelis complex in lactate dehydrogenase: the substrate binding pathway. *Biophys. J.* 89(3), 2024-2032.
- McClendon S, Vu DM, Clinch K, Callender R, Dyer RB (2005) Structural transformations in the dynamics of michaelis complex formation in lactate dehydrogenase. *Biophys. J.* 89(1), L07-9.
- Meyer B und Peters T (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, No.8. Wiley VCH-Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.
- Meyer M und Schomburg D (1998) Protein interactions. In: *Biotechnology*, eds. Mountain A, Ney UM, Schomburg D, Vol. 5, Recombinant proteins, monoclonal antibodies and therapeutic genes, VCH, Weinheim, 48-68.
- Meyerhof O (1928) Über die Verbreitung der Argininphosphorsäure in der Muskulatur der Wirbellosen. *Arch. Sci. biol. Napoli* 12, 536-548.
- Mizoue LS und Tellinghuisen J (2003) The role of backlash in the "first injection anomaly" in isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* 326, 125-127.
- Monneuse-Doublet MO, Olomucki A, Buc J (1977) Investigation on the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. A regulatory behaviour. *Eur. J. Biochem.* 84, 441-448.
- Monneuse-Doublet MO, Lefebure F, Olomucki A (1980) Isolation and characterization of two molecular forms of octopine dehydrogenase from *Pecten maximus* L. *J. Mol. Evol.* 25, 46-57.
- Monneuse MO und Rouzé P (1987) Sequence comparisons between *Agrobacterium-Tumefaciens* T-DNA-encoded octopine and nopaline dehydrogenases and other nucleotide-requiring enzymes - Structural and evolutionary implications. *J. Mol. Evol.* 25(1), 46-57.
- Morizawa K (1927) Über die Extraktstoffe von *Octopus octopodia*. *Acta Schol. Med. Kyoto* 10, 285-298.
- Mulcahy P und O'Flaherty M (2001) Kinetic locking-on strategy and auxiliary tactics for bioaffinity purification of NAD(P)(+)-dependent dehydrogenases. *Anal. Biochem.* 299(1), 1-18.

- O'Brien R, Ladbury JE, Chowdhry BZ (2001) Isothermal titration calorimetry of biomolecules. In: Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry, eds. Harding SE, Chowdhry BZ, Oxford University Press, 263-286.
- Olomucki A (1981) Structure and function of octopine dehydrogenase of *Pecten maximus* (great scallop). Biochem. Soc. Trans 9, 278-279.
- Oriol C und Olomucki A (1972) Spectropolarometric studies of binary and ternary complex of octopine dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 29, 288-292.
- Ornstein L (1964) Disc Electrophoresis - 1: Background and theory. Ann. NY Acad. Sci. 121, 321-349.
- van Os N (2001) Charakterisierung der Ligandenbindung rekombinanter Octopindehydrogenase mittels isothermaler Titrationskalorimetrie. Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Pauling L (1946) Molecular architecture and biological reactions. Chem. Eng. News 24, 1375-1377.
- Perozzo R, Jelesarov I, Bosshard HR, Folkers G, Scapozza L (2000) Compulsory order of substrate binding to herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. A calorimetric study. J. Biol. Chem. 275(21), 16139-16145.
- Roche (2005/2006) Datenblatt zur L-Laktatdehydrogenase aus dem Schweinmuskel <http://www.roche-applied-science.com>
- Rossmann MG, Liljas A, Brändén CI, Banaszak LJ (1975) Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. In: The Enzymes, ed. Boyer PD, 3rd ed., Academic Press, New York, 191-293.
- Ruhemann S (1911) Triketohydrindene Hydrate. J. Chem. Soc. (London) 89, 792-800.
- Stambaugh R und Post D (1966) Substrate and product inhibition of rabbit muscle lactic dehydrogenase heart (H4) and muscle (M4) isozymes. J. Biol. Chem. 241(7), 1462-1467.
- Sato M und Gäde G (1986) Rhodoic acid dehydrogenase: a novel amino acid-linked dehydrogenase from muscle tissue of *Haliotis* Species. Naturwissenschaften 73, 201-209.
- Sato M, Takahara M, Kanno N, Sato Y, Ellington R (1987) Isolation of a new opine, β -alano-pine, from the extracts of the muscle of marine bivalve molluscs, *Scarpharca broughtonii*. Comp. Biochem. Physiol 88B (No.3): 803-806.
- Schmid F, Hinz HJ, Jaenicke R (1976) Thermodynamic studies of binary and ternary complexes of pig heart lactate dehydrogenase. Biochemistry 15(14), 3052-3059.
- Schoffeniels E (1976) Adaptations with respect to salinity. Biochem. Soc. Symp. 41, 179-204.
- Schrimsher JL und Taylor KB (1984) Octopine dehydrogenase from *Pecten maximus*: steady-state mechanism. Biochemistry 23, 1348-1353.
- Sigurskjold BW (1999) Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. Anal. Biochem. 277, 260-266.

- Sheikh S und Katiyar SS (1993a) Involvement of different cysteines in the inactivation of octopine dehydrogenase by p-chloromercuricphenyl sulfonic acid and o-phthalaldehyde. *Biochem. Mol. Biol. Int* 29, 719-727.
- Stanley WC und Connet RJ (1991) Regulation of muscle carbohydrate metabolism during exercise. *FASEB J.* 5(8), 2155-2159.
- Straub FB (1940) Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle. *Biochem. J.* 34(4), 483-486.
- Subramanian S (1979) Thermodynamics of dehydrogenase reactions. *Trends Biochem. Sci.* 4(5), 102-105.
- Südi J (1970) Kinetics of protection of lactate dehydrogenase by substrates against heat inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* 212(2), 213-224.
- Sugrobova NP, Kurganov BI, Yakovlev VA (1974) A study of the mechanism of the formation of the unproductive lactate dehydrogenase-NAD⁺-pyruvate ternary complex. *Mol. Biol.* 7(4), 386-94.
- Takena Y und Schwert GW (1956) Lactic dehydrogenase III. Mechanism of the reaction. *J. Biol. Chem.* 233(1), 157-170.
- Tempé J (1983) Chemistry and biochemistry of open-chain imino-acids. In: Weinstein B (ed.): *Chemistry and biochemistry of open-chain amino-acids, peptides and proteins*. Vol. 7, Marcel Dekker, New York, 113-203.
- van Thoai N, Huc C, Pho DB, Olomucki A (1969) [Octopine dehydrogenase. Purification and catalytic properties.]. *Biochim. Biophys. Acta* 191, 46-57.
- Thomé F, Pho DB, Olomucki A (1985) Bromopyruvate, a potential affinity label for octopine dehydrogenase. *Biochimie* 67, 249-252.
- Thomé-Beau F und Olomucki A (1973) Presence of a single essential histidyl residue in octopine dehydrogenase as shown by photooxidation. *Eur. J. Biochem.* 39, 557-562.
- Thomé-Beau F, Le Thi L, Olomucki A, van Thoai N (1971) Essential histidyl residues in arginine oxygenase (decarboxylating). Comparison with amino acid oxidases. *Eur. J. Biochem* 19(2), 270-275.
- Turnbull WB und Daranas AH (2003) On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J. Am. Soc.* 125, 14859-14866.
- Warburg O und Christian W (1936) Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten.(Pyridin-Nucleotide.). *Helv. Chim. Acta*, 119, E79-E88.
- Webster KA (2003) Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J. Exp. Biol.* 206, 2911-2922.
- Wenzel HR und Trommer WE (1979) Ternary complex formation of pig heart lactate dehydrogenase with spin-labelled coenzyme and inhibitors as studied by electron spin resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 568 (2), 287-296.

Wilkinson JH und Walter SJ (1972) Oxamate as a differential inhibitor of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Enzyme* 13(4), 170-176.

Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131-137.

Zammit VA und Newsholme EA (1976) The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. *Biochem. J.* 160, 447-462.

Zettelmeissl G, Teschner W, Rudolph R, Jaenicke R, Gäde G (1984) Isolation, physicochemical properties, and folding of octopine dehydrogenase from *Pecten jacobaeus*. *Eur. J. Biochem.* 143, 401-407.

Zebe E, Grieshaber MK, Schöttler U (1980) Biotopbedingte und funktionsbedingte Anaerobiose. *Biologie in unserer Zeit* 10, No.6, 175-182.

de Zwaan A und Wijsman TCM (1976) Anaerobic metabolism in bivalvia (mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B, 313-324.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Manfred K. Grieshaber für seine engagierte Unterstützung meiner Arbeit und für die zahlreichen intensiven und anspruchsvollen Diskussionen.

Herrn Professor Dr. Georg Groth danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Helmut Ritter und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung eines zweiten Kalorimeters.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Zoophysikologie für die kollegiale Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen schönen Stunden neben und nach der Arbeit.

Andre Müller gilt mein besonderer Dank für seine wertvollen Tipps und Anregungen und die endlosen Diskussionen über die ODH.

Gedankt sei auch dem ‚ITC-Team‘ Ariane Pott und Astrid Wänke, da wir so manches Problem nur gemeinsam lösen konnten.

Silke Jakob und vor allem Barbara Bartosinska möchte ich ganz herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor danken.

Ein Dankeschön geht auch an alle Freunde und Bekannten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Gereon und ganz besonders meinen Eltern für ihr Wohlwollen und ihre Unterstützung.

Ein allerletzter Dank geht an die ‚Deutsche Forschungsgemeinschaft‘, da sie meine Arbeit über mehrere Jahre unterstützt hat.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den