Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie, Kiel 1977 (1978):

Anpassungen im Energiestoffwechsel von *Tubifex tubifex* an eine fakultativ anaerobe Lebensweise

Klaus H. Hoffmann

Under anaerobic conditions, *Tubifex tubifex (Oligochaeta)* gains energy mostly by succinate fermentation. Lactate fermentation plays an important role only within the first 24 h of anaerobiosis. The regulatory properties of *Tubifex* pyruvate kinase (PK), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), and malic enzyme (ME) in aerobic/anaerobic transitions are shown: *Tubifex* PK was characterized by sigmoidal kinetics with phosphoenolpyruvate (PEP) and by allosteric regulation under the influence of Mn^{++}, fructose-1,6-diphosphate (FDP) and the energy charge value. PEPCK is activated by HCO_3^--ions whereas PK is strongly inhibited by the carbonate system. The anaerobic succinate formation utilizes $NADH_2$, at least partly, from the action of the malic enzyme.

1. Einleitung und Problemstellung

Luftatmende Organismen gewinnen die für die Unterhaltung der vielfältigen Lebensprozesse benötigte Energie (chemische Energie in Form von ATP) in der Regel durch die Oxydation von Kohlenhydraten und Fetten. Dieser aerobe Energiestoffwechsel setzt eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff voraus. Nur einige Gewebe, wie z.B. Erythrocyten oder die hellen Muskelfasern bei Wirbeltieren, sind in der Lage, auch unter kurzzeitigen Sauerstoffmangelbedingungen chemische Energie freizusetzen, nämlich über die anaerobe Milchsäuregärung. Anders ist das bei vielen niederen Invertebraten, die im Wasser leben: Sie sind in ihrem Biotop häufig einem Sauerstoffmangel ausgesetzt, der langfristig ist und in manchen Fällen sogar permanent sein kann, und werden entsprechend als fakultative bzw. obligate Anaerobier bezeichnet. Zu den fakultativ anaeroben Organismen zählen u.a. einige im Grundschlamm von sauerstoffarmen Flüssen und Seen lebende Ringelwürmer, wie der Schlammröhrenwurm *Tubifex tubifex*. In Gegenwart von ausreichend Sauerstoff verläuft auch bei *Tubifex* der Energiestoffwechsel aerob über den Citratzyklus und die Atmungskette. *Tubifex* erwies sich in Laborversuchen aber auch

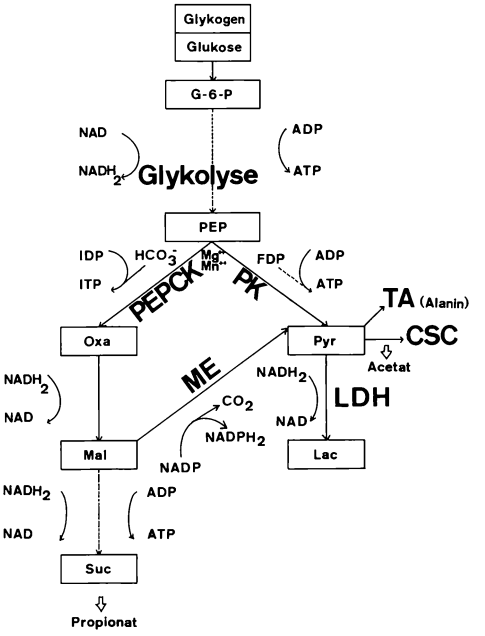

Abb. 1: Schema zum Energiestoffwechsel bei *Tubifex tubifex* (verändert nach ZEBE 1977). ADP, ATP = Adenosindi(tri)phosphat; CSC = Citratzyklus; FDP = Fruktose-1,6-diphosphat; G-6-P = Glukose-6-phosphat; IDP, ITP = Inosindi(tri)phosphat; Lac = Lactat; LDH = Lactatdehydrogenase; Mal = Malat; ME = malic enzyme; NAD/$NADH_2$ = Nicotinamid-adenindinukleotid oxydiert/reduziert; Oxa = Oxalacetat; PEP = Phosphoenolpyruvat; PEPCK = Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; PK = Pyruvatkinase; Pyr = Pyruvat; Suc = Succinat; TA = Transaminierung.

als resistent gegenüber einem mehrtägigen völligen Ausschluß von Sauerstoff. Während der anaeroben Inkubation werden Glykogenreserven zur Energiegewinnung abgebaut. Die Geschwindigkeit des Glykogenabbaus wird bei längerem Sauerstoffentzug um bis zu 40% verringert. Während die Konzentration an Lactat bei anaerober Inkubation nur in den ersten Stunden geringfügig ansteigt, konnte eine kontinuierliche Zunahme von Succinat in den Geweben gefunden werden (SCHÖTTLER u. SCHROFF 1976). Die Einzelheiten dieser Succinatgärung sind weitgehend bekannt (Abb. 1). Der Abbau des Glykogens erfolgt über den Embden-Meyerhof-Weg bis zur Stufe des Phosphoenolpyruvates (PEP). Die Carboxylierung des PEP zu Oxalacetat wird durch das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) katalysiert, dessen Aktivität in *Tubifex* auffallend hoch ist. In zwei anschließenden Reduktionsschritten wird über Malat und Fumarat Succinat gebildet. Die Succinatgärung ist energetisch vorteilhafter als die Lactatgärung; sie führt zum Gewinn von zwei zusätzlichen Mol ATP pro Mol abgebauter Glukose. Bei mehrtägiger Anaerobiose ist auch Succinat nur noch ein Zwischenprodukt des anaeroben Stoffwechsels. Als Endprodukte entstehen dann hauptsächlich die flüchtigen Fettsäuren Propionat und Acetat. Sie werden nach Erreichen einer bestimmten Konzentration im Körper in das umgebende Wasser ausgeschieden, wodurch eine zu starke Ansäuerung des inneren Milieus verhindert wird (SCHÖTTLER u. SCHROFF 1976).

Unter aeroben Bedingungen wird PEP aufgrund der hohen Pyruvatkinase (PK)-Aktivität aber nahezu vollständig zu Pyruvat umgesetzt. Beim Wechsel vom aeroben zum anaeroben Energiestoffwechsel muß somit eine Überleitung des Substratflusses an der Stelle des PEP stattfinden. Integriert in die Kontrolle am PEP sind die beiden Enzyme PK und PEPCK. Nur Enzyme mit einem hohen Maß an regulatorischen Eigenschaften sind in der Lage, den Substratumsatz in einer "spontanen" Antwort auf Änderungen im Umgebungsmilieu zu beeinflussen. Über die regulatorischen Eigenschaften beider Enzyme und über ihre Bedeutung für den Verzweigungspunkt am PEP wird im folgenden näher berichtet. Die Messungen wurden an teilweise gereinigten Enzymen (HOFFMANN 1976a) durchgeführt.

2. Experimentelle Ergebnisse und Diskussion

Die Struktur oder besser der Konformationszustand eines regulatorischen Enzymmoleküls kann vom Substrat und anderen niedermolekularen Effektoren, wie z.B. Ionen oder Intermediärprodukten, beeinflußt werden. Diese Flexibilität im Aufbau stellt den Schlüssel für die biologische Wirkung dieser Enzyme dar.

In Übereinstimmung mit regulatorischen Pyruvatkinasen anderer fakultativer Anaerobier weist die *Tubifex*-PK für PEP in Gegenwart von Magnesium-Ionen als Metallionenaktivatoren eine sigmoidale Bindungscharakteristik auf (Kurve 1 - Abb. 2), oder anders gesagt, die Substratumsetzung weist eine große Kooperativität auf. Die Aktivität der PK ist somit bei physiologischen PEP-Konzentrationen (unter 300 µMol) immer gering. Ein Ersatz der Magnesium- durch Mangan(II)Ionen führt zu einer hyperbolischen, nicht kooperativen Sättigungskurve (Kurve 2 - Abb. 2). Die Mangan(II)Ionen wirken nicht nur als Cofaktor, sondern auch als positiv allosterischer Aktivator. Im Falle der hyperbolischen Substratsättigungskurve ist die Umsatzrate auch bei geringen Substratkonzentrationen hoch. Das Glykolyse-Zwischenprodukt Fruktose-1,6-diphosphat (FDP) beeinflußt die PEP-Bindungscharakteristik in gleicher Weise wie Mangan(II)Ionen: Bei Überschuß an

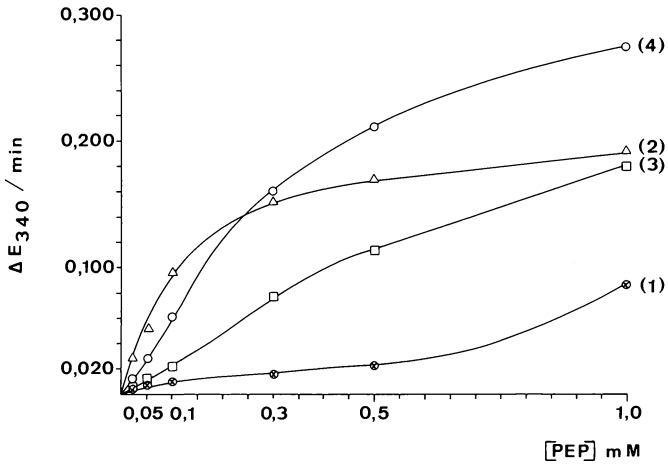

Abb. 2: Einfluß von Ionen und Stoffwechselmetaboliten auf die Substratbindung von *Tubifex*-PK (pH-Wert: 7.2).
(1): 10 mM Mg^{++}, 2 mM ADP, ohne FDP; (2): dto. (1) jedoch 5 mM Mn^{++};
(3): 10 mM Mg^{++}, 0.06 mM FDP, AEC = 0.91; (4) dto. (3) jedoch AEC = 0.67.
AEC = energy charge-Wert; PEP = Phosphoenolpyruvat.

FDP sind die Substratbindungskurven auch in Gegenwart von Magnesiumionen hyperbolisch (HOFFMANN 1977). Sowohl die Maximal-Umsatzgeschwindigkeit als auch die Affinität zum PEP werden darüber hinaus von der Größe des energy charge-Wertes (AEC-Wert = Anteil von ATP an Gesamtadeninnukleotiden) beeinflußt: Die V_{max}-Aktivität wie auch die ES-Affinität nehmen mit steigenden AEC-Werten ab (Kurve 3, 4 - Abb. 2). Änderungen in der Größe des energy charge im Laufe einer anaeroben Inkubation der Tiere haben wir auch tatsächlich gefunden. Der AEC-Wert nimmt in den ersten 24 Stunden einer Anaerobiose ab, steigt danach aber wieder an.

Eine weitere wichtige Bedeutung kommt dem HCO_3^-/CO_2-System bei der Regulation der Enzymaktivitäten am PEP-Verzweigungspunkt zu. Beim in vitro-Test wird die PEPCK durch $KHCO_3$ aktiviert (Abb. 3), die PK aber gehemmt. Ein Kontrollversuch mit KCl anstelle von $KHCO_3$ zeigt, daß die Hemmung nicht durch die Kaliumionen verursacht wird. Darüber hinaus weist die PEPCK (pH 6.4 - 6.7) ihr Aktivitätsmaximum bei einem niedrigeren pH-Wert auf als die PK (pH 6.9 - 7.4). Längerfristige Anaerobiose ist bei *Tubifex* auch unter natürlichen Bedingungen sicher mit einer Erhöhung der intrazellulären HCO_3^--Konzentration und einer Abnahme des pH-Wertes verbunden, wenn auch dazu noch keine Meßdaten vorliegen. Das in den ersten Stunden einer Anaerobiose als Stoffwechselendprodukt anfallende Alanin zeigt keinen Einfluß auf die Aktivität beider Enzyme.

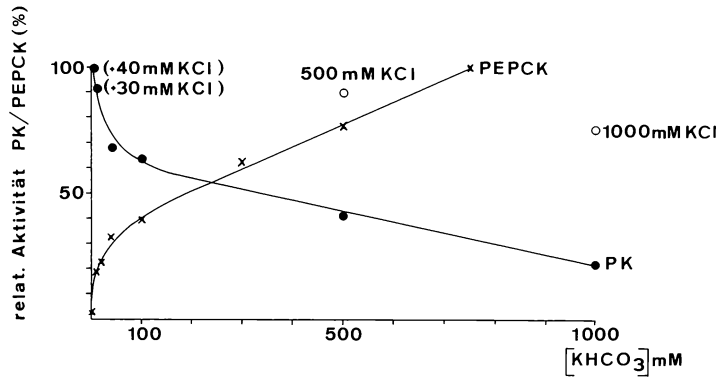

Abb. 3: Einfluß von Kaliumhydrogencarbonat auf die Aktivität von *Tubifex*-PK (●) und PEPCK (x); o = Kontrollversuche mit KCl(PK).
PEPCK = Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase.

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen lassen sich folgende Vorgänge beim Übertritt vom aeroben zum anaeroben Energiestoffwechsel ableiten:

I. Bei Kurzzeitanaerobiose (bis etwa 12 Stunden) gewinnt *Tubifex tubifex* Energie über die Milchsäuregärung. Glykogen wird über PEP zu Pyruvat abgebaut. Pyruvat wird zu Lactat reduziert. Die spezifische Aktivität der cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (LDH) von *Tubifex* ist hoch (0.272 U/mg). Die LDH zeigt ein pH-Optimum zwischen pH 6.1 und 6.8 mit einer hohen Pyruvataffinität. Im schwach alkalischen pH-Bereich (intrazellulärer pH-Wert unter aeroben Bedingungen?) nimmt die ES-Affinität ab.

II. Mit zunehmender Dauer der Anaerobiose gewinnt die Succinatgärung an Bedeutung. Die regulatorischen Eigenschaften der *Tubifex*-PK (Einfluß von bivalenten Kationen, Fruktose-1,6-diphosphat, AEC-Wert, HCO_3^--Konzentration) ermöglichen die Umschaltung des Substratflusses an der Stelle des PEP. Die Regulation der Aktivitäten von PK und PEPCK unterliegen dabei aber keiner entweder/oder-Entscheidung, vielmehr können beide Enzyme gleichzeitig funktionieren.

III. Aufgrund der herabgesetzten PK-Aktivität steht mit längerer Dauer der Anaerobiose der im Cytoplasma lokalisierten LDH zunehmend weniger Substrat zur Verfügung, die Milchsäuregärung verliert an Bedeutung.

IV. Für die bei der Succinatgärung ablaufende Fumaratreduktion müssen innerhalb der Mitochondrien Reduktionsäquivalente bereitgestellt werden. Diese Aufgabe wird, zumindest teilweise, vom mitochondrialen malic enzyme (ME) übernommen. ME decarboxyliert einen Teil des Malats zu Pyruvat unter Freisetzung von $NADPH_2$ (Abb. 1). Die Aktivität des ME (Malat ⟶ Pyruvat) in *Tubifex*-Mitochondrien ist hoch. Das mitochondriale Pyruvat wird nach SCHÖTTLER (1977) z.T. über Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust, der bei *Tubifex* auch unter Anaerobiosebedingungen voll funktionsfähig ist und eine Quelle zur Bereitstellung weiterer Reduktionsäquivalente darstellt.

V. Werden die Tiere nach Anaerobioseinkubation in sauerstoffhaltiges Wasser zurückgebracht, so ist der Sauerstoffverbrauch in den ersten Stunden gegenüber den Werten vor dem Einsetzen in anaerobe Bedingungen erhöht, und zwar umso mehr, je länger die Tiere einem Sauerstoffentzug ausgesetzt waren. Die Ursache für den erhöhten Sauerstoffverbrauch könnte in einem erhöhten Energiebedarf zur "Wiederherstellung" des inneren Milieus liegen, nachdem während der Anaerobiose beträchtliche Veränderungen an Ionen- und Metabolitkonzentrationen in den Zellen auftreten.

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse taucht natürlich die Frage auf, inwieweit diese in vitro gewonnenen Daten in situ bestätigt werden können. Die Schwierigkeit besteht darin, daß sich Enzyme innerhalb der Zelle und isolierte Enzymproteine im Hinblick auf ihre biochemischen Charakteristika und ihre Reaktionen auf verschiedene Effektoren beträchtlich unterscheiden können. Einen ersten Hinweis auf eine auch in situ ablaufende Änderung im Konformationszustand der *Tubifex*-PK während anaerober Inkubation gibt die Abb. 4. Bei jeweils gleichen Testbedingungen (10 mM Mg^{++}, kein FDP, AEC-Wert = 0.5, Triäthanolamin-HCl-Puffer pH 6.5) zeigt die PK aus anaerob inkubierten Tieren eine signifikant höhere Substratkooperativität als die PK aus aeroben Organismen. Die ES-Affinität geht in den ersten Stunden der Anaerobiose zurück, steigt nach 72 Stunden aber wieder auf den Wert der aeroben Kontrolltiere an. Während sich der Gesamtproteingehalt der Tiere während einer 72-stündigen anaeroben Inkubation nur wenig verändert, nimmt die spezifische Aktivität der PK ab (Tab. 1).

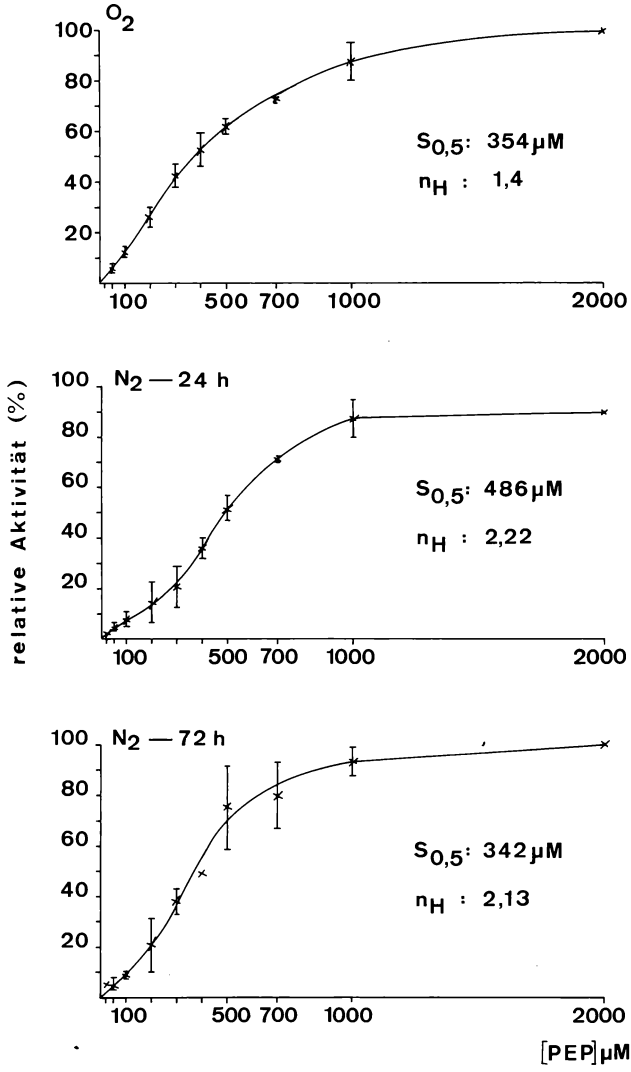

Abb. 4: Wirkung von aerober (O_2) und anaerober (N_2) Inkubation von *Tubifex* auf die Substratbindungsfähigkeit der Pyruvatkinase. (Näheres im Text).
n_H = Hill-Koeffizient; PEP = Phosphoenolpyruvat; $S_{0,5}$ = Halbsättigungswert.

Tab. 1: Wirkung von aerober und anaerober Inkubation von *Tubifex* auf den Proteingehalt eines cytoplasmatischen Enzymextraktes und auf die spezifische Aktivität der Pyruvatkinase (Testansatz im Text).

Inkubation	Proteingehalt mg/ml	spez. Aktivität U/mg
aerob	17.4	0.088
anaerob 24 h	16.5	0.076
anaerob 72 h	17.9	0.067

3. Schlußbetrachtung

Alle von uns untersuchten Enzyme, die in den anaeroben Energiestoffwechsel von *Tubifex tubifex* integriert sind, weisen regulatorische Fähigkeiten auf, die es ermöglichen, ihre katalytische Effizienz wie auch die ES-Affinität "optimal" an die jeweiligen Bedürfnisse in der Zelle anzupassen. Besonders deutlich ist dies an den Eigenschaften der *Tubifex*-Pyruvatkinase zu sehen. Die metabolischen Bedürfnisse der Zelle werden von den Umweltbedingungen bestimmt, denen die Organismen ausgesetzt sind, wie z.B. von der Temperatur (HOFFMANN 1976b), besonders aber auch von der Verfügbarkeit von Sauerstoff.

Literatur

HOFFMANN K.H., 1976a: Catalytic efficiency and structural properties of invertebrate muscle pyruvate kinase: Correlation with body temperature and oxygen consumption rates. J. comp. Physiol. 110: 185-195.

- , 1976b: Struktur- und Substratbindungseigenschaften von Invertebraten-Muskelpyruvatkinasen: Anpassungen an Körpertemperatur und Verfügbarkeit von Sauerstoff. Verh. Dt. Zool. Ges. 1976: 19.

- , 1977: The regulatory role of muscle pyruvate kinase in carbohydrate metabolism of invertebrates. A comparative study in catalytic properties of enzymes isolated from *Tubifex tubifex (Oligochaeta)* and *Tenebrio molitor (Coleoptera)*. Physiol. Zool. 50(2): 142-155.

SCHÖTTLER U., 1977: NADH generating reactions in anaerobic *Tubifex* mitochondria. Comp. Biochem. Physiol. 58B: 261-265.

- , SCHROFF G., 1976: Untersuchungen zum anaeroben Glykogenabbau bei *Tubifex tubifex* M. J. comp. Physiol. 108: 243-254.

ZEBE E., 1977: Anaerober Stoffwechsel bei wirbellosen Tieren. Rhein-Westf. Akad. Wiss. Vorträge N 269: 51-73.

Adresse

Dr. Klaus H. Hoffmann
2. Zool. Institut
Bismarckstr. 8-10

D-8520 Erlangen

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie

Jahr/Year: 1978

Band/Volume: 7_1978

Autor(en)/Author(s): Hoffmann Klaus-Hubert

Artikel/Article: Anpassungen im Energiestoffwechsel von Tubifex tubifex an eine fakultativ anaerobe Lebensweise 185-189