

Der Einfluss einiger Pflanzenproteasen auf das Lebergewebe VI. der Einfluss von Ficin, Papain und Bromelin auf das Zytochromoxydaseaktivität der Lebermitochondrien

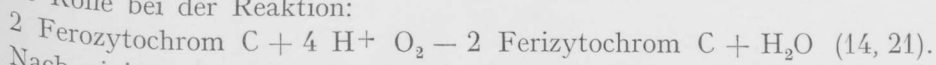
L. LILOV, R. DIMKOV, AL. GROZDANOV, N. NESTOROV

Technologisches Forschungsinstitut für Fleischwirtschaft, Sofia
Bulgarien

Die vorliegende Arbeit ist eine Fortsetzung der Untersuchungen über die Wirkung von Ficin, Papain und Bromelin auf die Enzymaktivität von Lebergewebe, unter besonderer Berücksichtigung der Succinatdehydrogenaseaktivität (1), über die Atmung ferner die Oxydationsphosphorylierung (2), ATP-aseaktivität der Lebermitochondrien (3) wie auch über Aldolase-, alkalische Phosphatase- und Glykose-6-Phosphataseaktivität (4) und Transaminaseaktivität (5).

Gegenstand unserer Arbeit ist die Zytochromoxydaseaktivität der Lebermitochondrien nach Behandlung mit Ficin, Papain und Bromelin.

Bekanntlich spielt die Zytochromoxydase (E.C.I. 9.3.1) eine katalytische Rolle bei der Reaktion:



Nach einiger Autoren tritt das Desintegrieren bestimmter Systeme von dem Enzymprofil der Mitochondrien als Folge der proteolytischen Wirkung auf, was zu entsprechenden Veränderungen der Enzymaktivität führt (10, 12). In diesem Fall ist auch eine Destruktion der mitochondrialen Membrane zu erwarten, welche gleichzeitige Veränderungen der Zytochromoxydaseaktivität hervorrufen könnte. Darüber hinaus ist die Möglichkeit zur eventuellen Einwirkung der Pflanzenproteasen auf das Enzymeiweiß auch noch nicht ausgeschlossen, was auch zur Veränderung deren Aktivität führen konnte.

MATERIAL UND METHODEN

1. Das Isolieren mitochondrialen Fraktion: Dazu wurden weiße Ratten im Alter von 6–8 Monaten und Körpergewicht von 120–150 g verwendet. Gleich wurde die Leber isoliert und homogenisiert.

Die Mitochondrien wurden nach der Methode von Hageboom (15) unter Anwendung von 0,25 M Saccharose isoliert.

2. Bestimmungsmethode für Zytochromoxydaseaktivität. Es wurde nach der manometrischen Methode von Slater (19) bei Gesamtmenge des Reaktionsgemisches in den einzelnen Gefässchen von 3,3 ml gearbeitet.

Die manometrischen Ablesungen wurden je 5 Minuten im Intervall von 20 Minuten durchgeführt. Die bemässigten Werte sind durch Kontrollproben korrigiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind auf mg Mitochondrieneiweiss bezogen, was einem frischen Lebergewebe von 40–50 mg entspricht.

3. Proteasen. Verwendet wurden hoch aktive Präparate der drei genannten Pflanzenproteasen — Ficin der Firma Calbiochem — Los Angellos USA, Papain und Bromelin der Firma Miles Chemical Company — New Jersey USA. Die Konsentration der Proteasen ist in g Enzymeiweiss bezogen auf ml Reaktionssubstrat $\mu\text{g/ml}$ ausgedrückt. Zytochrom C von der Firma »Reanal».

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Durch Behandlung der isolierten Lebermitochondrien mit Ficin, Papain und

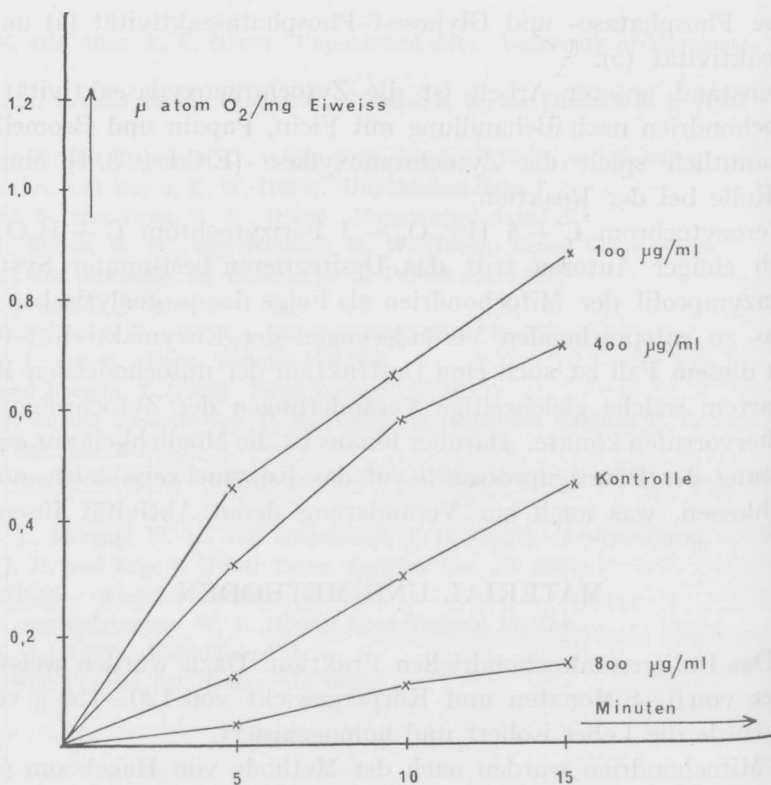


Fig. 1

Bromelin bei unterschiedlichen Bedingungen wurde gezielt den Einfluss der Pflanzenproteasen auf die Zytochromoxydaseaktivität zu klären.

Die Aufführungen auf die Figur I ziegen den Einfluss verschiedener Papainkonzentrationen auf die Enzymaktivität der Zytochromoxydase. Fig 1.

Zur Kontrolle dienen Mitochondrien, die nicht mit Papain behandelt wurden. Die obengenannten Ergebnisse bilden die Grundlage zu schliessen, dass die effekticolle Wirkung von Papain auf die Zytochromoxydaseaktivität ausschliesslich von seiner Konzentration abhängt, so z.B. bei Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ wird Erhöhung der Zytochromoxydaseaktivität beobachtet (Aktivieren von 86 %), während bei Konzentrationen von 800 $\mu\text{g/ml}$, Inhibition eintritt (73 %).

Besonders auffalend ist die Tatsache, dass die Eiweisstrukturen, die in eigem Zusammenhang mit der Zytochromoxydaseaktivität stehen, in gewissem Grad unwiederstadsfähiger sind, als als diejenigen, die an der Aktivität von Aspartataminotransferase (AAT, GOT) und der Alaninaminotransferase (A1AT, GPT/5) gebunden sind.

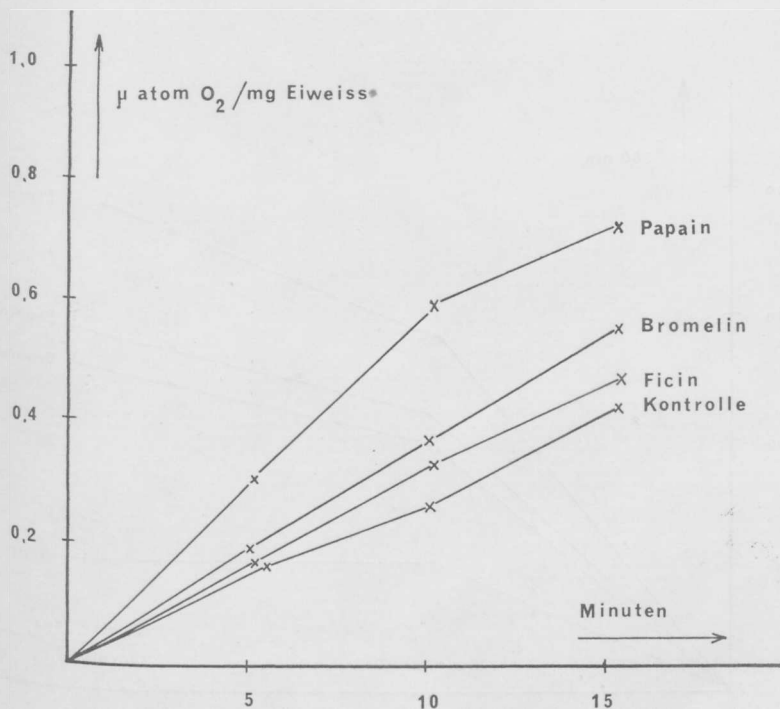


Fig. 2

Dies wird durch die folgenden Daten bestätigt: unter gleichbleibender Bedingungen führt eine und dieselbe Konzentration von Papain ($800 \mu\text{g/ml}$) zu Inhibieren von 72 % der Zytochromoxydaseaktivität, -33 % der Alamin-aminotransferase und 4 % der Aspartataminotransferaseaktivität.

Auf Fig. 2 sind die Versuchangaben über den Einfluss von Ficin, Papain und Bromelin auf die Zytochromoxydaseaktivität bei einer und dergleichen Konzentration ($400 \mu\text{g/ml}$ aufgeführt).

Die Ergebnisse zeigen die unterschiedlichen Grade von Aktivieren der Zytochromoxydaseaktivität.

Die Zytochromoxydaseaktivität erhöht sich nach Behandlung mit Pflanzenproteasen, wobei die folgende Wirkungsreihe gültig ist.

Papain > Bromelin > Ficin

Ohne Zweifel bestätigt diese Tatsache im Vergleich zu den Angaben über den Einwirkungsgrad der Proteasen auf die Succinatdehydrogenaseaktivität (I), der Wirkungsreihe Papain > Ficin > Bromelin über die Atmung und Oxydationsphosphorylierung (2) — Bromelin > Papain > Ficin das Vorhandensein der Spezifität der Proteasenwirkung auf die Eiweißstrukturen, die an Enzymaktivität der Mitochondrien gebunden ist.

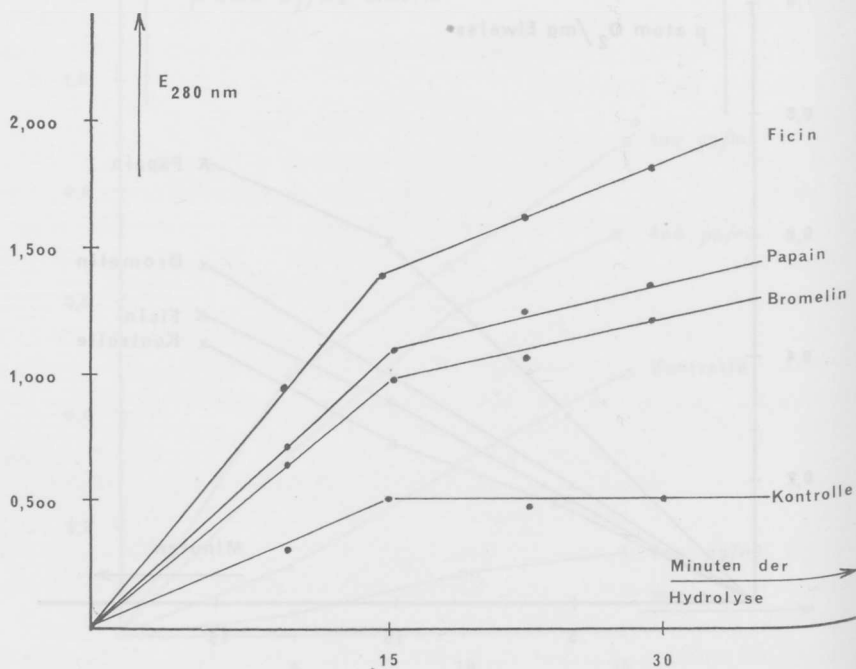


Fig. 3

Anderer Beweis dafür ist die Tatsache, dass zwischen der durch Ficin, Papain und Bromelin bewirkten Proteolyse der Lebermitochondrien und der festgestellten Veränderungen der untersuchten Enzymaktivitätsfälle keine einfache Korrelation besteht.

Die Angaben auf Fig. 3 zeigen einerseits bedeutende proteolytische Aktivität von Ficin gegen das Gesamtmitochondrieneiweiss und andererseits wie schon erwähnt wurde beeinflusst dasselbe Enzym am schwächsten die Zytochromoxydaseaktivität der Lebermitochondrien.

Zur Erläuterung des Einflusses der Vorinkubationszeit wurden die Mitochondrien vorinkubiert unter Anwendung von Proteasen innerhalb von 20 Min. bei Temperatur von 37° C. Die Ergebnisse sind graphisch auf Fig. 4 dargestellt.

Die Höhe der Säulen auf dem Diagramm entspricht dem Sauerstoffverbrauch bei der Vorinkubation innerhalb 15 Min. Die Bezeichnungen sind:

1. Sauerstoffverbrauch (Sauerstoff in Microatomen) bei den mit 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ficin behandelten Mitochondrien innerhalb 15 Min., ohne Vorinkubation.
2. Sauerstoffverbrauch bei Mitochondrien behandelt mit 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ficin mit 20minütigen Vorinkubation bei Temperatur von 37° C.
3. Sauerstoffverbrauch bei den mit 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ficin behandelten Mitochondrien, ohne Vorinkubation.

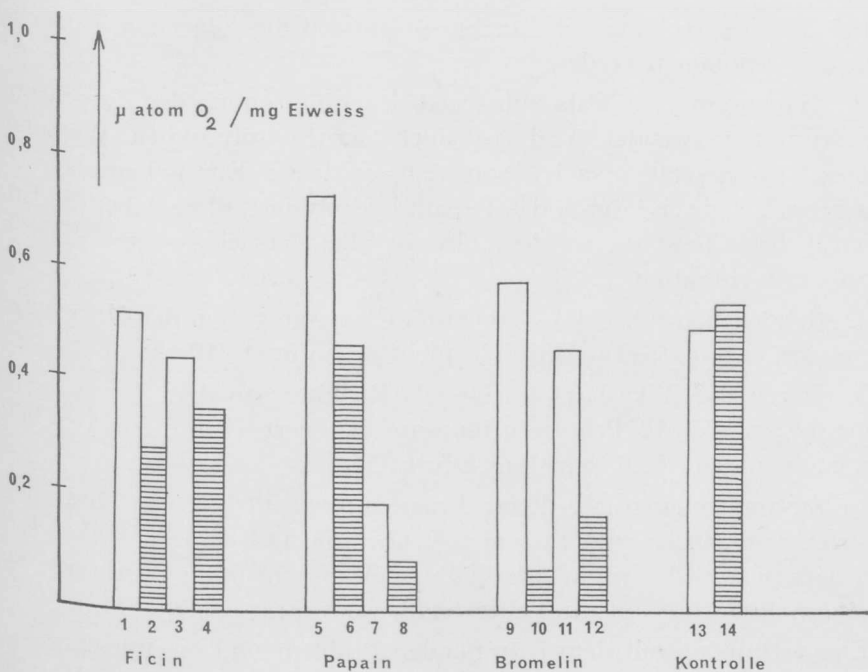


Fig. 4

4. Sauerstoffverbrauch bei mit 800 $\mu\text{g/ml}$ Ficin nach 20 minutigen Vorinkubation behandelten Mitochondrien.

5, 6, 7, 3. ähnlich den mit Papain behandelten Mitochondrien.

9, 10, 11, 12 — wie bei mit Bromelin behandelten Mitochondrien.

13. Kontrolle.

14. Sauerstoffverbrauch bei den mit Proteasen unbehandelten innerhalb von 20 Min. bei Temperatur von 37° C vorinkubierten Mitochondrien.

Aus dem Diagramm (Fig. 4) ist ersichtlich, dass die Vorinkubation ohne Proteasen innerhalb von 20 Min. bei Temperatur von 37° C zur unwesentlichen, spontanen Erhöhung der Zytochromoxydase führt (s. die letzten 2 Säulen); Bei Vorinkubation unter Anwendung von Proteasen verändert sich der Effekt quantitativ qualitativ. Charakteristisch ist das Beispiel mit dem Bromelin: bei Konzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ erhöht sich die Zytochromoxydaseaktivität leicht (Aktivieren von 15 %), während bei Vorinkubation innerhalb von 20 Min. und gleichbleibender Menge von Bromelin beobachtet man eine scharfe Senkung der Zytochromoxydaseaktivität (Inhibieren von 90 %).

Unter den verwendeten Pflanzenproteasen bei 20minütigen Vorinkubation zeichnet sich das Papain durch einen starken Inhibierungseffekt aus. Dieses Ergebnisse deckt sich mit unseren Angaben über die Wirkung der Vorinkubation unter Anwendung der Pflanzenproteasen auf die ATP-aseaktivität (3).

Bei der Besprechung der Ergebnisse müssen die folgenden Tatsachen in Rücksicht genommen werden:

1. Zytochrom C, das als Substrat bei der Forschung der Zytochromoxydaseaktivität verwendet wird, ist auch der hydrolytischen Wirkung der Proteasen ausgesetzt. Nach Tsou (20) wird die Eiweisskomponente des Zytochrom C teilweise durch das Papain hydrolysiert, ohne dabei die Enzymaktivität beeinflusst zu werden, obwohl alle Versuchssysteme Überschuss an Substrat enthalten.

2. Bekanntlich führt das Zytochrom C zu Aggregation der Mitochondrien, welche die enzymatische Aktivität nicht beeinflusst (10):

3. Durch das Ascorbat, welches als Reduktor an dem Versuchssystem teilnimmt, werden die Proteasen teilweise inhibiert (18), diese Erscheinung aber ist in diesem Fall kein limitativer Faktor.

In Zusammenhang mit dieser Frage interessant für uns sind die Forschungen von Ziegler und Linane (23) über die Dehydrogenaseaktivität der Mitochondrien und die Angaben über die fragmentäre Wirkung einiger Proteasen (Trypsin) auf die Mitochondrienstruktur (8, 9, 11, 12).

Eng verbunden mit dem betreffenden Problem sind die Forschungen von Dinzani (13) über die Wirkung von Papain und Trypsin auf die Morphologie und enzymatische Aktivität der isolierten Mitochondrien. Dianzani berichtet

nur von Inhibierung der Zytochromoxydaseaktivität durch Präparate von Rhopapain.

Die Konzeptionen von oben zitierten Autoren, auch unsere vorläufigen und gegenwärtigen Forschungen weisen auf einen konsequenten Zusammenhang zwischen den folgenden Faktoren hin:

- a) den zur Behandlung verwendeten Pflanzenproteasen
- b) den von ihnen angegriffenen Mitochondrienstrukturen
- c) der an diesen Strukturen gebundenen Enzymaktivität.

Dies wird durch die Effektorenwirkung von Papain (Aktivierung und Inhibierung/ s. Fig. 1) bestätigt, was sich mit den früheren Angaben über den Einfluss der Pflanzenproteasen auf die Succinatdehydrogenaseaktivität deckt (1).

Man nimmt an, dass die a priori erwartete partielle Destruktion der Mitochondrienmembrane (eventuell von Fragmentation begleitet) durch die niedrigen Konzentrationen von Papain zu erklären sind. Daraus folgt, dass das Zytochrom C leichter die Mitochondrienmembrane, worin die Elektronen-Übertragungsteilchen und die Zytochromoxydase konzentriert sind, angreift. (6, 7, 17).

Der additive Effekt ist Aktivieren der Zytochromoxydaseaktivität. Die höheren Konzentrationen von Pflanzenproteasen wirken wahrscheinlich direkt auf das Enzymeiweiss. Nur auf diese Weise könnte die Inhibierung der Zytochromoxydase erklärt werden.

Auf Grund der Versuchsergebnisse ist zu schliessen, dass die Pflanzenproteasen die Zytochromoxydaseaktivität beeinflussen, wobei Art, Konzentration und Vorinkubationszeit entscheidend für ihren Effekt sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Pflanzenproteasen bei milden Reaktionsbedingungen (niedrigere Konzentrationen, keine Vorinkubationszeit) die Mitochondrienmembrane beeinflussend einen »weitem Angriffsbereich« für die Wechselwirkung zwischen der Zytochromoxydase und deren Substrat ermöglichen. Unter anderen Bedingungen (höhere Konzentrationen der Proteasen Vorinkubation der Mitochondrien mit Proteasen) ist ein tieferes Eingreifen auf submitochondrialen Niveau einschliesslich auf die Komponenten der Atmungskette nicht ausgeschlossen.

LITERATUR

1. Nestorov, N., Grosdanov A., Lilov, L. Materiali ot 2. meschdunaroden simposium po fermentativna promischlenost, Leipzig 1968.
2. Dimitrov, O., Kaltshev, L., Grosdanov, A., Lilov, L., Nestorov, N., Materiali ot 2. Meschdunarod. simp. po ferm.prom., Leipzig, 1968.
3. Lilov, L., Grosdanov A., Dimkov R., Nestorov N., Materiali ot 2. Meschd. simpos. po ferm. prom, Leipzig, 1968.

4. Grosdanov A., Dimkov R., Lilov L., Nestorov N. — Materiali ot II Meschd. simp. po ferm. prom. Leipzig, 1968.
5. Nestorov N., R. Dimkov, Grosdanov A., Lilov L. — Informationen bületin na NITIZ-Sofia, br. 3, 1968.
6. Green D. v sbornike »Strukturnie komponenti keltki«, Moskva, IL, 1962.
7. Lemindger A. »Mitochondria«, Moskva, »Mir«, 1966.
8. Louzikov B, Rachimov M., Saks B., Beresin I. — »Biochimia« t. 32, v. 6, 1967.
9. Louzikov B, Rachimov M., Beresin I. — Dokladi AN SSSR, Biologia, t. 178, 1968.
10. Podilchak M. — »Klinicheskaia enzimologia«, »Zdorov'a«, Kiev, 1967.
11. Reker E. — »Bioenergeticheskie mehanizmi«, Moskva, »Mir«, 1967.
12. Hesin R. — »Biochimia Zitoplasmii«, Moskva, izd. AN SSSR, 1966.
13. Dianzani M. — »Experientia«, v. IX, 343, 1953.
14. Hatefi J. in »Comrehensive biochemistry«, Florkin & Stotz, AP, 1966.
15. Hogeboom G., in »Methods in enzymology«, ed. Colowick S. P. & Kaplan N. O. vol. 1., New York, 1955.
16. Gamble J. — Biochem. biophys. Acta, 23, 306, 1957.
17. Green D. and Crane F., Int. Symp. on Enzym. Chem., Tokyo & Kyoto, 1957.
18. Kyoichi Ozawa, J. Biochem., Tokyo, 51, 372, 1962.
19. Slater E. C., Biochemical J., 44, 305, 1949.
20. Tsou C., Biochemical J., 49, 362, 1951.
21. Yonetani M., in »Methods in enzymology« edit. by Colowick S. & Kaplan vol. X, New York, 1967.
22. Ziegler D., Linnane A., Green D., Biochem. biophys. Acta, 28, 524, 1958.
23. Ziegler D. and Linnane A., Biochem. biophys. Acta, 30, 53, 1958.