MARIAN SCHMIDT¹, THEODORA KRÓL¹, ULLA RENNE² und LOTHAR PANICKE²

Proteolytische Aktivität der lysosomalen Enzyme in der Leber wachsender Mäuse

Herrn Professor Dr. Dr. H. H. Sambras zum 65. Geburtstag gewidmet

Summary

Title of the paper: **Lysosomal proteolytic activity in the liver of growing mice**

The behaviour of the activity of some lysosomal proteolytic enzymes in the liver of mice, both selected and unselected for high body growth, was followed during the postnatal development. The activity of cathepsin D and L, the alanylaminopeptidase, the arginylaminopeptidase, the α -glucosidase and the N-acetyl-glucosaminidase was estimated in male mice aging 21, 28, 35 and 42 days. In the liver of animals with high body gain statistic significant lower activities (30-50 %) of all estimated enzymes were found, in comparison to the control mice. These results confirm the statement that inhibition of proteolysis is an immediate mechanism in the induction of growth.

Key Words: proteasen, mice liver, proteolysis, growth, enzyme

Zusammenfassung

In Ergänzung zu Untersuchungen der proteolytischen lysosomalen Enzymaktivitäten im Blut bei Rindern wurden wachsende Mäuse differenzierter Linien einbezogen.

In der Leber von wachsenden Mäusen mit hoher Wachstumskapazität sowie von unselektierten Kontrollmäusen wurden im Verlauf der Entwicklung die Aktivitäten einiger lysosomaler proteolytischer Enzyme untersucht. Dazu wurden die Aktivitäten der Kathepsine D und L (KATH D und L) und der Alanylaminopeptidase (ALA), der Arginylaminopeptidase (ARG) sowie zusätzlich der α -Glukosidase (AGLD) und der N-Acetyl-Glukosaminidase (NAGL) in der Leber männlicher Mäuse im Alter von 21, 28, 35 und 42 Tagen bestimmt.

In der Leber der Mäuse mit hoher Wachstumskapazität sind statistisch gesicherte geringere Aktivitäten aller bestimmten Enzyme im Vergleich zu den Kontrollmäusen nachgewiesen. Das bezog sich auf jedes Altersstadium. Generell sind die Aktivitäten der proteolytischen Enzyme, vor allem der Kathepsine, um 30-50 % niedriger als in der Leber der Mäuse mit hoher Wachstumskapazität. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, daß in einem wachsenden Organismus mit hoher Proteinsynthese die proteolytische Aktivität teilweise gehemmt ist. Die proteolytische Aktivität der Zellen kann somit für Rückschlüsse zur indirekten Beurteilung der potentiellen Proteindegradation und Proteinsynthese benutzt werden.

Schlüsselwörter: Lysosomale Proteasen, Mäuseleber, hohe Proteinsynthese, Wachstum, Enzyme

1. Einleitung

Der Proteinzuwachs des ganzen Organismus sowie der einzelnen Organe und Gewebe ist ein Resultat des dynamischen Gleichgewichtes zwischen den Syntheseraten und der Degradation der Proteine (AMENTA et al., 1980; BACCINO et al., 1981; BALLARD et al., 1980, 1981; BAXTER et al., 1978; BIENKOWSKI, 1983, 1986; LOBLEY, 1998; MORTIMORE et al., 1970, 1983; PFEIFER, 1981, 1987).

Eine deutliche Stimulierung der anabolen Prozesse wird erreicht durch Verschiebung

des Gleichgewichtes der beiden entgegengesetzten Reaktionen der Biosynthese und der Degradation (Proteolyse) der Proteine. In beiden Fällen kommt es zu einer erhöhten Proteinkonzentration in den Zellen, aber mit unterschiedlichem energetischen Aufwand des ganzen Organismus. So z.B. bedarf die Förderung der Proteinsynthese und des Wachstums des Tieres durch eine gesteuerte Hemmung der Proteolyse (Degradation) eine kleinere energetische Versorgung der Zellen, denn die Proteolyse im endosomalen Raum (SEGLEN und BOHLEY, 1992) verläuft mit geringerem energetischen Aufwand im Vergleich zur Proteinsynthese, welche expensive Mengen an ATP verbraucht (BIENKOWSKI, 1983; BALLARD et al., 1980; LOBLEY, 1998). Verringerter Protein-Degradation in den Zellen vor allem der Muskeln und der Leber, gemessen anhand der Aktivität der proteolytischen Enzyme, bildet damit ein wichtiges genetisches Merkmal in der Zucht und Selektion (LOBLEY, 1998), das sich indirekt mit verändert. Die degradativen Mechanismen in der Zelle bestimmen den Proteingehalt im Zytoplasma sowie den allgemeinen Turnover.

Diese Prozesse verlaufen in den endosomalen Raum (Endosome, Autophagolysosome) mit Beteiligung der Lysosomen und dessen degradativen Enzymen, vor allen der Proteasen (SEGLEN und BOHLEY, 1992).

Die Bedeutung der zellulären Autophagie für die intrazellulären Abbauprozesse sowie für die Aufrechterhaltung des dynamischen Gleichgewichtes der Zellen wird durch den Befund deutlich, daß in wachsenden Zellen, das heißt in Fällen eines positiven Gleichgewichtes, das Ausmaß der Proteolyse signifikant reduziert ist (PFEIFER, 1981, 1987). In der regenerierten Leber (nach teilweiser Hepatektomie) ist die Degradation in den Autophagosomen der frühen post-operativen Phase um 75 % reduziert, nach 24 Stunden um beinahe 100 %. Noch am 4. Tag nach der Operation war das Ausmaß der degradativen Prozesse um 50 % niedriger im Vergleich zur Kontrolle (PFEIFER, 1981).

Ein induziertes Wachstum des Herzmuskels (linker Ventrikel) wurde hervorgerufen durch eine Unterbindung der versorgenden Arterie. Im Verlauf von 3 Wochen stieg die Masse des Myokard um 70 % im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig beobachtete man eine starke Hemmung der Autophagie und der lysosomalen Proteolyse (PFEIFER, 1981, 1987). Die Hemmung der autophagalen Prozesse scheint ein spezifisches Merkmal für wachsende Zellen und Gewebe zu sein. Diese Befunde führten PFEIFER (1981) zu der Feststellung, daß in einem wachsenden Gewebe die proteolytischen Prozesse stark gehemmt sind.

Vorliegende Untersuchungen sollen einen Beitrag zum Verhalten der proteolytischen Enzymaktivitäten in der Leber von Mäusen mit hoher Wachstumsintensität und damit hoher Proteinsynthese im Vergleich zu Kontrollmäusen mit mittlerem Körpermassenzuwachs im Verlauf ihrer postnatalen Entwicklung in Ergänzung zu den vorliegenden Ergebnissen der proteolytischen lysosomalen Enzymaktivitäten beim Rind (PANICKE et al., 1999) leisten.

2. Material und Methode

In die Untersuchung wurden männliche Mäuse der unselektierten Kontrolllinie DU-Ks und der Wachstumslinie DU-6 in der 82. Generation bei verschiedenem Alter einbezogen (Tab. 1). Die Mäuse der Wachstumslinie wurden selektiert auf eine hohe Körper-

masse am 42. Lebenstag (LT). Sie erreichten eine Körpermasse am 42. Lebenstag (KM42) von 64 g gegenüber den Kontrollmäusen mit 25 g.

Tabelle 1

Versuchsumfang (n) in der Kontrolllinie (DU-Ks) und der Wachstumslinie (DU-6) in den Lebensabschnitten nach Lebenstagen (LT) und Körpermasse am 42. LT (KM42) (Sample size in the control line (DU-Ks) and the growth line (DU-6) in different life parts in days and body weight at 42nd day of life)

LT	21	28	35	42	KM42 in g
DU-Ks	18	26	15	22	25
DU-6	10	8	11	8	64

Tiere der beiden Untersuchungsgruppen wurden unter identischen Standardbedingungen gehalten. Nach der Tötung wurde die Leber schnell entnommen, im Gemisch von physiologischem Natrium-Chlorid mit Eis perfundiert und mit kalter Kochsalzlösung gespült. Nach Trocknung mit Löschpapier wurde eingewogen (± 10 mg). Das Gewebe wurde zerkleinert und im Glas-Teflon-Homogenisator mit 100 mM Azetat-Puffer, pH 6.0 $\pm$ 0.1 % TRITON X-100 (1:7, w/vol) bei 800 U/Min. 2 Minuten homogenisiert.

Das einheitliche Homogenisat wurde eingefroren bei -20°C für 12 Stunden und nach dem Auftauen zentrifugiert bei 20 000 x G (20 Min.). TRITON X-100 sowie das Einfrieren und Auftauen bewirkten eine Destruktion der Lysosomen und die totale Freisetzung der lysosomalen Enzyme, die sich dann im Überstand befinden. Der klare Überstand wurde eingefroren und nach Bedarf für die Bestimmung der lysosomalen Enzyme verwendet.

Es wurden die Aktivitäten folgender lysosomaler Enzyme bestimmt:

1. Alanylaminopeptidase (Cytosol)	ALA	E.C.3.4.11.14
2. Leuzylaminopeptidase	LEU	E.C.3.4.11.2
3. Arginylaminopeptidase	ARG	E.C.3.4.11.6
4. Kathepsine D + L	KATH D/L	E.C.3.4.23.5 + 3.4.22.15
5. α -Glukosidase	AGLD	E.C.3.2.1.20
6. N-Azetyl-Glukosaminidase	NAGL	E.C.3.2.1.30

Für die Bestimmung der Amino-peptidasenaktivität wurden spezifische Aminosäure-4-Nitroanilide verwendet anhand der beschriebenen Methode (KIRSCHKE und WIEDERANDERS, 1984). Die Amino-peptidasen haben eine viel größere Affinität für diese Substrate im Vergleich zu den Naphyl-Derivaten, welche vorher genutzt wurden. Zusätzlich ermöglichen diese Substrate eine schnelle kinetische Bestimmung der Aktivitäten, was eine Analyse auf Minuten verkürzt. Die Bestimmung der Aktivität der einzelnen Amino-peptidasen wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Enzym	Substrat	mM	pH	Puffer
ALA	L-Alanin-4-Nitroanilid	1.25	7.0	Phosphat, 100 mM
ARG	L-Arginin-4-Nitroanilid	1.50	6.5	Phosphat, 100 mM
LEU	L-Leuzin-4-Nitroanilid	1.50	7.0	Phosphat, 100 mM

Das abgespaltene 4-Nitroanilin wurde bei 410 nm bestimmt und anhand einer 4-Naphthyl-Standard-Lösung die Konzentration ermittelt. Die Extinktion ist stabil und kann zu beliebiger Zeit gemessen werden.

Die Aktivität der Kathepsine D und L wurden gemeinsam als katheptische Aktivität bestimmt nach der Azo-Kazein-Methode von LANGNER et al. (1973). In der Gegenwart von 3 M. Harnstoff werden bei pH 5.0 nur die zwei Proteasen erfaßt. Alle anderen Proteasen, darunter auch das Kathepsin H, sind inaktiv unter diesen Bedingungen. Diese Methode hat noch einen weiteren Vorteil. Sie neutralisiert die endogenen Proteasen-Inhibitoren.

Für die Bestimmung der 2 Glykosidasen: der α -Glukosidase (AGLD) und der N-Acetyl-Glukosaminidase (NAGL) wurden spezifische Nitrophenol-Derivate eingesetzt anhand der beschriebenen Methoden von BARRETT und HEATH (1977).

Die Aktivität der Aminopeptidasen und der Glykosidasen wurde errechnet als $\mu\text{Mol/g}$ Leber/h, der Kathepsine D/L in μg Azokazein/g Leber/h. Alle verwendeten Enzym-Substrate und Reagenzien wurden von SIGMA bezogen.

Die Signifikanz der Differenzen zwischen den Aktivitäten der einzelnen Enzyme in den Gruppen wurden mit dem t-Test statistisch geprüft.

3. Ergebnisse und Diskussion

Für die Proteinproduktion bauen Säugetiere überwiegend mehr Protein intrazellulär ab, als sie dafür aus der Nahrung aufnehmen (AMENTA et al., 1981; BALLARD et al., 1980; BACCINO et al., 1981; BIENKOWSKI et al., 1986; BOHLEY, 1968, 1988; HOLZER und HEINRICH, 1980; LOBLEY, 1998; PLOMP et al., 1987). Der Energiebedarf für diesen Proteinumsatz der Zellen ist beträchtlich. Er wird bis auf 25 % der Grundumsatzenergie geschätzt (BACCINO et al., 1981; BALLARD et al., 1981; BAXTER und STANNERS, 1978; BOHLEY, 1968; LOBLEY, 1998; MORTIMORE et al., 1970, 1983). KNAPP (1995) gibt sogar 35 % im Ergebnis einer Simulation dafür bei Schweinen an. Im Vordergrund dieser Prozesse stehen die degradativen Enzyme insbesondere die Proteasen (PFEIFER, 1976; SEGLEN et al., 1986, 1992). Die proteolytische Aktivität des Cytosoles ist so gering, daß der relativ hohe Proteinumsatz in der Zelle durch sie allein nicht erklärt werden kann. Dieser Prozeß unterliegt dem Mechanismus der zellulären Autophagie mit der vorrangigen Beteiligung der hochaktiven lysosomalen Proteasen (BOHLEY und SEGLEN, 1992; MORTIMORE und MONDON, 1970; PFEIFER, 1981; SEGLEN et al., 1981, 1986). Die Cytosolproteine werden normalerweise vor dem Abbau durch lysosomale Enzyme durch spezifische Kompartimentierung der Lysosomen geschützt. Die Zellproteine, welche in dem katabolen Prozeß abgebaut werden, gelangen in die abgeschlossenen autophagalen Strukturen, wo sie bis zu den elementaren Bestandteilen degradiert werden (SEGLEN und BOHLEY, 1992). Der lysosomale Abbauweg der meisten Zellproteine in den Leberzellen wird hormonell kontrolliert. Das bedeutet, daß die Aktivitäten der einzelnen proteolytischen Enzyme im Verlaufe des Wachstums- und Reifeprozesses unterschiedlich und variabel sein könnten.

Diese Feststellung bildet eine Voraussetzung. Eine weitere wichtige Voraussetzung war dabei die proteolytische Aktivität der lysosomalen Enzyme in der Leber differenzierter Mäuse mit hohem (DU-6) und mittlerem (DU-Ks) Körpermassezuwachs im Verlauf ihrer postnatalen Entwicklung zu prüfen und zu vergleichen.

Den Proteinumsatz in der Leber bewirken lysosomale Endoproteasen: Kathepsine B, D, H und L sowie einige Exoproteasen vor allem die Aminopeptidasen. Dieser Ab-

baumechanismus ist ein Resultat einer konzertartigen Wirkung der Kathepsine und der Amino-peptidasen. Die Kathepsine D und L spalten die großen Proteinmoleküle in kleinere Fragmente, die dann eine Substratmischung für die einzelnen Amino-peptidasen bilden. In unserer Untersuchung verfolgten wir die gemeinsame Aktivität der Kathepsine D und L in der Leber im Verlauf der Entwicklung der Tiere beider Linien (Tab. 2).

Tabelle 2

Vergleich der proteolytischen Aktivität der Kathepsine D und L (KATH D/L) in der Leber von Mäusen der Kontroll(DU-Ks)- und Wachstums(DU-6)-Linie im Verlauf des Wachstums in μg Azokazein/g Leber/h (Comparison of proteolytic activity of Kath D/ L in the liver of mice in the control line DU-Ks and the growth line (DU-6) in different life parts in μg Azokazein/g liver/h)

Alter Tage	DU - Ks			DU - 6			Diff.	P
	$\bar{x}$	s	s %	$\bar{x}$	s	s %		
21	1066	177	18	767	131	17	300	0,005
28	1227	201	16	893	141	16	334	0,001
35	1686	266	16	1019	151	15	667	0,001
42	2056	301	15	1021	173	17	1934	0,001
Zuwachs % 21 zu 42	193	160	-	159	132	-	34	-

In der Tabelle 2 sind die Aktivitäten der Kathepsine D/L in der Leber der wachsenden Mäuse mit hohem Wachstum (DU-6) und der Kontrollmäuse (DU-Ks) zusammengestellt. Man sieht im Mittelwertvergleich eindeutig, daß die proteolytischen Aktivitäten der DU-6 Linie kleinere Werte aufweisen. Schon am 21. LT ist die katheptische Aktivität in der Leber der schnell wachsenden Mäuse (DU-6) um 30 % niedriger im Vergleich zu den Kontrolltieren. Am 42. LT ist die Aktivität um 40 % niedriger in der DU-6 Linie. Weiterhin wächst die proteolytische Aktivität mit dem Alter der Tiere beider Linien, wenn auch unterschiedlich. Am 42. LT wächst die Aktivität in der Leber der Kontrollmäuse um ca. 93 % im Vergleich zu den Werten am 21. Tag. In der Leber der Mäuse der Wachstumslinie dagegen nur um 59 % der Ausgangswerte. Dieses Ergebnis läßt auf die auch zum späteren Zeitpunkt vorhandene höhere Wachstumskapazität schließen bzw. bestätigt sie.

Die in der Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß im schnell wachsenden Gewebe die proteolytischen Aktivitäten stark gehemmt sind (BACCINO et al., 1981). Es wurde festgestellt, daß eine Inhibierung der proteolytischen Aktivitäten eine Akkumulation der Proteine in der Zelle auslösen kann. Das wurde auch in anderen Fällen eines schnellen Wachstums bewiesen, besonders in der postnatalen Entwicklung (AMENTA et al., 1980; BACCINO et al., 1981). In der Leber junger Rassen ist die mitotische Aktivität in den Hepatozyten 15-20 mal größer als in reifen Zellen wachsender Ratten. Gleichzeitig ist aber die proteolytische Aktivität statistisch niedriger in dem Gewebe junger Tiere. Das ist eine Folge einer allgemeinen Reduzierung der proteolytischen Aktivität der Kathepsine D und L in Übereinstimmung zu unseren Ergebnissen in Tabelle 2.

Die Stimulierung der mitotischen Prozesse und des Wachstums durch Wachstumsfaktoren und spezifische Pharmaka führt zu einem prompten Abfall der proteolytischen Aktivität (BALLARD et al. 1980, 1981; KELLY et al., 1984; SEGLEN et al., 1981).

Bei jungen wachsenden Tieren wird der antiproteolytische Effekt in den Hepatozyten wahrscheinlich durch die antikatabole Wirkung des Insulins ausgelöst (BALLARD et al., 1981; LOBLEY, 1998; MORTIMORE und MONDON, 1970; PFEIFER, 1981).

Morphometrische Studien haben gezeigt, daß es unter der Insulineinwirkung auf die Leberzelle schon nach einigen Minuten zu einem totalen Abfall der Zahl der autophagischen Vakuolen (AV) kommt. Die Zahl der AV reguliert das Ausmaß der intrazellulären Proteolyse. Die Steuerung der degradativen intrazellulären Prozesse verläuft über die Bildung oder Involution der autophagischen Vakuolen.

Hormone, Wachstumsfaktoren und viele andere biologisch aktive Substanzen bewirken einen An- oder Abstieg der Anzahl dieser Strukturen sehr oft bei unveränderter Aktivität der proteolytischen Enzyme. Andererseits führten viele Substanzen z.B. Vinblastin zu einem Anstieg der katabolen Prozesse in Folge einer Vermehrung der autophagischen Strukturen (MARZELLA und GLAUMANN, 1980; KRÓL et al., 1994; SCHMIDT et al., 1996).

Die ermittelten katheptischen Aktivitäten in der Leber bilden eine gemeinsame kooperative proteolytische Stärke der 2 lysosomalen Proteasen: das Kathepsin D und das Kathepsin L. Außer diesen Proteasen sind in der Leberzelle noch die Kathepsine B und H vertreten. Beide Enzyme haben jedoch nur eine schwache proteolytische Aktivität.

Kathepsin L ist die stärkste proteinspaltende lysosomale Protease. Ihre Aktivität ist über 10 mal größer im Vergleich zu den anderen proteolytischen Enzymen (BOHLEY und SEGLEN, 1992; KIRSCHKE et al., 1977b; SCHMIDT und KIRSCHKE, 1990). Sowohl das Kathepsin D wie das Kathepsin L spalten die großen Zytosolproteine, meistens Glykoproteine, in kleinere Bruchstücke mit noch gebundenen Zuckern. Diese Oligopeptide bilden nun das Substrat für die Aminopeptidasen und Glykosidasen (darunter für NAGL).

In vorliegenden Untersuchungen wurden die Aktivitäten der drei Aminopeptidasen der Alanylaminopeptidase (ALA-AP), der Leuzyllaminopeptidase (LEU-AP) und der Arginylaminopeptidase (ARG-AP) in der Leber der Mäuse verfolgt. Die beiden ersten Enzyme sind eigentlich spezifische Alanylaminopeptidasen, aber mit verschiedener intrazellulärer Lokalisation. Die ALA ist ein lösliches (soluble) Zytosolenzym und wird bezeichnet als SALA. Die LEU ist auch eine echte Alanylaminopeptidase, gebunden an die Zellmembranen mALA. Sie bevorzugt Peptide mit endständigem Leuzin und wird deshalb falsch als Leuzinaminopeptidase bezeichnet, welches ein ganz anderes Enzym ist (E.C.3.4.11.1) und die hier eingesetzten Substrate nicht spaltet. Die Werte der aminopeptischen Aktivitäten werden in der Tabelle 3 dargestellt.

ALA und LEU haben ähnliche Aktivitäten am 21. Lebenstag bei Kontroll- und Wachstumslinie mit 39 und 31 bzw. 23 und 26 $\mu\text{Mol/g Leber/h}$ respektive. Beide verfügen über einen hohen Zuwachs am 42. Lebenstag auf 179 % und 225 % bzw. auf 244 und 192 %. Daraus kann auf das intensive Wachstum zu Beginn der Untersuchung geschlossen werden. Die größte Aktivität zeigt die ARG mit 79 bzw. 49 $\mu\text{Mol/g Leber/h}$ bei einem geringeren Zuwachs zum 42. Lebenstag auf 133 bzw. 160 % bei Kontroll- und Wachstumslinie respektive. Die relativ hohe Aktivität der Arginylaminopeptidase in der Leber beider Mäuselinien kann man erklären als eine zusätzliche Einwirkung des Kathepsins H (E.C. 3.4.22.16) einer Endo-Aminoprotease, welche spezifisch auf Peptide mit endständigem Arginin eingestellt ist (KIRSCHKE et al., 1977a).

Tabelle 3

Vergleich der Amino-peptidasen-Aktivität für ALA, ARG, LEU und gesamt zwischen der Kontroll(DU-Ks)- und Wachstums(DU-6)-Linie nach Lebenstagen (LT) in $\mu\text{Mol/g}$ Leber/h (Comparison of the proteolytic activity of ALA, ARG and LEU in the control line (DU-Ks) and the growth line (DU-6) in different life parts in $\mu\text{Mol/g}$ liver/h)

Enzym	LT	DU-Ks			DU-6			Diff.	P
		$\bar{x}$	s	s %	$\bar{x}$	s	s %		
ALA	21	39	7	17	23	3	13	16	0,01
	28	51	10	25	38	4	11	13	0,01
	35	67	14	21	59	8	13	8	0,05
	42	70	18	26	57	4	11	13	0,01
% zu	21	179			244				
ARG	21	79	13	16	49	10	21	30	0,01
	28	89	14	15	64	9	14	25	0,01
	35	107	18	17	62	10	16	45	0,01
	42	106	17	16	78	11	14	28	0,01
% zu	21	133			160				
LEU	21	32	6	18	26	5	19	6	0,05
	28	48	9	18	31	4	13	17	0,01
	35	65	10	15	38	7	19	27	0,01
	42	71	15	21	50	7	13	21	0,01
% zu	21	225			192				
Gesamt	21	150	25	17	98	18	19	52	0,01
	28	189	33	17	133	17	13	56	0,01
	35	239	43	18	159	25	16	80	0,01
	42	247	50	20	184	24	13	63	0,01
% zu	21	165			188				

In der Leber der Säugetiere ist dieses proteolytische Enzym weit verbreitet (BOHLEY und SEGLEN, 1992).

Betrachtet man die Variationskoeffizienten (s-%), so liegen sie mit 15-20 % ähnlich wie bei quantitativen Merkmalen bei ARG und LEU in beiden Linien. Deutliche Unterschiede sind vorhanden zu ALA mit über 20 % bei der Kontroll- und 11-13 % bei der Wachstumslinie.

Im Mittelwertvergleich (t-Test) der Aktivitäten der drei Amino-peptidasen in der Leber der Mäuse der Kontroll(DU-Ks) und der Wachstums(DU-6)-Linie liegen statistisch gesicherte hoch signifikante Differenzen in jedem Entwicklungsabschnitt vor. Die langsamer wachsenden Kontrollmäuse haben höhere Aktivitäten der untersuchten Enzyme als die Mäuse der Wachstumslinie (DU-6). Das bedeutet, daß bei intensivem Wachstum die proteolytischen lysosomalen Enzymaktivitäten der Amino-peptidasen gehemmt sind. Dies trifft übrigens auch im Verlauf vom 21. zum 42. Lebenstag innerhalb beider Linien zu. Die Aktivität der ALA zeigt am 21. LT der Mäuse der Wachstumslinie um ca. 40 % niedrigere Werte im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die Aktivität dieses Enzymes wächst in der Leber der Mäuse im Verlauf der Entwicklung. In der Kontrolllinie steigt die Aktivität am 42. LT um 79 % der Ausgangswerte. In der Wachstumslinie DU-6 ist der Anstieg noch größer und erreicht 144 % der Werte am 21. LT. Die Aktivität der ALA in dieser Linie ist am 42. LT um 20 % niedriger zu den Werten der Kontrollmäuse.

Auch die Aktivität der LEU der Leber der Mäuse mit hohem Wachstum zeigt deutlich niedrigere Werte: am 21. LT um ca. 18 % und am 42. LT um 30 % im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die Aktivität dieses Enzymes steigt am 42. LT um 125 % in der Kontrolllinie und um 92 % in der Wachstumslinie im Vergleich zu den Werten am 21. Lebenstag. Wie schon angedeutet, zeigt die höchsten Aktivitäten die Arginylamino-peptidase bei Mäusen beider Linien. In der Leber der Wachstumslinie DU-6 ist die Aktivität am 21. LT um 40 % und am 42. LT um 26 % niedriger im Vergleich zu der Kontrolllinie.

Im Verlauf der Entwicklung steigt die Aktivität der ARG ständig. In der DU-Ks-Linie wächst sie auf 125 % der Ausgangswerte und in der Leber der Mäuse der Wachstumslinie um über 90 % im Vergleich zu den Werten am 21. LT.

Eine vollständige Spaltung eines Proteins im endosomalen Raum verläuft unter einer konzertartigen Mitwirkung von Kathepsin D und L, der einzelnen Amino-peptidasen und auch einiger Glykosidasen, welche die an die Peptide gebundene Glykosid-Reste abspalten. Eine große Bedeutung in der Freisetzung der Zuckerreste aus den Oligopeptiden hat die Aktivität der N-Azetyl-Glukosaminidase (NAGL).

Ähnlich wie im Fall der katheptischen Aktivität, welche die allgemeine proteolytische Potenz der Kathepsine darstellt, kann man von einer aminopeptidischen Aktivität sprechen. Sie bezieht sich auf die oligopeptidspaltende Wirkung, welche zu einer Freisetzung der Aminosäuren führt. Sie wird ausgedrückt als die Gesamtaktivität der ALA + LEU + ARG (Tab. 3 „Gesamt“). Die ermittelten Werte der gesamten Amino-peptidasenaktivität im Verlauf der Entwicklung der Mäuse beider Linien (Tab. 3) weisen statistisch gesicherte niedrigere Aktivitäten in der Leber der Mäuse mit hohem Wachstum (DU-6) nach. Am 21. LT sind die Werte in der Leber der Wachstumslinie um 35 % niedriger im Vergleich zu der Kontrolllinie DU-Ks. Ungefähr dieselbe Aktivitätsdifferenz findet man am 42. LT der Mäuse beider Linien (ca. 26 %).

Im Verlauf der Entwicklung findet man einen progressiven Anstieg der totalen aminopeptischen Aktivität in der Leber der Tiere beider Linien. In der Kontrollgruppe DU-Ks der Mäuse steigt die Aktivität am 42. LT um 65 % im Vergleich zu dem Wert am 21. Tag. Ähnlich ist der Anstieg der Aktivität in der Wachstumslinie DU-6 um 88 % der Ausgangswerte. Alle Vergleiche sind statistisch gesichert und bestätigen die Schlußfolgerung, daß in wachsenden Geweben die proteolytischen Aktivitäten stark gehemmt sind.

In den katabolen Abbau der Glykoproteine, welche über 90 % der Zellproteine darstellen, sind auch spezifische Glykosidasen wie α - und β -Galaktosidasen, die α -Mannosidase und N-Azetyl-Glukosaminidase (NAGL) einbezogen. Somit kann man die N-Azetyl-Glukosaminidase als mitwirkendes glykoproteinspaltendes Enzym betrachten. Das Verhalten der Aktivität dieses Enzymes in den Wachstumsmäusen im Verlauf der postnatalen Entwicklung bestätigt diese Rolle. Die ermittelten Werte für NAGL wurden vergleichend für beide Linien in der Tabelle 4 zusammengestellt. Ähnlich wie im Falle der proteolytischen Enzyme (Tab. 2 und 3) sind eindeutig kleinere Aktivitäten in der Leber der schnell wachsenden Mäuse der DU-6 Linie erkennbar. Am 21. LT hat die Aktivität um 56 % kleinere Werte und am 42. LT sogar um 75 % im Vergleich zu den Mäusen der Kontrolllinie DU-Ks. Im Verlaufe der Entwicklung kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität dieses Enzyms. Am 42. LT steigt der Wert auf

269 % in der DU-Ks Linie und auf 154 % in der Wachstumslinie im Vergleich zu den Werten am 21. Tag.

Tabelle 4

Vergleich der Aktivität der ausgewählten Glukosiden α -Glukosidase (AGLD) und vN-Azetyl-Glukosaminidase (NAGL) in der Leber von Mäusen der Kontroll(DU-Ks)- und Wachstumslinie (DU-6) im Verlauf des Wachstums in $\mu\text{Mol/g Leber/h}$ (Comparison of activity of AGLD and NAGL in the liver of mice in the control line (Du-Ks) and the growth line (DU-6) in different life parts in $\mu\text{Mol/g liver/h}$)

Enzym	LT	DU - Ks			DU - 6			Diff.	P
		$\bar{x}$	s	s %	$\bar{x}$	s	s %		
AGDL	21	23	3	14	17	4	25	6	0,05
	28	29	5	16	19	4	21	10	0,01
	35	27	4	16	21	4	21	6	0,23
	42	29	5	16	19	4	19	10	0,04
% zu	21	129			115				
NAGL	21	109	23	21	48	11	22	61	0,01
	28	140	31	22	60	13	22	80	0,01
	35	271	43	16	77	16	21	194	0,01
	42	292	51	17	74	14	19	218	0,01
% zu	42	269			154				

Zusätzlich wurde das Verhalten der α -Glukosidase (AGDL) in der Leber der Mäuse beider Linien untersucht (Tab. 4).

AGLD ist eine Glykosidase, welche aber in der Degradation der Glykoproteine nicht teilnimmt, denn Glukose ist nicht ein Bestandteil dieser Proteine. Dieses Enzym ist einbezogen in den Glykogen-Umsatz in der Leberzelle. AGLD spaltet das Glykogen mit der Freisetzung der freien Glukose. Diese Glukosidase ist ein lysosomales Enzym, das eine wichtige Rolle in der Energieversorgung der Zelle spielt. Eine Freisetzung dieses Enzymes aus den Lysosomen bewirkt einen deutlichen Anstieg der Glukosekonzentration in den Geweben und Blut.

Aus den Werten der Aktivität der Glukosidase (AGLD) kann man sehen, daß die Unterschiede zwischen den Werten in beiden Mäuselinien nicht so deutlich sind und daß im Gegensatz zu den Aktivitäten der proteolytischen Enzyme kaum statistisch gesicherte Unterschiede der AGLD Werte zwischen den beiden Mäuselinien vorkommen.

Diese Feststellung unterstreicht noch zusätzlich den Wert der proteolytischen Aktivität in der Bewertung der Wachstumsraten der Tiere.

Schlußfolgerungen

Der Proteinansatz des ganzen Organismus ist ein Endeffekt des dynamischen Gleichgewichtes zwischen Raten der Biosynthese und der Degradation der Zellproteine. Eine Steigerung der Proteinkonzentration in der Zelle kann erreicht werden sowohl durch eine Stimulierung der Synthese wie auch durch eine Hemmung der Proteolyse. Diese letzte Möglichkeit verläuft mit geringen energetischen Auflagen im Vergleich zu den synthetischen Prozessen. Die Degradation der Proteine verläuft unter der Kontrolle der proteolytischen Enzyme. Die Rolle der einzelnen Proteasen im Verlauf des Wachstums in den Geweben und deren Einfluß auf den Proteinansatz sind in der Literatur wenig bekannt. Da der Proteinumsatz genetisch determiniert ist, erscheint die Fest-

stellung des Zusammenhangs zwischen den Aktivitäten der lysosomalen Enzyme und den Wachstumsraten der Tiere als begründet. Die Untersuchungen wurden durchgeführt an Mäusen mit hohem Körpermassezuwachs und Kontrollmäusen mit normalem Wachstum. Ermittelt wurden die Aktivitäten der Kathepsine D und L, der Aminopeptidasen und der N-Azetyl-Glukosaminidase, welche in der Degradation der Glykoproteine beteiligt sind.

Nach zusammenfassender Analyse der Ergebnisse kann geschlußfolgert werden:

1. Die Aktivitäten der Kathepsine D und L haben statistisch gesicherte kleinere Werte in der Leber der Mäuse mit hohem Wachstum. Im Verlauf der Entwicklung sind die Aktivitäten um 30-40 % niedriger im Vergleich zu den Kontrolltieren.
2. Die katheptische Aktivität wächst progressiv mit der Entwicklung und ist am 42. LT um ca. 93 % höher in der Kontrolllinie und um 59 % höher bei den schnellwachsenden Tieren in der Wachstumslinie.
3. Die Aminopeptidasen ALA, ARG und LEU zeigen ähnliches Verhalten der Aktivitäten in den beiden Untersuchungsgruppen: die Aktivitäten aller Aminopeptidasen sind um ca. 35 % niedriger in der Wachstumslinie im Vergleich zu den Kontrollmäusen.
4. Die Aktivität der N-Azetyl-Glukosaminidase, welche im Katabolismus der Zellproteine teilnimmt, ist im Verlauf des Wachstums um 56 bis 75 % niedriger in der Wachstumslinie.
5. Die Aktivität der α -Glukosidase, welche in der Proteolyse nicht teilnimmt, zeigt kaum statistische Unterschiede in den Werten beider Mäuselinien.
6. Die reduzierten Aktivitäten der proteolytischen Enzyme in der Leber der Mäuse der Wachstumslinie mit höherer Wachstumsintensität ist auch in anderen Geweben wahrscheinlich zu erwarten. Es ist zu schlußfolgern, daß in wachsenden Geweben die proteolytischen Enzymaktivitäten gehemmt werden. Es ist anzunehmen, daß sich dieser Parameter indirekt mit der Selektion auf hohe Zuwachsleistung verändert hat.

Literatur

- AMENTA, J.S.; BROCHER, S.C.:
Studies on protein turnover in cell culture: Evidence for a specific proteolytic state and its relation to cellular proliferation and cellular senescence. *Acta Biol. Med. Germ.* 40 (1981), 1215-1226
- AMENTA, J.C.; SARGUS, M.J.; BROCHER, S.C.:
Protein synthesis and degradation in growth regulation in rat embryo fibroblasts: role of fast-turnover and slow-turnover protein. *J. Cell. Physiol.* 105 (1980), 51-61
- BACCINO, F.M.; MESSINA, M.; MUSI, M.; TESSITORE, L.:
Levels of proteolytic activities and cell protein degradation. *Acta Biol. Med. Germ.* 40 (1981), 1249-1258
- BALLARD, F.J.; KNOWLES, S.E.; WONG, S.S.C.; BODNER, J.B.; WOOD, C.M.; GUNN, J.M.:
Inhibition of protein breakdown in cultured cells is a consistent response to growth factors. *FEBS Lett.* 114 (1980), 209-212
- BALLARD, F.J.; NIELD, M.K.; FRANCIS, G.L.; KNOWLES, S.E.:
Regulation of intracellular protein degradation by insulin and growth factors. *Acta Biol. Med. Germ.* 40 (1981), 1293-1300
- BAXTER, G.C.; STANNERS, C.P.:
The effect of protein degradation on cellular growth characteristics. *J. Cell. Physiol.* 96 (1978), 139-146

- BARRETT, A.J.; HEATH, M.F.:
Lysosomal enzymes. In: *Lysosomes. A laboratory handbook.* (DINGLE, J.T. Edit.), 2nd Ed., North-Holland Publ. Co. Amsterdam, 19-145, 1977
- BIENKOWSKI, R.S.:
Intracellular degradation of newly synthesized secretory proteins. *Biochem. J.* 214 (1983), 1-10
- BIENKOWSKI, R.S.; CURRAN, S.F.; BERG, R.A.:
Kinetics of intracellular degradation of newly synthesized collagen. *Biochemistry* 25 (1986), 2455-2459
- BOHLEY, P.:
Intrazelluläre Proteolyse. *Naturwissenschaften* 55 (1968), 211-217
- BOHLEY, P.; HIEKE, C.; KIRSCHKE, H.; SCHAPER, S.:
Protein degradation in rat liver cells. *Progr. Clin. Biol. Res.* 180 (1985), 447-454
- BOHLEY, P.:
Proteolysis in hepatocytes. *Adv. Clin. Enzymol.* (1988) 203-208
- BOHLEY, P.; SEGLEN, P.O.:
Proteases and proteolysis in the lysosomes. *Experientia*, 48 (1992), 151-157
- HOLZER, H.; HEINRICH, P.:
Control of proteolysis. *An. Rev. Biochem.* 49 (1980), 63-91
- KELLY, F.J.; LEWIS, S.E.M.; ANDERSON, P.; GOLDSPIK, D.F.:
Pre- and post-natal growth and protein turnover in four muscles of the rat. *Musc. Nerve* 7 (1984), 235-242
- KIRSCHKE, H.; LANGNER, J.; WIEDERANDERS, B.; ANSORGE, S.; BOHLEY, P.; HANSON, H.:
Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. *Acta Biol. Med. Germ.* 36 (1977a), 185-199
- KIRSCHKE, H.; LANGNER, J.; WIEDERANDERS, B.; ANSORGE, S.; BOHLEY, P.:
Cathepsin L: A new proteinase from rat liver lysosomes. *Europ. J. Biochem.* 74 (1977b), 293-301
- KIRSCHKE, H.:
On the substrate specificity of cathepsin L. *Acta Biol. Med. Germ.* 40 (1980), 1427-1431
- KIRSCHKE, H.; WIEDERANDERS, B.:
Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Proteinasen. *Martin-Luther-Univ. Halle, Wissenschaftliche Beiträge* 11 (R84) (1984), 3-62
- KRÓL, T.; SCHMIDT, M.; KOLATAJ, A.; WITEK, B.:
Vinblastine-induced autophagy in mouse liver. *Comp. Biochem. Biophys.* 107C (1994), 165-169
- KRÓL, T.; SCHMIDT, M.; LANKOFF, A.:
Retinol and Roaccutan effect on biochemical and morphological changes in mouse liver hepatocytes. (poln.) *Studia Kieleckie* 4/84 (1994), 27-33
- LANGNER, J.; WAKIL, A.; ZIMMERMANN, M.; ANSORGE, S.; BOHLEY, P.; KIRSCHKE, H.; WIEDERANDERS, B.:
Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme mit Azokazein als Substrat. *Acta Biol. Med. Germ.* 31 (1973), 1-18
- LOBLEY, G.E.:
Nutritional and hormonal control of muscles and peripheral tissue metabolism in farm species. *Livestock Production Science* 56 (1998), 91-114
- MARZELLA, L.; GLAUMANN, H.:
Increased degradation in rat liver induced by Vinblastine. I Biochemical characterization. *Lab. Invest.* 42 (1980), 8-17
- MORTIMORE, G.E.; HUTSON, N.J.M.; SURMACZ, C.A.:
Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983), 2173-2183
- MORTIMORE, G.C.; MONDON, C.E.:
Inhibition by insulin of valine turnover in liver. Evidence for a general control of proteolysis. *J. Biol. Chem.* 245 (1970), 2375-2383
- PANICKE, L.; SCHMIDT, M.; KRÓL, T.; STAUFENBIEL, R.:
Proteolytische Aktivitäten der lysosomalen Enzyme bei Milchrindern. I. Mitt.: Variation der lysosomalen Enzyme bei Milchkühen. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 42 (1999) 4, 321-334
- PFEIFER, U.:
Lysosomen und Autophagie. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 60 (1976), 28-64

PFEIFER, U.; BERTLING, J.:

A morphometric study on the inhibition of autophagic degradation during restorative growth of liver cells in rats refed after starvation. *Virchows Arch. Abt. B* 24 (1977), 109-120

PFEIFER, U.:

Morphological aspects of intracellular protein degradation: Autophagy. *Acta Biol. Med. Germ.* 40 (1981), 1619-1624

PLOMP, P.J.A.M.; WOLVETANG, E.J.; GROEN, E.J.; MEIJER, A.J.; GORDON, P.B.; SEGLEN, P.O.:

Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 164 (1987), 197-201

SCHMIDT, M.; KIRSCHKE, H.:

Degradation of proteoglycans by cathepsin H and L. In: *Proteinases and their inhibitors: Regulation of cellular metabolism* (DUBIN, A. Edit.) Univ. Jagiellonski, Kraków: 117-126, 1990

SEGLEN, P.O.; GORDON, B.; GRINDE, B.; SOLHEIM, A.E.; KOVAC, A.L.; POLI, A.:

Inhibitors and pathways of hepatocytic protein degradation. *Acta Biol. Med. Germ.* 40 (1981), 1587-1598

SEGLEN, P.O.; GORDON, P.B.; HOLEN, I.; HOYVIK, H.:

Hepatocytic autophagy. *Biomed. Biochem. Acta* 45 (1986), 1647-1656

SEGLEN, P.O.; BOHLEY, P.:

Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanism. *Experientia* 48 (1992), 158-171

Eingegangen: 26.05.1999

Akzeptiert: 09.05.2000

Anschriften der Verfasser

Prof. Dr. MARIAN SCHMIDT, Dr. THEODORA KROL

Biologisches Institut, Abt. Zellbiologie

u. Konopnickiej 15

25-406 Kielce

Polen

Prof. Dr. LOTHAR PANICKE, Dr. ULLA RENNE

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere

Wilhelm-Stahl-Allee 2

D-18196 Dummerstorf

Deutschland