

Der Einfluß von Cadmium, Zink, Blei und Quecksilber auf die Enzymaktivität bei *Saccharomyces cerevisiae* in vitro*)

H. J. Grafl und H. O. Schwantes

Institut für Pflanzenökologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung

Die vier Schwermetalle Cadmium, Zink, Blei und Quecksilber unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die Aktivität der untersuchten Enzyme nur sehr wenig. Konzentrationen über 10^{-5} M vermindern die Enzymaktivität signifikant, und Konzentrationen von etwa 10^{-3} M unterbinden sie völlig. Eine Steigerung der Enzymaktivität läßt sich nicht feststellen. Die Zugabe von Cadmium-, Zink- und Bleikombinationen führt zu einer Addition der toxischen Effekte, während bei der Interaktion zwischen Quecksilber und den anderen drei Schwermetallen die Gesamtwirkung fast ausschließlich durch das stärker hemmende Schwermetall allein bestimmt wird. Die erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, daß es unter In-vitro-Bedingungen zu einer direkten Wechselwirkung zwischen den Schwermetallen und den Enzymen kommt.

Summary

The difference between cadmium, zinc, lead, and mercury in regard of their effects on the activity of the enzymes tested is very slight. Concentrations higher than 10^{-5} M reduce significantly the activity of the enzymes, and concentrations of approximately 10^{-3} M inhibit it completely. An increase of the activity cannot be detected. The addition of combinations of cadmium, zinc, and lead results in a summing up of the toxic effects, whereas the interaction between mercury and the other three heavy metals shows a cumulative effect, which is appointed nearly completely by the heavy metal more toxic. The findings suggest that under in-vitro conditions there exists a direct interaction between the heavy metals and the enzymes.

Schlüsselwörter: Schwermetallwirkung, Malatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*

Einleitung

Die Umweltbelastung durch Cadmium, Zink, Blei und Quecksilber nahm in den vergangenen Jahrzehnten ständig zu. Deshalb finden sich diese Schwermetalle auch immer häufiger in Substraten, die zur Herstellung mikrobieller Erzeugnisse dienen, vor allem, weil dazu heute fast

*) Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt.

ausschließlich Neben- und Abfallprodukte aus Industrie und Landwirtschaft verwendet werden. Trotzdem ist bisher nur wenig über ihren Einfluß auf die Aktivität wichtiger Stoffwechsellenzyme von Mikroorganismen bekannt.

Die physiologische Wirkung der vier Schwermetalle beruht in erster Linie auf ihrer hohen Affinität zu Sulfhydryl-, Phosphoryl-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Amino- und Imidazolgruppen (8). Die Bindungsstärke zwischen den verschiedenen Metallen und Liganden weist dabei große Unterschiede auf. Bei Sulfhydrylgruppen ist sie z. B. für Quecksilber höher als für Cadmium, Zink und Blei (10), während es sich bei Imidazolgruppen genau umgekehrt verhält (3). Diese Liganden können bei Enzymen oft in unmittelbarer Nachbarschaft angeordnet sein und deshalb ist die Wechselbeziehung zwischen Enzymen und Metallen meistens sehr komplexer Natur.

Von den vier erwähnten Schwermetallen gilt bisher nur Zink mit Sicherheit als essentiell für die Aktivität vieler Enzyme (7, 9). Die toxische Wirkung der drei anderen Metalle ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß sie aufgrund ihrer höheren Affinität zu verschiedenen Bindungsgruppen essentielle Elemente aus den aktiven Zentren der Enzyme verdrängen und damit eine Aktivitätsverminderung oder sogar eine völlige Inaktivierung verursachen oder daß sie diese Effekte durch Interaktionen mit Seitenkettenliganden hervorrufen (8). Vor allem Sulfhydrylgruppen stellen die Hauptangriffspunkte für toxische Schwermetalle, besonders für Quecksilber und Cadmium, dar. Da die meisten Enzyme Sulfhydrylgruppen besitzen, wird bei 70 % von ihnen die Aktivität durch Quecksilber vermindert (11).

Die folgenden Untersuchungen sollen zeigen, inwieweit Cadmium, Zink, Blei und Quecksilber bei *Saccharomyces cerevisiae* die Aktivität der Malatdehydrogenase (MDH), Glutamatdehydrogenase (GIDH) und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) in vitro beeinflussen.

Material und Methoden

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung des Enzymrohextraktes dienten Zellkulturen von *Saccharomyces cerevisiae*, die 48 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 25 °C in einer synthetischen Nährlösung (2) kultiviert und anschließend abzentrifugiert und zweimal mit Phosphatpuffer (pH: 5,5) gewaschen wurden. Die Herstellung des Enzymrohextraktes erfolgte modifiziert nach Jäger und Weigel (5). Dazu wurden die Zellen unter Zugabe eines Tris-HCl-Puffers (0,1 M Tris (hydroxymethyl)-aminomethan + 1 mM Dithioerythrit, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt) bei 4 °C durch Zermörsern mit Quarzsand homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren der festen Zellbestandteile ließ sich die Aktivität der zu untersuchenden Enzyme im Überstand gut nachweisen.

Zur Herstellung der Testansätze dienten folgende Reagenzien: Tris-HCl-Puffer (0,05 M Tris (hydroxymethyl)-aminomethan + 0,1 mM Dithioerythrit, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt); 0,15 mM Oxalessigsäure; 10 mM NADH; 3 M NH_4Cl ; 1 M α -Ketoglutarat; 50 g/l Glycerat-3-phosphat; 20 g/l ATP (Dinatriumsalz); 0,1 M MgSO_4 ; 10 mg/l 3-Phosphoglycerat-Kinase (aus Hefe).

Testansätze:

- MDH (modifiziert nach Weigel (12)): 2550 μl Tris-HCl-Puffer + 200 μl Oxalessigsäure + 50 μl NADH + 200 μl Enzymextrakt

- GIDH (modifiziert nach Weigel (12)): 2150 μ l Tris-HCl-Puffer + 200 μ l NH_4Cl + 100 μ l α -Ketoglutarat + 50 μ l NADH + 500 μ l Enzymextrakt
- GAPDH (modifiziert nach Bergmeyer (1)): 2685 μ l Tris-HCl-Puffer + 60 μ l Glycerat-3-P + 100 μ l MgSO_4 + 50 μ l NADH + 5 μ l 3-Phosphoglycerat-Kinase + 100 μ l ATP + 20 μ l Enzymextrakt

Die Zugabe der Schwermetallchloridlösungen erfolgte 3 min vor dem Beginn der Extinktionsmessung, wobei jeweils 30 μ l (bei der Untersuchung der Schwermetalleinzelwirkung) bzw. 60 μ l (bei der Untersuchung der Schwermetallkombinationswirkung) des Tris-HCl-Puffers durch die Schwermetallchloridlösung ersetzt wurden. Die photometrische Messung der Enzymaktivität erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Reaktionstemperatur von 25 °C. Der Proteingehalt wurde nach der Biuret-Methode bestimmt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach Bergmeyer (1). Bei den graphischen Darstellungen wurde als Bezugsgröße (100 %) für sämtliche Ergebnisse unter Schwermetalleinfluß der Absolutwert der spezifischen Aktivität der Kontrolle gewählt.

Ergebnisse

Malatdehydrogenase (MDH):

Für die spezifische Aktivität der Kontrolle ergibt sich ein Mittelwert von 0,349 U/mg.

Die vier untersuchten Schwermetalle zeigen in ihrer Wirkung auf die MDH-Aktivität kaum Differenzen (Abb. 1). Alle vier verursachen erst in Konzentrationen über 10^{-5} M eine signifikante Hemmung der MDH-Aktivität. Bei 10^{-4} M treten die größten Toxizitätsunterschiede zwischen den Schwermetallen auf, wobei die Hemmwirkung in der Reihenfolge Zn Cd Pb Hg zunimmt.

Bei der Zugabe verschiedener Schwermetallkombinationen zum Testansatz lassen sich zwei unterschiedliche Arten von Wechselwirkungen feststellen. In Abbildung 2 wird jeweils ein charakteristisches Beispiel für jede Schwermetallpaarung dargestellt. Bei der Kombination von Zn mit Cd (Abb. 2A), Zn mit Pb (Abb. 2B) und Pb mit Cd (Abb. 2D) setzt sich

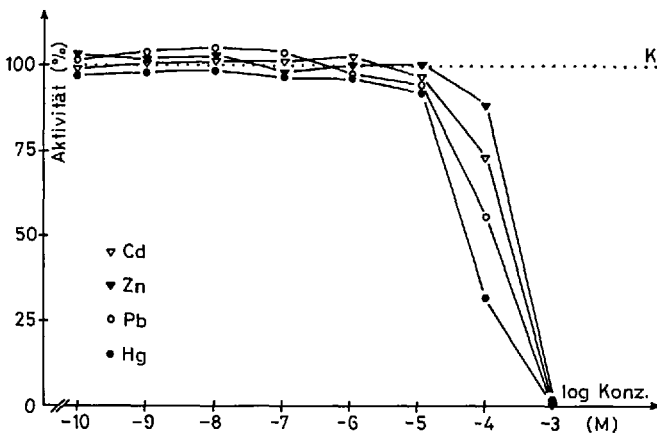


Abb. 1. Schwermetalleinfluß auf die MDH-Aktivität (K = Kontrolle).

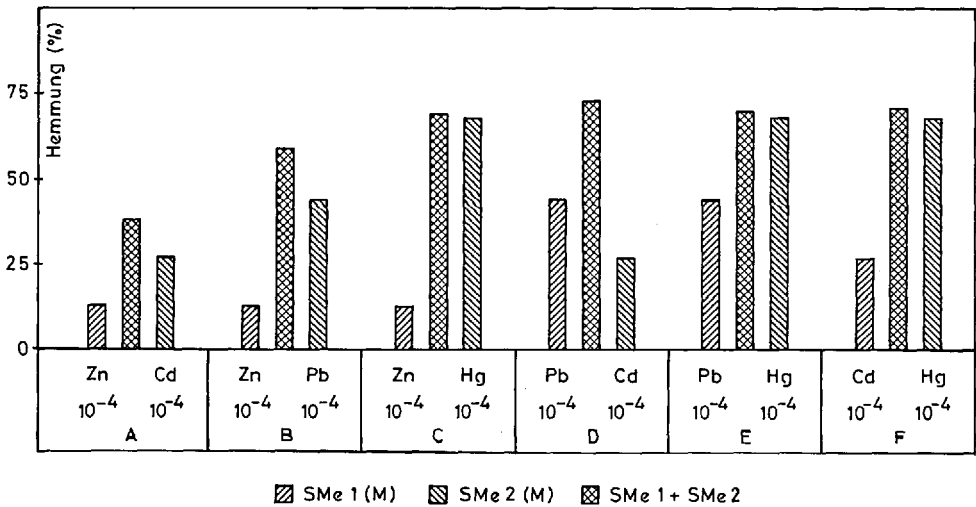


Abb. 2. Einfluß verschiedener Schwermetallkombinationen auf die MDH-Aktivität (K = Kontrolle).

die Gesamtwirkung aus der Summe der entsprechenden Einzelhemmwerte zusammen. Bei allen Paarungen von Cd, Zn und Pb mit Hg dagegen wird die Höhe der Gesamthemmung maßgeblich durch dasjenige der beiden Schwermetalle bestimmt, das die größere Einzelwirkung aufweist (Abb. 2C, 2E u. 2F). Der Effekt des zweiten Schwermetalles kommt nur sehr schwach oder überhaupt nicht zum Tragen.

Glutamatdehydrogenase (GIDH):

Für die spezifische Aktivität der Kontrolle ergibt sich ein Mittelwert von 0,816 U/mg.

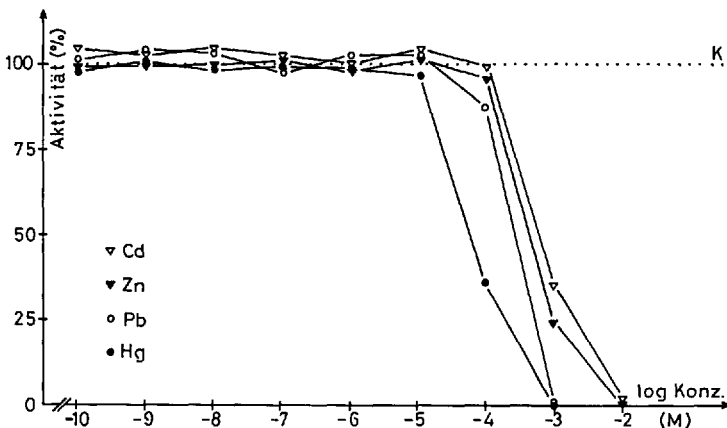


Abb. 3. Schwermetalleinfluß auf die GIDH-Aktivität (K = Kontrolle).

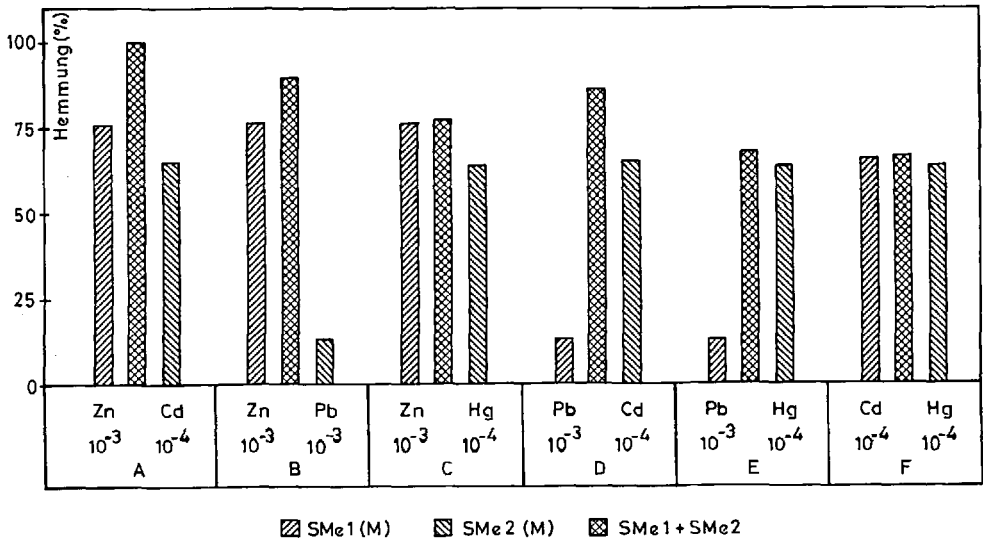


Abb. 4. Einfluß verschiedener Schwermetallkombinationen auf die GIDH-Aktivität (K = Kontrolle).

Die Aktivität der GIDH wird durch Pb- und Hg-Konzentrationen über 10^{-5} M und durch Cd- und Zn-Konzentrationen über 10^{-4} M signifikant vermindert (Abb. 3). Pb und Hg bewirken bereits bei 10^{-3} M eine vollständige Hemmung der Enzymaktivität, während Zn und Cd diese erst bei 10^{-2} M völlig blockieren. Somit gilt für die Stärke der Toxizität gegenüber der GIDH: Cd Zn Pb Hg.

Nach der Zugabe von Schwermetallkombinationen treten bei der GIDH die gleichen Effekte auf wie bei der MDH. Bei den Paarungen Zn-Cd (Abb. 4A), Zn-Pb (Abb. 4B) und Pb-Cd (Abb. 4D) addieren sich die toxischen Effekte. Für die Gesamtwirkung aller Hg-Kombinationen mit den anderen

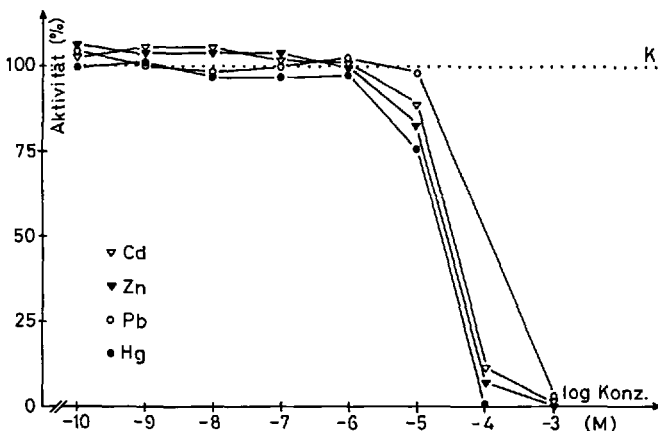


Abb. 5. Schwermetalleinfluß auf die GADPH-Aktivität (K = Kontrolle).

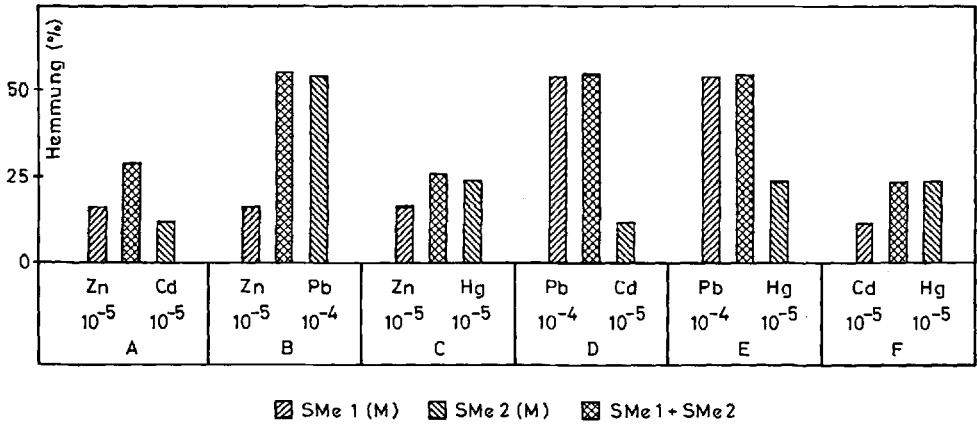


Abb. 6. Einfluß verschiedener Schwermetallkombinationen auf die GAPDH-Aktivität (K = Kontrolle).

drei Schwermetallen ist auch hier nur die Verminderung der G1DH-Aktivität durch das stärker hemmende Schwermetall jeder Paarung ausschlaggebend, während sich der Einfluß des anderen fast überhaupt nicht bemerkbar macht (Abb. 4C, 4E u. 4F).

Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH):

Für die GAPDH-Aktivität errechnet sich bei der Kontrolle ein Mittelwert von 5,35 U/mg.

Die GAPDH reagiert etwas empfindlicher auf die Schwermetallzugabe als die beiden anderen untersuchten Enzyme (Abb. 5). Die Toxizitätsgrenze liegt für Zn, Cd und Hg bei etwa 10^{-6} M und für Pb um eine Zehnerpotenz höher. Hg verursacht bereits in einer Konzentration von 10^{-4} M die Totalhemmung der GAPDH-Aktivität, während die anderen Schwermetalle diesen Effekt erst bei 10^{-3} M hervorrufen. Die Toxizität nimmt in der Reihenfolge Pb Cd Zn Hg zu, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß die Unterschiede zwischen den Ergebnissen für die einzelnen Schwermetalle meistens nicht signifikant sind.

Bei der GADH kommt es, im Gegensatz zur MDH und G1DH, nur bei der Zn-Cd-Kombination zu einer einfachen Summation der Hemmeffekte (Abb. 6A). Bei allen anderen untersuchten Schwermetallpaarungen wird die Höhe der Gesamtoxizität im wesentlichen durch dasjenige der beiden Schwermetalle einer Kombination bestimmt, das die größere Einzelwirkung besitzt, während sich der Einfluß des anderen auch hier kaum feststellen läßt (Abb. 6B–6F).

Diskussion

Die vier Schwermetalle Cadmium, Zink, Blei und Quecksilber weisen in ihrer Wirkung auf die Aktivität der MDH, G1DH und GAPDH nur geringe Unterschiede auf. Etwa bei einer Konzentration von 10^{-5} M wird die

Toxizitätsgrenze überschritten und ungefähr bei 10^{-3} M die Enzymaktivität völlig unterbunden. Ähnliche Grenzwerte finden sich auch bei höheren Pflanzen (13) und bei tierischen Geweben (10).

Die toxische Wirkung des Quecksilbers übertrifft in allen Fällen diejenige der anderen Schwermetalle, während deren Hemmeffekt bei jedem der drei Enzyme unterschiedlich stark ausgeprägt ist:

MDH: Toxizität Hg Pb Cd Zn

GIDH: Toxizität Hg Pb Zn Cd

GAPDH: Toxizität Hg Zn Cd Pb

Die Toxizitätsunterschiede zwischen den Schwermetallen sind nur in wenigen Fällen signifikant. Meistens differieren die ermittelten Ergebnisse nur geringfügig. Die Ursache für die große Ähnlichkeit der Schwermetalleffekte bei den In-vitro-Untersuchungen dürfte in der gleichen Ladung der vier Schwermetalle zu suchen sein. Dieses allen gemeinsame Merkmal kommt unter den gewählten Versuchsbedingungen mehr zum Tragen als die anderen unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß es in vitro offensichtlich zu einer direkten Interaktion zwischen den Enzymen und den Schwermetallen kommt.

Die drei untersuchten Enzyme unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Schwermetallen nur unwesentlich voneinander. Unter dem Vorbehalt, daß es sich hierbei meist nicht um signifikante Differenzen handelt, läßt sich die Sensibilität in der Reihenfolge GAPDH GIDH MDH abstufen. Diese Anordnung findet sich auch bei Jodacetat (4), das wie Quecksilber und Cadmium ein starkes SH-Reagenz darstellt (11). Weder Cadmium noch Zink, Blei und Quecksilber besitzen unter In-vitro-Bedingungen einen stimulierenden Einfluß auf die Enzymaktivität, worauf auch Joho et al. (6) bereits hinweisen.

Bei der Zugabe von Schwermetallkombinationen zum Testansatz treten zwei unterschiedliche Phänomene auf. Während sich die Hemmeffekte von Cadmium, Zink und Blei im allgemeinen addieren, wird bei Kombinationen mit Quecksilber die Höhe der Gesamtoxizität fast ausschließlich durch das stärker wirksame Schwermetall einer Paarung bestimmt. Die Wirkung des anderen Schwermetalles ist nur sehr schwach oder überhaupt nicht feststellbar. Möglicherweise verdrängt Quecksilber die anderen Schwermetalle von ihren Bindungsstellen.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigt sich, daß Schwermetalle unter In-vitro-Bedingungen die Enzymaktivität unmittelbar beeinflussen. Diese Ergebnisse lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf In-vivo-Verhältnisse übertragen, weil dort Faktoren wie z. B. die Schwermetallaufnahme oder die Lokalisation der Enzyme in der Zelle eine entscheidende Rolle spielen.

Literatur

1. Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse Verlag Chemie (Weinheim/Bergstraße 1974).
2. Grafl, H. J., H. O. Schwantes: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B **177**, 57 (1982).
3. Gurd, F. R. N.: The specificity of metal-protein interactions. In: Clark, H. T. and D. Nachmansohn: Ion transport across membrans 246. Academic Press (New York, London 1954).

4. Hasilik, A.: *Z. Naturforsch.* **28c**, 21 (1973).
5. Jäger, H.-J., H.-J. Weigel: *Bryologist* **81**, 107 (1978).
6. Joho, M., H. Matsumoto, H. Tohoyama, T. Murayama: *Biochem. Biophys. Acta* **585**, 383 (1979).
7. Neurath, H.: The proteins: composition, structure, and function. Vol. 5: Metalloproteins, Academic Press (New York, London 1970).
8. Passow, H., A. Rothstein, T. W. Clarkson: *Pharmacol. Rev.* **13**, 185 (1961).
9. Seeling, W., F. W. Ahnefeld, W. Dick, L. Fodor: *Anaesthesist* **24**, 329 (1975).
10. Vallee, B. L., D. D. Ulmer: *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91 (1972).
11. Webb, J. L.: *Enzyme and metabolic inhibitors*. Vol. 3 Academic Press (New York, London 1966).
12. Weigel, H.-J.: *Dissertation* (Gießen 1979).
13. Weigel, H.-J., H.-J. Jäger: *Z. Pflanzenphysiol.* **97**, 103 (1980).

Eingegangen 21. Februar 1983

Für die Verfasser:

Dr. H. J. Grafl, Heinrich-Buff-Ring 38, D-6300 Gießen