

**Glutathionreduktase: Reinigung aus Gehirn, Lokalisierung des Enzyms in
neuralen Zellen und Suche nach gewebsspezifischen Isoformen**

Dissertation

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2000

vorgelegt von

JAN MIRKO GUTTERER

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2000

Dekan: Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hamprecht

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Dringen

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Dringen und Herrn Prof. Dr. B. Hamprecht am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen angefertigt. Herr Priv.-Doz. Dr. R. Dringen und Herr Prof. Dr. B. Hamprecht möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen, sowie für ihre uneingeschränkte Unterstützung sehr danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Dringen danke ich besonders für die äußerst kompetente Betreuung in Theorie und Praxis, für die er zwar „keine Zeit“ hatte, diese aber trotzdem immer wieder fand.

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. B. Pfeiffer für die tatkräftige Unterstützung bei den immuncytochemischen Untersuchungen, Herrn Dr. Rau bei der Anleitung zur Immunisierung der Kaninchen und Gewinnung der Antiseren, Herrn Prof. Dr. J.E. Celis vom Department of Medical Biochemistry (Universität Århus, Dänemark) für die Durchführung der Zweidimensionalen Gelelektrophorese und Herrn Dr. F. Reutter aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. G. Jung für die hervorragende langjährige und erfolgreiche Zusammenarbeit bei den massenspektrometrischen Untersuchungen.

Meinen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen Herrn Johannes Hirrlinger, Herrn Lothar Kußmaul, Herrn Oliver Kranich und Herrn Basim Rahman danke ich für die hervorragende Teamarbeit und die damit höchst erfolgreiche Zusammenarbeit, die auch über das Berufliche hinausging und noch –geht.

Ferner danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Dringen und Herrn Johannes Hirrlinger für die Bereitstellung der Zellkulturen.

Der Frau Kollegin Carola Stegen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die interessanten Diskussionsrunden, auch wenn sie eigentlich immer beschäftigt war.

Frau K. Rehn, Frau R. Schmid und Herrn D. Vogel danke ich für die vielen schnell bearbeiteten Fotoaufträge.

Frau M. Gölz danke ich für die „Beseitigung“ einiger bürokratischer Probleme.

Allen nicht namentlich aufgeführten Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. B. Hamprecht danke ich für das äußerst angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Ich danke sehr meinen Eltern, die mich bedingungslos während meines Studiums unterstützt haben und stets für mich da sind, ebenso meinen Geschwistern, die mir jederzeit zur Seite stehen.

1. Inhaltsangabe

1.	Inhaltsangabe	
2.	Abkürzungsverzeichnis.....	5
3.	Einleitung.....	8
3.1.	Vorkommen, Synthese und Funktionen von Glutathion.....	8
3.2.	Glutathionreduktase.....	10
3.2.1	Vorkommen.....	10
3.2.2.	Proteinstruktur.....	11
3.2.3.	Die katalysierte Reaktion.....	13
3.2.4.	Glutathionreduktase im Gehirn.....	18
3.3	Neurale Zellen und ihre Fähigkeit zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies.....	19
3.3.1.	Astroglia.....	19
3.3.2.	Oligodendroglia.....	20
3.3.3.	Microglia.....	20
3.3.4.	Neuronen.....	22
4.	Aufgabenstellung.....	23
5.	Ergebnisse.....	24
5.1.	Reinigung von Enzymen aus Rinderhirn.....	24
5.1.1.	Reinigung der Glutathionreduktase.....	24
5.1.2.	Reinigung des Malatenzyms aus Rinderhirn.....	30
5.1.3.	Molekülmassenbestimmung der Glutathionreduktase und des Malatenzyms.....	34
5.1.4.	Identifizierung des cytosolischen Malatenzyms mittels analytischer Ionenaustauschchromatographie.....	39
5.2.	Gewinnung von Antiseren gegen die gereinigte Glutathionreduktase aus Rinderhirn.....	40
5.2.1.	Immunisierung der Kaninchen.....	40

INHALTSANGABE

5.2.2.	Charakterisierung der Antiseren.....	40
5.2.2.1.	Titerbestimmung.....	40
5.2.2.2.	Immunpräzipitation.....	42
5.2.2.3.	„Native Western Blot“-Analysen.....	44
5.3.	Nachweis der Glutathionreduktase in neuronalen Zellen.....	47
5.3.1.	Glutathionreduktase-Aktivität in neuronalen Primärkulturen.....	47
5.3.2.	Nachweis der Glutathionreduktase mittels „nativem Western-Blot“.....	48
5.3.3.	Immuncytochemische Lokalisation der Glutathionreduktase.....	49
5.4.	Suche nach Isoformen der Glutathionreduktase.....	55
5.4.1.	Reinigung von Glutathionreduktase aus Leber und Erythrocyten des Rindes.....	55
5.4.1.1.	Reinigung der Glutathionreduktase aus Leber.....	55
5.4.1.2.	Reinigung der Glutathionreduktase aus Erythrocyten.....	57
5.4.2.	Vergleich der gereinigten Glutathionreduktasen aus Gehirn, Leber und Erythrocyten.....	61
5.4.2.1.	K_M -Werte für die Substrate.....	61
5.4.2.2.	Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese.....	63
5.4.2.3.	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	64
5.4.2.4.	„Nativer Western Blot“.....	67
5.4.2.5.	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“.....	68
5.4.2.6.	Tryptischer Verdau der Glutathionreduktasen aus Hirn und Leber und Analyse tryptischer Peptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie.....	69
6.	Diskussion.....	75
6.1.	Reinigung von Enzymen.....	75
6.1.1.	Glutathionreduktase und Malatenzym.....	75
6.1.2.	Glutathionreduktasen aus Leber und Erythrocyten.....	78
6.2.	Gewinnung von Antiseren gegen die Glutathionreduktase aus Rinderhirn.....	80
6.2.1.	Herstellung der Antiseren.....	80
6.2.2.	Untersuchung der Spezifität eines der Antiseren.....	81

6.3.	Glutathionreduktase in neuronalen Zellkulturen.....	83
6.4.	Versuch des Nachweises von Isoformen der Glutathionreduktase.....	86
6.4.1.	Kinetische Parameter der gereinigten Glutathionreduktasen.....	86
6.4.2.	Elektrophoretische und immunologische Methoden.....	88
6.4.3.	Massenspektrometrie.....	89
6.5.	Ausblick.....	90
7.	Experimenteller Teil.....	92
7.1.	Geräte, Materialien, Reagenzien.....	92
7.1.1.	Geräte.....	92
7.1.2.	Materialien.....	93
7.1.3.	Reagenzien.....	94
7.2.	Zellkulturen.....	96
7.2.1.	Neurale Zellkulturen.....	96
7.2.2.	Herstellung von Zellkulturhomogenaten.....	97
7.3.	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	97
7.4.	Proteinbestimmungen.....	99
7.5.	Reinigung von Glutathionreduktasen und Malatenzym.....	99
7.5.1.	Aufschluß der Erythrocyten und Entfernung des Hämoglobins.....	99
7.5.2.	Gewebeaufschluß von Gehirn und Leber.....	100
7.5.3.	Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung und Dialyse.....	100
7.5.4.	Anionenaustausch -“Batch“-Verfahren.....	101
7.5.5.	Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose 4B.....	101
7.5.6.	Ammoniumsulfat-Fällung und Molekularsiebchromatographie an Superdex 200.....	101
7.5.7.	Konzentrierung der gereinigten Enzyme.....	102
7.5.8.	Analytische Ionenaustauschchromatographie des Malatenzyms.....	102
7.5.9.	Lagerung der gereinigten Enzyme.....	102
7.6.	Gelelektrophorese.....	103
7.6.1.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	103
7.6.2.	Native Gelelektrophorese.....	104

INHALTSANGABE

7.6.3.	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	104
7.6.4.	Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	105
7.7.	Gewinnung von Antiseren gegen die Glutathionreduktase aus Rinderhirn.....	106
7.7.1.	Immunisierungen.....	106
7.7.2.	Serumgewinnung und Titerbestimmung.....	106
7.8.	Immunologische Methoden.....	107
7.8.1.	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	107
7.8.2.	Immunpräzipitation.....	108
7.8.3.	„Nativer Western Blot“.....	108
7.8.4.	Indirekte Immuncytochemie mit Doppelmarkierung.....	108
7.8.4.1.	Vorbereitung der Zellen.....	108
7.8.4.2.	Immuncytochemische Doppelmarkierung.....	109
7.9.	Massenspektrometrie.....	110
7.9.1.	Massenbestimmung von Proteinen mittels Matrix-unterstützter Laserdesorption-Ionisationsmassenspektrometrie.....	110
7.9.2.	Analyse von Spaltpeptiden.....	110
7.9.2.1.	Probenvorbereitung.....	110
7.9.2.2.	Tryptischer Verdau.....	111
7.9.2.3.	Auftrennung der Spaltpeptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	111
7.9.2.4.	Peptidanalyse mittels Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie.....	111
8.	Literaturverzeichnis.....	113
9.	Zusammenfassung.....	131

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
al.	andere (lateinisch: <i>alii</i>)
AP	Alkalische Phosphatase
BP	Borat-Puffer
bzw.	beziehungsweise
C	Grad Celsius
ca.	circa
cME	cytosolisches Malatenzym
Cys	Cystein
d	Tag(e) (lateinisch: <i>dies</i>)
2D	zweidimensional
Da	Dalton
DMEM	englisch: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (englisch: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	englisch: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	fötale Kälberserum (englisch: <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (englisch: <i>fast protein liquid chromatography</i>)
g	Erdbeschleunigung,
GalC	Galactocerebrosid
GAP 43	Wachstumsassoziiertes Protein 43 (englisch: <i>growth-associated protein 43</i>)
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein (englisch: <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
G6PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase(n)
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form (Glutathiondisulfid)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

h	Stunde(n) (lateinisch: <i>hora</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hrsg.	Herausgeber
H ₂ O _{dd}	mittels Wasserreinigungsanlage SeralpurUP50 hergestelltes doppelt deionisiertes Wasser
ICDH	Isocitratdehydrogenase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
k	kilo
K _M	Michalis-Menten-Konstante
l	Liter
μ	micro
m	Masse
M	molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisation
ME	Malatenzym
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	millimolar
mME	mitochondriales Malatenzym
MS	Massenspektrometrie
NADP ⁺	Oxidiertes Nicotinsäureamid-Adenindinucleotidphosphat
NADPH	Reduziertes Nicotinsäureamid-Adenindinucleotidphosphat
n.n.	nicht nachgewiesen
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (englisch: <i>phosphate-buffered saline</i>)
6PGDH	6-Phosphogluconatdehydrogenase
pI	Isoelektrischer Punkt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

red	reduziert
R-OH	Alkohol
R-OOH	organisches Hydroperoxid
Rt	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
S.D.	Standardabweichung (englisch: <i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch: <i>sodium dodecylsulfate</i>)
s.o.	siehe oben
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (englisch: <i>trifluoroacetic acid</i>)
TH	Transhydrogenase
TIC	Totalionenstrom (englisch: <i>total ion current</i>)
TOF	englisch: <i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	unit
v	Geschwindigkeit (lateinisch: <i>velocitas</i>)
V _e	Elutionsvolumen
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
V _o	Ausschlußvolumen
V _t	Säulengesamtvolumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (englisch <i>weight/volume</i>)
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel

3. Einleitung

3.1. Vorkommen, Synthese und Funktionen von Glutathion

Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH, Abb. 1A) wurde 1888 von J. de Rey-Pailhade entdeckt und seine Struktur in den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts aufgeklärt. Die Struktur wurde durch chemische Synthesen in den Jahren 1935 und 1936 bestätigt (Meister, 1988). Das Tripeptid wird bei einer Vielzahl von Organismen (Bakterien, Pflanzen und Tieren) gefunden und kommt in zellulären Konzentrationen bis 12 mM vor (Cooper, 1997). GSH ist somit die am häufigsten vorkommende Thiol- und γ -Glutamyl-Verbindung. Weniger als 0.5 % des zellulären Glutathions liegen in der oxidierten Form als Glutathiondisulfid (GSSG, Abb. 1B) vor. Innerhalb der Zelle kommt GSH im Cytosol und in Mitochondrien vor (Cooper, 1997). Da Mitochondrien nicht über die Enzyme zur Synthese von Glutathion verfügen, muß es vom Cytosol ins Mitochondrion transportiert werden (Martensson et al., 1990).

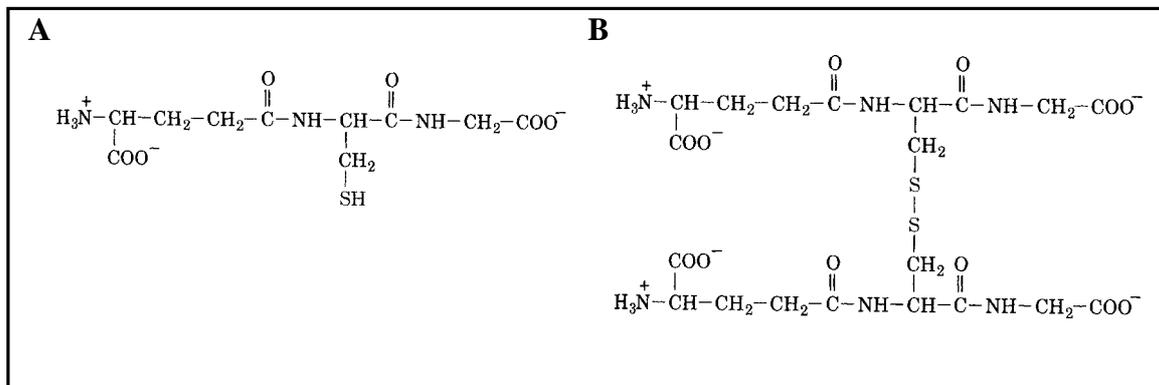


Abb. 1. Strukturformeln von Glutathion (A) und Glutathiondisulfid (B)

Im Säugetiergehirn werden GSH-Konzentrationen zwischen 1 mM und 3 mM gefunden (Cooper, 1997). In Gehirnschnitten konnte Glutathion mit Hilfe histochemischer und immunhistochemischer Methoden in Gliazellen und Neuronen nachgewiesen werden (Slivka et al., 1987; Philbert et al., 1991; Amara et al., 1994; Hjelle et al., 1994; Maybodi et al., 1999). Die GSH-Konzentration scheint in Gliazellen höher als in Neuronen zu sein (Rice und Russo-Menna, 1998). Auch im Gehirn wird Glutathion in Cytosol und in Mitochondrien (Panfili et al.,

1991) gefunden. In Gehirnen neugeborener und junger Ratten befinden sich bis zu 20 % der zellulären Glutathionmenge in Mitochondrien (Jain et al., 1991).

Für die de novo Synthese von Glutathion in Zellen werden die drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin sowie zwei Enzyme benötigt (Meister, 1974). In der ersten enzymkatalysierten Reaktion bildet die γ -Glutamylcysteinsynthetase aus Glutamat und Cystein das Dipeptid γ -Glutamylcystein, welches in der zweiten nachfolgenden Reaktion mit Glycin durch die Glutathionsynthetase zu Glutathion verbunden wird. Beide Enzyme benötigen pro Reaktion jeweils ein Molekül Adenosintriphosphat. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GSH-Synthese ist die durch die γ -Glutamylcysteinsynthetase katalysierte Reaktion, da dieses Enzym durch das Endprodukt GSH gehemmt wird (Richman und Meister, 1975; Misra und Griffith, 1998). Die GSH-Synthese im Gehirn erfolgt nach dem selben Muster wie in anderen Geweben. Die Aktivitäten beider an der Synthese beteiligten Enzyme wurden im Gehirn nachgewiesen (Tate et al., 1973; Okonkwo et al., 1974, Makar et al., 1994). Die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme im Gesamtgehirn sind jedoch wesentlich geringer als in Niere oder Leber (Sekura und Meister, 1977; Oppenheimer et al., 1979).

Glutathion wird für eine Vielzahl verschiedener Stoffwechselprozesse benötigt: es dient als Antioxidans, ist an der Entgiftung von Fremdstoffen beteiligt, ist Cofaktor für Isomerisierungsreaktionen und dient als Speicher- und Transportform von Cystein (Meister und Anderson, 1983; Cooper, 1997). Außerdem ist Glutathion essentiell für den Eintritt von Zellen in den Zellzyklus und dessen Ablauf (Poot et al., 1995), für den Erhalt von Sulfhydrylgruppen in Proteinen und zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxpotentials (Cotgreave und Gerdes, 1998). Ferner scheint Glutathion an der Regulation der Apoptose beteiligt zu sein (Hall, 1999). Als essentieller Cofaktor der Glutathionperoxidase (GPx; Flohé, 1989; Ursini et al., 1995) spielt GSH eine äußerst wichtige Rolle bei der Entgiftung von Peroxiden. Außerdem kann GSH aufgrund seiner freien Thiolgruppe direkt mit Radikalen reagieren (Cooper, 1997). Diese antioxidativen Funktionen von GSH sind besonders für das Gehirn wichtig, da es gegenüber anderen Organen und Geweben bezüglich oxidativen Stress benachteiligt zu sein scheint. So verbrauchen die Zellen des Gehirns 20 % des vom Körper aufgenommenen Sauerstoffs (Clarke und Sokoloff, 1999), was von einer intensiven

Superoxidproduktion im Gehirn begleitet sein müßte. In einigen Bereichen des Gehirns ist ein erhöhter Eisengehalt bestimmt worden (Gerlach et al., 1994), ein Risikofaktor für die metallionenkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen (Fenton-Reaktion). Das Gehirn ist reich an Lipiden mit mehrfach ungesättigten Fettsäureketten, die leicht zu Lipidperoxiden oxidiert werden können (Porter, 1984; Halliwell, 1992). Der erhöhten Bildungsrate reaktiver Sauerstoffspezies im Gehirn scheinen - im Vergleich zu anderen Geweben - nur geringe bis moderate Aktivitäten von Superoxiddismutase, Catalase und GPx gegenüber zu stehen (Cooper, 1997; Ho et al., 1997).

3.2. Glutathionreduktase

Bei der Reduktion von Radikalen und Peroxiden wird reduziertes Glutathion zu GSSG oxidiert. GSSG kann aber die oben aufgeführten GSH-Funktionen nicht erfüllen. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, daß GSSG wieder zu GSH reduziert wird. Der Anteil von GSSG am Gesamtglutathion von Zellen beträgt unter normalen Bedingungen weniger als 1 %. Verantwortlich für die schnelle Reduktion von GSSG zu GSH ist das Enzym Glutathionreduktase (GR).

3.2.1. Vorkommen

Im Jahre 1932 wurde beschrieben, daß die Reduktion von GSSG in der Leber an die Oxidation von Glucose gekoppelt ist (Mann, 1932). Das für die Reduktion von GSSG verantwortliche Enzym, GR (EC 1.6.4.2.) wurde aber erst 20 Jahre später von Rall und Lehninger (1952) identifiziert. Nach weiteren 20 Jahren wurde erstmals die Reinigung der GR zur Homogenität beschrieben (Carlberg und Mannervik, 1975). GR-Aktivität wurde bei einer Vielzahl von Organismen gefunden, unter anderem in Bakterien (*Escherichia coli*: Greer und Perham, 1986), Pilzen (*Penicillium chrysogenum*: Woodin und Segel, 1968; *Saccharomyces cerevisiae*: Carlberg und Mannervik, 1985), Pflanzen (*Zea mays*: Hull et al., 1997), Protozoen (*Euglena gracilis*: Shigeoka et al., 1987) und Tieren (*Kaninchen*: Zanetti, 1979; *Kalb*: Carlberg und Mannervik, 1981). Auch menschliche Zellen enthalten GR. Das Enzym wurde sogar aus menschlichen Blutplättchen (Moroff und Kosow, 1978), Leukocyten (Ögüs und Tezcan,

1981), Linsenfaser (Latta und Augusteyn, 1984) und Erythrocyten (Worthington und Rosemeyer, 1974; Krohne-Ehrich et al., 1977; Nakashima et al., 1976) gereinigt.

Intrazellulär befindet sich die GR im Cytosol (Williams, 1976), in den verschiedenen Kompartimenten der Mitochondrien (Panfili et al., 1991) und bei Pflanzen auch in Chloroplasten (Foyer und Halliwell, 1976; Schaedle und Bassham, 1977). Isoformen der GR innerhalb einer Spezies wurden bisher bei *Pisum sativum* (Mullineaux et al., 1996) und *Zea mays* (Hull et al., 1997) identifiziert. Im Gegensatz dazu sind für Säugetiere bisher noch keine Isoenzyme der GR beschrieben worden.

GR kommt aber nicht ubiquitär in allen Organismen vor. So konnte sie nicht bei einigen anaerob lebenden Eubakterien und in zwei Spezies von Archaeobakterien gefunden werden (Ondarza et al., 1983). In Trypanosomen ist GR ebenfalls nicht vorhanden. Bei dieser Spezies ist die GR funktionell durch das Enzym Trypanothionreduktase ersetzt, welches die Disulfidbrücke der oxidierten Bis-glutathionylspermidine (Trypanothionine) spaltet (Krauth-Siegel et al., 1987; Shames et al., 1986). In dem Protozoon *Euglena gracilis* kommen GR und Trypanothionreduktase nebeneinander vor (Montrichard et al., 1999). Eine große Anzahl von Bakterien besitzen Reduktasen von niedriger Molekülmasse, die GSSG reduzieren können, aber in ihrer Aminosäuresequenz nicht mit der GR verwandt sind (Maresca et al., 1978; Fahey et al., 1978, 1987).

3.2.2. Proteinstruktur

Die Struktur der GR menschlicher Erythrocyten wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Zappe et al., 1977; Schulz et al., 1978; Karplus und Schulz, 1987; Schirmer et al., 1989; Abb. 2). GR ist ein Dimer. Die Bindungsstellen für NADPH und GSSG liegen an gegenüberliegenden Seiten der Monomere (Abb. 2). Auf diese Weise erfolgt der Transfer von Reduktionsäquivalenten direkt durch die Mitte des Enzymmoleküls. Die GR-Monomere enthalten vier Domänen, die verschiedene Funktionen haben. Eine Domäne bindet FAD, eine NADPH, die dritte stellt die zentrale Domäne dar. Die vierte Domäne bildet einen Teil der Bindungsstelle für GSSG. Außerdem enthält die vierte Domäne das Cystein 90, welches mit dem der anderen Untereinheit eine Disulfidbrücke bildet und dadurch die dimere Struktur der

GR kovalent fixiert (Schulz et al., 1978). Erstaunlich ist die Tatsache, daß alle vier Domänen der GR-Monomere am Aufbau des aktiven Zentrums Anteil haben und deshalb essentiell für die Katalyse sind. Die GR ist daher ein gutes Beispiel für eine modulare Bauweise, um komplizierte katalytische Zentren zu bilden. Es gibt ferner einen 18 Aminoacylreste langen N-terminalen flexiblen Arm, dessen Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist. Die GSSG-Bindungsstelle wird von Aminosäurenresten beider Monomere gebildet (Abb. 2). Somit kann ein Monomer keine GSSG-Reduktion durchführen und ist katalytisch inaktiv. Durch die Dimerisierung der Monomere wird eine Bindungstasche gebildet, die das Cystein 58 trägt, dessen Schwefelatom eine wichtige Rolle bei der Katalyse spielt (3.2.3.). Vier positiv geladene Gruppen dieser Tasche binden die vier Carboxylgruppen des GSSG. Nur eine negativ geladene Seitenkette kommt in der Tasche vor, die eine der beiden Ammoniumgruppen des GSSG bindet (Karplus und Schulz, 1987). Einzige Ausnahme der dimeren Bauweise der GR ist vermutlich das tetramere Enzym aus dem Cyanobacterium *Spirulina maxima* (Rendón et al., 1995).

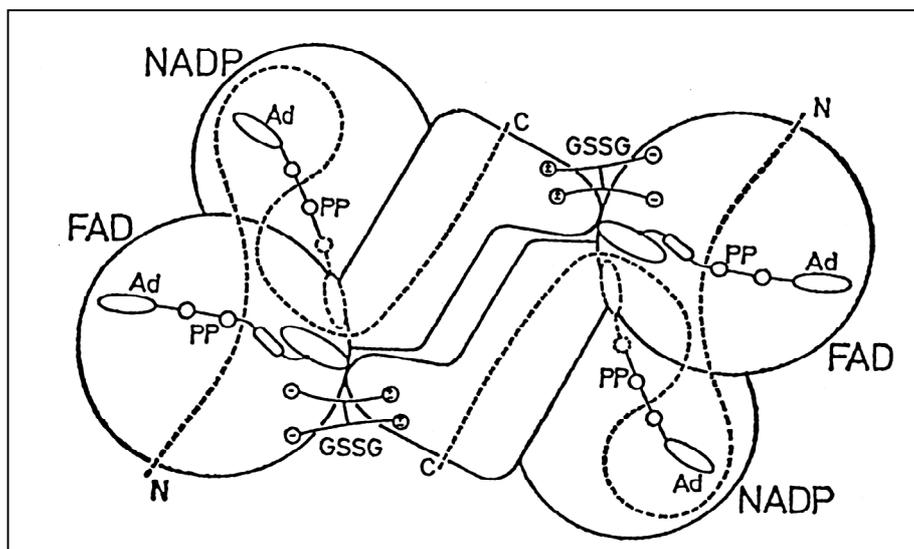


Abb. 2. Struktur der GR [modifiziert nach Schulz et al. (1978)]

Die GR gehört einer Familie von Enzymen an, die als Pyridinnucleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen bezeichnet werden (Williams, 1976) und phylogenetisch und mechanistisch miteinander verwandt sind. Mitglieder dieser Familie sind die Liponamiddehydrogenase-

Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (Rice et al., 1984), die Quecksilberionenreduktase (Fox und Walsh, 1982; Brown et al., 1983), welche ein bakterielles Enzym zur Entgiftung des schädlichen Quecksilberions in die weniger toxische elementare Form ist, sowie die Trypanothionreduktase (Krauth-Siegel et al., 1987). Ein weiteres Mitglied dieser Familie ist die Thiothionreduktase, die das redoxaktive Protein Thiothion in seiner reduzierten Form hält (Orr und Vitols, 1966; Zanetti und Williams, 1967; Williams et al., 1967).

3.2.3. Die katalysierte Reaktion

Die GR katalysiert die Reaktion



Bereitstellung der Cosubstrate

Die GR benötigt für die Reduktion von GSSG das Cosubstrat NADPH. Für die Bereitstellung von Reaktionsäquivalenten in Form von NADPH sind bislang folgende Enzyme identifiziert worden (Abb. 3): die beiden Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatweges (Baquer et al., 1988), Glucose-6-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.49.) und 6-Phosphogluconatdehydrogenase (EC 1.1.1.44.), die Isocitratdehydrogenase (EC 1.1.1.42; Vogel, 1991; Juurlink, 1993) und die Transhydrogenase (EC 1.6.1.1., Hoek und Rydström, 1988; Lee und Ernster, 1989).

Ein weiteres Enzym, das NADPH regenerieren kann, ist das Malatenzym (ME; EC 1.1.1.40). Es katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat. Dieses Enzym wurde erstmals für Taubenleber beschrieben und aus dieser partiell gereinigt (Ochoa et al., 1947, 1948). Die vollständige Reinigung der cytosolischen Isoform des ME (cME) wurde 1958 durch Rutter und Lardy beschrieben. Eine mitochondriale Isoform (mME) wurde für die Nebennierenrinde des Rindes gefunden (Simpson und Estrabrook, 1968, 1969). Beide Isoformen wurden im Gehirn des Rindes (Frenkel, 1972) und des Menschen (Bukato et al., 1995a,b) nachgewiesen. Mit immunocytochemischen Methoden wurde das cME in Astroglia- und Oligodendrogliazellen lokalisiert, nicht aber in Neuronen (Kurz et al., 1993), wohingegen das mME vor allem in Neuronen vorkommt (Vogel et al., 1998).

Die Funktionen des ME sind noch nicht eindeutig geklärt. Obwohl die bevorzugte Reaktion die oxidative Decarboxylierung ist (Bukato et al., 1995b), kann die Reaktion auch in die andere Richtung ablaufen. Diese anaplerotische Reaktion könnte besonders für Neuronen von Bedeutung sein, da dieser Zelltyp keine Pyruvatcarboxylase besitzt (Shank et al., 1985) und somit durch reduktive Carboxylierung von Pyruvat den C4-Körpern Malat synthetisieren

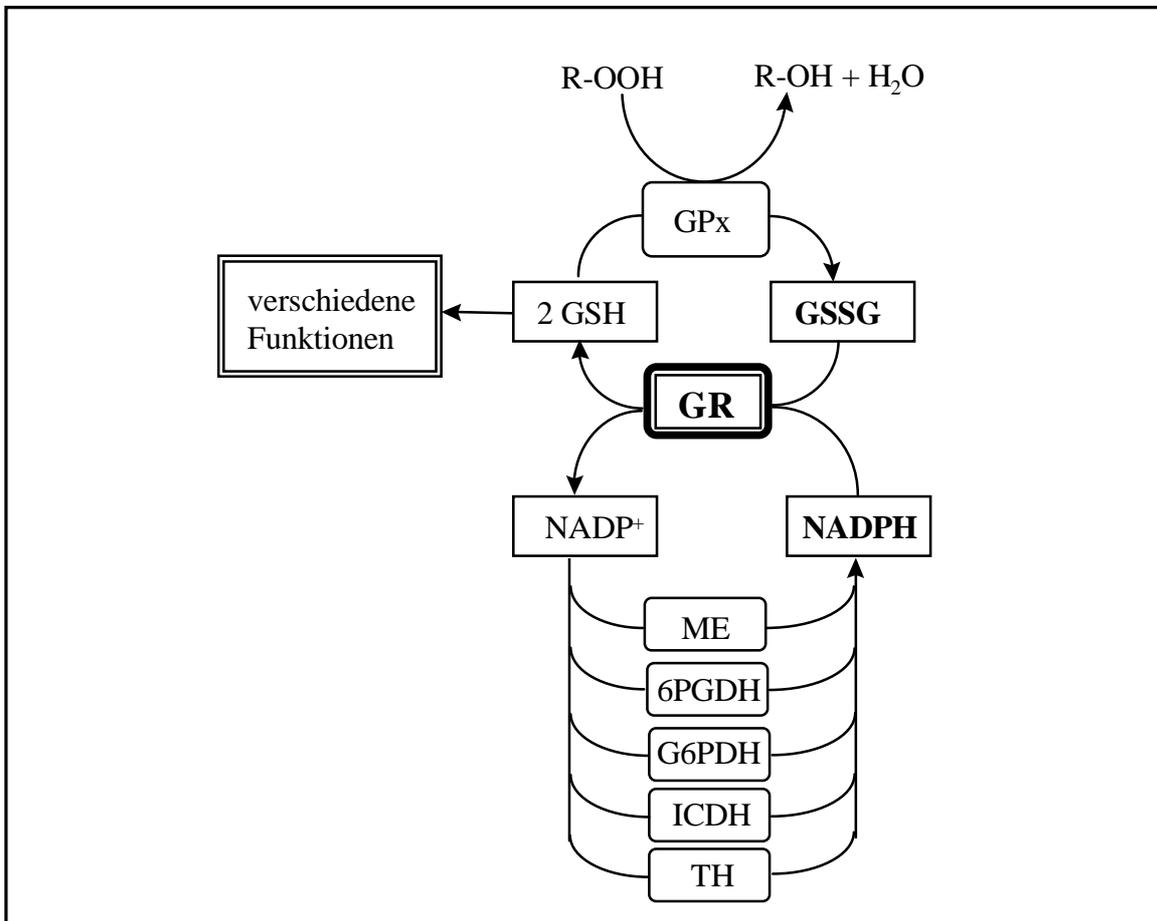


Abb. 3. Rolle der GR im Glutathionredoxzyklus und Bereitstellung des Cosubstrates NADPH. G6PDH: Glucose-6-phosphatdehydrogenase 6PGDH: 6-Phosphogluconatdehydrogenase; ICDH: Isocitratdehydrogenase; ME: Malatenzym; ROOH: Peroxid; R-OH: Alkohol bzw. Wasser; TH: Transhydrogenase.

könnte (Frenkel, 1972; Bukato et al., 1995a). Außerdem kann das mME für die Entgiftung von Wasserstoffperoxid durch das mitochondriale Glutathionsystem Reduktionsäquivalente bereitstellen (Vogel et al., 1999). Da in Gliazellen das anaplerotische Enzym Pyruvatcarboxylase (Shank et al., 1985; Cesar und Hamprecht, 1995) enthalten ist, ist das

cME zur Gewinnung von C4-Körpern nicht notwendig. Die Funktion des cME in Gliazellen könnte die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH für die Fettsäuresynthese (Kurz et al., 1993; Hamprecht und Dringen, 1995) und für die Reduktion von cytosolischem GSSG sein.

Mechanismus der Katalyse

Der Mechanismus der Katalyse der GR aus Hefe wurde von Williams (1976) und seinen Mitarbeitern (Arscott et al., 1981) aus chemischen und spektroskopischen Experimenten abgeleitet und durch Röntgenstrukturanalyse der menschlichen Erythrocyten-GR (Pai und Schulz, 1983; Karplus und Schulz, 1987), sowie durch Arbeiten von Douglas (1987) bestätigt und verfeinert (Abb. 4). Die GR katalysiert den Fluß von Reduktionsäquivalenten aus dem Pyridinnukleotid-Redoxsystem in das Thioldisulfid-System des Glutathions in einer zweistufigen katalytischen Reaktion, die NADPH-Oxidation (Abb. 4A-B) und GSSG-Reduktion (Abb. 4C-F) einschließt.

In der ersten Hälfte des Katalysezyklus bindet NADPH an das oxidierte Enzym. Voraussetzung für diese Bindung ist die Mobilität des Phenolrests des Tyrosin 197 (Huber und Brandt, 1980). Durch dessen Wegklappen wird Platz für die Bindung des C4' des Nicotinamids des NADPH an den N5 des Isoalloxazinringes des FAD der GR geschaffen. Das FAD wird umgehend reduziert. Die Cysteinreste 58 und 63 bilden ein redoxaktives Disulfid, das zwischen der GSSG-Bindungstasche und dem Flavinring liegt. Durch eine transiente sigma-Bindung zwischen C4a des Isoalloxazinringes und dem Schwefelatom des Cystein 63 wird das redoxaktive Disulfid reduziert. Diese Reduktion wird erleichtert durch Histidin 467, das ein Proton, welches möglicherweise aus einem Wassermolekül stammt, an das Schwefelatom des Cysteins 58 übergibt (Abb. 4B). Auf diese Weise wird ein Ladungs-Transfer-Komplex (gepunktete Linie, Abb. 4B) zwischen dem oxidierten FAD (Elektronen-Donor) und dem Cystein 63 Thiolat (Elektronen-Akzeptor) gebildet, welcher für das charakteristische Spektrum (roter Bereich) der reduzierten GR verantwortlich ist (Arscott et al., 1981). Im Gegensatz dazu sind Kristalle der oxidierten GR gelb (Keese et al., 1999). Nach der Reduktion der GR wird das NADP^+ durch die positive Ladung des Lysins 66 abgestoßen

EINLEITUNG

und aus dem Komplex entlassen (Abb. 4, 2). Der Phenolring des Tyrosin 197 klappt in seine Ausgangsstellung zurück (Abb. 4C).

Die zweite Hälfte der Katalyse beginnt mit der Bindung von GSSG an das reduzierte Enzym (Abb. 4, 3). Die Sulphydrylgruppe des Cystein 58 greift nukleophil ein Schwefelatom des GSSG (mit GS_I bezeichnet) an. Es bildet sich ein gemischtes Disulfid (Abb. 4D). Ein Proton von Histidin 467 wird auf die zweite Hälfte des GSSG (mit GS_{II} bezeichnet) übertragen (Abb.

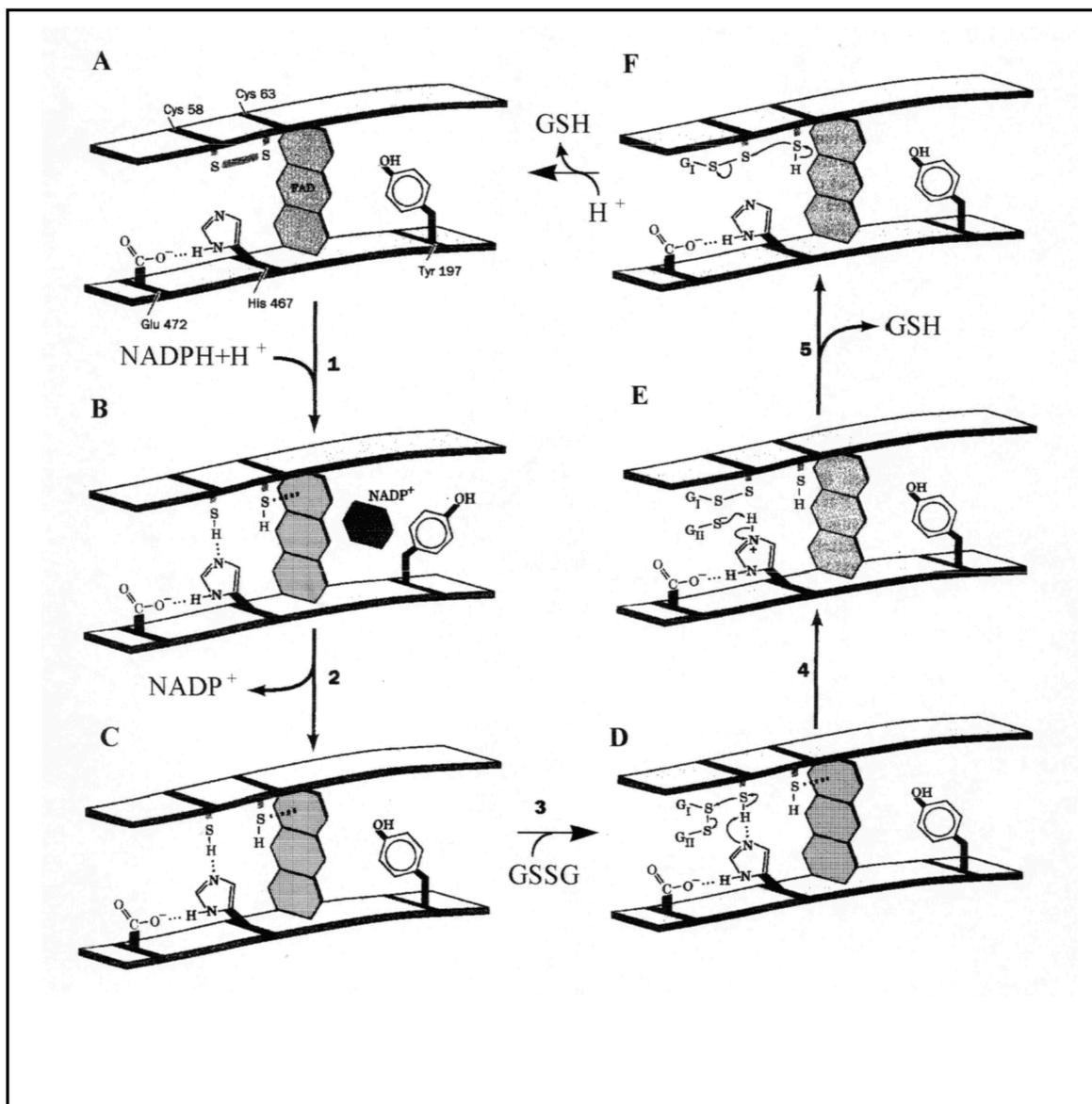


Abb. 4. Schematische Darstellung der katalytischen Reaktion der GR. Cys: Cysteinrest; Glu: Glutamatrest; His: Histidinrest; Tyr: Tyrosinrest. [verändert nach Douglas (1987)]

4E), wobei reduziertes Glutathion ($\text{GS}_{\text{II}}\text{H}$) entlassen wird (Abb. 3, 5). FAD liegt ab diesem Moment der Katalyse wieder in seinem oxidierten Zustand vor. Im letzten Teilschritt der Katalyse greift das Schwefelatom des Cystein 63 nukleophil das gemischte Disulfid an (Abb. 4F), wobei das zweite reduzierte Glutathion ($\text{GS}_{\text{I}}\text{H}$) entlassen wird (Abb. 4, 6). Das benötigte Proton stammt wahrscheinlich auch hier aus einem Wassermolekül. Die GR liegt nun wieder in ihrem oxidierten Zustand vor und ist für einen neuen Katalysezyklus bereit (Abb. 4A).

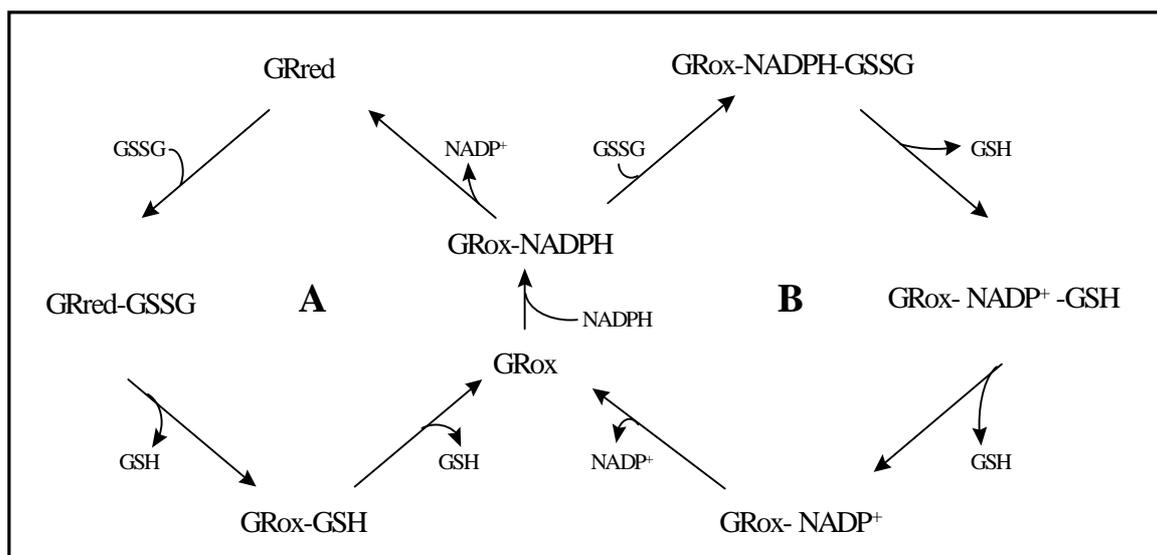


Abb. 5. Vorgeschlagenes Reaktionsschema für den verketteten Mechanismus der GR. Zwecks Übersichtlichkeit sind jeweils nur die Hinreaktionen dargestellt. A: „Ping-Pong“-Mechanismus, B: sequentieller Mechanismus; red: reduziert, ox: oxidiert. [modifiziert nach Mannervik (1973)].

Der in Abb. 4 dargestellte „Ping-Pong“-Mechanismus wurde bereits von Massey und Williams (1965) und Icen (1967) postuliert. Die GR folgt diesem Mechanismus jedoch nur bei niedriger GSSG-Konzentration ($\leq 179\mu\text{M}$ für das Enzym aus Rattenleber: Carlberg und Mannervik, 1975; $\leq 450\mu\text{M}$ für die GR aus Hefe: Serafini und Romeu, 1989) in der Hinreaktion und bei niedriger NADP^+ -Konzentration in der Rückreaktion (Rakauskiene et al., 1989). Bei hohen Konzentrationen an GSSG scheint ein sequentieller Mechanismus vorzuliegen. Daher wurde für die GR ein sogenannter verketteter Mechanismus vorgeschlagen, der beide Reaktionskinetiken einschließt (Abb. 5, Mannervik, 1973). Beiden Mechanismen gemeinsam ist die Bindung von NADPH an das freie Enzym. Dieser verkettete Mechanismus wurde

mittlerweile für GR aus verschiedenen Organen und Spezies beschrieben (Hefe: Carlberg und Mannervik, 1975; Rakauskiene et al., 1989; menschliche Erythrocyten: Worthington und Rosemeyer, 1976; Schafhirn: Acan und Tezcan, 1991).

3.2.4. Glutathionreduktase im Gehirn

Über Funktionen und zelluläre Lokalisation der GR im Gehirn ist bisher nur wenig bekannt. Aktivitäten der GR in Gehirnhomogenaten wurden mehrfach beschrieben (zur Übersicht: Cooper, 1997). Die spezifische Aktivität der GR im Gehirn ist geringer als in anderen Geweben. So beträgt die spezifischen Aktivitäten der GR in Maushirn nur 32 bzw. 65 % der spezifischen Aktivitäten der Mausniere und Mausleber (Ho et al., 1997). GR wurde aus Schafshirn gereinigt und als Dimer aus zwei identischen Untereinheiten mit einer Molekülmasse von ca. 50 kDa beschrieben (Acan und Tezcan, 1989). Die ermittelten K_M -Werte der gereinigten GR für die Cosubstrate liegen im micromolaren Bereich (Acan und Tezcan, 1991), ihre Aktivität wird durch Cd^{2+} inhibiert (Acan und Tezcan, 1995). Mit Hilfe eines gegen die menschliche Erythrocyten-GR hergestellten Antiserums wurde GR in Gehirnschnitten lokalisiert. Im Rattengehirn wurde GR-Immunoreaktivität vor allem in Neuronen, aber nicht in Astrocyten festgestellt (Knollema et al., 1996). Dieses Ergebnis überrascht, da astrogliale Kulturen GR-Aktivität enthalten (Copin et al., 1992; Makar et al., 1994; Huang und Philbert, 1995) und die Beteiligung der GR an der Entgiftung von Peroxiden in astroglia-reichen Primärkulturen nachgewiesen wurde (Dringen und Hamprecht, 1997; Dringen et al., 1998a).

3.3. Neurale Zellen und ihre Fähigkeit zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies

3.3.1. Astroglia

Astrogliazellen sind der im Gehirn am häufigsten vorkommende Zelltyp. Sie bilden etwa ein Drittel des Hirnvolumens und 50 % der Zellmembranen, die den Extrazellulärraum begrenzen (Leonhardt, 1985). Astrocyten formen im Gehirn ein dichtes dreidimensionales Netzwerk von Zellfortsätzen, mit denen sie einerseits in Kontakt zueinander stehen, andererseits mit anderen Gehirnzelltypen kommunizieren (Medana et al., 1996). Es lassen sich fibröse Astrocyten, die in der weißen Substanz vorkommen und von vorwiegend sternförmiger Gestalt sind, von protoplasmatischen Astrocyten unterscheiden. Letztere sind in der grauen Substanz zu finden und sind stark verzweigt (Privat et al., 1995).

Astrogliazellen in Kultur entgiften exogenes Wasserstoffperoxid (Desagher et al., 1996; Dringen und Hamprecht, 1997) und organische Hydroperoxide (Dringen et al., 1998a,b; Kussmaul et al., 1999) sehr effektiv. Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide wie tertiäres Butylhydroperoxid oder Cumolhydroperoxid sind Substrate der GPx. Nach Inkubation kultivierter Astrogliazellen mit Peroxiden wurde eine schnelle Oxidation von Glutathion gefunden (Dringen und Hamprecht, 1997; Dringen et al., 1998a; Kussmaul et al., 1999). An der Entgiftung von Wasserstoffperoxid ist auch die Catalase beteiligt (Desagher et al., 1996; Dringen und Hamprecht, 1997). Eine Inhibition der Catalase hat aber nur einen geringen Effekt auf die Entgiftung dieses Peroxides durch Astrogliazellen (Dringen und Hamprecht, 1997). Das Glutathionsystem der kultivierten Astrogliazellen kann somit einen Ausfall der Catalase funktionell kompensieren. Da die organischen Hydroperoxide keine Substrate für die Catalase darstellen, ist allein das Glutathionsystem für deren schnelle Beseitigung durch Astrogliazellen verantwortlich (Dringen et al., 1998a; Kussmaul et al., 1999).

3.3.2. Oligodendroglia

In der weißen Substanz bilden Oligodendrocyten die Myelinscheiden, indem sie mit ihren zungenförmigen Cytoplasmalamellen die Axone von Neuronen umwickeln. Diese Plasmamembranstapel wirken wie Isolatoren, da sie sehr reich an Lipiden sind. Dadurch werden die hohen Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Aktionspotentiale erreicht, obwohl die Axone einen geringen Durchmesser haben (Ritchie, 1984). Oligodendrocyten umwickeln die Axone nicht vollständig, sondern lassen Segmente (die sogenannten Ranvierschen Schnürringe) frei. Nervenfasern, die solche Myelinscheiden besitzen, leiten die Nervenimpulse wesentlich schneller weiter (bis 130 m pro Sekunde) als marklose (0.5 bis 2 m pro Sekunde), da sich das Aktionspotential von einem zum anderen Nodium sprunghaft weiterbewegen kann. (Weinberg und Spencer, 1979; Morell und Norton, 1980; Bunge, 1981).

Oligodendrogliazellen - und ihre Vorläufer scheinen sehr empfindlich gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies zu sein (Kim und Kim, 1991; Husain und Juurlink, 1995; Back et al., 1998), wahrscheinlich weil sie nur geringe Mengen an Glutathion und hohe Konzentrationen an Eisen besitzen (Thornburn und Juurlink, 1996; Juurlink, 1997; Juurlink et al., 1998). Oligodendrogliazellen überleben in Kultur nur dann, wenn Cystein oder Cystin vorhanden ist. Fehlt eine dieser Aminosäuren, sinkt der Glutathiongehalt und die Zellen sterben ab. Der Zelltod kann verhindert werden, wenn Substanzen anwesend sind, die Radikale abfangen können (Yonezawa et al., 1996; Back et al., 1998). Wasserstoffperoxid ist für Oligodendrogliazellen in Kultur toxisch. Dieser Effekt verschwindet teilweise in Gegenwart von N-Acetylcystein (Richter-Landsberg und Vollgraf, 1998). Ein funktionierendes Glutathionsystem zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. 3) scheint somit essentiell für das Überleben von Oligodendrogliazellen und ihrer Vorläufer in Kultur zu sein.

3.3.3. Microglia

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Zelltypen, die ektodermalen Ursprungs sind, also während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste und dem Neuralrohr hervorgehen, ist der Ursprung der Microgliazellen, den Macrophagen des Gehirns, bis heute nicht vollständig geklärt. Microgliazellen differenzieren sich aus Blutmonocyten und sind somit mesodermaler

EINLEITUNG

Abstammung (Ling, 1981). Blutmonocyten scheinen jedoch nur während des Embryonalstadiums ins Gehirn einzuwandern (Streit et al., 1988; Sievers et al., 1994). Microgliazellen kommen im Parenchym vor, also außerhalb der Basalmembran der Blutkapillaren. Auffallend ist ihr Territorialverhalten. Zwischen zwei Zellen ist immer ein gewisser Abstand vorhanden (Lassmann et al., 1991). Microgliazellen können anhand ihres Funktionszustandes und der daraus resultierenden Morphologie in ruhende, aktivierte und phagocytierende Formen unterschieden werden. Im adulten, gesunden Gehirn kommen fast ausschließlich ruhende Microgliazellen vor (Streit, 1995). Die Fortsätze der Microgliazellen finden sich zwischen denen der Astrocyten (Lassmann et al., 1991). Die Anordnung der Microgliazellen hängt vom Gehirnbereich ab: in der weißen Substanz sind ihre Fortsätze hauptsächlich parallel zu den dort verlaufenden Axonen gerichtet, während sie in der grauen Substanz ihre Fortsätze sternförmig in alle Richtungen verteilen.

Über den Glutathionstoffwechsel von Microgliazellen in Kultur ist wenig bekannt. Microgliazellen, die in astroglia-reichen Kulturen in geringer Anzahl vorkommen, besitzen die Enzyme GPx und Catalase (Noack et al., 1999) und haben den höchsten Glutathiongehalt aller in diesen Kulturen vorkommenden Gliazelltypen (Chatterjee et al., 1999). Im Vergleich zu Astroglia- und Neuronenkulturen wurden in microglia-reichen Sekundärkulturen, die aus astroglia-reichen Primärkulturen gewonnen wurden, ein höherer spezifischer Glutathiongehalt, höhere spezifische Aktivitäten von GPx und GR und eine niedrigere spezifische Aktivität der Catalase gemessen (Hirrlinger et al., 1999). Microgliazellen können Superoxid durch das Enzym NADPH-Oxidase (Sonderer et al., 1987; Colton und Gilbert, 1987; Sankarapandi et al., 1998) sowie Stickstoffmonoxid (Minghetti und Levi, 1998) bilden. Das Glutathion-System der Microgliazellen könnte ein wichtiger Selbstschutzmechanismus gegen diese reaktiven Substanzen sein, da GSH direkt mit Stickstoffmonoxid und Superoxid nicht-enzymatisch reagieren kann (Saez et al., 1990; Clancy et al., 1994; Winterbourn und Metodiewa, 1994; Singh et al., 1996). Außerdem ist GSH der Elektronendonator in der GPx-katalysierten Reduktion von Wasserstoffperoxid (Chance et al., 1979) und Peroxynitrit (Arteel et al., 1999), dem Produkt der Reaktion von NO mit Superoxid.

3.3.4. Neuronen

Neuronen (Nervenzellen) unterscheiden sich von den übrigen Zellen eines höheren tierischen Organismus. Sie bestehen meist aus dem eigentlichen Zellkörper (Soma, Perikaryon) mit einem auffallend großen Zellkern, und einer Vielzahl von Fortsätzen. Neuronen sind polar aufgebaut. Sie haben einen Zellpol, an dem die Eingänge von Erregungen aufgenommen werden (Rezeptorpol) und einen Zellpol, an dem die Erregungen abgegeben werden (Effektorpol). Die Rezeptorfortsätze werden als Dendriten bezeichnet, die Effektorfortsätze als Neurite (Axone). Die Anzahl und die Länge dieser Fortsätze kann je nach Zelltyp variieren und führt zu der großen anatomischen Vielfalt der Neuronen (Forssmann und Heym, 1974). Die Übertragung von Nervensignalen geschieht über besondere Zell-Zellkontakte (Kleinig und Sitte, 1984). Meistens handelt es sich um chemische Synapsen, die im Zentralnervensystem je nach Transmitter in cholinerge, adrenerge, dopaminerge, serotonerge, glycinerge, GABA (γ -Aminobuttersäure)-erge und peptiderge Synapsen unterteilt werden und excitatorischer oder inhibitorischer Natur sind. In seltenen Fällen können erregbare Zellen direkt elektrisch miteinander gekoppelt sein. Dies geschieht über *gap junctions*, die in dieser Funktion als elektrische Synapsen bezeichnet werden (Kleinig und Sitte, 1984).

Für Neuronen ist Wasserstoffperoxid besonders toxisch (Mischel et al., 1997; Abe und Saito, 1998). Dieses Peroxid führt zu apoptotischem Zelltod von Neuronen in Kultur (Whittemore et al., 1995; Hoyt et al., 1997). Dennoch sind Neuronen in der Lage Wasserstoffperoxid zu beseitigen (Desagher et al., 1996; Dringen et al., 1999). An der Entgiftung dieses Peroxides scheint das Glutathionsystem maßgeblich beteiligt zu sein (Desagher et al., 1996). Die schnelle Oxidation von GSH nach Zugabe von Wasserstoffperoxid zu Zellen neuronenen-reicher Primärkulturen und die beinahe vollständige Wiederherstellung des hohen GSH zu GSSG-Verhältnisses nach Wegwaschen des Peroxides innerhalb von Minuten bestätigte diese Annahme (Dringen et al., 1999). Im Gegensatz zur Situation in astrogliareichen Primärkulturen (Dringen und Hamprecht, 1997) kann das Glutathionsystem die Funktion der Catalase nach deren Hemmung jedoch nicht vollständig ersetzen (Dringen et al., 1999). Somit scheint das neuronale Glutathionsystem eine geringere Effizienz zur Peroxidentgiftung zu haben als das der Astrogliazellen. Diese Vermutung wird gestützt durch die geringe Kapazität von Neuronen zur Entgiftung von Cumolhydroperoxid (Dringen et al., 1999).

4. Aufgabenstellung

Über die GR des Gehirns ist nur wenig bekannt, ihre Funktion ist aber essentiell zur Erhaltung des hohen Verhältnisses von GSH zu GSSG in Gehirnzellen. Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit GR aus Gehirn zur Homogenität gereinigt und enzymatisch charakterisiert werden. Außerdem sollte gegen das gereinigte Enzym ein Antiserum gewonnen werden, um damit das Vorkommen der GR in verschiedenen Hirnzelltypen zu untersuchen. Schließlich sollte geprüft werden, ob sich die GR des Gehirns von der aus anderen Organen unterscheidet, um die Frage nach der Existenz gewebsspezifischer Isoformen der GR zu beantworten.

5. Ergebnisse

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle gezeigten Experimente wenigstens zweimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Die gezeigten Daten stellen die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments dar.

5.1. Reinigung von Enzymen aus Rinderhirn

5.1.1. Reinigung der Glutathionreduktase

Für die Reinigung der GR aus Rinderhirn wurde das Protokoll für die Reinigung des Enzyms aus Schafshirn (Acan und Tezcan, 1989) modifiziert. Rinderhirn wurde als Quelle genommen,

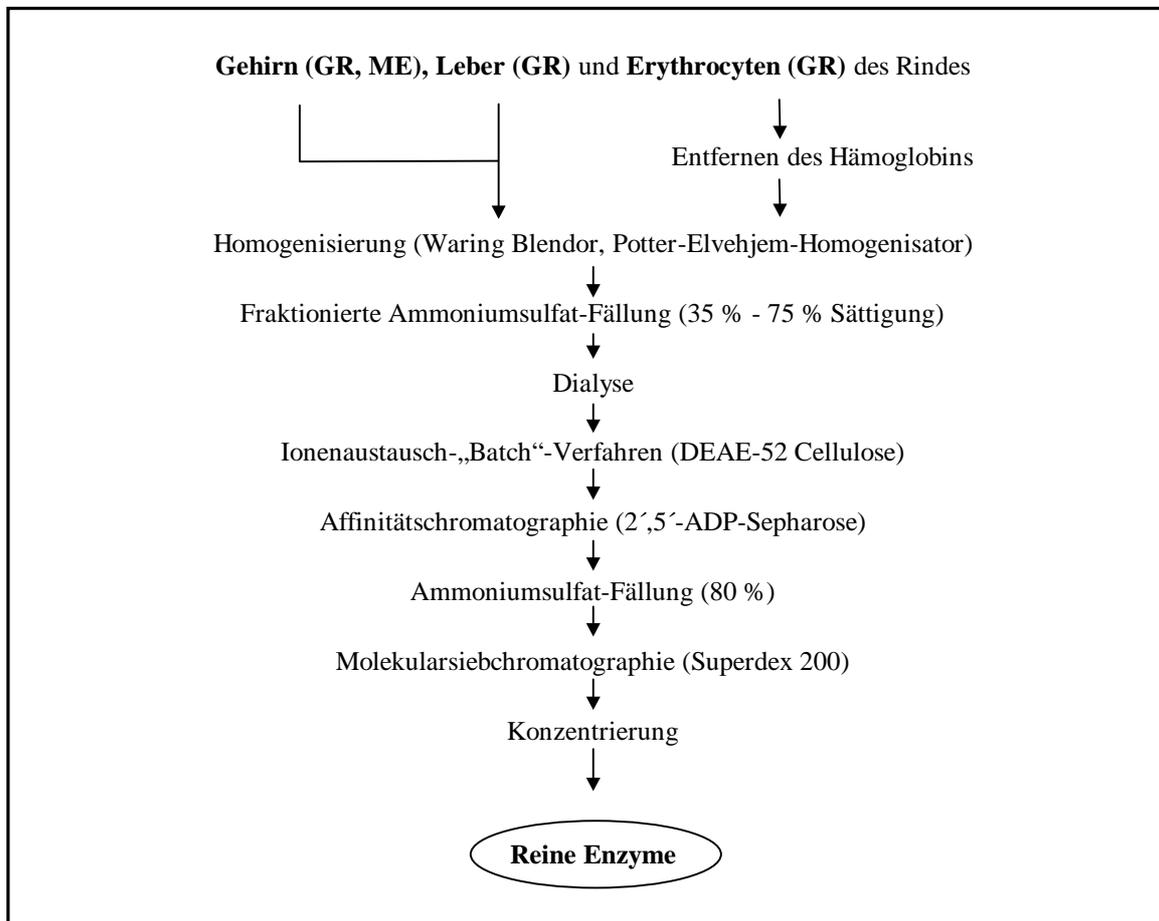


Abb. 6. Flußdiagramm für die Reinigung von GR und ME.

ERGEBNISSE

weil es im Schlachthof leicht und in großen Mengen erhältlich war. Das optimierte Verfahren der Reinigung (Abb. 6) beinhaltet als Arbeitsschritte fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung, Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose, Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose und Molekularsiebchromatographie an Superdex 200. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über eine typische Reinigung der GR aus Rinderhirn.

Tabelle 1 Beispiel einer typischen Reinigung der GR aus Rinderhirn

Reinigungsschritt	Protein- gehalt (mg)	Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U x mg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Anreicher- ungsfaktor
<i>Homogenatsüberstand</i>	10370	303	0.029	100	1
<i>Ammoniumsulfat- präzipitation (35-75 % Sättigung)</i>	4750	212	0.045	70	1.6
<i>Dialysat</i>	4970	212	0.043	70	1.5
<i>DEAE-Cellulose</i>	2680	208	0.078	69	2.7
<i>2',5'-ADP-Sepharose</i>	12.3	92	7.5	30	258
<i>Ammoniumsulfat- präzipitat (80 % Sättigung)</i>	7.6	77	10.1	25	348
<i>Superdex 200</i>	0.37	44	117	14	4040
<i>Konzentrierung</i>	0.30	36	145	12	5000

Es wurden 600 g Rinderhirn als Ausgangsmaterial eingesetzt.

Homogenisierung

Bei der Reinigung der GR wurde von 600 g Rinderhirn (Naßgewicht) ausgegangen. Das aufgetaute Gehirn wurde mit 1800 ml Homogenisierungspuffer versetzt, damit die Zellen des Gewebes wie unter 7.5.2. beschrieben aufgeschlossen werden konnten. Der bei der Zentrifugation erhaltene Niederschlag wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und das Material ein zweites Mal mittels Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Dadurch konnte die Aktivitätsausbeute um ca. 38 % gesteigert werden.

Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Durch die langsame Zugabe von gepulvertem Ammoniumsulfat zum Homogenatsüberstand bis zu einer Konzentration von 35 % Ammoniumsulfat konnten ausgehend von 10.4 g Protein im ersten Schritt 4 g Protein gefällt werden. Im Überstand der 75 %-igen Ammoniumsulfat-Fällung wurden weitere 1.6 g Protein abgetrennt. Im Vergleich zum Homogenatsüberstand gingen durch die fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung zwar 30 % der Ausgangsaktivität verloren, gleichzeitig konnte aber 54 % des kontaminierenden Proteins abgetrennt werden. Die nachfolgende Dialyse des resuspendierten Niederschlages verringerte die Aktivität der GR nicht.

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Das Dialysat (460 ml) wurde mit 50 g DEAE-Cellulose inkubiert. Unter den gewählten Bedingungen (50 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM EDTA, pH 7.4) wurden nur ca. 15 % der aufgetragenen GR-Aktivität gebunden. Deshalb wurde dieser Schritt zur Beschleunigung der Reinigung als negative Chromatographie im „batch“-Verfahren benutzt und der Überstand weiterverwendet. Bei diesem Schritt blieb 46 % des aufgetragenen Proteins an dem Anionenaustauschermaterial gebunden. Nach fraktionierter Ammoniumsulfatpräzipitation, Dialyse und Anionenaustauschchromatographie waren 75 % des Proteins entfernt worden bei 31 %-igem Verlust an GR-Aktivität.

Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose

Der Überstand des Ionenaustauschers wurde mit GSH und NaCl (Endkonzentrationen: 2 mM bzw. 0.15 M) versetzt und auf die 2',5'-ADP-Sepharose-Säule aufgepumpt. Die Affinitätschromatographie führte zu einer weiteren 100-fachen Anreicherung der GR (Tabelle 1). Dabei war das Waschen der Säule mit 1 M NaCl (Abb. 7) essentiell zur Abtrennung zweier Proteine (Abb. 8, Bahn 4), welche in den Fraktionen 17 bis 20 eluiert wurden. Diese Proteine konnten im weiteren Verlauf der Reinigung nicht von der GR getrennt werden (Daten nicht gezeigt). Siebzig Prozent der auf die Affinitätssäule aufgetragenen Aktivität an GR wurde durch einen linearen NADPH-Gradienten eluiert. Das Maximum der GR-Aktivität erschien bei 0.12 mM NADPH (Abb. 7). Da die Extinktion von NADPH (Absorptionsmaximum: 260 nm)

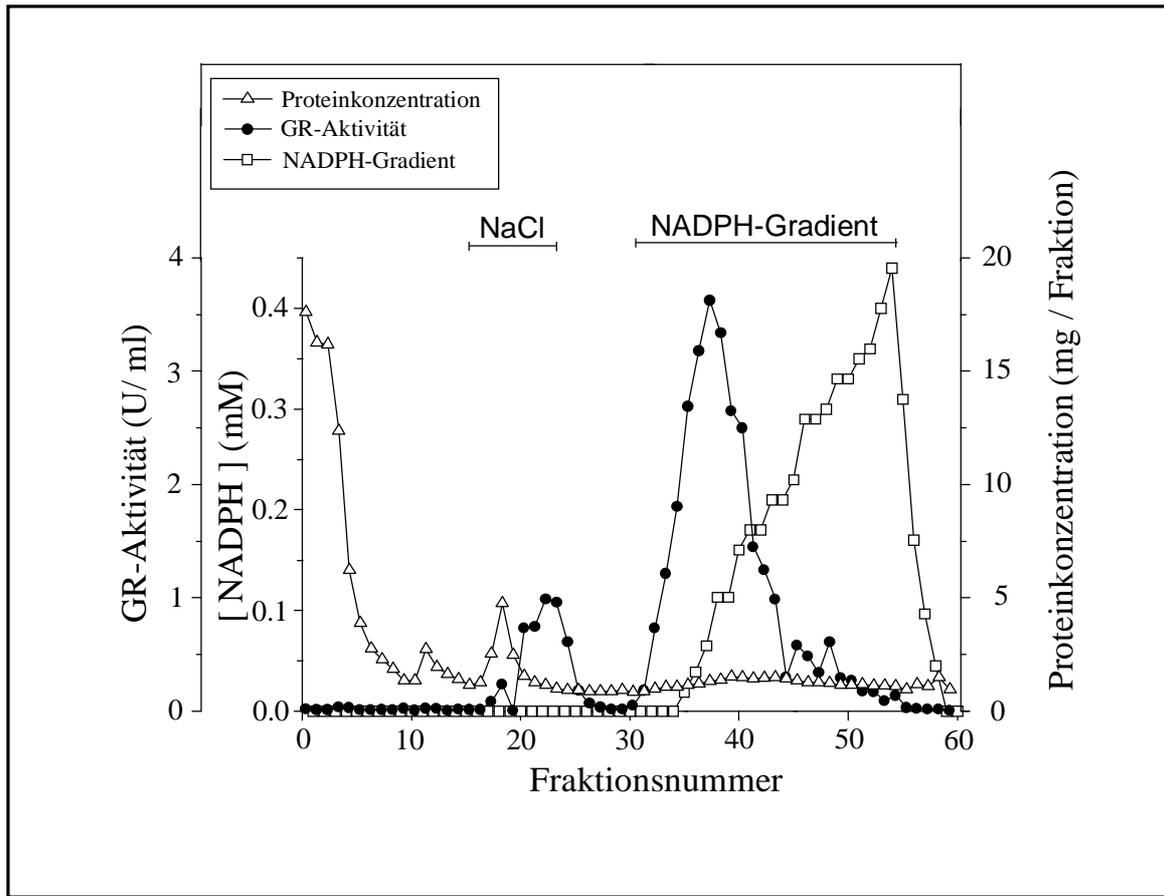


Abb. 7. Elution von GR aus Rinderhirn von einer 2',5'-ADP-Sepharose 4B-Säule. Nach dem Waschen der Säule (7.5 cm x 1 cm) mit einem 1 M NaCl-Puls wurde GR mit einem linearen NADPH-Gradienten (0 - 0.5 mM) von der Säule eluiert. Fraktionsvolumen: 2.8 ml. Fließgeschwindigkeit: 0.7 ml/min. Aufgetragen wurden 2.7 g Protein in 830 ml DEAE-Cellulose-Überstand.

in den Fraktionen die Proteindetektion bei 280 nm störte, wurde der Proteingehalt aller Fraktionen bestimmt. Dabei zeigte sich, daß mit dem Gradienten nur eine sehr geringe Menge an Protein eluiert wurde. Von dem aufgetragenen Protein wurde unter den gewählten Bedingungen 80 % nicht an die Säule gebunden. Von dem gebundenen Protein wurde 38 % bereits mit dem 1 M NaCl-Puls eluiert (Abb. 8).

Polyacrylamidgelelektrophorese von Teilschritten der Reinigung

Der Verlauf der Reinigung bis zur Affinitätschromatographie wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Im Gegensatz zu dem DEAE-Cellulose-Überstand und dem Durchlauf der Affinitätschromatographie-Säule wurde im Eluat des NADPH-Gradienten der 2',5'-ADP-Sepharose-Säule nur eine einzige Proteinbande im Gel angefärbt (Abb. 8). Die geringe spezifische Aktivität der GR und die geringe Anreicherung (Tabelle 1) ließen jedoch vermuten, daß - trotz des Auftretens einer Einzelbande nach der Affinitätschromatographie - die GR noch nicht bis zur Homogenität gereinigt war, also sich noch Fremdprotein in der Bande befinden mußte.

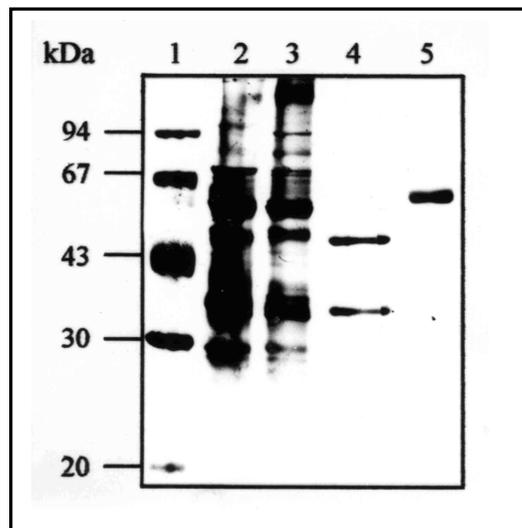


Abb. 8. Überprüfung von Teilschritten der Reinigung der GR aus Rinderhirn durch SDS-PAGE. Nach Auftrennung im 11 %-igen Polyacrylamid-Trenngel wurden Proben durch Silbernitrat angefärbt. 1: Markerproteine; 2: Überstand der DEAE-Cellulosechromatographie (7 µg Protein), 3: Durchlauf der Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose (7 µg Protein), 4: Eluat des 1 M NaCl-Pulses der Affinitätschromatographie (3 µg Protein), 5: Eluat des NADPH-Gradienten der Affinitätschromatographie (3 µg Protein).

80%-ige Ammoniumsulfat-Fällung

Zur weiteren Reinigung wurden die GR-enthaltenden Fraktionen der 2',5'-ADP-Sepharose-Säule vereinigt und mit Ammoniumsulfat (80 % Endkonzentration) versetzt. Dadurch konnte

bei einem geringen Verlust an GR-Aktivität nochmals ca. 40 % an Protein abgetrennt werden (Tabelle 1). Gleichzeitig wurde das Auftragsvolumen für die nachfolgende Molekularsiebchromatographie reduziert.

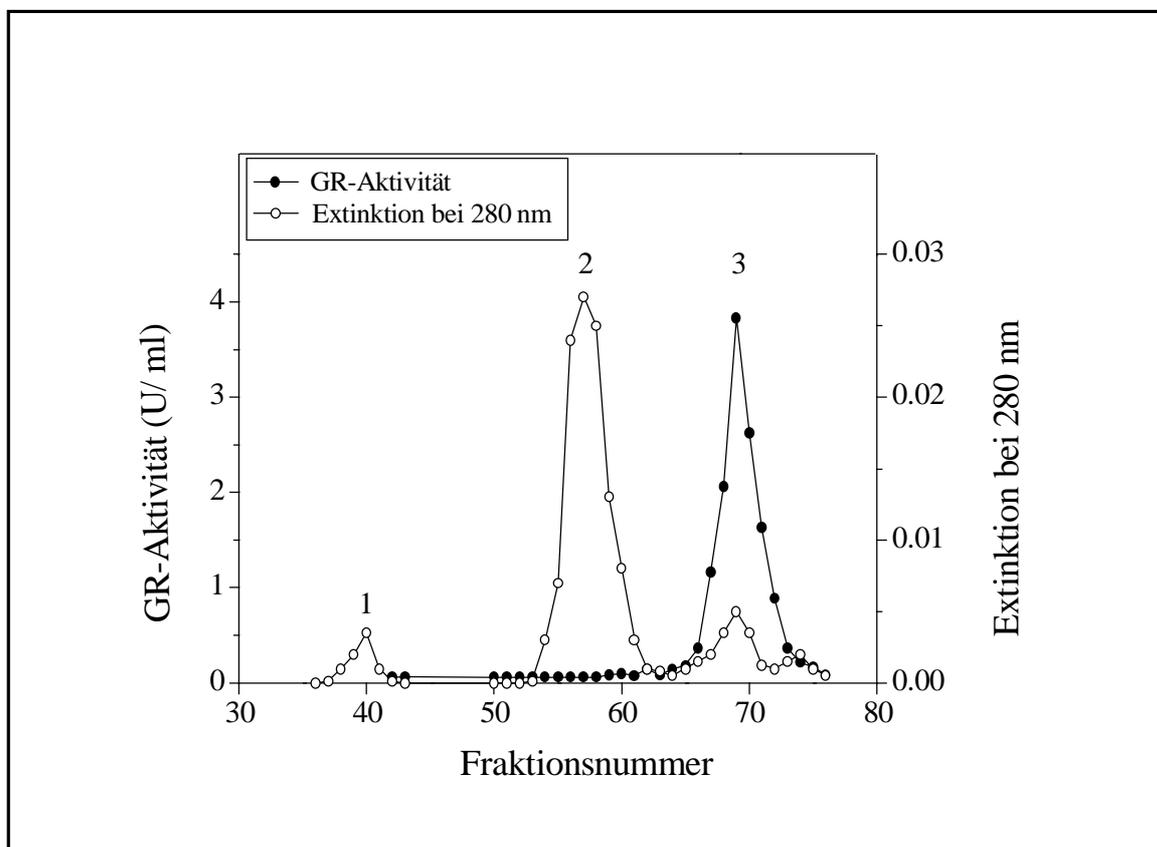


Abb. 9. Molekularsiebchromatographie an einer Superdex 200-FPLC-Säule. ME eluiert bei einem Elutionsvolumen von 57 ml (Gipfel 2), GR bei einem Elutionsvolumen von 69 ml (Gipfel 3). Säulenabmessungen: 60 cm x 1.6 cm; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml. Aufgetragen wurden 2.5 mg Protein in 0.5 ml Puffer C.

Superdex 200-Molekularsiebchromatographie

Das Präzipitat der 80 %-igen Ammoniumsulfat-Fällung wurde in einem geringen Volumen resuspendiert und auf die Superdex 200-Säule aufgetragen. Drei Proteingipfel wurden von dieser Säule eluiert, von denen nur Gipfel 3 GR-Aktivität enthielt (Abb. 9). Bei dem Proteingipfel 2 im Elutionsprofil der Molekularsiebchromatographiesäule handelte es sich um ME, das von der GR vollständig abgetrennt werden konnte (s. 5.1.2.). In Gipfel 1 eluiert ein bisher nicht identifiziertes Protein (Abb. 9).

Konzentrierung

Die Konzentrierung der vereinigten GR-enhaltenden Fraktionen der Molekularsiebchromatographie durch Centricon 30-Filtrationseinheiten führte zu einer weiteren 1.2-fachen Anreicherung der GR im Vergleich zum vorangegangenen Schritt. Das hier beschriebene Reinigungsprotokoll führte somit zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität der GR von 0.03 U/mg im Homogenatsüberstand zu 145 U/mg im gereinigten Enzym. Insgesamt wurde das Enzym mit dem beschriebenen Protokoll 5000-fach angereichert.

5.1.2. Reinigung des Malatenzyms aus Rinderhirn

Aufgrund der hohen Affinität zum 2',5'-ADP-Sepharose-Material, welches zur Reinigung von Enzymen mit Affinität für NADP⁺ Verwendung findet, und der in der Molekularsiebchromatographie erkennbaren Größe des nativen Proteins, wurde vermutet, ME gereinigt zu haben. Diese Annahme konnte durch einen ME-Enzymtest (7.3.) bestätigt werden. Daher wurde während der Reinigung der GR zusätzlich Ausbeute und Anreicherung des ME

Tabelle 2. Beispiel einer typischen Reinigung des Malatenzyms aus Rinderhirn

Reinigungsschritt	Protein- gehalt (mg)	Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U x mg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Anreicher- ungsfaktor
<i>Homogenatsüberstand</i>	10841	423	0.039	100	1
<i>Ammoniumsulfat- präzipitation (35-75 %)</i>	5084	320	0.063	76	1.6
<i>Dialysat</i>	4117	326	0.079	77	2
<i>DEAE-Cellulose</i>	2546	315	0.124	74	3.2
<i>2',5'-ADP-Sepharose</i>	5.8	83	14.3	20	367
<i>Ammoniumsulfat- präzipitat (80 %-Sättigung)</i>	4.6	57	12.4	13.5	318
<i>Superdex 200</i>	0.96	38	40	9	1026

Als Ausgangsmaterial wurden 600 g Rinderhirn eingesetzt.

bestimmt. Es zeigte sich, daß mit dem für die GR entwickelten Reinigungsschema ebenfalls ME bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. In Tabelle 2 ist eine repräsentative Anreicherung des ME dargestellt.

Homogenisierung

Für die Reinigung des ME wurde ebenfalls von 600 g Rinderhirn (Naßgewicht) ausgegangen. Erneute Homogenisierung des Niederschlages der ersten Homogenisierung steigerte die Aktivitätsausbeute um ca. 37 %.

Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung und Dialyse

Im Niederschlag der 35 %-igen Ammoniumsulfat-Fällung wurde nach Resuspendierung keine ME-Aktivität festgestellt; er wurde deshalb verworfen. Zum Überstand wurde solange Ammoniumsulfat zugegeben bis eine Sättigung von 75 % erreicht war. Im Niederschlag der anschließenden Zentrifugation war 76 % der ME-Aktivität enthalten. Durch die fraktionierte Fällung waren 53 % an Fremdprotein entfernt worden. Bei der Dialyse des resuspendierten Präzipitats der 75 %-Fällung blieb die ME-Aktivität vollständig erhalten.

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Das Dialysat wurde mit 50 g DEAE-Cellulose inkubiert. ME band unter den gewählten Bedingungen nicht an den Anionenaustauscher. Bei diesem Schritt gingen nur 4 % ME-Aktivität verloren, 39 % des aufgetragenen Proteins wurde abgetrennt. Gegenüber dem vorhergehenden Schritt stieg die Anreicherung um den Faktor 1.6.

Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose

Die Affinitätschromatographie wurde durchgeführt wie bei der Reinigung der GR aus Rinderhirn beschrieben. Dabei wurde durch den 1 M NaCl-Puls keine ME-Aktivität, jedoch viel Fremdprotein (Fraktionen 10 bis 15, Abb. 10) eluiert. ME-Aktivität fand sich im Eluat des NADPH-Gradienten wieder. Das Maximum an ME-Aktivität wurde bei einer Konzentration von 0.22 mM NADPH nachgewiesen. Nach der Affinitätschromatographie war das ME 357-fach angereichert und 99 % an Fremdprotein abgetrennt.

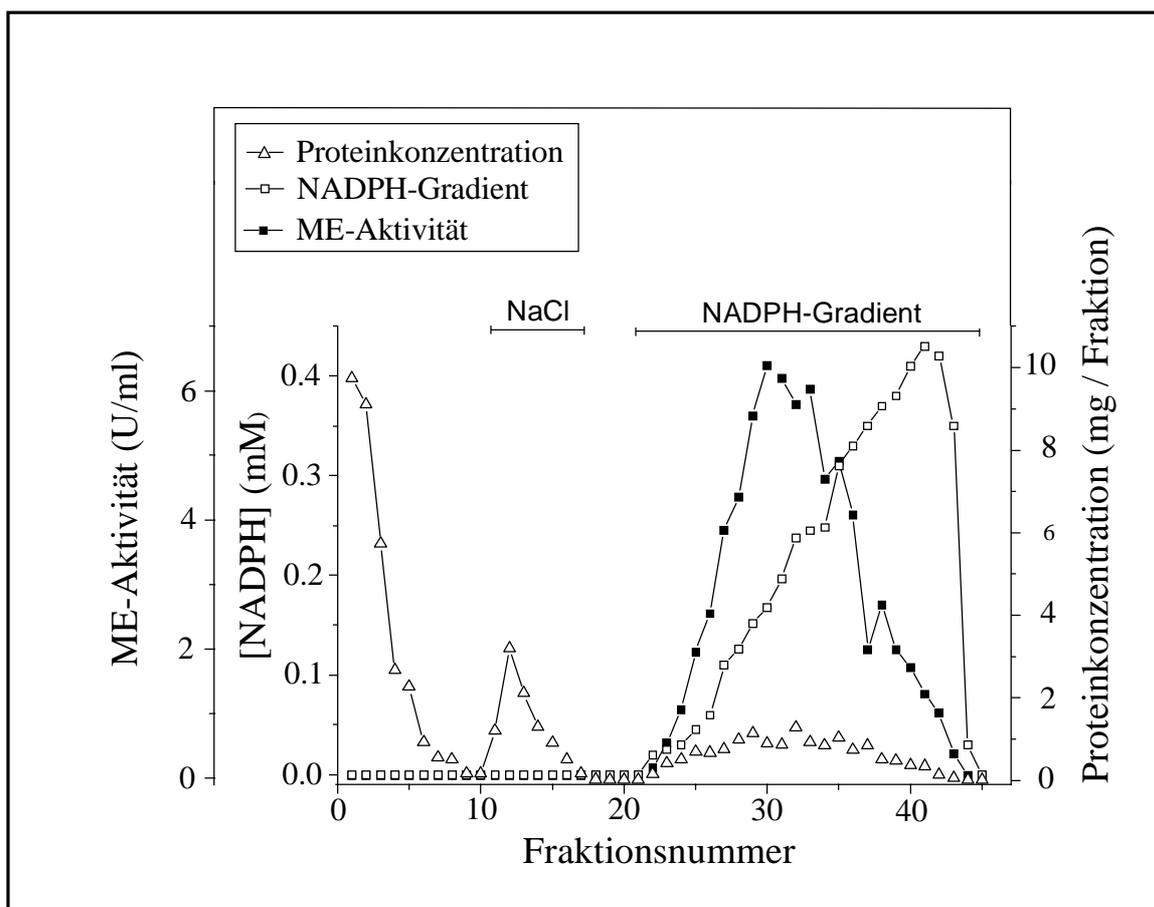


Abb. 10. Elution von ME aus Rinderhirn von einer 2',5'-ADP-Sepharose-Säule.

Nach dem Waschen der Säule (7.5 cm x 1 cm) mit einem 1 M NaCl-Puls wurde ME mit einem linearen NADPH-Gradienten (0 - 0.5 mM) von der Säule eluiert. Fraktionsvolumen: 2.8 ml. Fließgeschwindigkeit: 0.7 ml/min. Auf die Säule wurden 2.5 g Protein in 830 ml DEAE-Cellulose-Überstand aufgetragen.

80%-ige Ammoniumsulfat-Fällung und Molekularsiebchromatographie an Superdex 200

Zur Konzentrierung wurden die Proteine im Eluat der 2',5'-ADP-Sepharose-Säule mit Ammoniumsulfat (Endkonzentration 80 %) gefällt. Der Niederschlag wurde resuspendiert und auf die Molekularsiebchromatographie-Säule appliziert. Nach der Ammoniumsulfat-Fällung blieben 30 % der ME-Aktivität im Überstand und konnten auch nach erneuter Zentrifugation nicht gefällt werden. Von der Molekularsiebchromatographie-Säule wurden drei voneinander getrennte Protein-Gipfel eluiert. Das Maximum der ME-Aktivität wurde in Fraktion 57 (Gipfel

ERGEBNISSE

2) bestimmt. Bei dem Gipfel 3 handelt es sich um GR. Im Vergleich zum vorherigen Schritt erhöhte sich die Anreicherung des ME durch die Molekularsiebchromatographie um das 3.2-fache. Unmittelbar im Anschluß an die Molekularsiebchromatographie wurde eine spezifische Aktivität für ME von 40 U/mg ermittelt. Somit wurde ausgehend von einer spezifischen Aktivität von 0.039 U/mg im Homogenatsüberstand das ME um den Faktor 1000 angereichert.

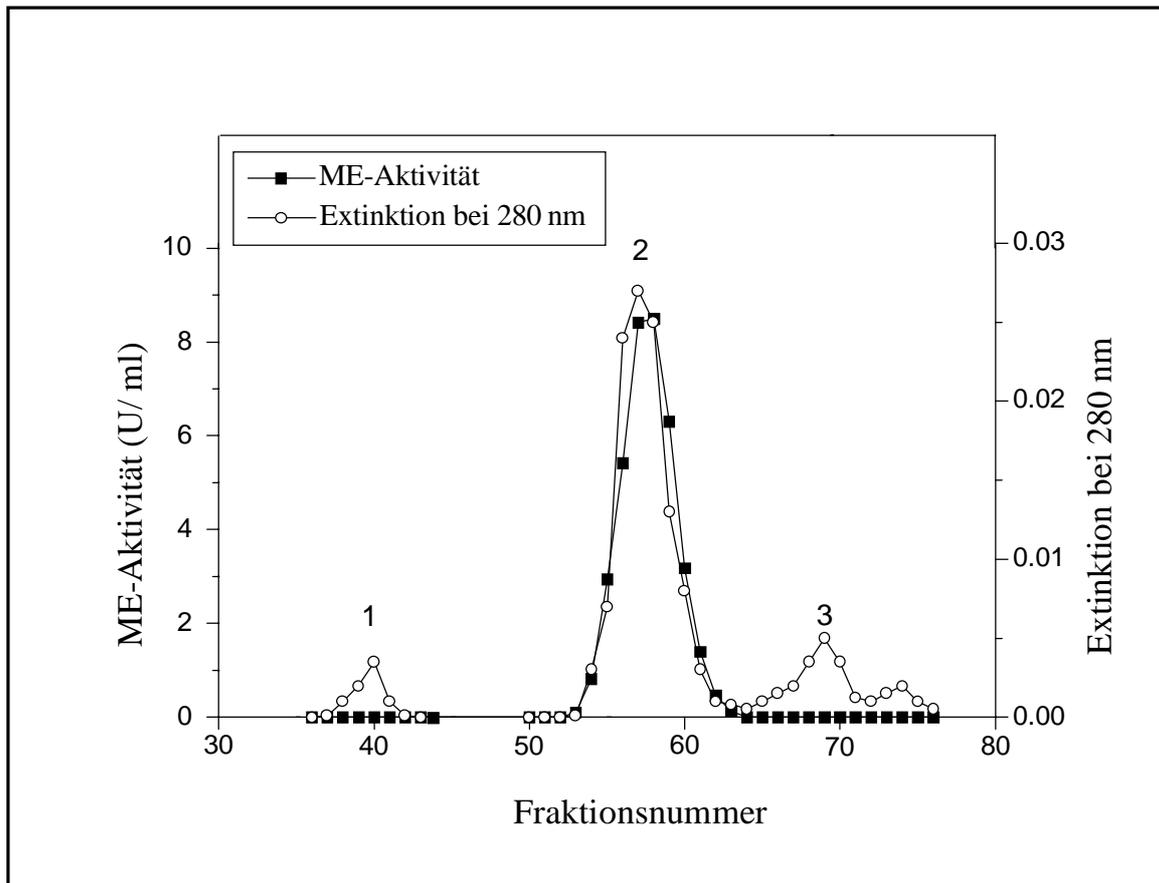


Abb. 11. Molekularsiebchromatographie an einer Superdex 200-FPLC-Säule - Test auf ME-Aktivität. ME eluiert bei einem Elutionsvolumen von 57 ml (Gipfel 2), GR bei einem Elutionsvolumen von 69 ml (Gipfel 3). Säulenabmessungen: 60 cm x 1.6 cm; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Fraktionsgröße: 1 ml; aufgetragene Proteinmenge: 2.3 mg in 0.5 ml.

5.1.3. Molekülmassenbestimmung der Glutathionreduktase und des Malatenzyms

Analytische Gelfiltration

Das Elutionsprofil von GR und ME an der Superdex 200-Säule wurde benutzt, um die Molekülmasse der Proteine abzuschätzen. Dazu wurde ein Gemisch aus Proteinen verschiedener Molekülmassen auf die Superdex 200-Säule appliziert und unter identischen

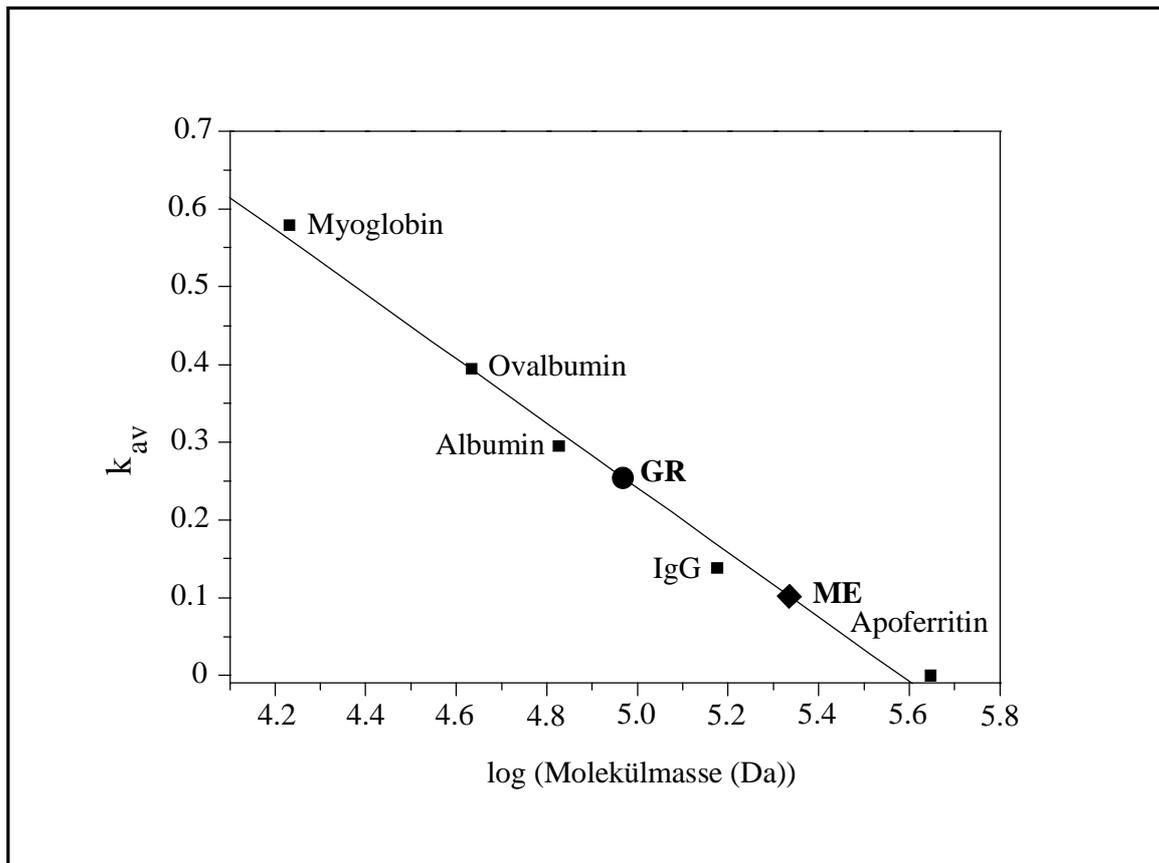


Abb. 12. Bestimmung der Molekülmassen der gereinigten GR und des gereinigten ME nach Gelfiltration an Superdex 200. Als Molekülmassenstandards wurden eingesetzt: Apoferritin (443 kDa), IgG (150 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Myoglobin (17 kDa).

$$k_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (V_e: \text{Elutionsvolumen der Proteine, } V_0: \text{Ausschlußvolumen} = V_e \text{ (Apoferritin): } 50 \text{ ml, } V_t: \text{Säulengesamtvolumen (120.6 ml)}).$$

Bedingungen eluiert. Mit Hilfe des von Laurent und Killander (1964) definierten Parameters k_{av} (Abb. 12), welcher für jedes Protein in Verbindung mit dem benutzten Gelfiltrationsmaterial spezifisch ist, läßt sich bei geeigneter Wahl der Molekülmasse der Kalibrierungsproteine, eine lineare Beziehung des Logarithmus der Molekülmasse der eluierten Proteine zum Elutionsvolumen darstellen. Die verwendeten Proteine mit Molekülmassen zwischen 17 und 443 kDa zusammen mit dem Molekularsieb-Material Superdex 200 erfüllten diese Voraussetzung (Abb. 12). Somit konnten die apparenten Molekülmassen für GR mit 116 ± 19 kDa ($n = 13$ Chromatographien) und für ME mit 263 ± 17 kDa ($n = 5$ Chromatographien) bestimmt werden.

Polyacrylamidgelelektrophorese

Um die Reinheit der GR und des ME zu überprüfen, wurden die Proteine in einem 11 %-igen SDS-Polyacrylamid-Trenngel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben wurden in einem weiteren Ansatz zusätzlich mit Mercaptoethanol versetzt, um Disulfidbrücken der Enzyme zu reduzieren. Silbernitratanfärbung ermöglichte den Nachweis aufgetrennter Proteine mit hoher Empfindlichkeit. GR wurde durch das beschriebene Verfahren zur Homogenität gereinigt. Die nicht-reduzierte GR hat eine Molekülmasse von ca. 100 kDa (Abb. 13, Bahn A4). Zusätzlich wurde in dieser Probe eine Proteinbande mit einer Molekülmasse > 100 kDa angefärbt (Abb. 13, Bahn A4), die in der reduzierten Probe nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 13, Bahn B4). Nach Reduktion der gereinigten GR mit Mercaptoethanol wurde eine einzelne Proteinbande mit einer Molekülmasse von 54.8 ± 1.5 kDa ($n = 3$ Gele) nachgewiesen. Das ME wurde durch die beschriebene Prozedur ebenfalls bis zur Homogenität gereinigt. Im reduzierten und nicht-reduzierten Zustand besaß das ME eine Molekülmasse von 60 ± 1.5 kDa ($n = 3$ Gele) (Abb. 13, Bahnen 3). In einem Gemisch aus gereinigter GR und gereinigtem ME konnten beide Proteine unter den verwendeten elektrophoretischen Bedingungen vollständig voneinander getrennt werden (Abb. 13, Bahnen 2). Eine Kontamination der beiden gereinigten Enzyme mit dem jeweils anderen Protein war nicht nachweisbar.

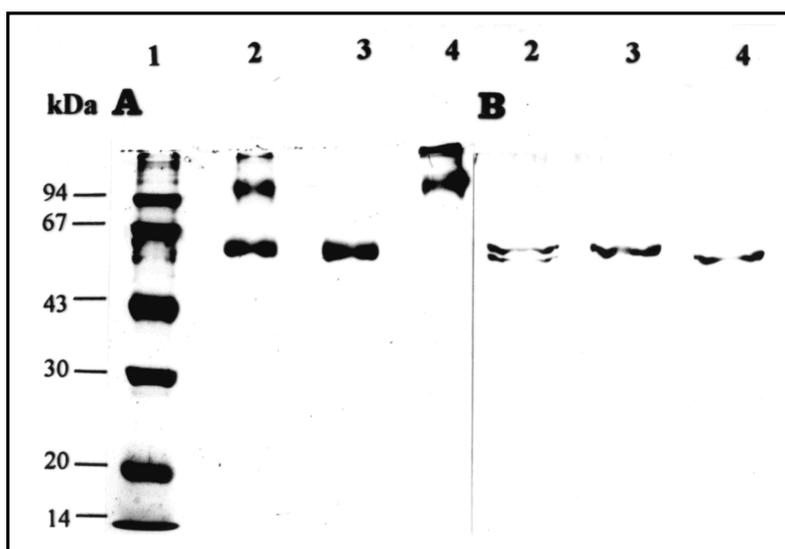


Abb. 13. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von gereinigter GR und ME. Ein 11 % Acrylamid enthaltendes Trenngel wurde verwendet, um Proben zu trennen, die ohne (A) oder mit (B) Mercaptoethanol vorbehandelt worden waren. 1: Markerproteine; 2: GR (1.6 µg Protein) plus ME (2 µg Protein); 3: ME (2 µg Protein); 4: GR (1.6 µg Protein).

Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisationsmassenspektrometrie

Um die Molekülmasse der gereinigten GR und des gereinigten ME genauer zu bestimmen, wurde die MALDI-MS- Methode in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Felix Reutter (Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen) angewandt. Im erhaltenen Massenspektrum der GR fanden sich zwei deutlich sichtbare Gipfel, bei denen es sich um die Masse des Monomers ($m/z = 53431$) und des GR-Dimers ($m/z = 106720$) handelt (Abb. 14A). Im MALDI-Massenspektrum des ME (Abb. 14B) konnte das intensivste Signal bei $m/z = 63982$ bestimmt werden. Dabei handelt es sich vermutlich um das Monomer. Außerdem waren noch Signale des doppelt ($[M + 2H]^{2+}$; $m/z = 32005$) und des dreifach geladenen Monomers nachzuweisen

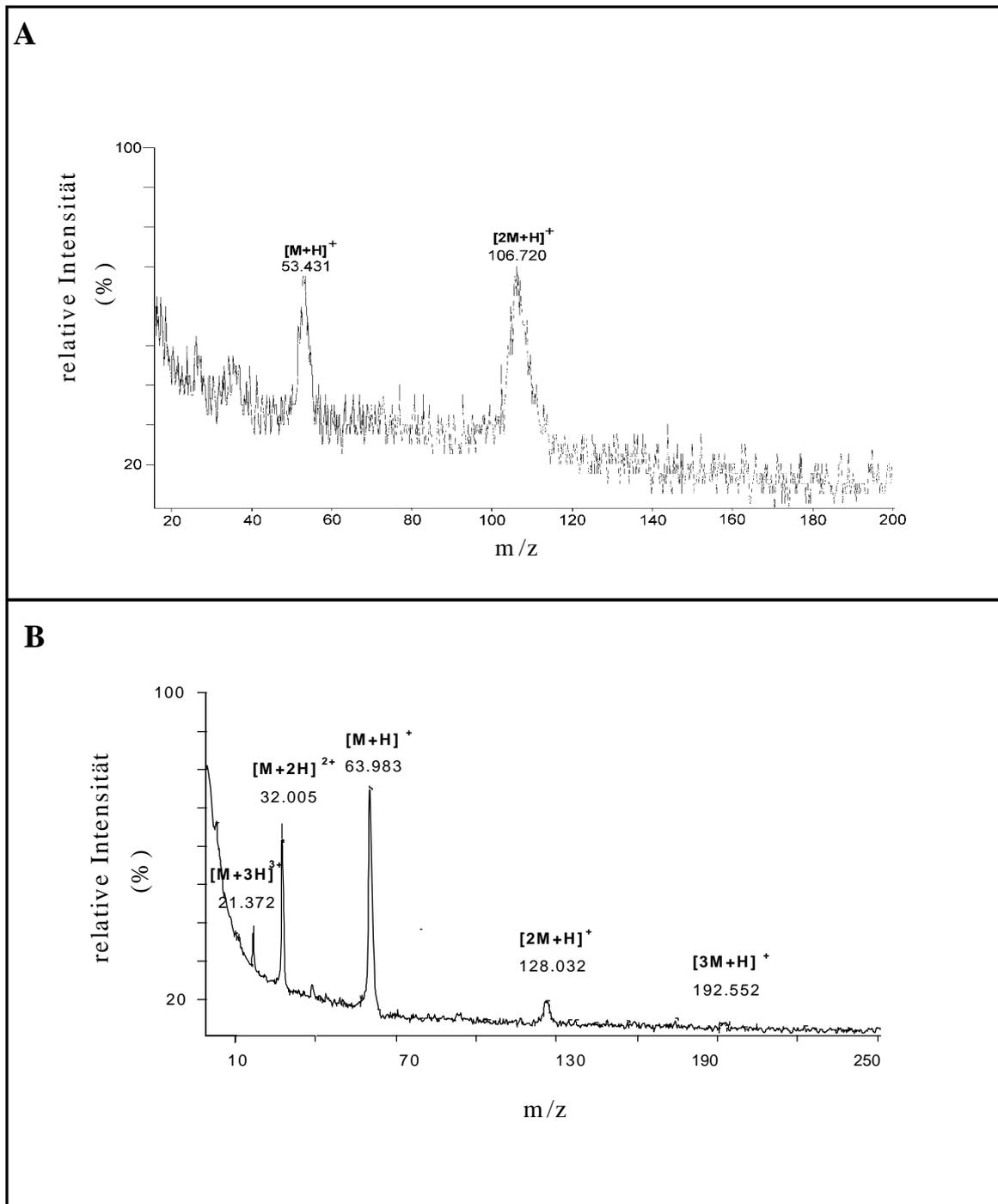


Abb. 14. MALDI-MS Spektrum zur Bestimmung der Molekülmasse der GR (A) und des ME (B) aus Rinderhirn. In beiden Fällen wurde das Spektrum aus 50 akkumulierten Einzelmessungen aufgebaut. Die analysierte Probenmenge betrug jeweils 100 ng. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde das erhaltene Peptidspektrum für GR und ME (nicht gezeigt) für die entsprechenden Molekülmassenbereiche der GR und des ME umgerechnet. Die Proteinmassen sind in kDa angegeben [Abb. verändert nach Reutter (1999)].

ERGEBNISSE

($[M + 3H]^{3+}$; $m/z = 21372$). Im Bereich von $m/z = 128032$ ($[2M + H^+]$) und $m/z = 192552$ ($[3M + H^+]$) waren weitere Gipfel sichtbar, bei denen es sich vermutlich um das Homodimer bzw. um das Homotrimer handelt. Ein Signal für das Homotetramer konnte nicht entdeckt werden.

Zusammenfassung der bestimmten Molekülmassen

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die mit den verschiedenen Methoden ermittelten Molekülmassen der GR und des ME. Mit Hilfe der Molekularsiebchromatographie wurden die

Tabelle 3. Vergleich der mit verschiedenen Methoden erhaltenen Molekülmassen in kDa von GR und ME aus Rinderhirn

	SDS-PAGE	Molekularsieb- chromatographie	MALDI-MS
GR-Dimer	94 (1)	116 ± 19 (13)	106.720 (1)
GR-Monomer	54.8 ± 1.5 (3)	-----	53.430 (1)
ME-Tetramer	-----	263 ± 17 (5)	-----
ME-Monomer	60 ± 1.5 (3)	-----	63.982 (1)

(n) = Anzahl der Experimente.

Molekülmassen der beiden nativen Enzyme bestimmt (GR: 116 kDa; ME: 263 kDa). Mit SDS-PAGE und MALDI-MS wurde die Masse des GR-Dimers (94 kDa bzw 106.72 kDa), ermittelt. Die Molekülmassen der Monomere der GR wurden mit 54 kDa, die des ME mit 61 kDa (SDS-PAGE) und 64 kDa (MALDI-MS) bestimmt. In den Molekularsiebchromatographieläufen konnten die Monomere von GR und ME nicht nachgewiesen werden. Ebenso war die Bestimmung der Molekülmasse des nativen ME mit Hilfe der SDS-PAGE und MALDI-MS nicht möglich.

5.1.4. Identifizierung des cytosolischen Malatenzyms mittels analytischer Ionenaustauschchromatographie

Um zu klären, ob es sich bei dem gereinigten ME um die cytosolische oder mitochondriale Isoform handelt, wurde das von Kurz (1992) beschriebene Verfahren der analytischen Ionenaustauschchromatographie zur Trennung der beiden Isoformen einmal durchgeführt. Von der aufgetragenen ME-Aktivität wurde 87 % bei einer Magnesiumacetat-Konzentration von 5 mM eluiert. Mit 30 mM Magnesiumacetat wurde 13 % der ME-Aktivität von der Säule gewaschen (Abb. 15).

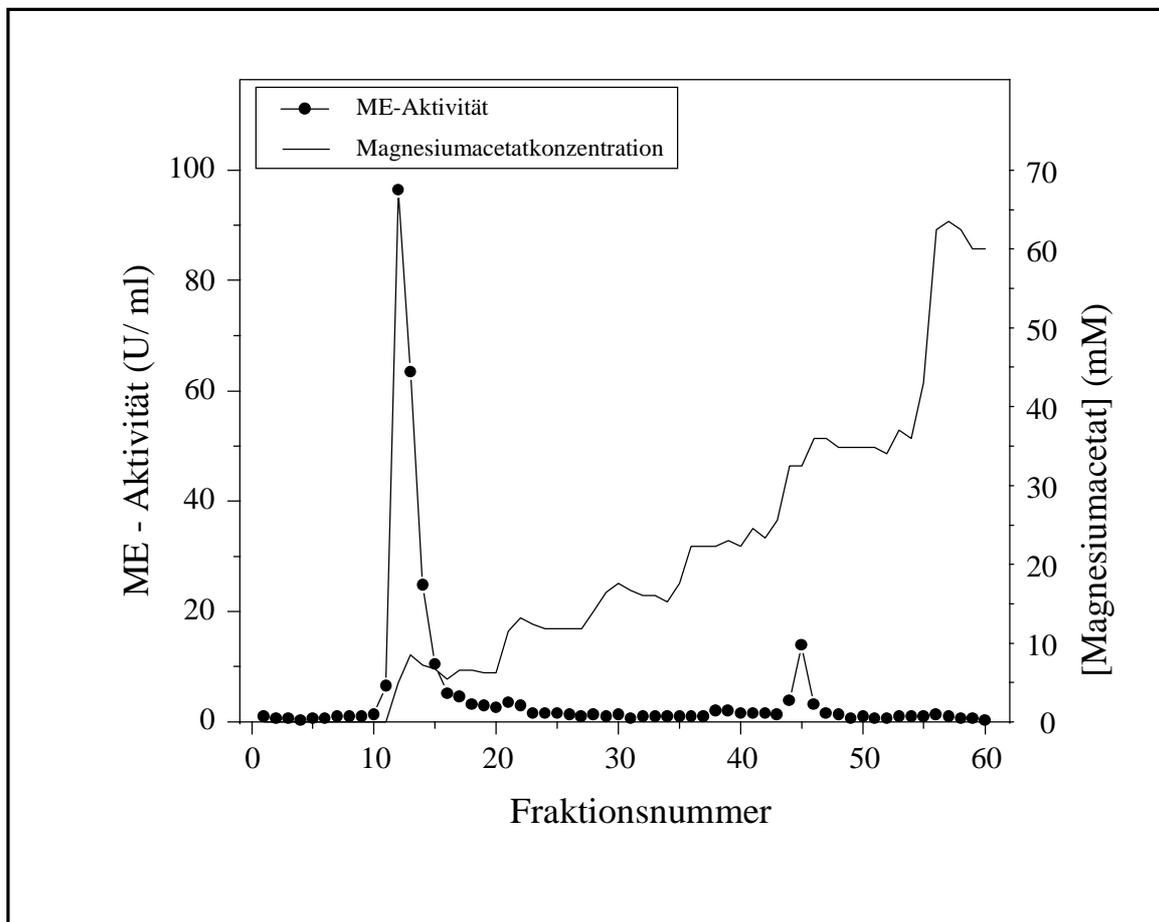


Abb. 15. Elution von ME aus DEAE-52-Cellulose zur Identifizierung von ME-Isoformen nach Kurz (1992). Säule: 2.5 cm x 1 cm; Fließgeschwindigkeit: 0.75 ml/min; verwendeter Stufengradient: 5, 10, 15, 20, 30 und 50 mM Magnesiumacetat.

5.2. Gewinnung von Antiseren gegen die gereinigte Glutathionreduktase aus Rinderhirn

5.2.1. Immunisierung der Kaninchen

Da in der SDS-PAGE keine Verunreinigungen der gereinigten GR zu erkennen waren, stand geeignetes Material für die Immunisierung von Kaninchen zur Verfügung. Zwei Kaninchen (Kennnummern 40650 und 40696) wurden nach der in 7.7.1. beschriebenen Methode immunisiert.

5.2.2. Charakterisierung der Antiseren

5.2.2.1. Titerbestimmung

Mittels ELISA (7.8.1.) wurde der Antikörpertiter vor und nach den einzelnen Immunisierungsschritten ermittelt und so der Verlauf der Immunreaktion verfolgt. Die Extinktionswerte im ELISA hängen sowohl von der Proteinmenge, mit der die Vertiefungen der Mikrotiterplatten beschichtet werden, als auch von der Inkubationszeit der einzelnen Schritte ab. Deshalb wurden die Titer aller Seren (Präimmunserum und Seren der Auffrischimmunisierungen), sowie die Extinktionen aller Kontrollansätze in einem einzigen Experiment unter identischen Bedingungen bestimmt. Die Titer-Entwicklungen für die beiden Kaninchen sind in Abb. 16 sowie in Tabelle 4 dargestellt.

Die Präimmunseren zeigten im ELISA keine Immunreaktivität gegenüber GR. Bereits nach der Erstimmunisierung der Kaninchen wurde ein IgG-Antikörpertiter von 1:1600 (40650) bzw. 1:1100 (40696) ermittelt. Der Titer erhöhte sich nach der Zweitimmunisierung in beiden Kaninchen deutlich, wohingegen nach der dritten Auffrischimmunisierung kein weiterer Anstieg mehr feststellbar war. Daher wurde beschlossen, die Seren durch Ausbluten beider Tiere zu diesem Zeitpunkt zu erhalten. Die Extinktionen der Kontrollen (Abb. 16B, D) betrug weniger als 10 % der Extinktionen der entsprechenden Ansätze mit den verdünnten Antiseren. Im folgenden wurde das Antiserum des Kaninchens mit der Nummer 40650 (anti-GR) weiter charakterisiert und für die Immuncytochemie eingesetzt.

ERGEBNISSE

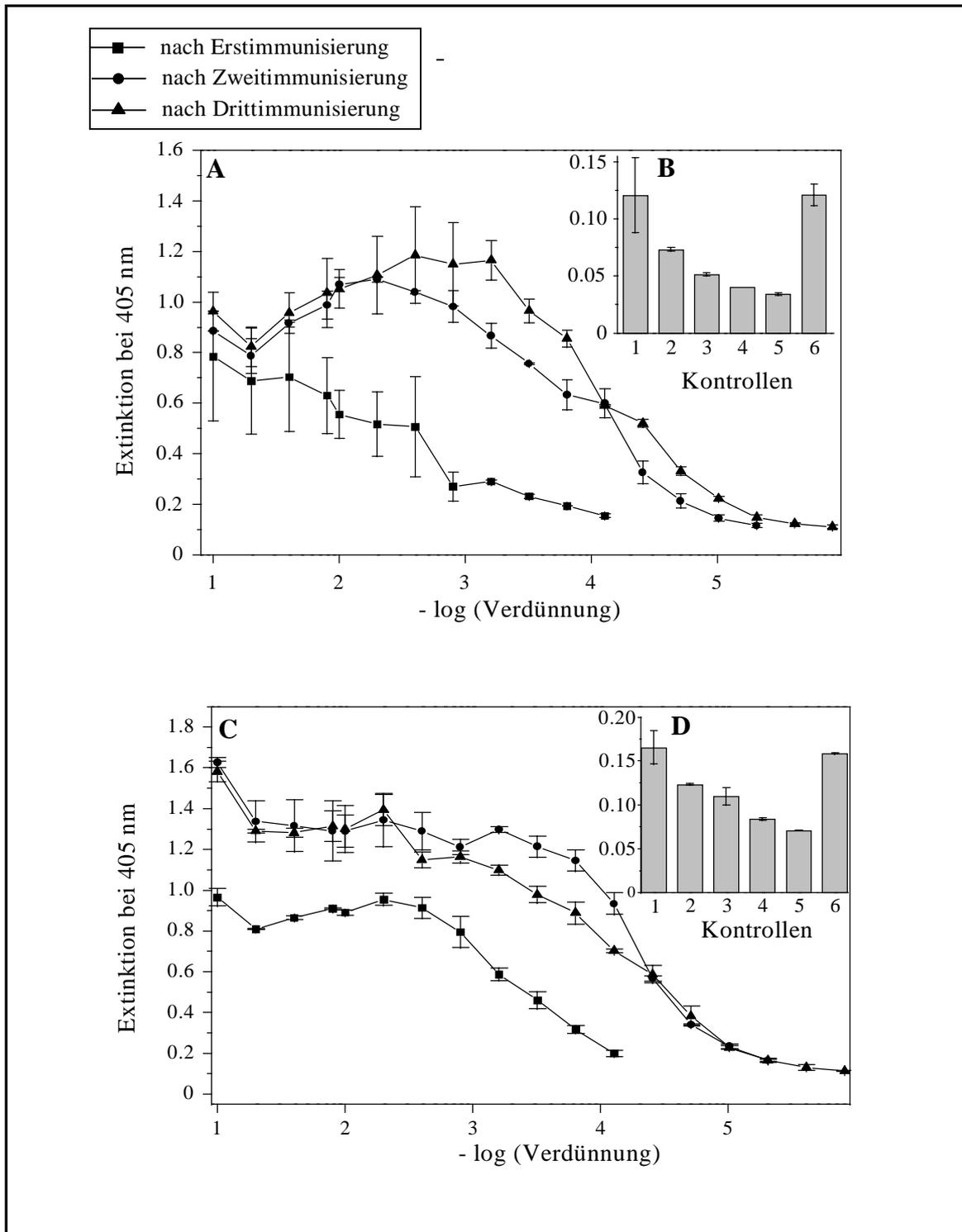


Abb. 16. Entwicklung des Antikörpertiters im Serum des Kaninchens 40650 (A) und des Kaninchens 40696 (C). Die Daten wurden aus einem Experiment gewonnen, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Jeder Napf der Mikrotiterplatte war mit 100 ng GR beschichtet. Kontrollen (B/D): 1-3: Verdünnungen des Präimmunsersums (1, 1: 100; 2, 1: 1000; 3, 1: 10000), 4: ohne anti-GR, 5: ohne Sekundärantikörper, 6: ohne GR. Verdünnung von anti-GR bei 5 und 6: 1:800.

Tabelle 4. Entwicklung des Antikörpertiters gegen GR aus Rinderhirn in den Kaninchen 40650 und 40696

	Kaninchen 40650		Kaninchen 40696	
	Titer	Zeit nach der letzten Immunisierung (d)	Titer	Zeit nach der letzten Immunisierung (d)
<i>Präimmunserum</i>	kein Titer	-----	kein Titer	-----
<i>Primärantwort</i>	1: 1600	28	1: 1100	35
<i>Sekundärantwort</i>	1: 6000	35	1: 11600	34
<i>Tertiärantwort</i>	1: 11000	26	1: 10500	38

Die Titer wurden aus den in Abb. 16 dargestellten Kurven abgelesen.

5.2.2.2. Immunpräzipitation

Um zu testen, ob das Antiserum 40650 native GR erkennen kann, wurde eine Immunpräzipitation mit Gewebehomogenatsüberständen durchgeführt. Nach Inkubation mit anti-GR waren in den eingesetzten Homogenatsüberständen bestenfalls 10 % der GR-Aktivität des Kontrollansatzes nachweisbar (Abb. 17 A). Dabei war es unerheblich, ob den Ansätzen Protein-A-Sepharose zur besseren Fällung der Antigen-Antikörper-Aggregate beigelegt war oder nicht. In den Niederschlägen aller Ansätze wurden nach Resuspendierung zwischen 20 % und 30 % der im Test eingesetzten GR-Aktivität gefunden (Abb. 17 B). Von der eingesetzten GR-Aktivität (Summe von Überstand und Niederschlag) waren nach Inkubation mit anti-GR 60 % (Rinderhirn), 65 % (Rinderleber) und 74 % (Rattenhirn) nicht mehr nachzuweisen.

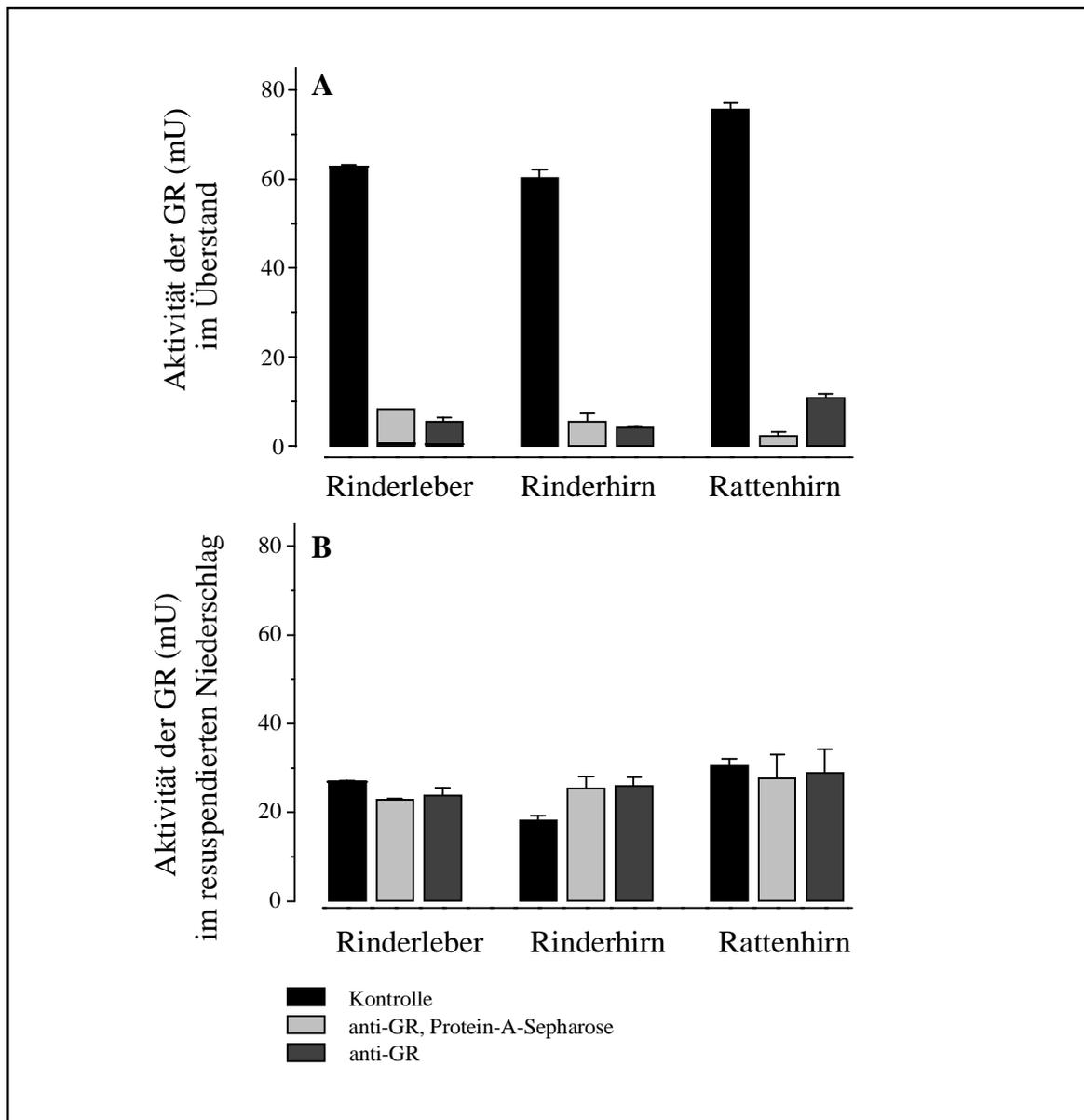


Abb. 17. Immunpräzipitation der GR mit anti-GR aus Homogenatsüberständen vom Rind (Leber und Hirn) und Ratte (Hirn). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. der Enzymaktivitäten aus jeweils drei Ansätzen. Die Enzymaktivitäten stellen die Gesamtaktivität im Überstand bzw. im resuspendierten Niederschlag dar. Kontrolle: PBS statt anti-GR.

5.2.2.3. „Native Western Blot“-Analysen

Nachweis von denaturierter und nativer Glutathionreduktase

Die Spezifität des Antiserums wurde in „Western Blot“-Experimenten untersucht. Wie aus dem Immunpräzipitations-Experiment (Abb. 17) ersichtlich war, verschwand die Aktivität der GR teilweise aus Rinderhirn in Gegenwart des Antiserums. Um zu untersuchen, ob das Antiserum GR unter denaturierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen nachweisen kann, wurden Überstände von Rinderhirnhomogenaten bzw. gereinigte GR mit einem SDS-enthaltenden Ladepuffer 5 min gekocht oder mit einem SDS-freien gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (Rt) inkubiert. Die so gewonnenen Proben wurden auf das Sammelgel appliziert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. SDS- und native Gelelektrophorese wurden zum gleichen Zeitpunkt abgestoppt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine in den Gelen mit Silbernitrat angefärbt oder auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit anti-GR oder Präimmunserum inkubiert. Nach Wegwaschen der Antiseren wurden die Membranen mit den denaturierten und nicht-denaturierten Proteinen unter identischen Bedingungen weiterbehandelt (7.8.3.).

Nach Silbernitratfärbung war in den Gelbahnen eine einzige durchgehende Proteinspur angefärbt. Einzelne Proteinbanden waren nicht auflösbar (Abb. 18A1 und D1). Gereinigte GR wurde als distinkte Bande durch die Silbernitratanfärbung nachgewiesen (Abb. 18A2 und D2). Im „Western Blot“ der SDS behandelten Proben konnte nach Inkubation mit anti-GR weder für Homogenatüberstand, noch für gereinigte GR eine spezifische Bande der GR nachgewiesen werden (Abb. 18B1 und B2). Auch konzentrierter eingesetzte Antiseren (Verdünnungen: 1: 200; 1: 500) führten unter denaturierenden Bedingungen nicht zum Nachweis der GR (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den denaturierten Proben war in den SDS-unbehandelten („nativen“) Proben jeweils eine einzelne Bande mit anti-GR nachweisbar (Abb. 18E1 und E2), welche das gleiche Laufverhalten aufwies wie die gereinigte GR (Abb. 18D2). Nach Inkubation mit Präimmunserum wurde unter den gewählten Bedingungen keine Proteinbande angefärbt (Abb. 18 C und F). Für ein an immobilisierter GR aufgereinigtes Antiserum wurden identische Anfärbungen wie mit unbehandeltem Antiserum gefunden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für die nachfolgenden „Western Blots“ die unbehandelte Antikörperlösung verwendet.

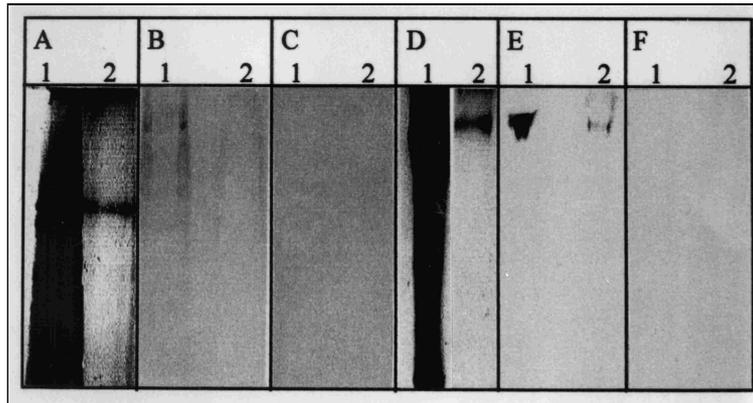


Abb. 18. Untersuchung zur Spezifität des anti-GR mittels „Western Blot“ von Proben, die nach Behandlung mit SDS (A-C) und ohne SDS (D-F) aufgetrennt wurden. Aufgetragen wurden (1) Homogenatsüberstand aus Rinderhirn (40 μ g Protein) und (2) gereinigte GR aus Rinderhirn (100 ng Protein (A, D) bzw. 20 ng Protein (B, C, E, F)). Vor dem Auftrag wurden die Proben ohne SDS (D-F) bei Rt inkubiert, diejenigen mit SDS (A-C) 5 min lang gekocht. A, D: Silbernitratanfärbung; B, E: Inkubation mit anti-GR (1:1000); C, F: Präimmunsereum (1:1000).

Vorinkubation des Antiserums mit gereinigter Glutathionreduktase

Zur weiteren Charakterisierung der Spezifität des gegen GR gewonnenen Antiserums wurden die Antikörper mit einem Überschuß an gereinigter GR vorinkubiert, um die Bindungsstellen für GR abzusättigen. Nach Inkubation mit anti-GR waren angefärbte Proteinbanden mit der Mobilität der gereinigten GR in Hirnhomogenaten von Ratte und Rind zu erkennen (Abb. 19 A1-3). Für Rattenhirnhomogenat war diese Bande jedoch nur schwach angefärbt (Abb. 19 A1). Im Gegensatz dazu wurden auf der Nitrocellulosemembran, welche mit dem vorinkubierten Gemisch von anti-GR und reiner GR behandelt worden war, keine Banden zu erkennen (Abb. 19 B1-3). Selbst nach längerer Exposition mit Färbelösung zeigte sich hier allenfalls unspezifische Hintergrundanfärbung (Daten nicht gezeigt).

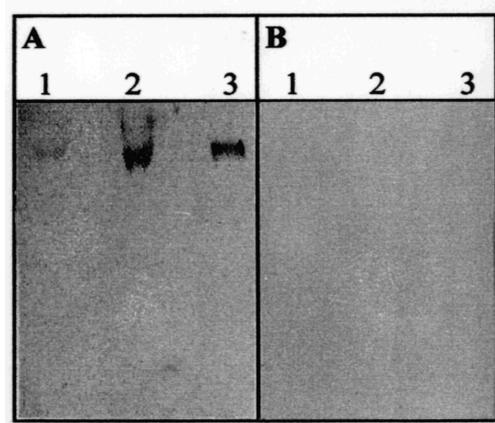


Abb. 19. Untersuchung zur Spezifität des anti-GR mittels „nativem Western Blot“: Vorinkubation des Antiserums mit gereinigter GR. Aufgetragen sind Homogenatsüberstände aus (1) adultem Rattenhirn (57 µg Protein) und (2) Rinderhirn (40 µg Protein) sowie (3) gereinigte GR aus Rinderhirn (25 ng Protein). Die Membranen wurden mit anti-GR (1:1000) inkubiert (A) oder mit dem Überstand der Vorinkubation des anti-GR (1:1000) mit 30 µg gereinigter GR aus Rinderhirn (B). Nach Wegwaschen der Antiseren wurden beide Membranen unter identischen Bedingungen weiter inkubiert.

Nachweis der Glutathionreduktase in Homogenaten von Rinderorganen

Um zu untersuchen, ob anti-GR die GR in verschiedenen Organen des Rindes nachweisen kann, wurden für einen „nativen Western Blot“ Homogenatsüberstände aus Herz, Hirn und Leber elektrophoretisch aufgetrennt. In den drei Homogenatsüberständen war eine Bande mit nahezu identischem Laufverhalten zu erkennen (Abb. 20). Wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen, ergaben sich Unterschiede in der Intensität der erhaltenen Signale (Abb. 20A). So war das Signal für den Leberhomogenatsüberstand am intensivsten (Abb. 20, A3), schwächer waren die für Herz (A1) und Hirn (A2). Wurden gleiche Enzymaktivitäten aufgetragen, waren keine deutlichen Unterschiede in der Intensität der Signale nachzuweisen (Abb. 20B 1-3).

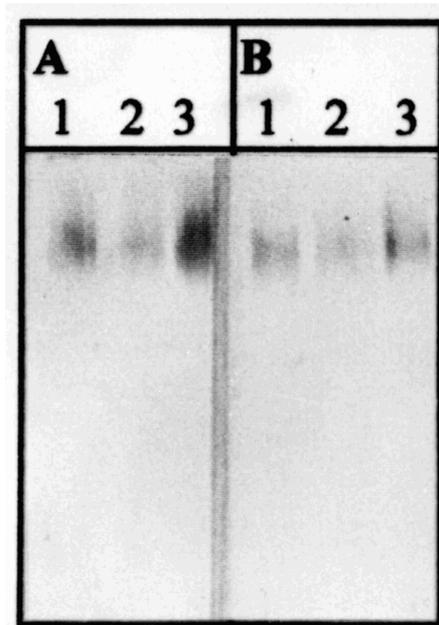


Abb. 20. Nachweis der GR mittels „nativem Western Blot“ in Homogenatsüberständen von Rinderorganen. Von den Homogenatsüberständen aus Herz (1), Hirn (2) und Leber (3) wurden gleiche Proteinmengen (40 µg Protein) (A) bzw. gleiche GR-Aktivitäten (0.6 mU) (B) aufgetragen. Verdünnung von anti-GR: 1: 1000.

5.3. Nachweis der Glutathionreduktase in neuronalen Zellen

5.3.1. Glutathionreduktase-Aktivität in neuronalen Primärkulturen

Zum Nachweis der GR in neuronalen Zellkulturen wurde die Aktivitäten der GR in Homogenatsüberständen astroglia-reicher und neuron-reicher Primärkulturen bestimmt. In beiden Kulturen war GR-Aktivität nachweisbar. Es wurde für die beiden Kulturtypen kein signifikanter Unterschied in den spezifischen Aktivitäten der GR gefunden (Tabelle 5).

Tabelle 5. Spezifische Aktivitäten von GR in neuronen-reichen und astroglia-reichen Primärkulturen

Primärkultur	spezifische GR-Aktivität (nmol/(min x mg Protein))
neuronen-reich	32 ± 6.0
astroglia-reich	33 ± 12.5

Die Daten stellen die Mittelwerte \pm S.D. der spezifischen Enzymaktivitäten aus jeweils 11 Kulturschalen (aus je drei unabhängigen Präparationen der beiden Kulturtypen) dar. Die gemessene GR-Aktivität wurde auf den Proteingehalt des jeweiligen Zentrifugationsüberstandes normiert.

5.3.2. Nachweis der Glutathionreduktase mittels „nativem Western Blot“

Das gewonnene anti-GR sollte in immuncytochemischen Anfärbungen von Rattenzellkulturen verwendet werden. Deshalb wurde versucht, GR in Homogenaten von astroglia-reichen und

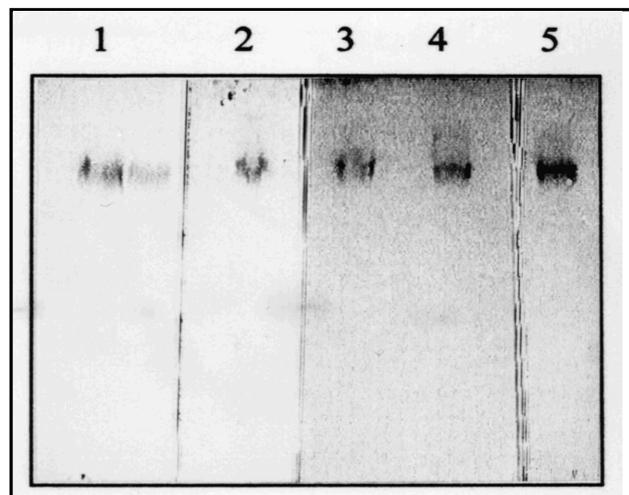


Abb. 21. Nachweis der GR mittels „nativem Western Blot“ in Homogenat-überständen neuraler Zellen. Gereinigte GR aus Rinderhirn (Bahn 1, 100 ng; 30 ng). In den Bahnen 2 bis 5 sind Homogenatüberstände (80 μ g) von adultem (2) und neonatalem (3) Rattenhirn, sowie von neuronen-reichen (4) und astroglia-reichen (5) Primärkulturen aufgetrennt worden. Das Antiserum wurde hier in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

neuronen-reichen Primärkulturen aus Rattenhirn, sowie in Homogenaten von adultem und neonatalem Rattenhirn nachzuweisen. Dazu wurde wiederum ein „Western Blot“ ohne SDS und Mercaptoethanol mit den in den vorangegangenen Experimenten erfolgreich eingesetzten Parametern durchgeführt. In allen untersuchten Homogenatüberständen konnte eine Bande detektiert werden, die dasselbe Laufverhalten aufwies wie gereinigte GR aus Rinderhirn (Abb. 21).

5.3.3. Immuncytochemische Lokalisation der Glutathionreduktase

Da der Nachweis der GR in Homogenaten astroglia-reicher und neuronen-reicher Primärkulturen mit Hilfe des gegen die GR aus Rinderhirn gewonnenen Antiserums erfolgreich war, wurde nun mit dem anti-GR versucht, die GR exprimierenden Zelltypen in den Kulturen zu identifizieren.

Astroglia-reiche Primärkulturen

Mit dem Antiserum (Verdünnung 1: 400) konnten Zellen in astroglia-reichen Primärkulturen spezifisch angefärbt werden (Abb. 22A), sofern biotinyliertes anti-Kaninchen-IgG als Sekundärantikörper eingesetzt und anschließend mit Streptavidin-Texasrot inkubiert wurde. Fluoresceinisothiocyanat- (FITC) bzw. Tetramethylrhodaminisothiocyanat- (TRITC) gekoppelte sekundäre Antikörper führten zu keinen befriedigenden Resultaten (Daten nicht gezeigt). Die Anfärbung unterblieb nahezu vollständig, wenn anstelle des Antiserums Präimmunserum in der gleichen Verdünnung verwendet wurde (Abb. 22C) oder wenn anti-GR zuvor mit gereinigter GR aus Rinderhirn vorinkubiert worden war (Abb. 22D).

Nicht alle Zellen in astroglia-reichen Primärkulturen wurden mit dem Antiserum angefärbt. Deshalb wurde versucht, in Doppelmarkierungsstudien die Zelltypen zu identifizieren, die intensive oder schwache GR-Immunanfärbung aufwiesen. Zellen, die mit einem monoclonalen Antikörper gegen das astrogliale Markerprotein GFAP angefärbt werden konnten (Abb. 23B), zeigten nur eine schwache Anfärbung für GR. In diesem Zelltyp war eine granuläre Anfärbung der GR im Cytosol vor allem in der Nähe des Zellkernes zu beobachten, der selbst von einer Färbung ausgespart blieb (Abb. 23A). In den verwendeten Kulturen fielen Zellen auf, die GFAP-negativ waren, aber eine intensive GR-Immunoreaktivität aufwiesen. Diese Zellen

ERGEBNISSE

waren von kleiner rundlicher Gestalt und konnten mittels eines Antikörpers (Ox 42) gegen den Rezeptor der Komplementkomponente C3b als Microgliazellen identifiziert werden (Abb. 23D,E). Mit diesem Antikörper wurden kleine, runde Zellen mit geringer Cytoplasmaausdehnung angefärbt (Abb. 23F). Ox42-positive Zellen waren intensiv über den gesamten Zelleib für GR angefärbt (Abb. 23D-F).

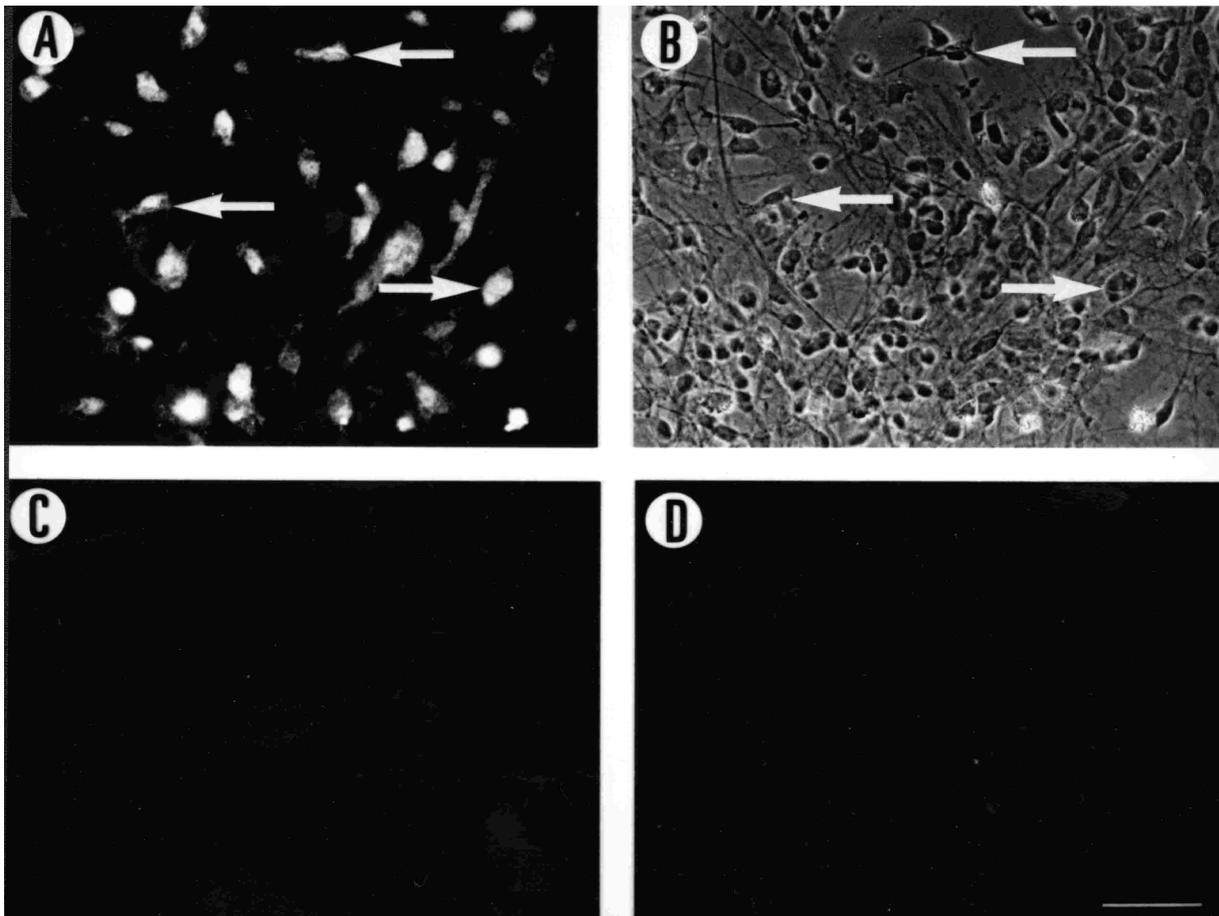


Abb. 22. Immunocytochemische Anfärbung einer 10 d alten astroglia-reichen Primärkultur. A zeigt die Anfärbung für GR nach Inkubation mit anti-GR (1:400 verdünnt), nachgewiesen mit biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG/Streptavidin-Texasrot. Nahezu keine Immunanfärbung war nachweisbar mit Präimmenserum (1:400) (C) bzw. nach einer Vorinkubation des anti-GR mit 3 µg gereinigter GR aus Rinderhirn (D). B zeigt die Phasenkontrastaufnahme der Zellen in A. Der Balken in D entspricht einer Länge von 50 µm.

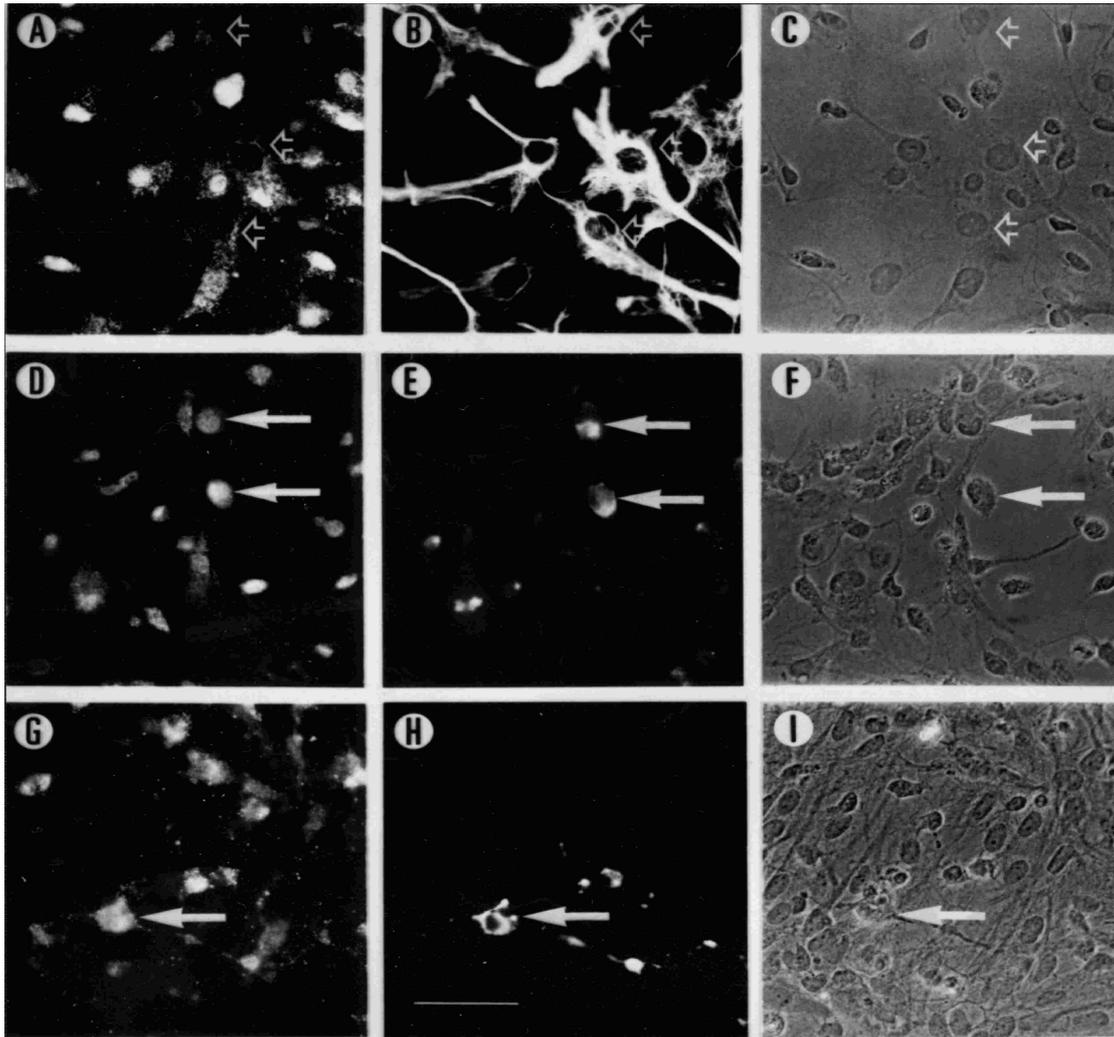


Abb. 23. Immunocytochemische Doppelmarkierung einer 10 d (A-F) bzw. 15 (G-I) d alten astroglia-reichen Primärkultur mit anti-GR Antiserum (A, D, G) und einem monoklonalen Antikörper gegen das astrogliale Markerprotein GFAP (B), das microgliale Markerprotein CR 3b (Antikörper Ox42; E) oder den oligodendroglialen Marker GalC (H). Bindung des anti-GR wurde nachgewiesen mit biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG/Streptavidin-Texasrot, Bindung des monoklonalen Antikörpers wurde mit FITC-markiertem anti-Maus-IgG detektiert. C, F und I sind die Phasenkontrastaufnahmen der Zellen in derselben Zeile. Pfeile in D-I bezeichnen eine Colokalisierung von GR mit einem der Markerproteine, offene Pfeile in A und B zeigen die allenfalls schwache Anfärbung von GFAP-positiven Zellen für GR. Der Balken in H entspricht einer Länge von 50 μm und gilt für alle Einzelbilder.

Ein weiterer Zelltyp mit kleiner, runder Morphologie und langen, dünnen Fortsätzen zeigte in den astroglia-reichen Primärkulturen sehr intensive GR-Immunoreaktivität (Abb. 23G). Dieser Zelltyp konnte in Doppelmarkierungsstudien mit anti-GalC angefärbt werden (Abb. 23H), einem Antikörper gegen das membranständige Galactocerebroside von Oligodendrogliazellen (Ranscht et al., 1982). GalC-positive Zellen wiesen eine intensive Anfärbung der Zellsomata für GR auf, wohingegen die ausgedehnten dünnen Fortsätze weniger intensiv angefärbt waren (Abb. 23G). Sowohl bei den Microglia- wie auch den Oligodendrogliazellen waren die gesamten Zellen mit anti-GR angefärbt, eine Aussparung der Färbung für den Zellkern konnte bei diesen Zellen nicht gefunden werden (Abb. 23D,G).

Microglia-reiche Sekundärkulturen

In einer astroglia-reichen Primärkultur sind ca. 10 % der Zellen Microgliazellen (Verleysdonk, 1994). Werden diese Zellen durch wiederholtes seitliches Klopfen von der Unterlage gelöst und erneut angesät, dann erhält man eine microglia-reiche Sekundärkultur (Hirrlinger, 1999). Die mit anti-GR inkubierten Microglia-Zellen wiesen eine intensive Immunfluoreszenz-Anfärbung auf (Abb. 24B). Vor allem die runden Somata zeigten eine sehr intensive Immunreaktivität. Die Fortsätze der Zellen waren dagegen nicht angefärbt. Eine Zelle mit Astroglia-Morphologie zeigte eine schwache kreisförmig GR-Anfärbung. Diese ist vermutlich auf eine Microglia-Zelle zurückzuführen (Pfeilspitze in Abb. 24A), die unter der anderen Zelle liegt und deshalb nur teilweise angefärbt werden konnte.

Neuronen-reiche Primärkulturen

Zur immunocytochemischen Lokalisierung von GR in Neuronen wurden neuron-reiche Primärkulturen untersucht. Um die GR und das Markerprotein GAP43 mit den entsprechenden Antisera nachweisen zu können, mußte das für die astroglia-reichen Primärkulturen verwendete Fixierungsprotokoll modifiziert werden (7.8.4.1.). Mit anti-GR konnten die Körper kleiner runder Zellen intensiv angefärbt werden (Abb. 25A), die durch gleichzeitige Anfärbung mit einem monoklonalem Antikörper gegen GAP43 als Neuronen identifiziert werden konnten (Abb. 25B). Die Fortsätze der Zellen waren intensiv für GAP43 angefärbt, zeigten aber keine

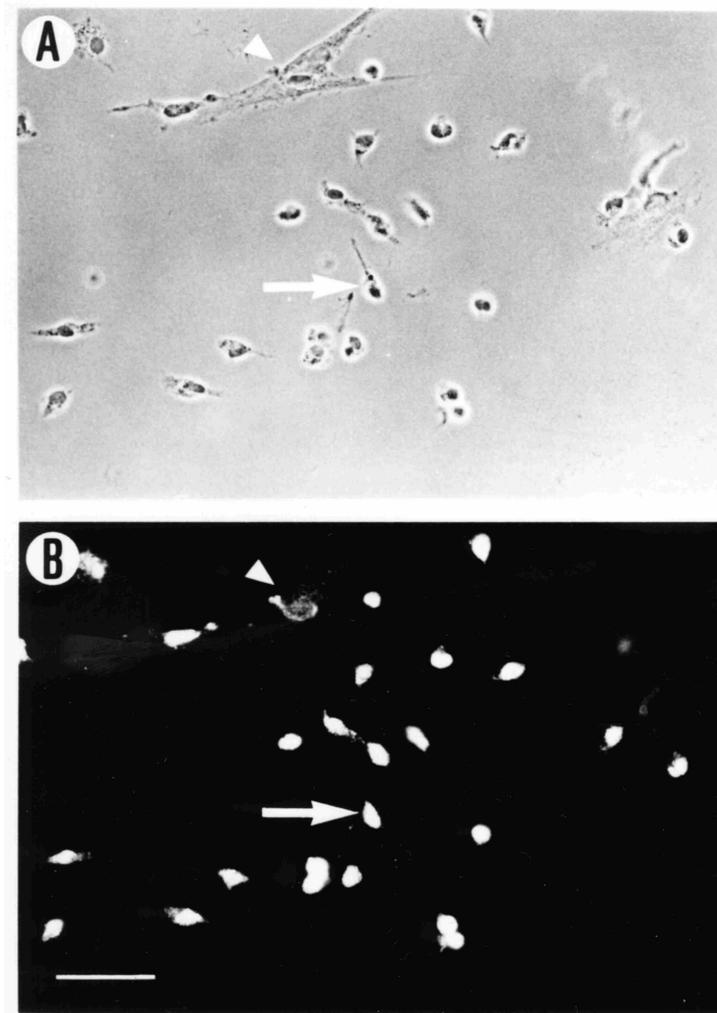


Abb. 24. Immunocytochemische Anfärbung einer 3 d alten microglia-reichen Kultur mit anti-GR (1: 400 verdünnt). A ist die der anti-GR-Anfärbung in B entsprechende Phasenkontrastaufnahme. Der Balken in B entspricht 50 μm . Der Pfeil kennzeichnet eine intensiv angefärbte Microgliazelle, der Pfeilkopf weist auf eine Zelle mit Astroglia-Morphologie hin, die über einer Microgliazelle liegt.

GR-Immunreaktivität. Im Phasenkontrastbild der Neuronenkulturen (Abb. 25C) waren wenig Zellen mit flacher Morphologie zu sehen, die nicht mit anti-GAP43 angefärbt waren (Abb. 25B) und die auch keine Anfärbung für GR zeigten (Abb. 25A). Bei diesen Zelltypen handelt es sich vermutlich um Astrogliazellen, die 5 % der Zellen in diesen Kulturen ausmachen (Dringen et al., 1999). Wurde anstelle des Antiserums das Präimmunserum in entsprechender Verdünnung eingesetzt, war auch in neuron-reichen Primärkulturen keine Immunanfärbung zu erkennen (Abb. 25D).

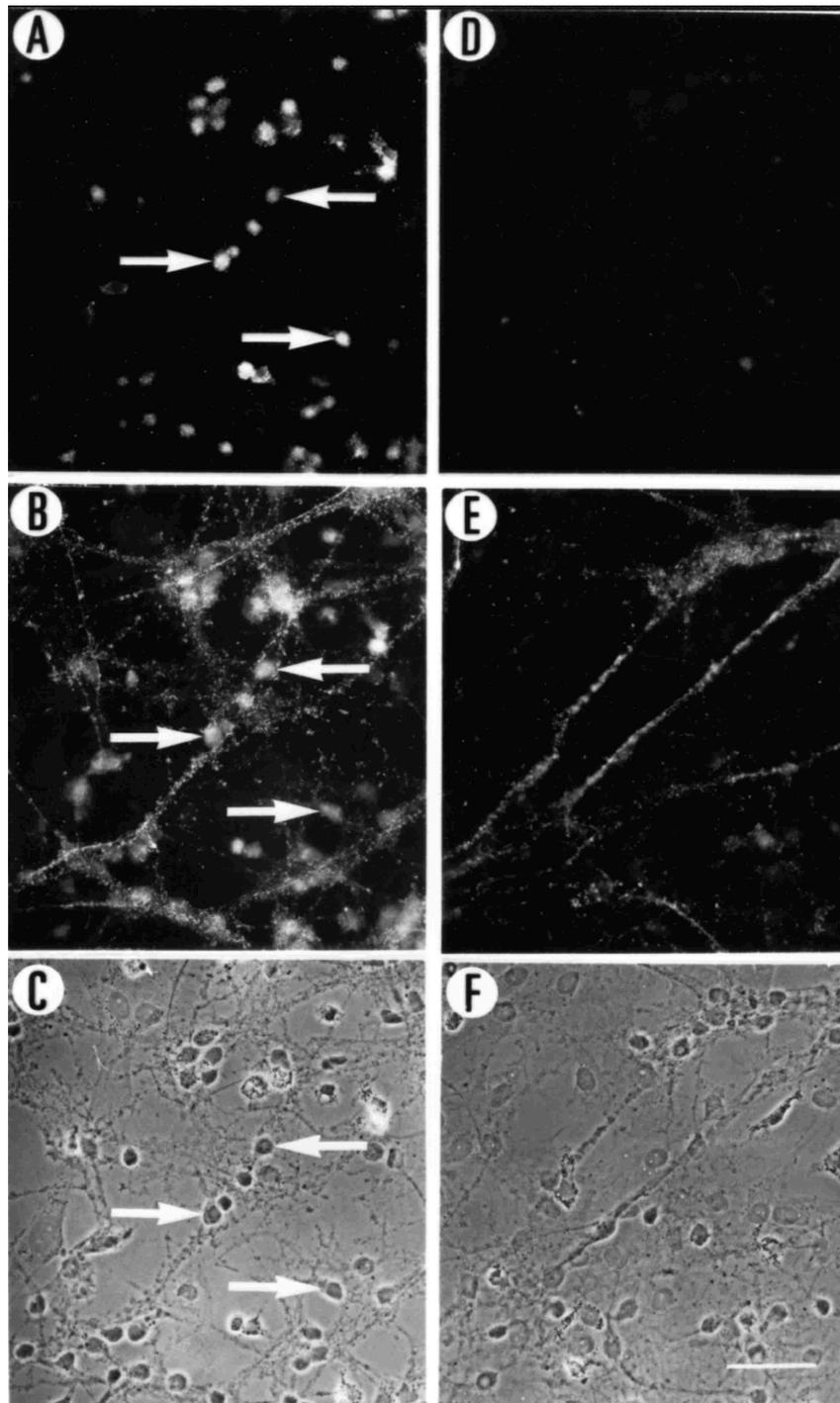


Abb. 25. Immunocytochemische Doppelmarkierung einer 7 d alten neuronenreichen Primärkultur mit anti-GR (1:400 verdünnt; A), nachgewiesen mit biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG/Streptavidin-Texasrot, und dem mit FITC-markiertem anti-Maus-IgG nachgewiesenen neuronalen Markerprotein GAP43 (B). Nahezu keine Immunanfärbung war nachweisbar mit Präimmunsereum (1:400) (D) in Kombination mit einer GAP43-Anfärbung (E). C und F zeigen Phasenkontrastaufnahmen der Zellen. Die Pfeile weisen auf die Colokalisation von GAP43 mit GR (A und B) hin. Der Balken in F entspricht einer Länge von 50 µm.

5.4. Suche nach Isoformen der Glutathionreduktase

Isoformen der GR wurden in *Pisum sativum* (Mullineaux et al., 1996) und *Zea mays* (Hull et al., 1997) gefunden. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch nicht bekannt, ob auch GR-Isoenzyme in Säugetieren vorkommen. Deshalb wurde mit Hilfe der für das Gehirnenzym entwickelten Methode (Abb. 6) die GR aus Rinderleber und aus den Erythrocyten des Rindes zur Homogenität gereinigt, um die drei gereinigten Enzyme untereinander vergleichen zu können.

5.4.1. Reinigung von Glutathionreduktase aus Leber und Erythrocyten des Rindes

Nur die Abweichungen vom Reinigungsschema der GR aus Rinderhirn (5.1.1.) sind im nachfolgenden detailliert beschrieben.

5.4.1.1. Reinigung der Glutathionreduktase aus Leber

Der Verlauf einer repräsentativen Reinigung der GR aus Leber ist in Tabelle 6 dargestellt. Im Vergleich zum Homogenatsüberstand gingen durch die fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung zwar 43 % der Ausgangsaktivität der GR verloren, gleichzeitig wurden aber auch 66 % des kontaminierenden Proteins beseitigt. Die nachfolgende Dialyse des resuspendierten 75 %-igen Niederschlages der Ammoniumsulfat-Fällung verringerte die Aktivität der GR allenfalls geringfügig. Bei der anschließenden Inkubation mit dem DEAE-Cellulose-Material im „batch“-Verfahren wurden ca 18 % Fremdprotein an das Austauschermaterial unter den gegebenen Bedingungen gebunden. Nach der fraktionierten Ammoniumsulfatpräzipitation, der Dialyse und der negativen Ionenaustauschchromatographie waren 75 % an Fremdprotein entfernt worden. Die Hälfte der Ausgangs-Aktivität an GR war noch vorhanden. Somit war nach diesem Schritt eine 2-fache Anreicherung des Enzyms erreicht.

Mittels Affinitätschromatographie wurden 99 % der noch vorhandenen Fremdproteine von der GR separiert, wobei der Anreicherungsfaktor im Vergleich zum vorhergehenden Schritt auf das 382-fache anstieg. Das erhaltene Elutionsdiagramm der 2',5'-ADP-Sepharose-Säule war dem der Reinigung aus Rinderhirn ähnlich (Daten nicht gezeigt). Es wurde aber durch den 1 M

ERGEBNISSE

NaCl-Puls weniger Fremdprotein und ein Drittel der GR-Aktivität eluiert. Nach Anlegen des linearen NADPH-Gradienten erschien das Maximum der GR-Aktivität bei einer NADPH-Konzentration von 0.13 mM. Die GR enthaltenden Fraktionen des Gradienten wurden vereinigt, Ammoniumsulfat wurde bis zu einer 80 %-igen Sättigung zugegeben und die Suspension zentrifugiert. Das Präzipitat der Zentrifugation wurde in einem kleinen Volumen des Puffers C (7.5.5.) resuspendiert und die Lösung auf die Superdex 200-Gelfiltrationssäule

Tabelle 6. Beispiel einer Reinigung der GR aus Rinderleber

Reinigungsschritt	Protein- gehalt (mg)	Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U x mg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Anreicher- ungsfaktor
<i>Homogenatsüberstand</i>	66000	3170	0.048	100	1
<i>Ammoniumsulfat- präzipitation (35-75 % Sättigung)</i>	22340	1810	0.081	57	1.7
<i>Dialysat</i>	19910	1740	0.087	55	1.8
<i>DEAE-Cellulose</i>	16340	1590	0.097	50	2.0
<i>2',5'-ADP-Sepharose</i>	9.5	348	36.7	11	764
<i>Ammoniumsulfat- präzipitat (80 % Sättigung)</i>	1.11	35.6	32.0	1.1	667
<i>Superdex 200</i>	0.084	9.7	116	0.3	2417
<i>Konzentrierung</i>	0.011	1.6	147	0.05	3063

Für die Reinigung wurden 720 g Rinderleber als Ausgangsmaterial eingesetzt.

aufgetragen. Von den drei Proteingipfeln im Elutionsprofil bei der GR-Reinigung aus Rinderhirn (Abb. 4) ist hier Gipfel 2 allenfalls zu erahnen. In Gipfel 3 wurde der überwiegende Teil der GR-Aktivität nachgewiesen (Abb. 26). Die spezifische Aktivität stieg durch die Molekularsiebchromatographie im Vergleich zum vorangegangenen Schritt auf das 3.8-fache an. Nur die GR-enthaltenden Fraktionen (69-75) wurden vereinigt und für die nachfolgenden Untersuchungen weiter verwendet. Konzentrierung mittels Microcon-30-Konzentratoren führte zu einem weiteren Anstieg des Reinigungsfaktors. Im Verlauf der Reinigung aus Leber

stieg die spezifische Aktivität der GR von 0.048 U/mg im Homogenatsüberstand auf 147 U/mg im gereinigten Enzym an. Dies entspricht einer Anreicherung der GR um den Faktor 3063.

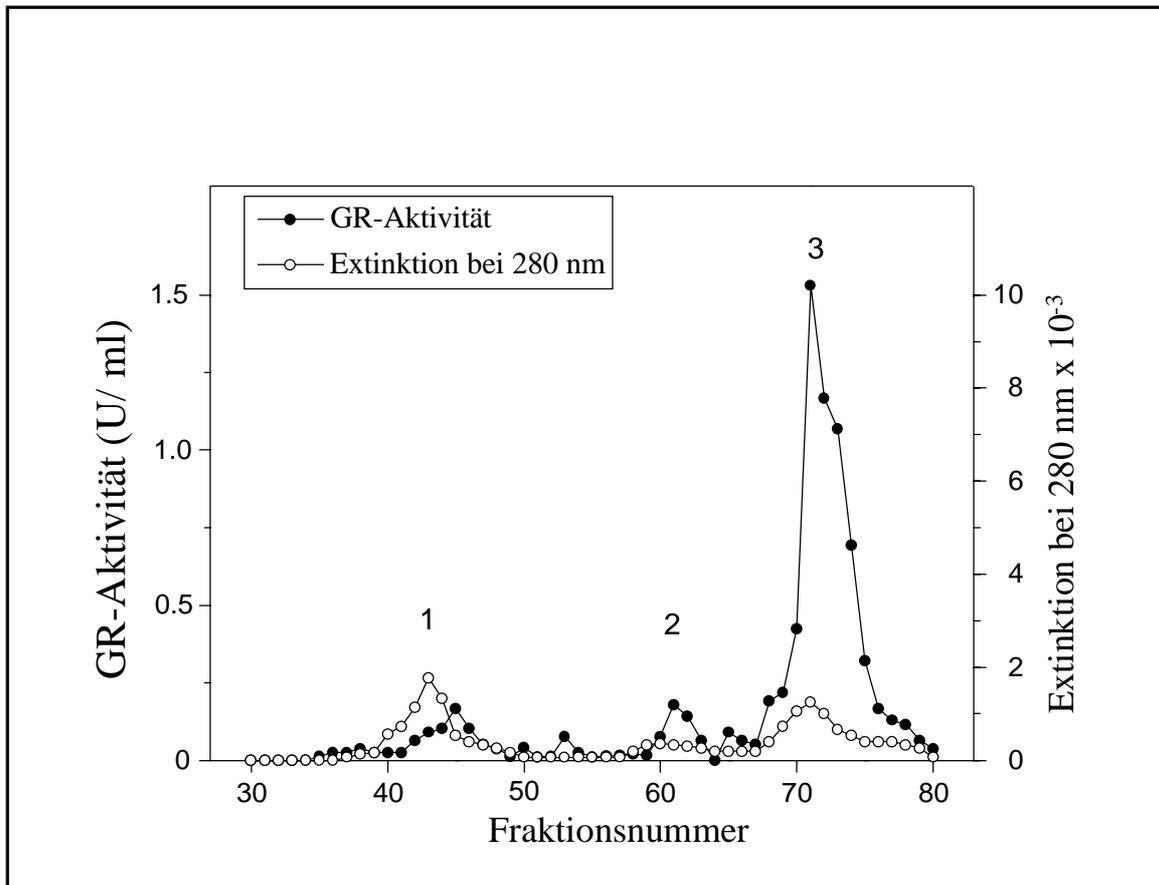


Abb. 26. Repräsentative Molekularsiebchromatographie an einer Superdex 200-FPLC-Säule. GR aus Rinderleber eluiert bei einem Elutionsvolumen von 71 ml (Gipfel 3). Gipfel 1 und 2 werden vermutlich von Aggregaten der GR verursacht. Säulenabmessungen: 60 cm x 1.6 cm; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Fraktionsgröße: 1 ml; aufgetragene Proteinmenge: 0.3 mg in 0.5 ml.

5.4.1.2. Reinigung der Glutathionreduktase aus Erythrocyten

Der Verlauf einer repräsentativen Reinigung der GR aus den Erythrocyten des Rindes ist in Tabelle 7 gezeigt. Erschwert wurde die Reinigung der GR durch Hämoglobin, dem Hauptprotein der Erythrocyten. Da dieses Protein bei 340 nm absorbiert, war eine zuverlässige Messung der Aktivität der GR in Rinderblut nicht möglich. Mit Hilfe eine Modifikation des

ERGEBNISSE

Verfahrens (7.5.1.) von Krohne-Ehrich et al. (1977), um die GR nicht länger als nötig den organischen Lösungsmitteln Chloroform/Butanol und Aceton auszusetzen, konnte nach der Chloroform/Butanol-Extraktion (Überstand 1) erstmals die Aktivität der GR genau bestimmt werden. Der Extrakt war zu diesem Zeitpunkt gelblich und nicht mehr tiefrot gefärbt. Die Acetonfällung (Überstände 2 und 3) entfernte 79 % an Fremdprotein ohne Verlust der GR-Aktivität. Der Aceton-Protein-Niederschlag wurde resuspendiert und über Nacht bei 4°C dialysiert. Bei den nachfolgenden Schritten (fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (35-75 %), erneute Dialyse und „batch-Verfahren“ am Anionenaustauscher) gingen nur 15 % an Aktivität verloren, insgesamt wurden aber 87 % des Proteins abgetrennt. Somit war das Enzym bereits 6.7-fach angereichert.

Tabelle 7. Beispiel einer typischen Reinigung der GR aus Erythrocyten des Rindes

Reinigungsschritt	Protein- gehalt (mg)	Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U x mg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Anreicher- ungsfaktor
<i>Überstand 1</i>	27380	57	0.0021	100	1
<i>Überstand 2 + 3</i>	6220	62	0.01	110	4.8
<i>Dialysat 1</i>	5740	59	0.01	104	4.8
<i>Ammoniumsulfat- präzipitation (35-75 % Sättigung)</i>	4240	60	0.014	106	6.7
<i>Dialysat 2</i>	4350	61	0.014	106	6.7
<i>DEAE-Cellulose</i>	3500	48	0.014	106	6.7
<i>2',5'-ADP-Sepharose</i>	0.79	24	30	42	14000
<i>Ammoniumsulfat- präzipitat (80 % Sättigung)</i>	n.d.	5	n.d.	8.8	n.d.
<i>Superdex 200</i>	0.077	3.25	42.2	5.7	20100
<i>Konzentrierung</i>	0.005	0.569	114	1	54300

Die Reinigung der GR erfolgte aus 780 ml Rinderblut. Überstand 1: Überstand der Chloroform/Butanol-Extraktion; Überstände 2+3: Resuspensionen und Lösung der durch Aceton gefällten Proteine.

ERGEBNISSE

Im Gegensatz zu den Reinigungen der GR aus Rinderhirn und -leber wurde hier dem Puffer der Affinitätschromatographie kein GSH zugesetzt, da dieses zu einem 67 %-igen Verlust der Aktivität führte (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe des Pulses von 1 M NaCl wurde etwa 30 % der GR-Aktivität von der Säule eluiert, wohingegen in diesem GR-Aktivitätsgipfel kaum Protein detektiert werden konnte (Abb. 27). Nach Anlegen des NADPH-Gradienten erschien das Maximum der GR bei einer NADPH-Konzentration von 0.11 mM. (Abb. 27). Ein Puls von 0.525 mM NADPH erbrachte keine weitere Elution der GR von der 2',5'-ADP-Sepharose-Säule. Durch die Affinitätschromatographie wurden 99 % des Fremdproteins abgetrennt. Der

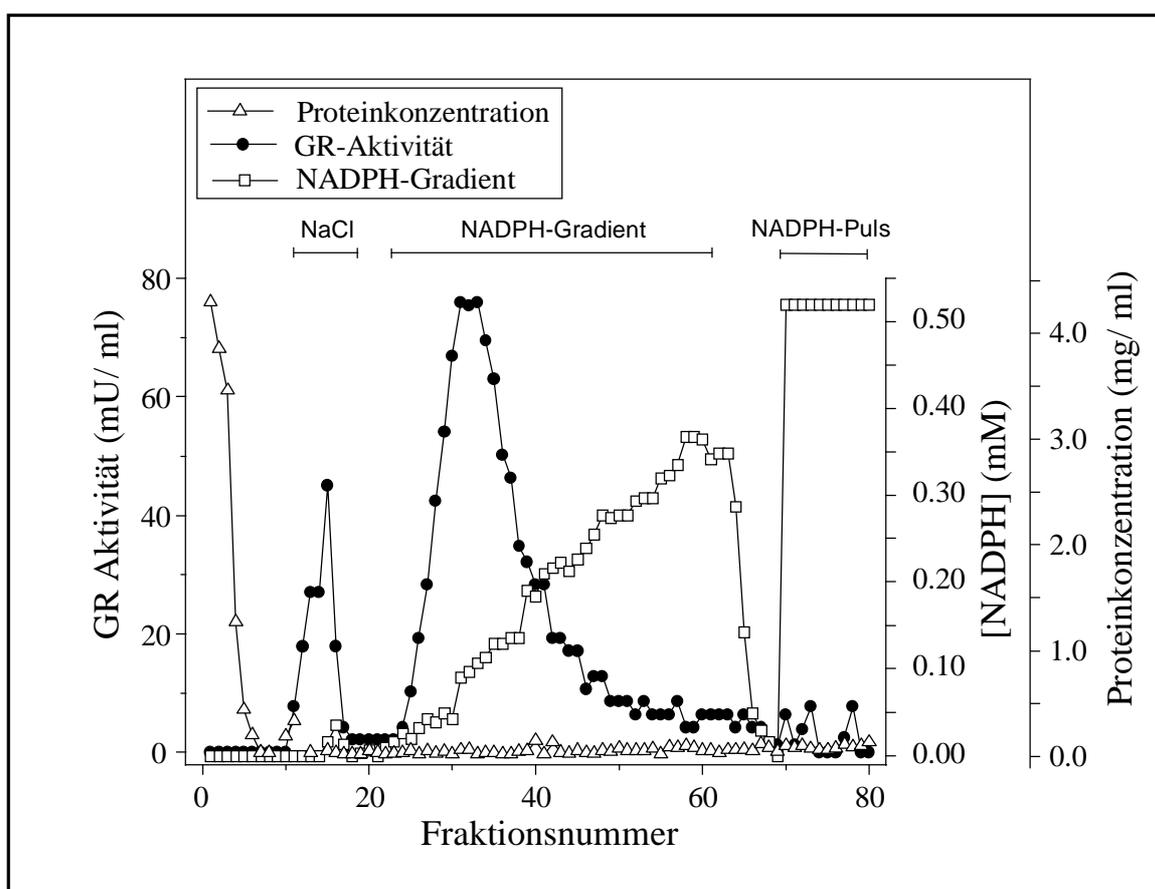


Abb. 27. Elution von GR aus Erythrocyten des Rindes von einer 2',5'-ADP-Sepharose-4B-Säule. Nach dem Waschen der Säule (6.8 cm x 1 cm) mit 1 M NaCl wurde GR mit einem linearen NADPH-Gradienten (0 - 0.5 mM) von der Säule eluiert. Fraktionsvolumen: 2.8 ml. Fließgeschwindigkeit: 0.7 ml/min. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 3.5 g in 480 ml DEAE-Cellulose-Überstand. Die Elutionspuffer enthielten kein GSH.

ERGEBNISSE

Anreicherungsfaktor stieg dabei um das 2090-fache gegenüber dem vorangegangenen Schritt an (Tabelle 7).

Da die GR-Aktivität-enthaltenden Fraktionen nur wenig Protein enthielten, wurde bei dem durch 80 %-ige Sättigung mit Ammoniumsulfat erhaltenen Niederschlag auf eine Proteinbestimmung verzichtet. Das in Puffer C (7.5.5.) gelöste Präzipitat dieser Fällung wurde auf eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule appliziert. Im Elutionsprofil waren 3 Proteingipfel zu erkennen, wobei nur derjenige mit einem Elutionsvolumen von 72 ml (Gipfel 3) GR-Aktivität aufwies (Abb. 28). Die GR-enthaltenden Fraktionen (69-75) wurden anschließend vereinigt;

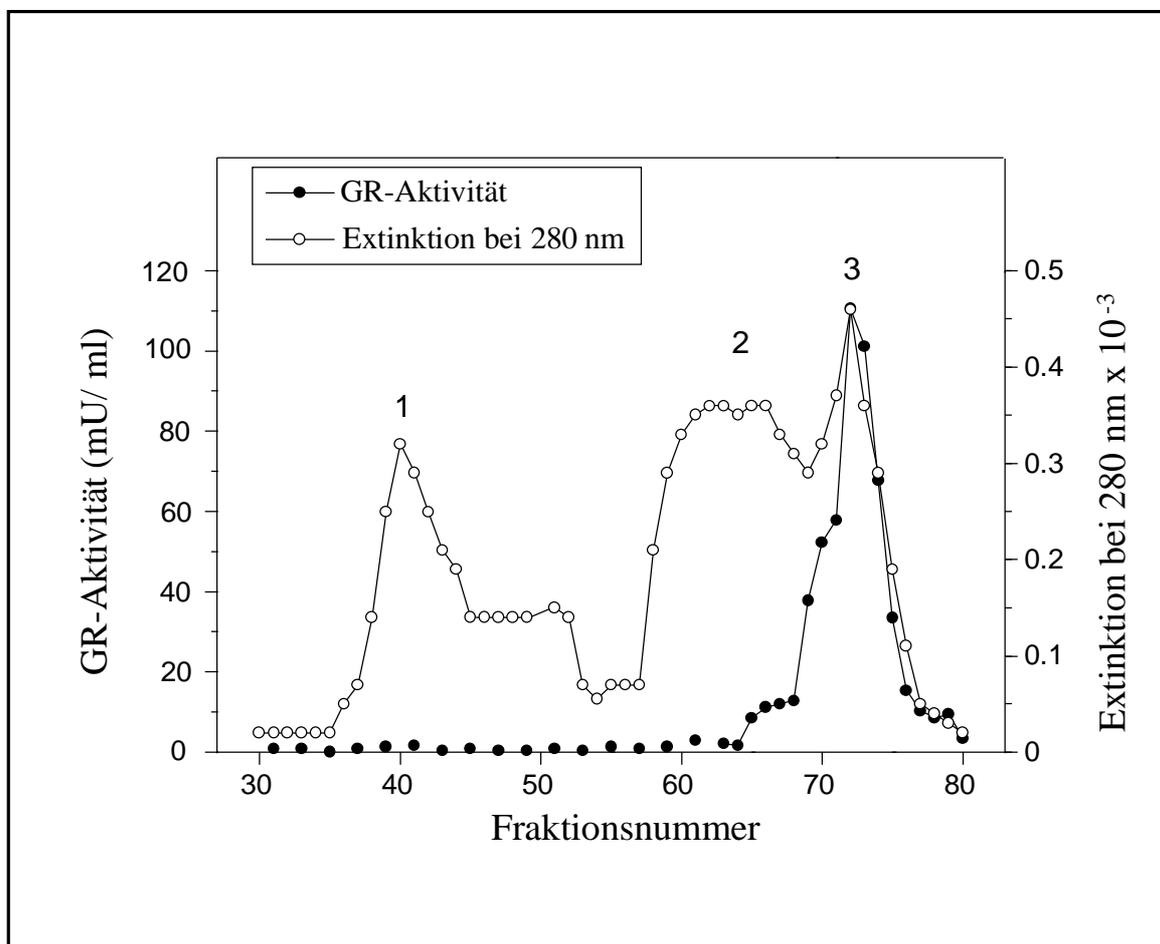


Abb. 28. Molekularsiebchromatographie an einer Superdex 200-FPLC-Säule.

Zu erkennen sind drei Proteingipfel, von denen nur der letzte Gipfel GR-Aktivität enthielt. Diese eluiert bei einem Elutionsvolumen von 72 ml. Säulenabmessungen: 60 cm x 1.6 cm; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Fraktionsgröße: 1 ml; aufgetragene Proteinmenge: 0.3 mg in 0.5 ml.

für die weiteren Untersuchungen des Proteins wurden aliquote Teile konzentriert. Im Verlauf der Reinigung wurde ein Anstieg der spezifischen Aktivität von 0.0021 U/mg im Extrakt der Chloroform/Butanol-Behandlung auf 114 U/mg im Ultrafiltrations-Konzentrat gefunden, was einem Anreicherungsfaktor von 54300 entspricht (Tabelle 7).

5.4.2. Vergleich der gereinigten Glutathionreduktasen aus Hirn, Leber und Erythrocyten

5.4.2.1. K_M -Werte für die Substrate

Über die biochemischen Eigenschaften der GR aus Gehirn ist wenig bekannt. Bisher wurden kinetische Daten nur für das Enzym aus Schafshirn bestimmt (Acan and Tezcan, 1991). Ein Vergleich der kinetischen Parameter von GR aus verschiedenen Organen einer Säugetier-Spezies wurde bisher nicht beschrieben. Somit war nicht bekannt, ob es diesbezüglich Unterschiede gibt. Aus diesem Grund wurden die K_M -Werte für die Substrate der gereinigten GR aus Hirn, Leber und Erythrocyten des Rindes bestimmt. Um identische Bedingungen für die Bestimmung der K_M -Werte der drei GR zu schaffen, wurden alle Untersuchungen am gleichen Tag mit denselben, verschieden konzentrierten Substrat-Lösungen durchgeführt. Für jede der GR wurden zur K_M -Wert-Bestimmung drei unabhängige Experimente in Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Zur Übersichtlichkeit werden hier exemplarisch die Ergebnisse von Experimenten für die GR aus Rinderhirn gezeigt (Abb. 29). Unter den gewählten Meßbedingungen zeigten alle gereinigten GR für beide Substrate, GSSG und NADPH, klassisches Michaelis-Menten-Verhalten. Nach Linearisierung der Daten nach Hanes (1932) wurden die K_M -Werte für die beiden Substrate berechnet (Tabelle 8). Die angegebenen K_M -Werte wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes durch Extrapolation gewonnen. Im Gegensatz zum K_M -Wert für GSSG lagen für das Substrat NADPH nur der K_M -Wert der Hirn-GR innerhalb des Bereiches der eingesetzten Substratkonzentration. Für das Substrat GSSG wurde ein signifikanter Unterschied im K_M -Wert für GR aus Hirn oder Leber im Vergleich zur GR aus Erythrocyten gefunden (Tabelle 8).

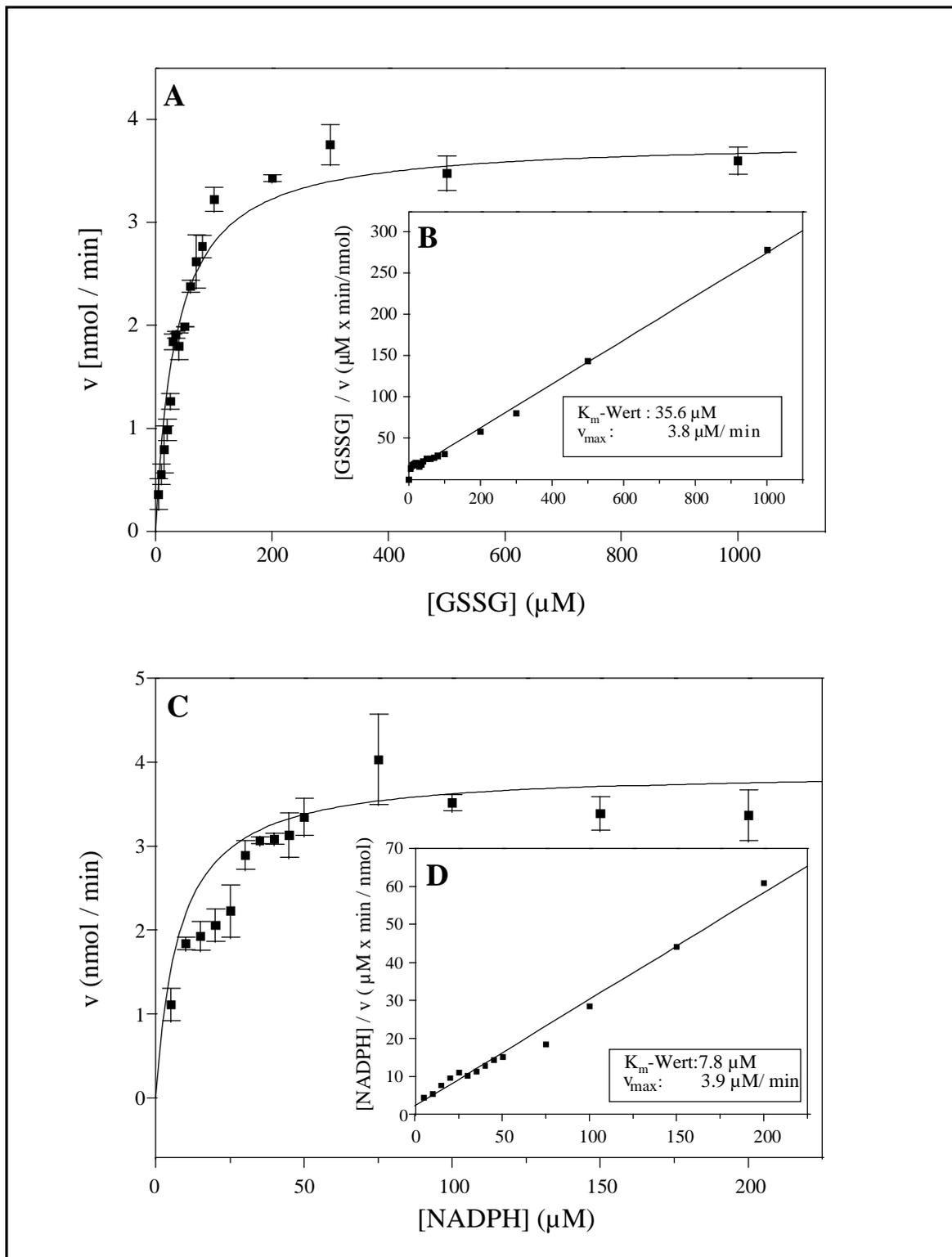


Abb. 29. Repräsentative Darstellung der Bestimmung des K_M -Wertes der GR aus Rinderhirn für GSSG (A, B) und NADPH (C, D). Die Daten stellen die Mittelwerte \pm S.D. der Enzymaktivitäten aus einem Experiment dar, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. A, C: Direkte Auftragung der Meßwerte. Die in A und C dargestellten Hyperbeln wurden mit Hilfe der durch Linearisierung nach Hanes (B, D) gewonnenen Parameter K_M -Wert und V_{max} berechnet.

Tabelle 8. K_M -Werte der gereinigten GR aus Hirn, Leber und Erythrocyten des Rindes für die Substrate GSSG und NADPH

GR gereinigt aus	K_M (NADPH) (μM)	K_M (GSSG) (μM)
<i>Gehirn</i>	8.1 ± 0.4	36.0 ± 3.1
<i>Leber</i>	(4.4 ± 2.6)	40.2 ± 6.3
<i>Erythrocyten</i>	(4.0 ± 1.3)	$23.0 \pm 2.6^*$

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm S.D. der Enzymaktivitäten aus jeweils drei unabhängigen in Dreifach-Bestimmung durchgeführten Experimenten. Die in Klammern gesetzte Werte liegen außerhalb des Bereiches der verwendeten Substratkonzentrationen (kleinste eingesetzte NADPH-Konzentration: 5 μM). Der K_M -Wert für GSSG der GR aus Erythrocyten war signifikant verschieden von dem für die GR aus Hirn oder Leber (* $p < 0.05$, ANOVA mit Bonferroni post hoc Test).

5.4.2.2. Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Um die Homogenität der gereinigten GR aus Leber und Erythrocyten des Rindes zu überprüfen und um das elektrophoretische Laufverhalten der denaturierten gereinigten GR aus den drei Organen miteinander zu vergleichen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden die drei Proben mit Mercaptoethanol reduziert, um schärfer fokussierte Banden zu erhalten. Die Silbernitratanfärbung der aufgetrennten Proteine zeigte jeweils nur eine Bande, die für die drei GR identische elektrophoretische Mobilität hatte. Die apparente Molekülmasse der Monomere lag für die GR aus den drei Organen bei ca. 52 kDa (Abb. 30).

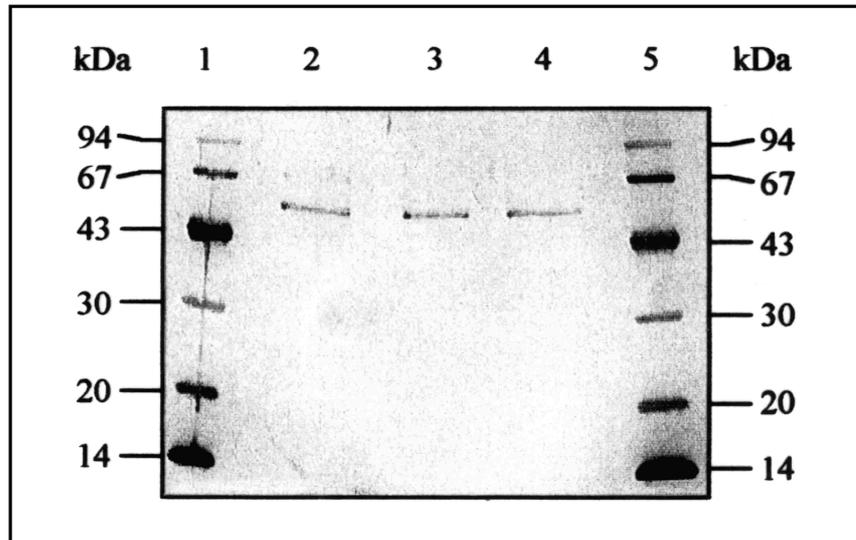


Abb. 30. SDS-PAGE der gereinigten GR aus Hirn, Leber und Erythrocyten des Rindes. Die Enzyme (jeweils 0.3 μg) wurden mit SDS und Mercaptoethanol denaturiert, auf einem 11 % Acrylamid enthaltenden Trenngel aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt. Bahnen 1 und 5: Markerproteine, 2: GR aus Leber; 3: GR aus Hirn; 4: GR aus Erythrocyten.

5.4.2.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Nach Auftrennung mit SDS-PAGE waren keine Unterschiede in den molekularen Massen der Untereinheiten der GR aus Gehirn, Leber und Erythrocyten des Rindes erkennbar (Abb. 30). Um Ladungsunterschiede zwischen den gereinigten GR feststellen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Celis (Department of Medical Biochemistry, Universität Århus, Dänemark) die gereinigten Enzyme einer zweidimensionalen (2D) Gelelektrophorese unterworfen. Bei der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese nach O'Farrell (1975) werden nach zwei verschiedenen Parametern, dem isoelektrischen Punkt in der ersten Dimension und der elektrophoretischen Beweglichkeit in der zweiten Dimension Proteine aufgetrennt. Auch nach 2D-Auftrennung waren keine Unterschiede in der Mobilität der GR in der Elektrophorese-Dimension festzustellen. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), zeigten die Gele für die drei GR das gleiche Muster von 5

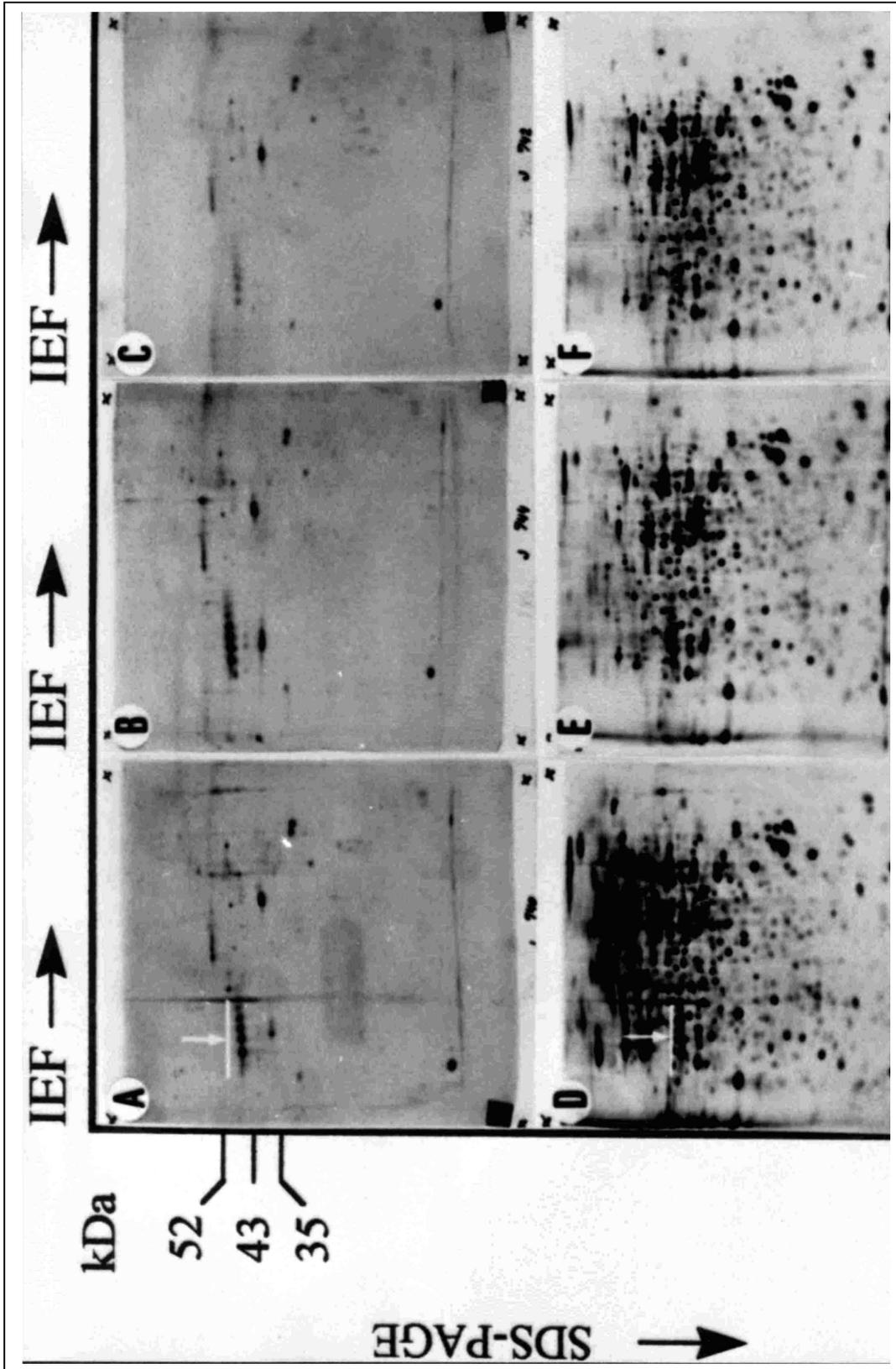


Abb. 31. 2D-Auftrennung der GR aus Hirn (A, D), Leber (B, E) und den Erythrocyten des Rindes (C, F). 1. Dimension, IEF: immobilisierter pH-Gradient 7.5-4. 2. Dimension: SDS-PAGE. Die Gele wurden mit Silbernitrat angefärbt (A-C). Den reinen Enzymen waren zur besseren Positionsbestimmung der GR-Flecke ein [³⁵S]Methionin markierter Tumorzellextrakt (1 µg Protein) beigefügt worden. D-F zeigen die Autoradiogramme zu A-C. Balken in A und D zeigen äquidistante Flecke in der ersten Dimension. Applizierte Proteinmenge: 0.2 µg. Die Autoradiogramme

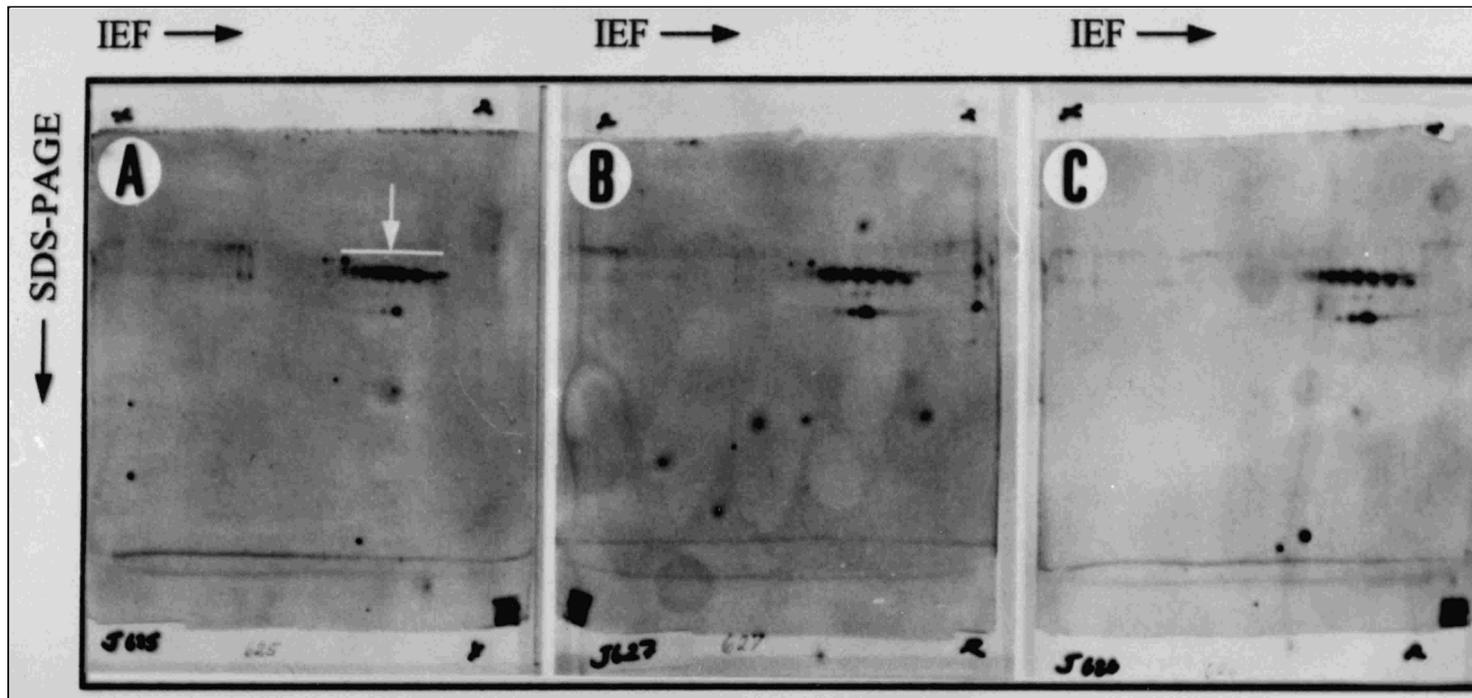


Abb. 32. 2D-Auftrennung von GR-Gemischen. A: Leber-GR und Erythrocyten-GR, B: Hirn-GR und Leber-GR; C: Leber-GR und Erythrocyten-GR. 1. Dimension: immobilisierter pH-Gradient 4. 2-7.5. Dimension: SDS-PAGE. Die Gele wurden mit Silbernitrat angefärbt. Geladene Proteinmengen: 0.2 μ g von beiden GR. Der Balken in A weist auf die äquidistanten Flecke der GR hin.

ERGEBNISSE

äquidistanten Flecken (Abb. 31A-C), das sich im alkalischen Teil des Gels befand. Den gereinigten GR waren [³⁵S]Methionin markierte Tumorproteine beigemischt worden, um die Position der aufgetrennten Proteine in verschiedenen 2D-Gelen besser miteinander vergleichen zu können. Auch im Vergleich der GR-Flecken zu denen der aufgetrennten markierten Proteine wurden keine Unterschiede für die drei GR festgestellt (Abb. 31D-F). Ebenso führte eine Mischung von jeweils zwei der gereinigten GR vor dem Auftrag auf ein 2D-Gel zu Mustern, die identisch waren zu denen der Einzelaufträge (Abb. 32A-C).

5.4.2.4. „Nativer Western Blot“

„Western Blot“-Experimente wurden durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Erkennung der gereinigten GR aus Hirn, Leber und Erythrocyten durch anti-GR nachzuweisen. Dazu wurden drei Proteinmengen (10 ng, 20 ng, 40 ng) der gereinigten nicht-denaturierten Enzyme auf ein 11 %-iges Trenngel ohne SDS aufgetragen. Nach Elektrotransfer wurden die

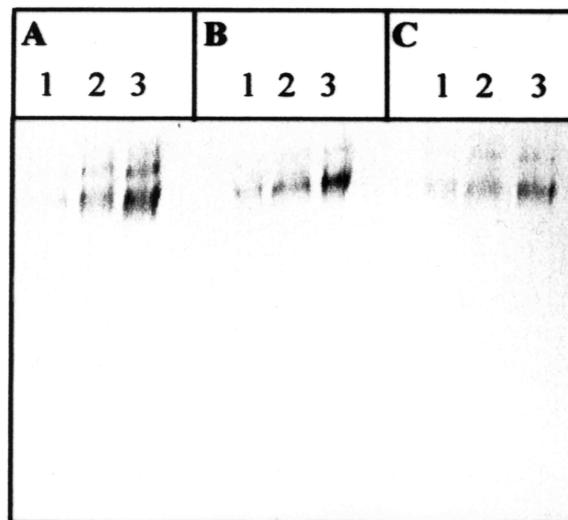


Abb. 33. „Nativer Western Blot“ der gereinigten GR aus Leber (A), Hirn (B), und Erythrocyten (C). Von der GR wurden jeweils 10 ng (1), 20 ng (2) oder 40 ng (3) appliziert.

Membranen mit anti-GR inkubiert. Nach Anfärbung der Proteinbanden konnten jedoch keine Unterschiede in den Intensitäten der Banden für gleiche Mengen an aufgetragener GR gefunden werden. Mit zunehmender Menge an aufgetragener GR wurde die Signalintensität

stärker. Der Nachweis von 10 ng GR (Abb. 33A1, B1, C1) war für die drei Enzyme kaum möglich, während bei 20 ng und 40 ng intensive Signale festgestellt wurden. Auch hinsichtlich der elektrophoretischen Mobilität der Enzyme waren nahezu keine Unterschiede zu erkennen.

5.4.2.5. „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“

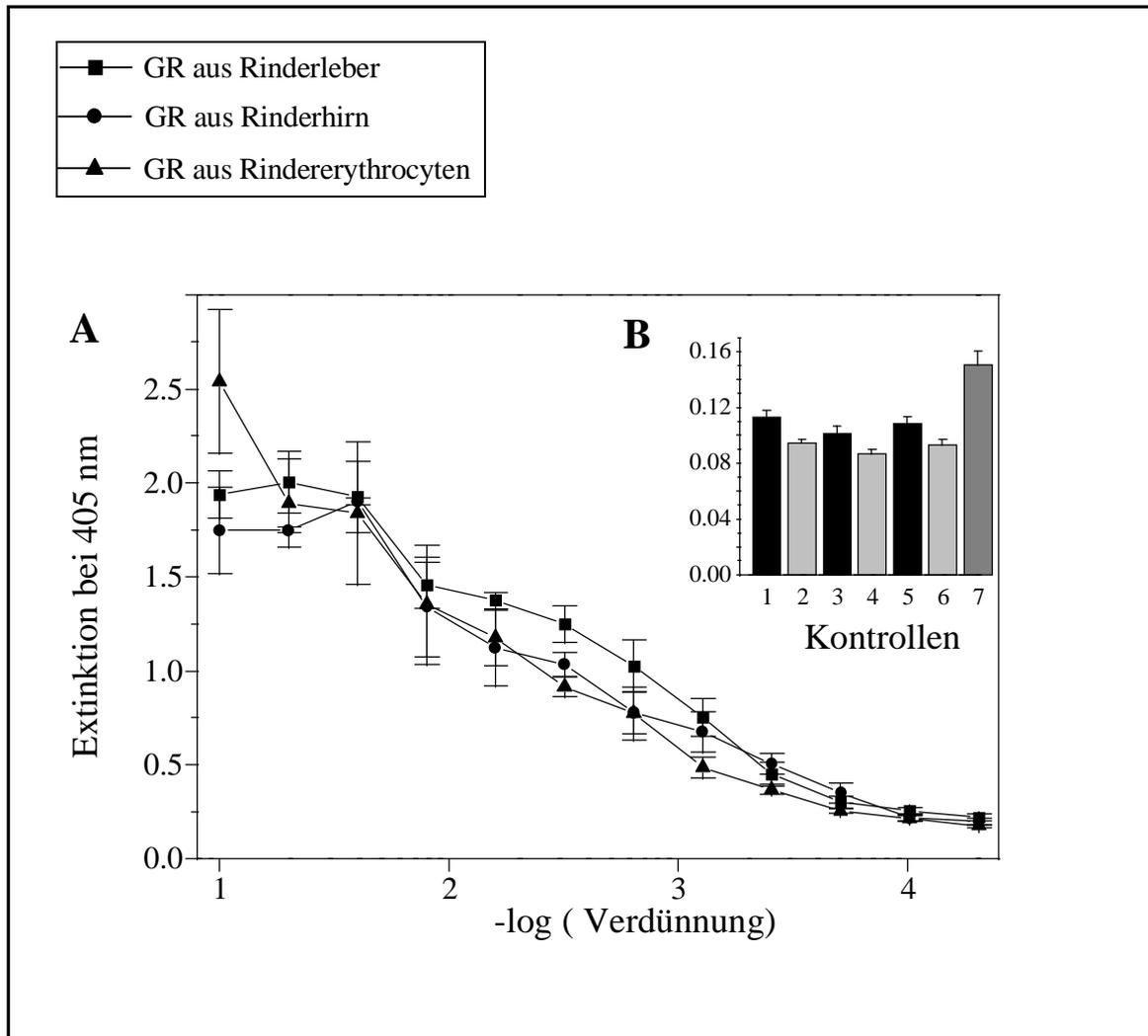


Abb. 34. Vergleich der GR aus Gehirn, Leber und Erythrocyten im ELISA unter Verwendung des gegen GR aus Hirn gewonnenen Antiserums (A). Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 100 ng eines der drei GR beschichtet. **Kontrollen (B):** 1, 2 Leber; 3, 4 Gehirn; 5, 6 Erythrocyten (1, 3, 5 ohne anti-GR, 2, 4, 6 ohne Sekundärantikörper); 7 ohne GR. Alle Proben wurden unter identischen Bedingungen behandelt. Die Extinktion wurde von allen Proben zum selben Zeitpunkt ermittelt. Die Daten wurden in einem Experiment gewonnen, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Zum Nachweis von Unterschieden in der Antigenität der drei gereinigten GR wurden ELISAs durchgeführt. Der Verlauf der erhaltenen Titerkurven war für die drei gereinigten GR nahezu identisch (Abb. 34A). Die Kontrollen zeigten nur eine geringe Extinktion, die deutlich unterhalb der der jeweiligen Proben lag (Abb. 34B).

5.4.2.6. Tryptischer Verdau der Glutathionreduktasen aus Hirn und Leber und Analyse tryptischer Peptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie

Eine sehr empfindliche Methode, Massen von Proteinen und Peptiden zu bestimmen, ist die Massenspektrometrie. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Felix Reutter (Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen) wurde die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) eingesetzt, nachdem durch tryptischen Verdau entstandene Peptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt worden waren. Diese Methode gewährleistet eine definierte und vollständige Desolvatisierung von Analytmolekülen, die in Lösung gebracht wurden. Außerdem gilt die ESI-MS als äußerst schonend. Beide Faktoren sind wichtige Voraussetzungen, um Proteine mit unbekanntem Eigenschaften zu untersuchen. Lyophilisierte GR aus Hirn und Leber wurde resuspendiert und mit Trypsin inkubiert. In einem zweiten Experiment wurde zusätzlich ein Gemisch der beiden GR im Verhältnis 1:1 tryptisch verdaut. Als Kontrolle wurde in beiden Experimenten Trypsin ohne GR unter identischen Bedingungen inkubiert. Die in den beiden Experimenten eingesetzten GR-Präparationen und die eingesetzten Proteinmengen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die entstandenen tryptischen Peptide wurden anschließend mittels der Umkehrphasen-HPLC chromatographisch aufgetrennt. Durch Kopplung von Chromatographie und ESI-MS konnte die Retentionszeit eines Peptides im UV-Chromatogramm direkt auf die jeweilige Masse im Totalionenstrom-(TIC)-Chromatogramm bezogen werden. Die dabei entstandenen Massen-Ladungs- (m/z)-Signale der tryptischen Spaltpeptide der GR wurden miteinander verglichen.

Tabelle 9. Übersicht über die in zwei tryptischen Spaltungsexperimenten eingesetzten Präparationen der GR aus Hirn und Leber

Quelle der GR	Verdau-Experiment	verwendete GR-Präparation(en)	für Verdau eingesetzte Menge an GR (µg)	Bezeichnung der Ansätze in Abb. 35 und 36
<i>Gehirn</i>	1	1	15	-
	2	2	17	A
<i>Leber</i>	1	3	15	-
	2	3	17	B
<i>Gehirn und Leber</i>	2	2 und 3	14 (7+7)	C

Durch Addition aller Ionensignale der während des Chromatographielaufes kontinuierlich aufgenommenen Massenspektren wurde der TIC für jede Retentionszeit erhalten. Die auf die HPLC-Säule applizierten tryptischen Verdauansätze führten zu deutlichen Signalen im TIC-Chromatogramm der HPLC-ESI-MS (Abb. 35A-C), während in der Kontrolle (Trypsin-Autolyse) keine Signale zu detektieren waren (Abb. 35D). Die Spektren für die tryptischen Peptide der GR aus Hirn und Leber waren sehr ähnlich. Eine Vielzahl von Peptidgipfeln eluierten bei nahezu identischen Retentionszeit (Abb. 35A-C).

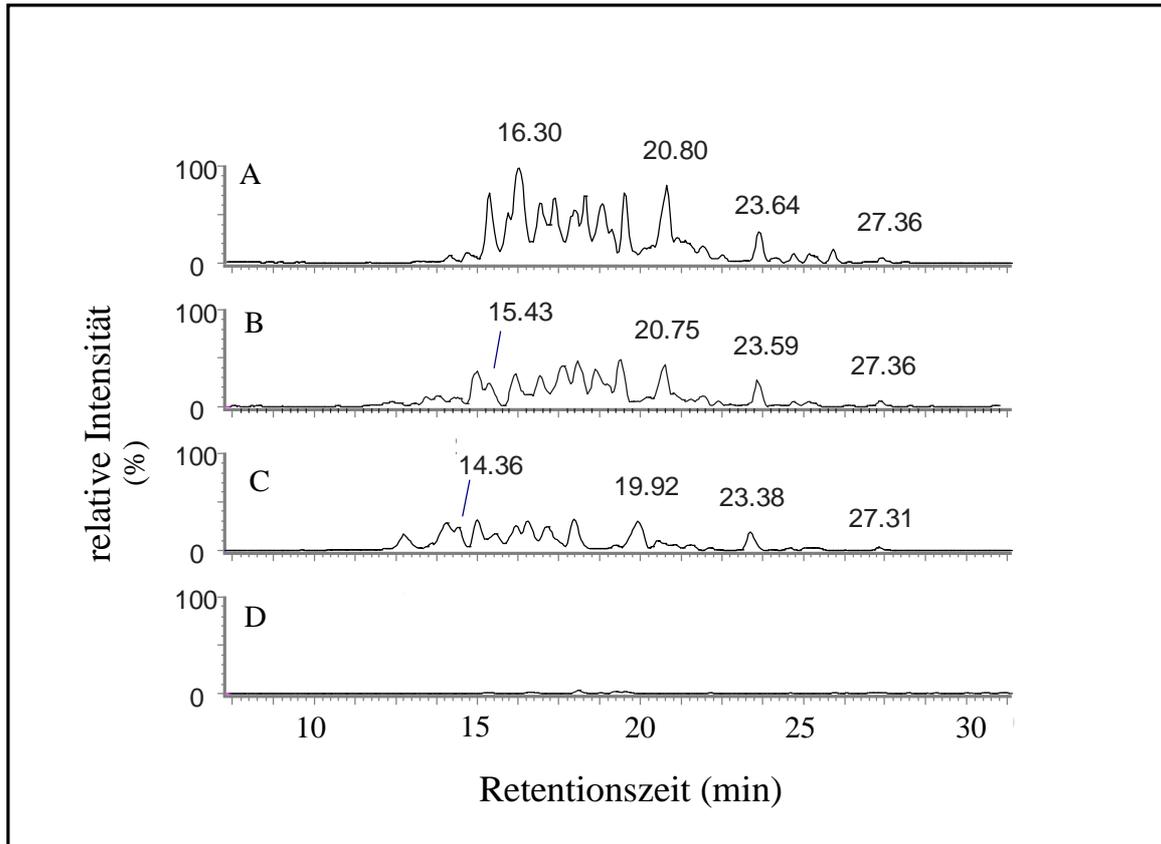


Abb. 35. HPLC-ESI-MS-Analysen tryptischer Peptide der GR aus Gehirn und Leber. Gezeigt werden die TIC-Chromatogramme der Analysen der tryptischen Verdauungsansätze des Experiments 2 von Gehirn-GR (A), Leber-GR (B), GR-Mischung (C) und der Trypsin-Autolysekontrolle (D). In den Chromatogrammen A-C sind korrespondierende Signale mit Retentionszeiten markiert. [modifizierte Abb. nach Reutter (1999)].

Um festzustellen, ob bei den tryptischen Verdauungen der beiden GR unterschiedlich große Peptidfragmente entstanden, wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes sämtliche erhaltenen Massen der jeweiligen HPLC-ESI-MS-Chromatogramme summiert. Somit wurde für jede HPLC-Auftrennung ein akkumuliertes ESI-MS-Spektrum der m/z -Ionenserien der detektierten tryptischen Peptide erhalten. Zum Vergleich der verschiedenen Ansätze wurden die so gewonnenen akkumulierten ESI-MS-Spektren übereinander gelegt (Abb. 36).

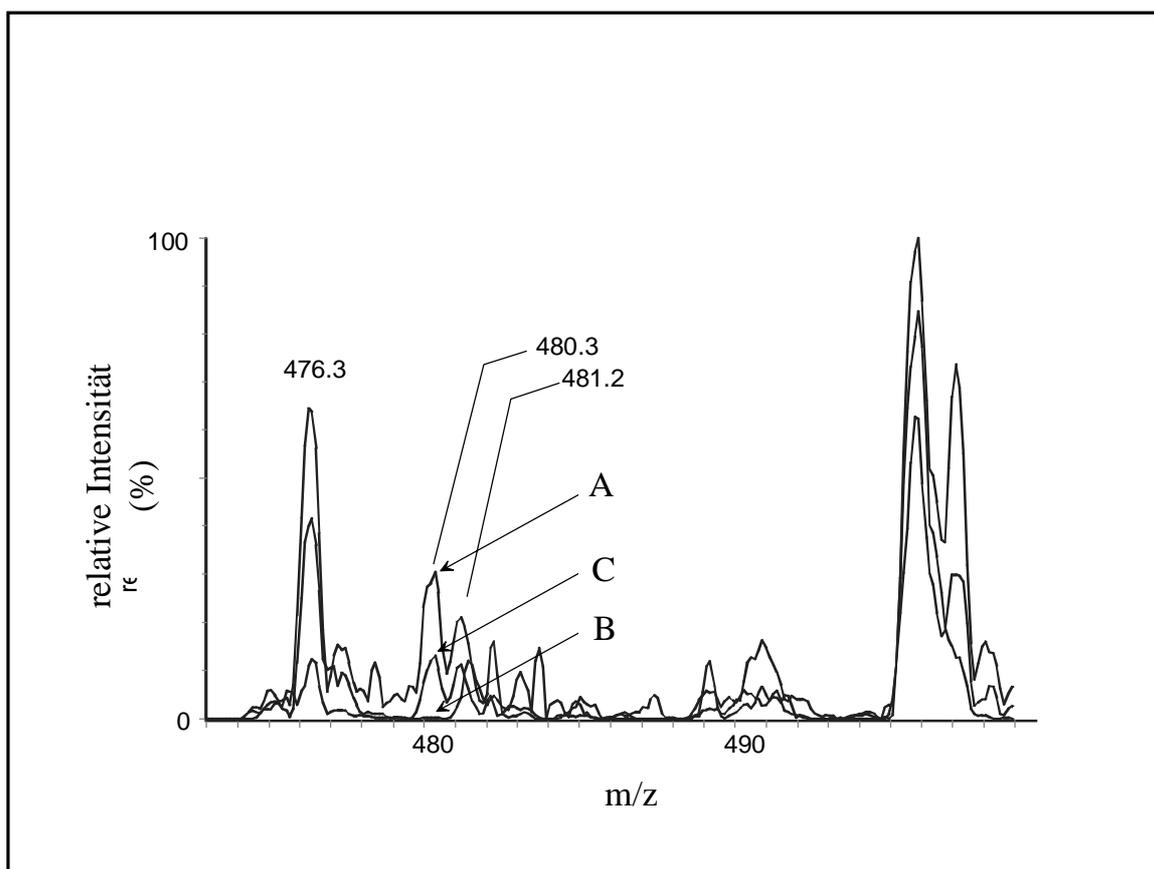


Abb. 36. Überlagerte Darstellung der akkumulierten ESI-MS-Spektren der tryptischen Verdau (Experiment 2) von Gehirn-GR (A), Leber-GR (B), GR-Mischung (C). Dargestellt ist der Bereich von 473 m/z bis 499 m/z. Besonders zu beachten ist m/z= 480.3. [modifizierte Abb. nach Reutter (1999)].

Während das Signal bei einer Masse von m/z= 480.3 im tryptischen Verdau von GR aus Gehirn (Abb. 36A) und in der GR-Mischung (Abb. 36C) deutlich erkennbar ist, fehlt dieses bei dem Verdau-Ansatz der GR aus Leber (Abb. 36B).

Signale mit nahezu identischen Massen können von verschiedenen tryptischen Peptiden stammen. Aus diesem Grund wurde erneut in den TIC-Chromatogrammen die Massen-Ladungssignale von m/z= 480.3 für die einzelnen Ansätze beider Experimente untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß im Chromatogramm des Verdau der GR aus Hirn und im GR-Gemisch ein TIC-Signal gefunden wurde, nicht aber in dem der GR aus Leber (Abb. 37). Das in Abb. 37 exemplarisch für eine Masse dargestellte Verfahren wurde auf sämtliche Signale der

ERGEBNISSE

akkumulierten ESI-MS Spektren angewandt. Dadurch wurde eine Vielzahl identischer Peptide identifiziert, aber auch weitere Unterschiede von Peptidmassen und Retentionszeiten für die GR

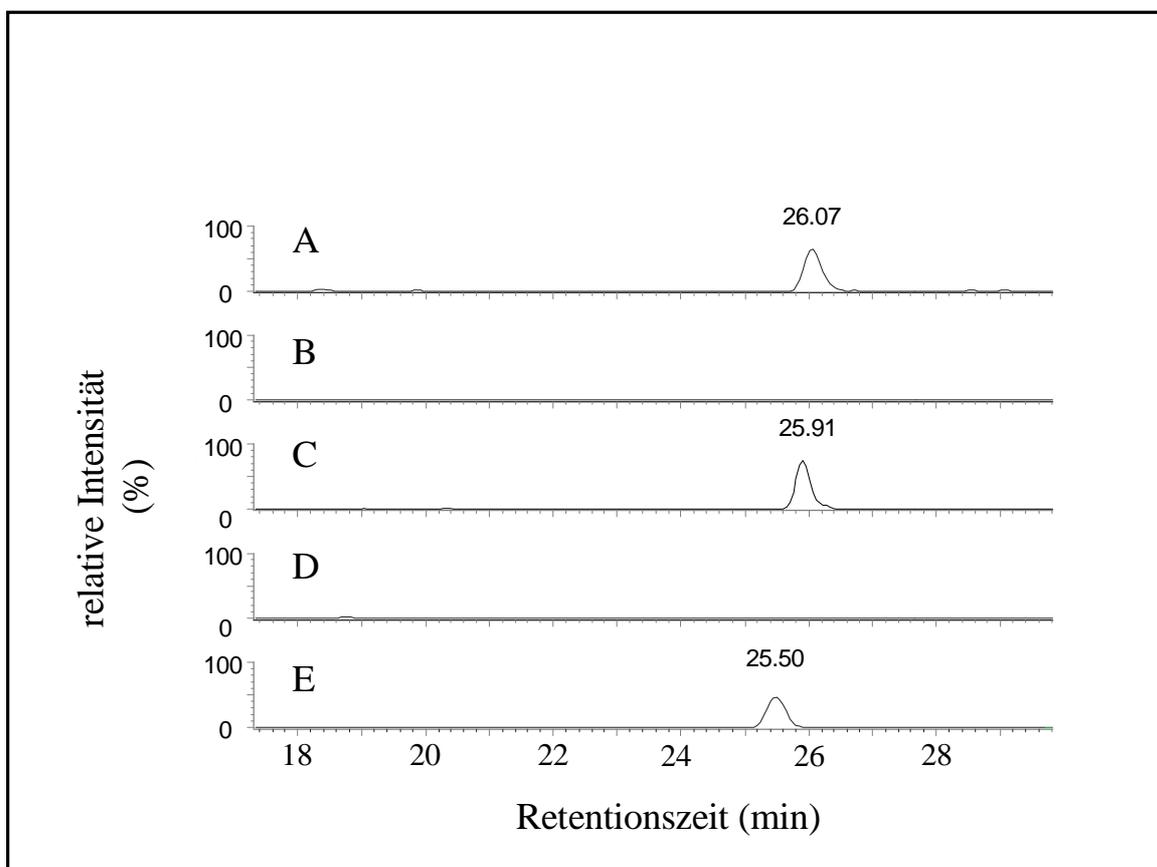


Abb. 37. TIC-Diagramme der Massenladungssignale von $m/z = 480.3$ von fünf HPLC-ESI-MS-Analysen. gehirn-GR (A) und Leber-GR (B) aus Experiment Nr. 1; Hirn-GR (C) und Leber-GR (D) und Gemisch aus Gehirn-GR und Leber-GR (E) aus Experiment Nr. 2. [modifizierte Abb. nach Reutter (1999)].

aus Hirn und Leber festgestellt werden (Tabelle 10). Dabei wurden in beiden Experimenten mehr Signale für die Gehirn-GR festgestellt. Im Experiment 2 wurden aufgrund der eingesetzten größeren Proteinmenge (Tabelle 9) mehr Signale bei Gehirn-GR und Leber-GR gefunden. Nur für Gehirn-GR konnten dabei drei Signale mit den Retentionszeiten 21.40 min, 19.19 min und 20.02 min ermittelt werden. Im Falle der Leber-GR wurde ein Peptid-Signal mit der Retentionszeit von 28.29 min nachgewiesen, das nicht in Gehirn-GR, wohl aber im GR-Gemisch vorhanden war.

ERGEBNISSE

Tabelle 10. Unterschiede in den Molekülmassen und Retentionszeiten tryptischer Peptide der GR aus Hirn und aus Leber

			Verdau-Experiment Nr.				
			2	1	1	2	2
			Retentionszeiten (min)				
Masse (Da)	z	m/z (gefunden)	GR-Mischung	Leber- GR	Gehirn-GR	Leber-GR	Gehirn-GR
458.8	1	459.8	n.n.		15.94		15.94
1079.2	2	540.6	n.n.	13.98		11.91	
1086.4	2	544.2	17.39		19.14		19.14
546.1	1	546.1	15.89		17.75		17.75
651.9	1	651.9	n.n.				21.40
717.3	1	717.3	15.53		17.33		17.54
2346.5	3	782.7	n.n.	26.43		26.43	
2518.6	3	839.5	17.59				19.19
868.8	1	868.8	n.n.		24.52		
1764.6	2	883.3	19.56		20.59		20.59
17771.0	2	886.5	19.59		20.59		20.59
2104.0	2	1053.0	23.90		24.10		24.10
2223.9	3	1112.0	19.81		20.74		20.80
2312.2	2	1157.1	28.24			28.29	
2503.9	2	1251.6	18.94		20.33		20.23
2507.7	3	1254.0	20.54		21.05		21.16
2600.0	2	1300.9	19.04				20.02
2713.1	3	1356.1	21.52		21.88		21.93

Aufgeführt sind die Molekülmassen der tryptischen Spaltpeptide, die entweder nur in den proteolytischen Ansätzen der GR aus Gehirn oder nur im Ansatz der GR aus Leber vorhanden waren. Dargestellt sind Ergebnisse aus zwei Experimenten. n.n.: nicht nachgewiesen. z = Ladung

6. Diskussion

6.1. Reinigung von Enzymen

6.1.1. Glutathionreduktase und Malatenzym

Das verwendete Verfahren erlaubte die Reinigung der GR aus Gehirn zur Homogenität. Zur vollständigen Fällung der GR mußte die Ammoniumsulfatkonzentration auf 75 % Sättigung erhöht werden, da bei der geringeren Konzentration von 55 % Ammoniumsulfat (Acan und Tezcan, 1989) noch 53 % an GR-Aktivität im Überstand verblieb. Auch auf den in dieser Publikation beschriebenen Hitzeschritt (1 Stunde bei 65 °C) wurde bei dem in vorliegender Arbeit beschriebenen Verfahren verzichtet und dafür eine negative Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose eingesetzt. Dieser Schritt erbrachte zwar nicht die Anreicherung, die für einen Hitzeschritt angegeben wurde (Acan und Tezcan, 1989), vermied aber hitzebedingte Veränderungen von Oberflächenepitopen der GR, z.B. Hydrolyse von Amidresten von Asparagin- und Glutaminresten in der Proteinkette und Umlagerungen zu β -Aspartyl-Isopeptiden (Vogel, 1997; Vogel et al., 1998). Thermische Behandlung von GR aus dem Cyanobakterium *Spirulina maxima* führte trotz hoher Hitzestabilität des Enzyms zu einer erhöhten Bildung von Sekundärstrukturen (Rojo-Dominguez et al., 1997). Hitzeschritte sind auch bedenklich, da bei erhöhter Temperatur die Aktivität von Proteasen kurzfristig ansteigen kann, die im Gehirn in großer Menge vorkommen (Kurz, 1992). Das kann zu Ausbeuteverlusten und zu Artefaktbildung führen (Scopes, 1989). Diese Gefahren sollten im Hinblick auf eine spätere Verwendung der gereinigten GR zur Gewinnung von Antiseren vermieden werden.

Der effizienteste Schritt in der Reinigung war die Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose, einem Säulenmaterial, das von Brodelius et al. (1974) eingeführt wurde und für die Reinigung NADP-abhängiger Dehydrogenasen und anderer Enzyme mit Affinität für NADP⁺ Verwendung findet. GR wurde erstmals von Mannervik et al. (1976) unter Verwendung von 2',5'-ADP-Sepharose aus Erythrocyten des Menschen gereinigt. Bei der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Reinigungsprozedur wurde als eluierendes Molekül NADPH verwendet, da GR mit NADPH in einem schmalen Gipfel von dem Affinitätsmaterial eluiert (Carlberg und

DISKUSSION

Mannervik, 1981). Entscheidend für die hohe Anreicherung der GR durch die Affinitätschromatographie war die Elution von Fremdprotein durch den Waschschrift mit 1 M NaCl (Craven et al., 1974). Ebenso war der Schutz vor Aktivitätsverlust durch Zusatz von GSH zum Elutionspuffer wichtig. GSH wurde in ähnlicher Konzentration bei der Reinigung der GR aus Schafshirn eingesetzt (Acan und Tezcan, 1989). Auf der Affinitätschromatographie-Säule blieben neben der GR zwei weitere Proteine gebunden, die durch den linearen NADPH-Gradienten nur partiell von der GR separiert werden konnten. Bei einem dieser Proteine handelte es sich um ME, welches die reversible Bildung von Pyruvat, Kohlendioxid und NADPH aus Malat und NADP^+ katalysiert. 2',5'-ADP-Sepharose wurde als Affinitätsmaterial zur Reinigung des ME von Yeung und Carrico (1976) erstmals eingesetzt. Auch für die Reinigung des ME aus Gehirn fand dieses Säulenmaterial bereits Verwendung und stellte wie auch in der vorliegenden Arbeit den effizientesten Schritt in der Reinigung des ME dar (Kurz et al., 1993; Bukato et al., 1995a,b; Vogel et al., 1998). Bei dem weiteren bisher unbekanntem, mit dem NADPH-Gradienten eluierten Protein muß es sich um eines handeln, welches hohe Affinität zu NADP^+ oder NADPH aufweist und eine Molekülmasse größer als 443 kDa besitzt.

Essentiell für die vollständige Auftrennung der drei Proteine, die von der 2',5'-ADP-Sepharose-Säule eluierten, war die nachfolgende Molekularsiebchromatographie. Die nach diesem Reinigungsschema gereinigte GR erreichte mit einer spezifischen Aktivität von 145 U/mg Protein einen Wert ähnlich zu dem der isolierten GR aus Schafshirn (193 U/mg; Acan und Tezcan, 1989). Mit einer spezifischen Aktivität des gereinigten ME von 40 U/mg führte die Anreicherung des ME mit dem für die GR entwickelten Reinigungsprotokoll zu ähnlichen Ergebnissen wie Vorschriften, die für die Reinigung der Isoformen des ME aus Rinderhirn optimiert worden waren (47.4 U/mg: Kurz et al., 1993; 71 U/mg: Vogel et al., 1998). Mit Hilfe der von Kurz (1992) eingeführten und von Vogel (1997) angewandten analytischen Ionenaustauschchromatographie zur Trennung des cytosolischen vom mitochondrialen ME konnte gezeigt werden, daß durch das hier beschriebene Reinigungsverfahren hauptsächlich die cytosolische Isoform des ME angereichert wurde.

Analyse der Reinheit und Bestimmung der Molekülmassen der gereinigten GR und ME wurden mit unterschiedlichen Methoden unternommen, die zu ähnlichen Ergebnissen führten. Die

DISKUSSION

gereinigte GR aus Rinderhirn ist ein Dimer (Gesamt-Molekülmasse 106 kDa). Mit Hilfe der SDS-PAGE (Fehlerbreite aufgrund von Proteinkonformations-Effekten $\pm 30\%$; Lehmann, 1996) wurde eine apparente Molekülmasse des Monomers von 55 kDa bestimmt, mittels der exakteren MALDI-MS (Präzision 0.01%; Lehmann (1996)) eine Molekülmasse von 53430 Da. Ähnliche Werte wurden für die GR aus Schweineerythrocyten (Boggaram et al., 1978), menschlichen Erythrocyten (Worthington und Rosemeyer, 1976), Mäuseleber (Lopez-Barea und Lee, 1979) und Kalbsleber (Carlberg und Mannervik, 1981) beschrieben. Ebenso liegt die Molekülmasse der GR-Untereinheit aus Rinderhirn im Bereich derjenigen, die aus der cDNA-Sequenz der menschlichen Erythrocyten-GR berechnet wurde (51698 Da, ohne FAD; Tutic et al., 1990). Bei den Proteinbanden mit höherer Molekülmasse, die in der SDS-PAGE in nicht-reduzierten Proben von gereinigter GR aus Rinderhirn beobachtet wurden, handelt es sich vermutlich um Aggregate, zu deren Bildung GR tendiert (Worthington und Rosemeyer, 1976). Diese Banden verschwanden durch Behandlung der GR mit Mercaptoethanol. Das GR-Dimer konnte mit allen verwendeten Methoden nachgewiesen werden, es wurden aber deutliche Unterschiede in der Molekülmasse gefunden. Bei der SDS-PAGE wurde eine um ca. 10 kDa niedrigere Masse bestimmt als mit der Molekularsiebchromatographie oder MALDI-MS. Grund dafür könnte sein, daß nicht-reduzierte und nicht genügend mit SDS denaturierte Proteine (z.B. Apolipoprotein A; Steele und Reynolds, 1979) verschiedene hydrodynamische Volumina zeigen, was ihre Mobilität im Gel beeinflusst. Die fehlende genaue Korrelation der Molekülmassen für das Mono- und Dimer der GR bei der Molekülmassenbestimmung mit MALDI-MS ist vermutlich auf die breiten Masse/Ladungs-Gipfel (wahrscheinlich hervorgerufen durch unterschiedliche Ladungszustände der GR, s. 5.4.2.3.) und damit auf die ungenauere Berechnung mit dem „software“-internen Berechnungsprogramm zurückzuführen.

Für das gereinigte ME zeigte sich in der SDS-PAGE, daß dieses Enzym mit Hilfe der Molekularsiebchromatographie vollständig von der GR separiert war. Aufgrund des Fehlens von Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten, war die Molekülmasse mit und ohne Reduktionsmittel jeweils 61 kDa (SDS-PAGE). Durch MALDI-MS wurde eine Molekülmasse von 63982 Da pro Untereinheit ermittelt. Damit liegen die gefundenen Molekülmassen im Bereich derjenigen, die für die Isoformen des ME aus Rinderhirn beschrieben worden sind (60 kDa: Kurz et al., 1993; 64 ± 2 kDa: Vogel et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde durch analytische Molekularsiebchromatographie die Molekülmasse des Homotetramers des

ME mit 263 kDa bestimmt, obwohl bei einer Temperatur (4°C) gearbeitet wurde, die zur Dissoziation des ME in enzymatisch aktive Monomere und Dimere führt (Huang und Chang, 1992). Eine ähnliche Masse (235 kDa) wurde durch Molekularsiebchromatographie an Superose TM 12 für das cME gefunden (Kurz et. al, 1993). Ursache für das Fehlen des Signals für das Homotetramer von ME bei der MALDI-MS ist vermutlich auf das Lösen des ME in 0.1 % TFA/Acetonitril und das Einbetten in die Sinapinsäurematrix zurückzuführen. Beides sind saure Bedingungen, bei denen Proteine mit hoher Molekülmasse und einem Aufbau aus mehreren nicht kovalent verbundenen Untereinheiten leicht denaturieren können (Lehmann, 1996). Das Auftreten des Homotrimers zeigt aber dennoch, daß die Pulslänge (Nanosekundenbereich) und die Energie des Laser von 6.2 µJ bestmöglichst gewählt waren.

6.1.2. Glutathionreduktasen aus Leber und Erythrocyten

Mit dem Reinigungsschema, welches für die GR aus Rinderhirn entwickelt worden war, ließ sich ebenfalls die GR aus Rinderleber isolieren. Die dabei erreichte spezifische Aktivität von 147 U/mg Protein liegt im Bereich der des gereinigten Enzyms aus Kaninchen (180 U/mg; Zanetti, 1979), Maus (158 U/mg; Lopez-Barea und Lee, 1979) und Ratte (190 U/mg; Carlberg und Mannervik, 1981). Die Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose stellte erneut den entscheidenden Schritt der Reinigung dar. Der erzielte Anreicherungsfaktor (764-fach) ist ähnlich demjenigem bei der Reinigung des Kalbsleberenzym (858-fach, Affinitätschromatographie Nr.1 des Reinigungsprotokolls; Carlberg und Mannervik, 1981). Die Molekülmasse der Untereinheiten der GR aus Rinderleber (52 kDa) befindet sich im Bereich der in der Literatur angegebenen Daten für die gereinigte GR aus diesem Organ (44 kDa, Mize und Langdon, 1961; 50 kDa, Carlberg und Mannervik, 1981; 56 kDa, Zanetti, 1979).

Als eine weitere Quelle zur Reinigung der GR wurden Erythrocyten verwendet. Reinigungen der GR aus Erythrocyten verschiedener Spezies, insbesondere auch des Menschen, sind mehrfach beschrieben worden (Staal et al., 1969; Mannervik et al., 1976; Nakashima et al., 1976; Boggaram et al., 1979). Hauptproblem dieser Reinigungen war das Entfernen des Hämoglobins, des Hauptbestandteils der Erythrocyten. Es wurde dazu ein Verfahren angewendet, das von Scott (1976) erstmals beschrieben und von Krohne-Ehrich et al. (1977)

DISKUSSION

modifiziert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden die Schritte für die GR aus Rindererythrocyten weiter modifiziert. Die Chloroform/Butanol-Behandlung war ein sehr effektiver Schritt zur Lyse der Erythrocyten und zur Ausfällung des Hämoglobins. Gleichzeitig wurde die GR in Lösung überführt. Dieser Schritt stellt einen kritischen Punkt dieser Reinigung dar, da durch zu langsames Rühren das Hämoglobin teerartig verklumpen kann. Da im Vollblut die Aktivität der GR nicht exakt bestimmt werden konnte, ist der Aktivitätsverlust der GR bei diesem Schritt nicht zu quantifizieren. Für die GR aus menschlichen Erythrocyten wird bei diesem Schritt ein Verlust von 39 % gefunden (Krohne-Ehrich et al., 1977). Da die GR sich in der organischen Phase der Extraktion wiederfand, muß das Protein eine vorwiegend unpolare Oberfläche besitzen. Die zur Volumenreduzierung angewendete Acetonfällung führte zu einer effizienten Abtrennung von Fremdprotein ohne GR-Aktivitätsverlust. Somit scheint entgegen früheren Annahmen (Rall und Lehninger, 1952) GR ein sehr stabiles Enzym zu sein.

Die anschließende fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung, die im Bereich von 35 % - 75 % Sättigung für das Hirn und Leberenzym bereits erfolgreich angewendet wurde, war ebenso für das Erythrocytenenzym geeignet. Die Affinitätschromatographie war erneut der effizienteste Schritt der Reinigung (14000-fache Anreicherung). Ähnliche Anreicherungen wurden bei den Reinigungen der GR aus den Erythrocyten von Mannervik et al. (1976) und Krohne-Ehrich et al. (1977) erzielt. Im Gegensatz zur Reinigung der GR aus Hirn und Leber wurde bei der Affinitätschromatographie der GR aus den Erythrocyten auf den Zusatz von GSH in den Elutions- und Waschpuffern verzichtet. Die beschriebene protektive Wirkung von GSH auf die GR-Aktivität (Boggaram et al., 1979) konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr wurde nach Zugabe von GSH ein Aktivitätsverlust (66 %) beobachtet. Durch die nachfolgende Molekularsiebchromatographie und Ultrafiltration wurde reine GR mit einer spezifischen Aktivität von 114 U/mg nach 54000-facher Anreicherung erhalten. Diese Resultate sind ähnlich zu beschriebenen Resultaten für die GR aus Erythrocyten (165 U/mg, 47000-fach: Staal et al., 1969; 240 U/mg, 39000-fach: Worthington und Rosemeyer, 1974; 125 U/mg, 78000-fach: Mannervik et al., 1976). Die gefundene Molekülmasse von 52 kDa liegt im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte (50 kDa) für das Erythrocyten-Enzym (Worthington und Rosemeyer, 1975; Krohne-Ehrich et al., 1977).

Ein Lagerungsexperiment mit der GR aus Leber und die Erfahrungen mit der GR aus Gehirn zeigten, daß für die GR eine Lagerung bei 4°C, in Gegenwart von Natriumazid als antibakteriellen Agenz (7.5.9.), optimal ist. Diese Lagerung wurde auch für die GR aus Kalbs- und Rattenleber (Carlberg und Mannervik, 1985) und für die GR aus menschlichen Erythrocyten (Krohne-Ehrich et al., 1977) beschrieben. Deshalb wurden alle gereinigten GR bei 4°C gelagert. Einfrieren der gereinigten GR führte - wie in der Literatur beschrieben - zu Verlust der Aktivität (Zanetti, 1979; Carlberg und Mannervik, 1981). Die Organe, aus denen das Enzym gereinigt werden sollte, wurden dagegen bei -20°C gelagert, wie von Zanetti (1979) und Carlberg und Mannervik (1981) empfohlen. Die gereinigte GR scheint demnach ein äußerst gefrierempfindliches Enzym zu sein, ähnlich der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (Bixel, 1998), wohingegen Hitzeschritte während der Reinigung (Zanetti, 1979; Acan und Tezcan, 1989) und Denaturierungsexperimente (Lopez-Barea und Lee, 1979; Mata et al., 1984) kaum zu Aktivitätsverlusten führten. Ob bei solchen Experimenten die GR in nativer Konformation vorliegt, kann angezweifelt werden, da enzymatisch aktive GR extrem instabil in ihrer Struktur sein kann (Krauth -Siegel, 1985).

6.2. Gewinnung von Antiseren gegen die Glutathionreduktase aus Rinderhirn

6.2.1. Herstellung der Antiseren

Da das Immunsystem bereits kleinste Mengen an Antigen wahrnehmen kann, muß Gewißheit über die Reinheit des für die Immunisierung zu verwendenden Antigens bestehen (Cooper, 1981). Aus diesem Grund wurde die Reinheit der GR im SDS-Polyacrylamid-Trenngel nicht mit Coomassie-Anfärbung, sondern mit Hilfe der 10 bis 50-fach sensitiveren Silbernitratfärbung (Goldenberg, 1990) überprüft. Da keine Kontamination der GR-Präparation erkennbar war, wurde die gereinigte GR zur Immunisierung eingesetzt.

Die richtige Dosis eines Immunogens ist entscheidend für die Stärke der Immunantwort. Bei zu geringen Mengen an Proteinantigen wird keine Immunreaktion ausgelöst. Oberhalb einer bestimmten Schwelle nimmt die Reaktion proportional zur verabreichten Menge bis zum Erreichen eines Plateaus zu, sinkt dann aber bei sehr hohen Dosen wieder ab. Auch die Art der

Verabreichung eines Antigens beeinflusst Stärke und Art der Antwort. Subcutan injizierte Antigene lösen im allgemeinen die stärkste Reaktion aus (Janeway und Travers, 1995). Die in der vorliegenden Arbeit für Kaninchen gewählten Antigenmengen (Hurn und Chantler, 1980), die subcutane Injektion in den Nackenbereich der Kaninchen und die empfohlenen Immunisierungszeiten (Herbert, 1978) führten zu hohen Antikörpertitern in beiden Kaninchen. Auch der Verlauf der Entwicklung der Titer in beiden Kaninchen war nahezu simultan. Der Kurvenverlauf des Titers bei Kaninchen 40650 folgt nach der ersten Auffrischimmunisierung einer von Heidelberger und Kendall (Linke, 1998) beschriebenen Kurve. Das weist darauf hin, daß bei einer Verdünnung des Antiserums von 1:900 die an den Kunststoff der Mikrotiterplatte gebundene GR-Menge mit dem GR-Antikörper optimal verbunden ist. Bei den Titerkurven des Kaninchens 40696 konnte ein solcher Kurvenverlauf nicht gefunden werden. Die Antikörper-Antigen-Komplexe sind demnach bereits bei geringerer Verdünnung optimal miteinander verbunden.

Große und komplexe Proteine, die Aggregate bilden, führen leichter zu Immunantworten als kleine Proteine (Janeway und Travers, 1995). Die Molekülmasse von ca. 100 kDa der nativen GR und ihrer Tendenz zur Aggregatbildung (Worthington und Rosemeyer, 1976) dürften zu der starken Immunantwort beigetragen haben. Die Qualität des Antikörpers im Antiserum aus Kaninchen 40650, welches für die weiteren immunologischen Untersuchungen verwendet wurde, war bereits so hoch, daß die Antikörper nicht gereinigt werden mußten. Das Antiserum konnte mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden, ohne daß in den verwendeten immunologischen Techniken der Nachweis der GR merklich beeinträchtigt wurde. Grund dafür dürfte sein, daß Antikörper im Antiserum, d.h. in ihrer „natürlichen Umgebung“ am stabilsten sind. Das verhindert das Aggregieren der Antikörper und damit den Verlust von Antikörpern durch Anhaften an Plastikoberflächen der Aufbewahrungsgefäße (Linke, 1998).

6.2.2. Untersuchung der Spezifität eines der Antiseren

Zur Überprüfung der Monospezifität des gewonnenen Antiserums gegen die GR aus Rinderhirn wurden „Western-Blot“-Analysen durchgeführt. Das von Burnette (1981) beschriebene Verfahren des „Western-Blots“ konnte in seiner ursprünglichen Form nicht erfolgreich zum Nachweis der GR angewendet werden. Wurden SDS-denaturierte Proteine

DISKUSSION

elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf die Nitrocellulosmembran überführt, so wurden bei Anfärbung mit anti-GR keine deutlichen Signale mit dem Indikatorantikörper erkennbar. Wurden die Proben jedoch nicht denaturiert, war eine spezifische Bande im Homogenat des Rinderhirns nachweisbar, deren Mobilität identisch war mit derjenigen der zur Positivkontrolle aufgetragenen reinen GR aus Rinderhirn. Somit wird das denaturierte Enzym von den Antikörpern des Antiserums in den eingesetzten Verdünnungen nicht erkannt, im Gegensatz zu der in nativer Konformation vorliegenden GR. Ursache dafür könnte sein, daß bei der Immunisierung vor allem native GR in die Kaninchen injiziert wurde.

Bei Verwendung des Präimmunserums wurde keine Anfärbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine im „nativen Western-Blot“ beobachtet. Somit sind im Präimmunserum des Kaninchens wahrscheinlich keine Antikörper gegen die GR vorhanden, eine Vermutung, die durch die Ergebnisse im ELISA gestützt wurde. Ein weiterer Beweis für die Spezifität des Antiserums ist der Verlust des Nachweises der Proteinbande im „nativen Western-Blot“ nach Vorinkubation der anti-GR-Lösung mit einem Überschuß an reiner GR. Dieses Resultat zeigt überzeugend, daß es sich bei der im Homogenat angefärbten Bande um GR und nicht um ein anderes Protein gleicher Molekülmasse handelt, mit dem die Antikörper kreuzreagieren.

Mit dem Antiserum wurde auch die GR aus anderen Rinderorganen im „nativen Western-Blot“ nachgewiesen; in den Homogenatüberständen von Herz und Leber wurden Signale mit gleicher Mobilität gefunden. Somit scheinen keine großen Epitop-Unterschiede aufgrund ausgetauschter Aminosäuren auf der Oberfläche der GR verschiedener Organe vorhanden zu sein. Die Unterschiede in den Intensitäten der angefärbten Banden bei Auftrennung gleicher Mengen an Protein beruhen auf den unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der GR in den einzelnen Organen.

Auch im Rattenhirn konnte mit anti-GR im „nativen Western-Blot“ GR nachgewiesen werden. Die beobachtete geringe Nachweisempfindlichkeit für die GR aus Rattenhirn mußte jedoch durch Verwendung eines geringer verdünnten Antiserums kompensiert werden. Trotz ähnlicher gelelektrophoretischer Mobilität unter nativen Bedingungen scheint die GR aus Rattenhirn also Unterschiede zu dem Enzym aus Rinderhirn aufzuweisen. Im Hinblick auf die

immuncytochemischen Untersuchungen von entscheidender Bedeutung war die Tatsache, daß GR in Homogenaten astroglia- und neuronen-reicher Primärkulturen angefärbt werden konnte.

In Gegenwart von anti-GR wurde nach Zentrifugation eine verminderte Aktivität der GR in Homogenatüberständen aus Rinderhirn, Rinderleber und Rattenhirn festgestellt, die nicht im resuspendierten Niederschlag nachgewiesen werden konnte. Wurden die GR-Aktivitäten aus dem Überstand und dem Niederschlag der Kontrollansätze ohne anti-GR addiert, so ergab sich die eingesetzte Gesamt-Aktivität. Das war in Gegenwart von anti-GR nicht der Fall. Das Antiserum hemmt somit die Aktivität der GR teilweise. Offensichtlich gibt es im Antiserum Populationen von Antikörpern, welche entweder direkt Epitope an den Substratbindungsstellen erkennen oder Stellen besetzen, die nach Bindung von Antikörpern die Diffusion der Substrate zu ihren Bindungsstellen verhindern. Daß der Verlust der Aktivität auf die Präzipitation der GR selbst zurückzuführen ist, scheint angesichts des Ergebnisses der Kontrolle ohne Protein-A-Sepharose eher unwahrscheinlich. Die annähernd gleichen Aktivitätsverluste der GR in den untersuchten Homogenatüberständen deuten auf eine große Ähnlichkeit der Oberflächenepitope der vorkommenden GR hin. Auch im Kontrollansatz (PBS) war eine nicht unerhebliche GR-Aktivität im resuspendierten Niederschlag feststellbar. Vermutlich wurde die GR durch Assoziation an andere im Homogenatüberstand vorkommende Proteine mitgefällt.

6.3. Glutathionreduktase in neuronalen Zellkulturen

Die Anwesenheit der GR in astroglia- und neuronen-reichen Primärkulturen wurde durch Bestimmung der spezifischen Aktivität demonstriert. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kulturtypen zu erkennen. Die spezifische Aktivität für die GR in neuronen-reichen Primärkulturen ist nahezu identisch zu Literaturdaten (34.5 mU/mg: Huang und Philbert, 1995; 32 mU/mg: Ying et al., 1999). Im Gegensatz zu diesen Aktivitäten enthielten Neuronenkulturen des Hippocampus deutlich geringere spezifische GR-Aktivität (1.3 mU/mg; Mattson et al., 1995). In astroglia-reichen Primärkulturen wurde von Huang und Philbert (1995) eine spezifische Aktivität der GR gemessen, die mit 87 mU/mg mehr als doppelt so hoch ist wie die in der vorliegenden Arbeit bestimmte. Andere Bedingungen im Enzymtest (Puffersubstanz, pH-Wert, Ionenstärke), Verwendung einer anderen Proteinbestimmungsmethode (nach Lowry et al. (1951), anstatt nach Bradford, 1976)),

unterschiedliche Kultivierung der Zellen und/oder unterschiedliches Alter der für die Enzymaktivitätsbestimmung verwendeten Zellkulturen könnten Ursachen für die beobachteten Unterschiede sein.

Die Lokalisation der GR in verschiedenen Zelltypen des Gehirns wurde durch immunocytochemische Verfahren unter Verwendung des gegen die GR aus Rinderhirn gewonnenen Antiserums zusammen mit zelltypspezifischer Marker an neuronalen Zellkulturen untersucht.

In astroglia-reichen Primärkulturen zeigte die immunocytochemische Charakterisierung mit dem Antiserum gegen die GR Unterschiede in der Intensität der Anfärbung. Große Zellen mit langen Fortsätzen, die positiv für das astrogliale Markerprotein GFAP waren, wiesen nur schwache Anfärbung für die GR auf. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen überein, die von immunhistochemischen Anfärbungen gegen die GR an Gehirnschnitten von Wistarratten gewonnen wurden. Auch in dieser Untersuchung konnte keine Immunreaktivität in Astrocyten gefunden werden (Knollema et al., 1996). Aus diesen Daten kann aber nicht geschlossen werden, daß Astrogliazellen keine oder nur geringe GR-Aktivität besitzen. Die erhöhte Aktivität der NADPH-produzierenden Enzyme des Pentose-Phosphat-Stoffwechselweges nach Zugabe von Wasserstoffperoxid (Ben-Yoseph et al., 1994) und der erhöhte Verbrauch von Glucose während der raschen Entgiftung von Peroxiden in astroglialen Kulturen (Dringen und Hamprecht, 1997; Dringen et al., 1998a) kann ohne die Anwesenheit von GR nicht erklärt werden. Verschiedene Gründe könnten die schwache Immunreaktivität der astroglialen Zellen in der astroglia-reichen Primärkultur erklären: 1.) Das in dieser Arbeit eingesetzte Antiserum und das für die immunhistochemische Anfärbung eingesetzte Antiserum (Knollema et al., 1996) könnten nicht besonders geeignet sein, die GR der astroglialen Zellen nachzuweisen. Mangelnde Kreuzreaktivität der verwendeten Antiseren mit einer Isoform der GR in Astrogliazellen könnte Ursache einer schwachen Anfärbung sein. 2.) Die flache Morphologie der Astrogliazellen in Kultur könnte ebenfalls eine schwache Anfärbung vortäuschen. Bei GFAP-positiven Zellen war nur um den großen Zellkern eine allerdings schwache Immunreaktivität zu erkennen. Das deutet darauf hin, daß positive Immunreaktivität

nur bei der dickeren Cytosolschicht um den Kern, nicht aber bei der dünnen Cytosolschicht in den flachen Bereichen der Zellen dokumentiert werden kann. Die schwache Immunreaktivität der GR um den Zellkern war punktförmig, was auf Lokalisierung der GR in Organellen hindeuten könnte. Diese Organellen könnten Mitochondrien sein, von denen bekannt ist, daß sie GR enthalten (Panfili et al., 1991).

In astroglia-reichen Primärkulturen sind neben Astrogliazellen auch Oligodendroglia- und Microglia-Zellen vorhanden (Reinhart et al., 1990). Die Colokalisation mit Markern für diese beiden Zelltypen zeigte, daß GR in Oligodendroglia- und Microglia-Zellen stark exprimiert wird. Die intensive Anfärbung von GR in oligodendroglialen Zellen scheint im Widerspruch zu Ergebnissen an oligodendroglia-reichen Kulturen zu stehen, deren spezifische Aktivität der GR geringer war als die astroglialer Kulturen (Juurlink et al., 1998). Ursache für diese Diskrepanz könnten unterschiedlich gewählte Kulturbedingungen der neuronalen Kulturen sein. Außerdem könnte die Expression der GR in oligodendroglialen Zellen durch die Anwesenheit von Astrogliazellen positiv beeinflußt werden.

Die intensive Anfärbung der GR in den Microgliazellen dürfte die Fähigkeit dieser Zellen widerspiegeln, GSSG schnell zu reduzieren, welches durch die Reaktion der GPx entsteht. In Rattenhirnschnitten wurden besonders die Microgliazellen intensiv mit Antikörpern gegen die GPx angefärbt (Lindenau et al., 1998). Enzymatische Untersuchungen von GPx und GR in microglia-reichen Sekundärkulturen stützen ebenfalls diese Vermutung, da für beide Enzyme in solchen Kulturen höhere spezifische Aktivitäten nachgewiesen wurden als in neuron-reichen und astroglia-reichen Primärkulturen (Hirrlinger et al., 1999). Diese Daten deuten auf eine hohe Kapazität der Microgliazellen hin, reaktive Sauerstoffspezies durch das Glutathion-System zu entgiften (Hirrlinger, 1999).

Die fehlende Immunreaktivität nach Inkubation der Zellen einer astroglia-reichen Primärkultur mit dem Präimmenserum bestätigte die Spezifität der Anfärbung mit anti-GR und zeigte, daß das Kaninchen vor der Immunisierung mit GR keine Antikörper gegen dieses Enzym im Serum hatte. Dieser Befund wurde bestätigt durch Resultate aus ELISAs und „nativen Western-Blot“-Analysen. Die Verhinderung der Zellanfärbung durch Vorinkubation des Antiserums mit reiner GR unterstreicht die Monospezifität des Antiserums.

Zum Nachweis der GR in Neuronen wurden die Zellen in neuronen-reichen Primärkulturen mit dem neuronalen Markerprotein GAP43 identifiziert (Meiri et al., 1991; Schmidt et al., 1991). GAP43-positiv können aber auch Oligodendrogliazellen sein (Sensenbrenner et al., 1997). Da in neuronen-reichen Primärkulturen jedoch keine Oligodendrogliazellen vorkommen (Löffler et al., 1986), ist GAP43 ein geeignetes Markerprotein zur Identifizierung von Neuronen. GAP43-positive Zellen in Neuronenkulturen zeigten eine intensive Immunreaktivität gegen GR in den Somata, wohingegen die Neuriten nur schwach angefärbt waren. Somit ist GR in Neuronen vorhanden und vermutlich für die Reduktion von GSSG verantwortlich, das durch die in Neuronen nachgewiesene GPx (Lindenau et al., 1998) gebildet wird. Das Glutathionsystem in Neuronen ist bezüglich der Peroxidentgiftung aber anscheinend weniger effizient als das in Astrogliazellen (Dringen et al., 1999).

Von den verschiedenen neuronalen Zellen scheinen also besonders diejenigen intensive GR-Immunreaktivität aufzuweisen, die in Kulturen einem erhöhten oxidativen Streß ausgesetzt sind: Oligodendrogliazellen, die einen geringen Glutathiongehalt und einen erhöhten Gehalt an Eisen und Membranlipiden aufweisen (Juurlink, 1997), Microgliazellen, die exogenes Superoxid produzieren können (Colton und Gilbert, 1987; Boje und Arora, 1992) und Neuronen, die eine erhöhte endogene Radikalproduktion zeigen (Ben-Yoseph et al., 1996).

6.4. Versuch des Nachweises von Isoformen der Glutathionreduktase

6.4.1. Kinetische Parameter der gereinigten Glutathionreduktasen

Alle drei untersuchten GR zeigten unter den gewählten Bedingungen eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik. Die ermittelten apparenten K_M -Werte der drei gereinigten GR aus Rinderorganen sind jeweils etwas geringer als die K_M -Werte der gereinigten GR aus den entsprechenden Organen anderer Spezies (Tabelle 11). Die Unterschiede in den beschriebenen K_M -Werten sind vermutlich auf unterschiedliche Bedingungen bei den Aktivitätsmessungen zurückzuführen, da die Enzymaktivität der GR stark von den verwendeten Puffer-Ionen und pH-Werten im Enzymtest abhängt (Worthington und Rosemeyer, 1976; Williams, 1976;

DISKUSSION

Morroff und Kosow, 1978). Daher ist es von entscheidender Bedeutung, bei der Bestimmungen der K_M -Werte die Meßbedingungen genau zu definieren.

Tabelle 11. Apparente K_M -Werte von GR aus Hirn, Leber und Erythrocyten verschiedener Spezies

Quelle der GR		K_M -Wert	K_M -Wert	Referenzen
Organ	Spezies	bezüglich GSSG (μM)	bezüglich NADPH (μM)	
<i>Gehirn</i>	<i>Rind</i>	36	8.1	vorliegende Arbeit
	<i>Schaf</i>	117	61	Acan und Tezcan, 1991
<i>Leber</i>	<i>Rind</i>	40	4.4	vorliegende Arbeit
	<i>Ratte</i>	57	7.9	Carlberg und Mannervik, 1975
	<i>Pferd</i>	59	8.8	Garcia-Alfonso et al., 1993
	<i>Kaninchen</i>	58	8	Zanetti, 1979
	<i>Kalb</i>	101	21	Carlberg und Mannervik, 1985
<i>Erythrocyten</i>	<i>Rind</i>	23	4	vorliegende Arbeit
	<i>Mensch</i>	65	8.5	Worthington und Rosemeyer, 1976

Um alle drei aus Rinderorganen gereinigten Enzyme miteinander vergleichen zu können, wurden deshalb gleiche Testbedingungen geschaffen. Die Bestimmung des K_M -Wertes für NADPH war mit der verwendeten Methode schwierig, da das Cosubstrat NADPH in einer Konzentration von $< 5 \mu\text{M}$ zu schnell verbraucht wurde, um Anfangsgeschwindigkeiten bestimmen zu können. Die Bestimmung der K_M -Werte wurde somit ungenauer, was die Signifikanz der gefundenen Unterschiede in den K_M -Werten der drei GR für NADPH bezweifeln läßt. Im Gegensatz dazu erscheinen die ermittelten K_M -Werte für GSSG experimentell besser gesichert. Es wurde ein signifikanter Unterschied der Werte für GR aus Hirn und Leber im Vergleich zum Erythrocyten-Enzym festgestellt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die extremen Reinigungsbedingungen (organische Lösungsmittel) Eigenschaften der GR aus Erythrocyten verändert haben, obwohl mehrfach in der Literatur auf die extreme Stabilität dieses Enzyms hingewiesen wurde (D'Alessandri 1969; Worthington und Rosemeyer, 1974; Krohne-Ehrich et al., 1977; Boggaram et al., 1979).

6.4.2. Elektrophoretische und immunologische Methoden

In der SDS-PAGE, die unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, waren für die GR aus den drei Rinderorganen keine Mobilitätsunterschiede erkennbar, die auf Isoformen hindeuten. Alle in der vorliegenden Arbeit gereinigten GR besitzen demnach nahezu identische Molekülmassen. Deutliche Unterschiede waren aber auch nicht zu erwarten, da für Untereinheiten der GR aus verschiedenen Spezies und Organen immer Molekülmassen von ca. 50 kDa angegeben werden (s. 6.1.1. und 6.1.2.).

Als weitere Methode zum Nachweis möglicher Isoformen wurde daher die 2D-Gelelektrophorese angewendet, mit der Proteine nach Ladung und nach Molekülmasse aufgetrennt werden können. Eine genaue Bestimmung des isoelektrischen Punktes der gereinigten GR aus Gehirn, Leber und Erythrocyten des Rindes war nicht möglich, da mehrere Proteinflecke im Bereich von pH 7.1 bis 7.4 angefärbt waren, die in der IEF-Dimension äquidistante Abstände zueinander aufwiesen, aber nahezu identische Molekülmassen in der PAGE-Dimension hatten. Ursache für das Auftreten eines solchen Musters sind Ladungsunterschiede von Proteinen mit nahezu identischer Molekülmasse (O'Farrell, 1975). Proteinmodifikationen, die zu solchen Ladungsunterschieden führen können, sind die Oxidation von Cystein und spontane Desamidierungen von Glutamin- und Asparaginresten (McKerrow und Robinson, 1971; Scotchler und Robinson, 1974). Solche Reaktionen kommen bei großen Proteinen häufig vor (O'Farrell, 1975) und sind bei milden Lagerungsbedingungen, z.B. in Phosphatpuffern mit einer Ionenstärke von 0.15 M, begünstigt (McKerrow und Robinson, 1971; Scotchler und Robinson, 1974). Dies führt zu negativeren Gesamtladungen, wobei konsequenterweise der isoelektrische Punkt sinkt. Solche Modifikationen der GR könnten bereits während der Reinigung oder bei der Lagerung erfolgt sein. Mehrere verschiedene geladene Formen in homogen gereinigten Präparaten der GR wurden auch bei der GR aus menschlichen Erythrocyten beobachtet (Prof. Krauth-Siegel, persönliche Mitteilung).

Das Muster der Proteinflecke nach 2D-Gelelektrophorese der drei GR aus Rind war identisch. Auch bei Auftrennung von Mischungen aus zwei GR wurden keine zusätzlichen Flecke gefunden. Somit verhalten sich alle drei GR identisch in der 2D-Gelelektrophorese, haben also

ähnliche Ladung und ähnliche Molekülmasse. Ähnliche Masse und Ladung bedeutet aber nicht, daß keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz vorliegen können.

Mit dem gegen die GR aus Rinderhirn generierten Antikörper war es ebenfalls nicht möglich, Unterschiede zwischen den Rinder-GR aufzuzeigen. Die drei gereinigten GR verhalten sich identisch im „nativen Western Blot“. Auch im ELISA wurden für die drei GR nahezu identische Kurvenverläufe gefunden. Somit scheinen die GR aus den verschiedenen Organen des Rindes allenfalls geringe Unterschiede in ihren antigenen Oberflächenepitopen zu besitzen.

6.4.3. Massenspektrometrie

Weder in den kinetischen Parametern noch in elektrophoretischen und immunologischen Eigenschaften konnten Unterschiede zwischen den gereinigten GR gefunden werden, die diese eindeutig als Isoformen hätten nachweisen können. Die Tatsache, daß selbst die GR aus verschiedenen Spezies sich sehr stark ähneln, dürfte die Suche nach Isoformen ebenfalls bisher erschwert haben. So wurde von Tutic et al. (1990) gezeigt, daß die GR aus menschlichen Erythrocyten und die GR aus der Leber der Maus zu 82 % homolog sind. Deshalb wurde nach Unterschieden in GR aus Gehirn und Leber mit ESI-MS gesucht, der derzeit empfindlichsten Proteinanalyse-Methode (bis in den femtomol-Bereich; Lehmann, 1996). Eine Vielzahl tryptischer Peptide der GR aus Gehirn und Leber zeigten nach dem HPLC-Lauf identische Retentionszeiten und Massen. In der überlagerten Darstellung der mittels ESI-MS erzeugten akkumulierten Spektren tryptischer Peptide wurden aber auch Unterschiede in den Signalintensitäten für beide analysierten GR aus Gehirn und Leber nachgewiesen. Dieser Signalunterschied konnte durch den Vergleich der Massenspuren verifiziert werden. Auf diese Weise konnten auch weitere deutliche Signalunterschiede zwischen Gehirn und Leber detektiert werden, die zum größten Teil alle in dem Bereich des Gradienten mit hoher Reproduzierbarkeit (Reutter, 1999) lagen. Diese Ergebnisse lassen auf Unterschiede in der Primärstruktur der GR aus Gehirn und Leber schließen, da durch den tryptischen Verdau offensichtlich Peptide von unterschiedlicher Größe entstanden. Es müssen somit Unterschiede in der Aminosäuresequenz der GR aus Gehirn und Leber existieren und/oder einzelne Peptide aus den GR der beiden Organe unterschiedlich modifiziert sein.

6.5. Ausblick

Die GR konnte in neuronalen Zellkulturen in den verschiedenen Zelltypen in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. Die schwache punktförmige Anfärbung in den Astrogliazellen könnte auf Anfärbung der Mitochondrien zurückzuführen sein. Co-Anfärbung mit einem mitochondrienspezifischen Marker (z.B. anti-Citratsynthase, Mitotracker®) und die Dokumentation mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie oder/und der Einsatz der Elektronenmikroskopie könnten die intrazelluläre Lokalisation der GR in neuronalen Zellen, insbesondere in Astrogliazellen, klären.

Die an neuronalen Zellkulturen gewonnenen Erkenntnisse müssen nicht zwangsläufig die Situation im Gehirn widerspiegeln. Deshalb sollte nun durch immunhistochemische Untersuchungen an Gehirnschnitten auch die Lokalisierung der GR in vivo untersucht werden. Dabei könnte das in der vorliegenden Arbeit gewonnene Antiserum besser geeignet sein, GR in Astrocyten in Wistarrattenhirnen nachzuweisen, als das Antiserum gegen die menschliche Erythrocyten-GR (Knollema et al., 1996). Es wäre wichtig die Lokalisation der GR in Hirnschnitten von Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen zu untersuchen, um Hinweise auf eine Reaktion der GR-Expression auf den berichteten oxidativen Streß während neurodegenerativer Prozesse zu erhalten. In diesem Zusammenhang könnten dann auch humane Gehirnschnitte bezüglich der Lokalisation der GR untersucht werden.

Im Hinblick auf das Interesse unserer Arbeitsgruppe am neuronalen Glutathionstoffwechsel könnte die Untersuchung des Glutathionsystems im Modellsystem Auge sinnvoll sein. GR kommt in Augen vor und wurde aus den Linsen des menschlichen Auges gereinigt (Latta und Augusteyn, 1984). Die Lokalisation der GR im Auge, insbesondere ihr Vorkommen in den Müller-Gliazellen der Retina, könnte mit dem generierten Antiserum gegen GR aus Gehirn untersucht werden.

Für Colokalisationsstudien der GR mit zelltypspezifischen Markern wäre es von Vorteil, monoklonale Antikörper der GR zur Verfügung zu haben, da für den Nachweis vieler Markerproteine nur Antiseren aus Kaninchen zugänglich sind. Verschiedene monoklonale

Antikörper gegen GR könnten auch ein Werkzeug sein, potentielle Epitopunterschiede zwischen GR aus verschiedenen Organen nachzuweisen, die mit dem polyclonalen Antiserum nicht detektierbar waren. Außerdem würden Antikörper von chemisch einheitlicher Struktur und Funktion in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen, Eigenschaften die ein polyclonales Antiserum nicht vorweisen kann.

Im Zusammenhang mit den massenspektrometrischen Untersuchungen konnte mittels Edman-Sequenzierung eine Aminosäuresequenz des C-terminalen Bereichs der GR bestimmt werden (Reutter, 1999). Somit steht eine Teilsequenz zur Verfügung, um degenerierte Oligonucleotid-„Primer“ zu erzeugen. Nach Sequenzierung von PCR-amplifizierten cDNA-Fragmenten sollte ein Vergleich der Sequenzen der cDNAs für GR aus verschiedenen Organen möglich sein und die Frage nach Sequenzisoformen beantwortet werden können.

Strukturdaten für GR sind bislang nur für die GR aus den Erythrocyten des Menschen bekannt. Im Hinblick auf die z.T geringen Mengen reiner GR aus den verschiedenen Organen des Rindes, könnte die Struktur mit den neuesten Geräten der 3-Dimensionalen Kernresonanzspektroskopie ermittelt werden. Damit ist es mittlerweile auch möglich, die Struktur von Proteinen größer als 35 kDa zu bestimmen (Wider und Wüthrich, 1999). Basierend auf den so gewonnenen Strukturdaten könnten die Dynamik der GR (Übergänge zwischen mehreren Konformationen und Rotationen von Bindungen), Protein-Ligand-Wechselwirkungen und Proteinfaltungskinetiken untersucht werden. Ferner könnte His-tag-GR in *E. coli* oder Hefe exprimiert werden, um ausreichende Mengen GR für die zur Röntgenstrukturanalyse benötigten Kristalle zu erhalten.

7. Experimenteller Teil

7.1. Geräte, Materialien, Reagenzien

7.1.1. Geräte

Autoklav	Typ 669, Aigner (München)
„Blot“-Kammer	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Biorad (München)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
ELISA-“Reader“	Titertek Plus MS 212, ICN (Meckenheim)
Elektrophoresekammer	Typ 0162, Renner (Darmstadt)
FPLC-Anlage	Kontrolleinheit GP-250, Fraktionssammler Frac-100, Durchflußphotometer UV-1, Pumpe P 500, Zweikanalschreiber Rec-482, Pharmacia (Freiburg)
Fraktionssammler	Frac 100 und Frac 300, Pharmacia (Freiburg)
Gradientenmischer	Eigenbau, Werkstatt des PCI (Tübingen)
Gelscanner	GDS 1, Advanced Biosolutions (Adelbsen)
Haemocytometer	nach Neubauer, Bachofer (Reutlingen)
Homogenisatoren	nach Potter-Elvehjem, Braun (Melsungen) Waring Blendor 34 BL 22, Bachofer (Reutlingen)
HPLC	Reversed-Phase-HPLC auf INTEGRAL™ (Perseptive Biosystems, Weiterstadt)
Hybridisierungsschrank	Modell Hybrid, Biometra (Göttingen)
Leitfähigkeitsmeßgerät	CM 83, Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Massenpektrometer	Quatro II Tripel-Quadropol-Massenspektrometer, Micromass (Altrincham, UK) MALDI-TOF-MS Hewlett Packard G2025 A (Waldbronn)
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskope IM 35 und Universal, Zeiss (Oberkochen)
Netzgeräte	Power Supply 2301 MacroDrive, LKB (Uppsala, Schweden)
Ölpumpe	Drehschieberölpumpe Typ 317, Dürr-Dental (Bietigheim)

EXPERIMENTELLER TEIL

Osmometer	Osmometer Automatic, Knauer (Eppelheim)
pH-Meter	PHM 92 Lab-pH-Meter, Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Photoapparate	OM2 und OM4, Olympus Optical (Tokyo, Japan)
Photometer	Shimadzu UV-120-02, Shimadzu (Kyoto, Japan)
Pipettoren	Finnpipetten (Bereiche 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) und Finnpipette Stepette, Labsystem Oy (Helsinki, Finnland); Eppendorf Reference (0.5-10 µl), Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg); Vielkanaldispenser Biohit Proline 1200, Biohit Oy (Helsinki, Finnland)
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein (München)
Rotationsschüttler	Typ TMR, Infors (Bottmingen, Schweiz)
sterile Werkbank	Lamin Air HLB 2448, Heraeus (Hanau)
Waagen	Typ 1403, 1405 und 1702, Sartorius (Göttingen) und Typ P 1200, Mettler (Albstadt)
Wasserbad	Eigenbau, Werkstatt des PCI (Tübingen)
Wasserreinigungsanlage	Seralpur UP 50, Seral (Ransbach-Baumbach)
Zellbank	Typ Cryosystem CS 950 B, Cryosystem GmbH (Duisburg)
Zellinkubator	Typ B 5060EK CO ₂ , Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415C und Biofuge pico, Eppendorf (Hamburg); Zellzentrifuge Varifuge K, Heraeus (Hanau); Kühlzentrifugen Centrikon H-401 mit Rotoren A6.14 und A8.24, Kontron (Eching)

7.1.2. Materialien

Chromatographiematerialien	DEAE-52 Cellulose, Whatman (Maidstone, UK) über Bender und Hobein (München); 2',5'-ADP-Sepharose 4B, Pharmacia (Freiburg)
Dialyseschläuche	Servapor, Serva (Heidelberg)
Dialyseeinheiten	Slide-A-Lyzer, Pierce (Rockford, USA)
Einmal-Sterilfilter	Renner (Darmstadt)

EXPERIMENTELLER TEIL

Filmmaterial	Kodak TMY 135-36, Kodak Limited (England); Agfapan 25, Agfa-Gevaert (Leverkusen)
FPLC-Säule	Superdex G-200 16/60 pg, Pharmacia (Freiburg)
HPLC-Säule	C18- Modell Luna, 3 µm, 150 mm x 1 mm, SV: 0.12 ml Phenomenex (Hösbach)
Kanülen	Sterican® Luer-Lock, Dimensionen: 0.7 x 30 mm und 0.9 x 40 mm, Braun (Melsungen)
Konzentratoren	Centricon-30 concentrators, Amicon (Beverly, USA)
Microtiterplatten	Nunc-Immuno™ Platten, MaxiSorb F96 und MicroWell™ - Platten 96 well, Nunc (Wiesbaden), über Multimed (Kirchheim)
Nitrocellulosemembran	Immobilon-NC Transfer Membrane, Millipore (Bedford, USA)
Spritzen	Bereiche 2 ml und 5 ml, Braun (Melsungen)
sterile Zellkulturgefäße	Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen)

7.1.3. Reagenzien

Antikörper und Reagenzien für Immuncytochemie und „Western Blot“

anti-Kaninchen-IgG-AP, Boehringer (Mannheim)

5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (Dinatriumsalz), Boehringer (Mannheim)

biotinyliertes anti-Kaninchen-IgG, Dianova (Hamburg)

Dimethylformamid, E. Merck (Darmstadt)

FITC-markiertes anti-Maus-IgG, Dianova (Hamburg)

Glycerin, E. Merck (Darmstadt)

inkomplettes Freundesches Adjuvans, Sigma (Deisenhofen)

komplettes Freundesches Adjuvans, Calbiochem (Gießen)

Magermilchpulver, Nestlé Deutschland AG (Frankfurt am Main)

monoclonaler anti-GalC-Antikörper, Geschenk von Dr. B. Ranscht (La Jolla, CA, USA)

monoclonaler anti-GAP 43-Antikörper, Sigma (Deisenhofen)

monoclonaler anti-GFAP-Antikörper, Boehringer (Mannheim)

4-Nitroblautetrazoliumchlorid, Boehringer (Mannheim)

4-Nitrophenylphosphat, Sigma (Deisenhofen)

Ox42, Serotec (Oxford, England)
Paraformaldehyd, E. Merck (Darmstadt)
Protein-A-Sepharose, Pharmacia (Freiburg)
Streptavidin-Texasrot, Amersham (Braunschweig)
Triton X-100, Serva (Heidelberg)
Ziegennormalserum, GIBCO (Eggenstein)

Reagenzien für die Elektrophorese

Acrylamid, Serva (Heidelberg)
Ammoniumperoxodisulfat, Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau, E. Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva (Heidelberg)
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, E. Merck (Darmstadt)
Glycin, Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat, E. Merck (Darmstadt)
Mercaptoethanol, E. Merck (Darmstadt)
Molekülmassenstandard low range, Pharmacia (Freiburg)
N,N'-Methylenbisacrylamid, Serva (Heidelberg)
Natriumdodecylsulfat, E. Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat, E. Merck (Darmstadt)
Natriumthiosulfat-5-Hydrat, E. Merck (Darmstadt)
Silbernitrat, E. Merck (Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Roth (Karlsruhe)

Reagenzien und Medien für die Zellkultur

DMEM, GIBCO (Eggenstein)
FCS, Boehringer (Mannheim)
Nigrosin, Eastman-Kodak über Atlanta (Heidelberg)
Poly-D-Lysin, Sigma (Deisenhofen)

Weitere Chemikalien

Acetonitril, LiChrosolv[®], E. Merck (Darmstadt)

Bradford-Reagenz, Bio Rad (München)

Rinderserumalbumin, Boehringer (Mannheim)

DTT, Fluka (Buchs)

GSH, Boehringer (Mannheim)

GSSG, Boehringer (Mannheim)

EDTA, E. Merck (Darmstadt)

FAD, Sigma (Steinheim)

Harnstoff, Fluka (Buchs)

Malat (Dinatriumsalz), Sigma (Steinheim)

NADP⁺ und NADPH, Applichem (Darmstadt)

Natriumchlorid, E. Merck (Darmstadt)

Phenylmethylsulfonylfluorid, Sigma (Steinheim)

Sinapinsäure (3,5-dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure), Lancaster (Mühlheim am Main)

Trypsin, Boehringer (Mannheim)

7.2. Zellkulturen

7.2.1. Neurale Zellkulturen

Die verwendeten neuronalen Zellkulturen wurden freundlicherweise von Herrn Johannes Hirrlinger und Herrn Dr. Ralf Dringen zur Verfügung gestellt. Astroglia-reiche Primärkulturen wurden aus den Gehirnen neugeborener Wistar-Ratten angelegt und kultiviert (Hamprecht und Löffler, 1985). Die Kulturen wurden in einem Kulturalter von 10 d bis 21 d für Experimente verwendet. Neuronenreiche Primärkulturen wurden aus den Gehirnen embryonaler Ratten (E16) angelegt, auf poly-D-Lysin vorinkubierten Kulturschalen mit oder ohne Deckgläschen angesät und kultiviert, wie bei Löffler et al. (1986) beschrieben. Die Kulturen wurden in einem Kulturalter von 5 d bis 7 d verwendet. Microglia-reiche Sekundärkulturen wurden nach einer Modifikation (Hirrlinger, 1999) eines publizierten Verfahrens (Giulian und Barker, 1986; Colton und Gilbert, 1987) gewonnen. Diese Sekundärkulturen wurden in einem Alter von 3 d für immunocytochemische Anfärbungen verwendet.

7.2.2. Herstellung von Zellkulturhomogenaten

Vor der Bestimmung der Enzymaktivitäten kultivierter Zellen wurden die Zellen zweimal mit je 4 ml eiskaltem PBS gewaschen und durch Lyse in 400 μ l 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, 10 min lang auf Eis lysiert. Die lysierten Zellen wurden dann von der Kulturschale abgeschabt und zentrifugiert (5 min, 15000 x g, 4°C). Die Überstände der Zentrifugation wurden zur Messung der Aktivitäten verwendet.

7.3. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivität 1 U ist als die Aktivität definiert, die den Umsatz von 1 μ mol Substrat pro Minute unter den angegebenen Bedingungen katalysiert. Zur Bestimmung der Aktivität der GR wurde ein aliquoter Teil der zu messenden Probe mit einer Reaktionsmischung auf ein Gesamtvolumen von 1 ml (in einer Küvette, Messung bei 30°C, Tabelle 12) oder 400 μ l (in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte, Messung bei Rt, Tabelle 13) aufgefüllt. Im Falle des Malatenzyms wurde der von Kurz (1992) beschriebene Enzymtest auf den Mikrotitermaßstab adaptiert (Tabelle 14).

Tabelle 12. Enzymtest für GR in Küvette (1 ml)

Stammlösungen	Volumen (μ l)	Endkonzentration (mM)
<i>100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 + 1 mM EDTA</i>	395 - 275	99.5- 87.5 0.995-0.88
<i>Probe</i>	5 - 125	
<i>0.4 mM NADPH</i>	500	0.2
START DER REAKTION		
<i>10 mM GSSG</i>	100	1

Tabelle 13. Enzymtest für GR im Napf der Mikrotiterplatte (400 µl)

Stammlösungen	Volumen (µl)	Endkonzentration (mM)
<i>100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 + 1 mM EDTA</i>	145	99 0.99
<i>Probe</i>	5	
<i>1.6 mM NADPH</i>	50	0.2
START DER REAKTION		
<i>2 mM GSSG</i>	200	1

Tabelle 14. Enzymtest für ME im Napf der Mikrotiterplatte (400 µl)

Stammlösungen	Volumen (µl)	Endkonzentration (mM)
<i>0.2 M Tris / HCl-Puffer, pH 7.5</i>	155	78
<i>Probe</i>	5	
<i>8 mM NADP⁺</i>	20	0.4
<i>80 mM MgCl₂</i>	20	4
START DER REAKTION		
<i>10 mM Malat-Dinatriumsalz</i>	200	5

Die Enzymaktivität wurde aus der Ab- (GR) bzw. Zunahme (ME) der Extinktion bei 340 nm mittels des Extinktionskoeffizienten für NADPH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet. Die Substrate der GR (NADPH und GSSG) wurden in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM EDTA, pH 7.0 gelöst.

7.4. Proteinbestimmungen

Während der Enzymreinigungen wurde der Proteingehalt der Fraktionen nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Für die Ermittlung kleiner Proteinmengen (im Bereich von 0 bis 5 µg) wurde die Methode nach Bradford modifiziert, indem die BSA-Stammlösung (1 mg/ml) auf die entsprechende Proteinmengen eingestellt und das Bradford-Reagenz 1:5 verdünnt eingesetzt wurde. Um sowohl den Probenverbrauch so klein wie möglich zu halten als auch einen schnellen Probendurchsatz zu gewährleisten (z.B. Proteinbestimmung in den Fraktionen der Affinitätschromatographien), wurden die Ansätze direkt in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert (Gesamtvolumen 200 µl pro Vertiefung) und die Bestimmungen der Absorption im ELISA-Reader bei 595 nm durchgeführt. Bei den Proteinreinigungen wurden Proteingehalte nach Bradford (1976) und nicht nach Lowry bestimmt, da EDTA und GSH den Test nach Lowry et al. (1951) stören und damit eine genaue Proteinbestimmung unmöglich machen (Peterson, 1979). Dagegen stört nach Herstellerangaben keine der beiden Substanzen die Proteinbestimmung nach Bradford. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der GR in den neuronalen Zellkulturen war die Methode nach Lowry et al. (1951) dagegen aufgrund der Präparation der Proben von Vorteil. Rinderserumalbumin diente für alle Bestimmungsmethoden als Standardprotein.

7.5. Reinigung von Glutathionreduktasen und Malatenzym

Die Arbeiten wurden soweit nicht anders angegeben bei 4°C durchgeführt. Rinderhirn, -leber und -blut wurden aus dem Schlachthof in Tübingen oder Rottenburg bezogen und bis zur Verwendung bei -20°C (Organe) bzw. 4°C (Blut) gelagert. Die Säulenmaterialien wurden nach den Angaben der Hersteller vorbehandelt und regeneriert.

7.5.1. Aufschluß der Erythrocyten und Entfernung des Hämoglobins

Für die Reinigung der GR aus Erythrocyten des Rindes mußte zunächst das Hämoglobin entfernt werden. Dazu wurde die Methode nach Krohne-Ehrich et al. (1977) modifiziert. Rinderblut wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) mit 1 M Kaliumphosphatpuffer, 150 mM EDTA, pH 7.4, über Nacht bei 4°C gelagert. Das Serum wurde abdekantiert und der Niederschlag vor

dem Aufschluß der Erythrocyten mit Phenylmethylsulfonylfluorid und FAD in den Endkonzentrationen 50 μM bzw. 6 μM versetzt. Eine Lösung aus Chloroform/Butanol (2.5/1; v/v; -20°C) wurde langsam zu 10 Teilen Erythrocyten unter ständigem Rühren mit einem Paddelrührer zugegeben und die Mischung anschließend 1 h lang auf Eis gerührt. Die Lösung wurde zuerst 30 min bei 9000 x g, anschließend 10 min bei 21500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem 1.5- fachen Volumen an Aceton versetzt, die entstandenen beiden Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und das in der Unterphase (wäßrig) ausgefallene Protein nochmals 10 min bei 2500 x g zentrifugiert. Das so entstandene Präzipitat wurde in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM EDTA, pH 7.4 (Puffer A) resuspendiert, die Suspension 3 h lang gerührt und dann bei 16000 x g 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Präzipitat ein weiteres Mal in Puffer A resuspendiert und die Suspension 2 h lang gerührt. Nach Zentrifugation wurden die beiden Überstände vereinigt und gegen Puffer A dialysiert.

7.5.2. Gewebeaufschluß von Hirn und Leber

Rinderhirn und -leber wurden aufgetaut und im Gewichtsverhältnis 1:3 mit Puffer A 2 min lang im Waring Blendor zerkleinert. Die Zellen im Rohhomogenat wurden in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem durch Scherkräfte zerstört. Nach Zentrifugation des Homogenates (21600 x g, 30 min) wurde der Niederschlag in Puffer A resuspendiert und nochmals in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die beiden Zentrifugationsüberstände vereinigt.

7.5.3. Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung und Dialyse

Fein gepulvertes Ammoniumsulfat wurde den vereinigten Überständen unter ständigem Rühren bis zu einer Sättigung von 35 % langsam zugegeben und die entstandene Suspension 1 h lang gerührt bevor sie zentrifugiert wurde (21600 x g, 30 min). Der Niederschlag wurde verworfen, der Überstand mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 75 % versetzt und erneut eine Stunde gerührt. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM EDTA, pH 7.4 (Puffer B) resuspendiert und die entstandene Lösung gegen Puffer B (2 x 5 l) über Nacht dialysiert.

7.5.4. Anionenaustausch-“Batch“-Verfahren

DE-52 Cellulose (ca. fünffacher Überschuß an Bindungskapazität) wurde in Puffer B äquilibriert, entgast und zum Dialysat gegeben. Nach 15-minütigem Rühren mit einem Paddelrührer wurde die Suspension über eine Sinterglasfritte abgesaugt. Der Ionenaustauscher wurde mit Puffer B 15 min lang gewaschen bevor die Suspension erneut abgesaugt wurde. Die beiden Überstände wurden vereinigt.

7.5.5. Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose 4B

Nach Zugabe von NaCl (Endkonzentration 150 mM) und GSH (Endkonzentration 2 mM) wurde der vereinigte Überstand der Anionenaustauschchromatographie auf eine 2',5'-ADP-Sepharose 4B-Säule appliziert. Das Affinitätsmaterial war zuvor in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM EDTA, 2 mM GSH, 150 mM NaCl, pH 7.4 (Puffer C) äquilibriert worden. Nach Beendigung des Auftrages wurde die Säule mit Puffer C gewaschen und Fremdprotein mit NaCl (Endkonzentration 1 M, in Puffer C) eluiert. Nach erneutem Waschen mit Puffer C wurden GR und ME mit einem linearen NADPH-Gradienten (0 - 0.5 mM NADPH) aus der Säule eluiert (Gesamtvolumen des Gradienten: 60 ml). Im Falle der Reinigung der GR aus Erythrocyten des Rindes wurde in allen Puffern auf GSH verzichtet. Zur Ermittlung des NADPH-Gradienten wurden aliquote Volumina der Fraktionen 1:20 mit Puffer B verdünnt. Anschließend wurde im ELISA- „Reader“ bei 340 nm die Extinktion bestimmt und mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NADPH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) die Konzentration an NADPH ermittelt.

7.5.6. Ammoniumsulfat-Fällung und Molekularsiebchromatographie an Superdex 200

Die Enzymaktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf 80 %-ige Sättigung gebracht. Anschließend wurde der Niederschlag abzentrifugiert (21600 x g, 45 min) und der Überstand vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und verworfen. Das Präzipitat der Ammoniumsulfat-Fällung wurde in wenig Puffer C (1-2 ml) resuspendiert und in 500 µl-Portionen auf eine Superdex 200-FPLC-Säule aufgetragen. Die Säule wurde bei Rt mit Puffer C eluiert. Im Falle der Reinigung der GR aus

Erythrocyten und Leber war in dem Elutions-Puffer kein GSH enthalten. Während des Molekularsiebchromatographie-Laufes wurde die Säule mit Eiswasser gekühlt.

7.5.7. Konzentrierung der gereinigten Enzyme

Die Enzym-enthaltenden Fraktionen der Gelfiltration wurden vereinigt und in Centricon-30/Microcon 30 Ultrafiltrationsröhrchen (11000 x g, Rt) konzentriert.

7.5.8. Analytische Ionenaustauschchromatographie des Malatenzyms

Ein Aliquot (0.4 mg ME in 3 ml) der vereinigten ME-enthaltenden Fraktionen der Molekularsiebchromatographie wurde über Nacht gegen 30 mM Tris/HCl, pH 7.4 (4°C) dialysiert. Das Dialysat wurde auf ME-Aktivität überprüft und - wenn Test positiv ausgefallen - auf eine DEAE-52-Cellulose-Säule appliziert. Eluiert wurde stufenweise mit Magnesiumacetat (5, 10, 15, 20, 30 und 50 mM) gelöst in 30 mM Tris/HCl, pH 7.4, jeweils mit dem 5-fachen des Bettvolumens. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ME-Aktivität getestet und die Magnesiumacetatkonzentrationen durch Leitfähigkeitsmessung bestimmt.

7.5.9. Lagerung der gereinigten Enzyme

Verschiedene Lagerungsbedingungen für gereinigte GR wurden in einem Experiment exemplarisch für GR aus Rinderleber untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, daß die GR-Aktivität am besten erhalten blieb, wenn die GR bei 4°C in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 2 mM GSH (nicht bei der Erythrocyten-GR) mit 0.05 % Natriumazid gelagert wurde. Für Experimente, bei denen nur das Protein Verwendung fand (ELISA, „Western Blots“), wurden aliquote Volumina gereinigter GR in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 2 mM GSH (nicht bei der Erythrocyten-GR) bei -20°C gelagert. Proben für MALDI-MS und HPLC-ESI-MS wurden gegen doppelt-deionisiertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und ebenfalls bei -20°C gelagert. Das ME wurde unter denselben Bedingungen gelagert wie die GR.

7.6. Gelelektrophorese

7.6.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Stammlösungen

Acrylamidlösung:	29.2 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris/HCl, pH 6.8
Trenngelpuffer:	3 M Tris/HCl, pH 8.9
Probenpuffer:	125 mM Tris/HCl, pH 6.8; 5 % SDS (w/v) (nicht bei nativer Gelelektrophorese); 20 % Glycerin (w/v); 0.002 % Bromphenolblau (w/v)
Elektrodenpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0.1% SDS (w/v) (nicht bei nativer Gelelektrophorese); pH 8.5

Tabelle 15. Zusammensetzung des Polyacrylamidgels

Lösung	11 %-iges Trenngel (ml)	4.2 %-iges Sammelgel (ml)
<i>Acrylamid/ Bisacrylamid</i>	3.6	0.70
<i>Sammelgelpuffer</i>	-----	0.63
<i>Trenngelpuffer</i>	1.25	-----
<i>H₂O_{dd}</i>	5.1	3.6
ENTGASEN		
<i>SDS-Lösung (10 %-ig)</i>	0.1	0.050
<i>TEMED</i>	0.02	0.005
START DER POLYMERISATION		
<i>Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10 %-ig)</i>	0.038	0.20

Durchführung

Die Proteine wurden gelelektrophoretisch nach Laemmli (1970) in Minigelen (8 cm x 10 cm x 0.1 cm) aufgetrennt.

Probenvorbereitung/ Trennparameter

Proteinlösungen (max. 16 µl) wurden mit 4 µl Probenpuffer (mit oder ohne SDS) gemischt, sofern angegeben mit Mercaptoethanol (5 µl) versetzt und 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Proben abgekühlt, 2 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand in die Auftragstaschen des Sammelgels appliziert. Eine konstante Stromstärke von 20 A wurde für 1 bis 1.5 h angelegt. Zur Bestimmung von Molekülmassen der gereinigten Enzyme wurden als Markerproteine Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20 kDa) und Lactalbumin (14 kDa) eingesetzt.

7.6.2. Native Gelelektrophorese

Die Zusammensetzungen der Gele war identisch zu denen in Tabelle 15 beschriebenen, mit der Ausnahme, daß SDS in Gel und Puffern fehlte. Es wurden die gleichen Volumina an Proteinlösungen appliziert wie bei der SDS-Gelelektrophorese, mit dem Unterschied, daß diese Proben nicht mit Mercaptoethanol behandelt und auch nicht gekocht wurden. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 200 V für maximal 1.5 h durchgeführt. Nachdem die Bromphenolblaufront der Proben aus dem Trenngel ausgewandert war, wurde in unbenutzte Sammelgeltaschen erneut eine kleine Menge des Probenpuffers eingefüllt. Die Elektrophorese wurde anschließend solange betrieben bis dieses Bromphenolblau zur Mitte des Trenngels gelangt war. Danach wurde die Elektrophorese beendet und das Gel entweder mit Silbernitrat angefärbt oder die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

7.6.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Celis et al. (1997) durchgeführt.

7.6.4. Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Lösungen

- Fixierlösung 1: 10 % (v/v) Eisessig, 30 % Methanol (v/v) in H₂O_{dd}
- Fixierlösung 2: 5 % (v/v) Eisessig, 10 % Ethanol (v/v) in H₂O_{dd}
- Fixierlösung 3: 30 % Methanol (v/v) in H₂O_{dd}
- Färbelösung 1: 25 µl 37 % Formaldehyd, 21 µl 43 % Natriumthiosulfat (w/v),
50 ml H₂O_{dd}
- Färbelösung 2: 25 µl 37 % Formaldehyd, 50 ml 0.2 % Silbernitrat (w/v)
- Färbelösung 3: 25 µl 37 % Formaldehyd, 5 µl 4.3 % Natriumthiosulfat (w/v),
50 ml 6 % Natriumcarbonat (w/v)
- Stopplösung: 3 % Eisessig (v/v), 5 % Glycerin (v/v) in H₂O_{dd}

Durchführung

Gele wurden für 5 min in H₂O_{dd}, anschließend für 5 min in Fixierlösung 1 und danach für 30 min in Fixierlösung 2 inkubiert. Nach zweimaliger Inkubation für jeweils 15 min in Fixierlösung 3 wurde das Gel 1 min in Färbelösung 1 inkubiert und dann mit H₂O_{dd} gewaschen. Nach 10-minütigem sanften Schütteln in Färbelösung 2 wurde mit H₂O_{dd} intensiv nachgewaschen. Die Entwicklung der Banden bis zur gewünschten Farbintensität erfolgte in Färbelösung 3 und wurde mittels der Stopplösung beendet. Die Silbernitratanfärbung erfolgte in Glas-Petrischalen. Die Färbelösungen wurden jeweils vor dem Gebrauch aus Stammlösungen neu hergestellt. Es muß absolut chloridfreies (< 0.002 %) Natriumcarbonat verwendet werden.

Die Gele der 2D-Gelelektrophorese wurden nach der Methode von Tunón und Johansson (1984) angefärbt.

7.7. Gewinnung von Antiseren gegen die Glutathionreduktase aus Rinderhirn

7.7.1. Immunisierungen

Immunisiert wurden zwei Chinchilla Bastarde (bezogen von der Firma Thomae, Biberach) mit den Kennnummern 40650 und 40696. Vor der Erstimmunisierung wurde den Kaninchen ca. 6 ml Blut entnommen.

Zur Erstimmunisierung wurden gleiche Volumina an komplettem Freundsches Adjuvans und gereinigter GR aus Rinderhirn in je eine 2 ml-Einmalspritze aufgezogen. Beide Spritzen wurden über ein Kopplungsstück miteinander verbunden. Das Lösungsgemisch wurde für 15 min durch den Adaptor hin und her gepreßt, wobei sich eine dickflüssige, weiße Emulsion bildete, die subcutan im Nackenbereich des Kaninchens auf viele Stellen verteilt injiziert wurde.

Die weiteren Immunisierungen wurden identisch zur Erstimmunisierung durchgeführt, mit der Ausnahme, daß inkomplettes Freundsches Adjuvans verwendet wurde. Die eingesetzten Antigenmengen (GR) bei den jeweiligen Immunisierungen waren:

Immunisierung	Kaninchen 40650	Kaninchen 40696
Erstimmunisierung	100 µg in 1 ml Emulsion	200 µg in 0.5 ml Emulsion
Zweitimmunisierung	150 µg in 2 ml Emulsion	73 µg in 1.6 ml Emulsion
Drittimmunisierung	73 µg in 1.6 ml Emulsion	47 µg in 1.6 ml Emulsion

7.7.2. Serumgewinnung und Titerbestimmung

Für die Bestimmung des Antikörpertiters im Serum wurde Blut aus der Ohrvene mit einer Kanüle entnommen und das austretende Blut (5-6 ml) in einem 10 ml-Plastikgefäß aufgefangen. Zur Gewinnung des Gesamtserums wurden die Kaninchen durch Injektion eines Barbiturates (Ketanest/Rhompun) durch den Tierarzt der Universität Tübingen, Herrn Dr. Rau, betäubt und durch Herzpunktion ausgeblutet. Das Blut wurde in 50 ml-Zentrifugenröhrchen

überführt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der entstandene Blutpfropf in ein weiteres 50 ml-Röhrchen überführt. Beide Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C gelagert. Das verbliebene Antiserum im ersten Röhrchen wurde schließlich zentrifugiert (500 x g, 10 min, 4°C). Das Serum wurde mittels einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgenommen. Das durch Absetzen des Blutpropfes ausgetretene Serum wurde ebenfalls mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgenommen. Beide Lösungen wurden vereinigt und aliquote Teile davon über flüssigem Stickstoff bzw. bei -20°C gelagert. Der Antikörpertiter in den Seren wurde mittels ELISA (7.8.1.) bestimmt. Es wurde eine Verdünnungsreihe in Boratpuffer durchgeführt. Als Titer wurde die Verdünnung definiert, bei der die halbmaximale Extinktion gemessen wurde.

7.8. Immunologische Methoden

7.8.1. „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“

Lösungen

Borat-Puffer (BP): 100 mM Borsäure, 25 mM Borax, 75 mM NaCl, pH 8.4

Substratpuffer: 100 mM Glycin/NaOH, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH 9.5

Substratlösung: 1 mg 4-Nitrophenylphosphat pro ml Substratpuffer (Herstellung kurz vor Gebrauch)

Durchführung

Die Näpfe einer Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno MaxiSorp) wurden über Nacht mit 100 ng gereinigter GR in BP bei 4°C beschichtet. Nach zweimaligem Waschen der Näpfe mit 400 µl BP wurde 2 h lang mit 400 µl 1 % Rinderserumalbumin (w/v) in BP bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit BP wurde 2 h lang mit 150 µl Antiserum (verdünnt in BP) bei 37°C inkubiert. Das Antiserum wurde durch zweimaliges Waschen mit BP entfernt. Sodann wurden 150 µl anti-Kaninchen-IgG-AP (1:1000 in BP) zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde dreimal mit BP gewaschen, 150 µl Substratlösung zugegeben und bis zu 1 h bei Rt inkubiert. Der Extinktionsanstieg in jedem Napf wurde bei 405 nm im ELISA-„Reader“ verfolgt.

7.8.2. Immunpräzipitation

500 µl verdünnter Homogenatüberstand (Rinderhirn, Rinderleber und Rattenhirn, eingestellte GR-Aktivität jeweils ca. 90 mU) wurde mit 10 µl PBS (Kontrolle) oder mit 10 µl Antiserum gemischt. Die Ansätze wurden 1 h bei Rt auf einem Rotationsschüttler bei 400 Umdrehungen pro Minute geschüttelt und anschließend mit oder ohne Protein A-Sepharose (100 µl) eine weitere Stunde lang geschüttelt. Danach wurden die Lösungen 30 min zentrifugiert (15000 x g, 4°C) und die GR-Aktivität in den Überständen und den Niederschlägen (in 200 µl PBS resuspendiert) bestimmt.

7.8.3. „Nativer Western Blot“

Zum Nachweis von GR in Zellhomogenaten mittels „nativer Western Blot“-Analyse wurden die Homogenatüberstände durch native Polyacrylamidgelelektrophorese in einem 4 %-igen Sammelgel und einem 11 %-igen Trenngel in Abwesenheit von SDS und Mercaptoethanol aufgetrennt. Bei 100 V wurden die Proteine dann während einer Stunde bei 4°C in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8.5, 20 % (v/v) Methanol) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden dann 1 h lang mit Milchpulver (5 % w/v) in PBS geblockt und 2 h lang bei Rt mit anti-GR (in PBS/Milchpulver) (Verdünnung: 1:200 im Falle der Rattenhomogenatüberstände; 1: 1000 für die Rinderhomogenatüberstände) inkubiert. Nach Waschen mit PBS (2 x 10 min) wurde die Membran 1 h lang mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen-IgG-AP (1: 5000 verdünnt in PBS) inkubiert. Nach Waschen in PBS (2 x 10 min) wurde die Membran in 0.2 M Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 9.5 mit 40 µM 4-Nitroblautetrazoliumchlorid und 41 µM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat inkubiert. Die Substratreaktion wurde durch Waschen mit H₂O_{dd} und anschließender Inkubation in PBS/20 mM EDTA abgestoppt.

7.8.4. Indirekte Immuncytochemie mit Doppelmarkierung

7.8.4.1. Vorbereitung der Zellen

Astroglia-reiche Primärkulturen und microglia-reiche Sekundärkulturen wurden auf Glasdeckgläschen (18 x 18 mm) kultiviert. Die Zellen wurden bei Rt mit 3.5 % (w/v)

Paraformaldehyd in PBS 10 min lang fixiert. Nach zweimaligem 10-minütigem Waschen in PBS wurden die Zellen 5 min lang in 0.1 % (w/v) Glycin in PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Inkubation mit 0.3 % (w/v) Triton X-100 in PBS 10 min lang permeabilisiert. Neuronen-reiche Primärkulturen wurden auf poly-D-Lysin-vorbehandelten Deckgläschen kultiviert und durch Inkubation mit 3.5 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS 15 min lang und mit 30 % (v/v) Methanol (-20°C) 5 min lang fixiert und - wie oben beschrieben - mit Glycin und Triton X-100 weiterbehandelt. Für die Anfärbung mit anti-GalC wurden die Zellen vor der Fixierung/Permeabilisierung 2 x mit HEPES-Medium (25 mM HEPES in DMEM, 330 milliosmolar durch Zugabe der entsprechenden Menge an NaCl) je 10 min lang gewaschen und 1 h lang bei Rt mit anti-GalC (1:10 in HEPES-Medium) inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 2 x mit HEPES-Medium gewaschen und, wie oben beschrieben, fixiert und permeabilisiert.

7.8.4.2. Immuncytochemische Doppelmarkierung

Die immuncytochemische Doppelmarkierung wurde bei Rt durchgeführt. Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurden die Zellen zweimal mit PBS je 10 min lang gewaschen. Die Antikörper und das Streptavidin-Texasrot wurden in PBS mit 10 % Ziegennormalserum verdünnt. Einzige Ausnahme war der GAP43-Antikörper, der in PBS mit 3 % (w/v) Rinderserumalbumin verdünnt wurde. Die primären Antikörper wurden in den folgenden Verdünnungen verwendet: anti-GFAP, 1:10; anti-GalC, 1:10; Ox42, 1:10; anti-GAP43, 1:100; Präimmunserum, 1: 400; anti-GR, 1:400. Die fixierten Zellen wurden mit einem monoclonalen Antikörper und dem GR-Antiserum (bzw. dem Präimmunserum) 2 h lang, danach mit biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG (1:250) 1 h lang und letztlich mit Streptavidin-Texasrot (1:200) und FITC-markiertem anti-Maus-IgG (1:100) 30 min lang unter Lichtausschluß inkubiert. Die Deckgläschen wurden mit 50 % Glycerin in PBS eingebettet bevor die Anfärbung im Fluoreszenzmikroskop untersucht wurde.

7.9. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchungen der gereinigten Enzyme wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Felix Reutter (Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen) durchgeführt (Reutter, 1999).

7.9.1. Massenbestimmung von Proteinen mittels Matrixunterstützter Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie

Für die Massenbestimmung wurde 10 µg der zu untersuchenden Proteine in 50 µl H₂O_{dd} gelöst. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugieren (16000 x g, 1 min) entfernt. Zu 5 µl des klaren Überstandes wurden 5 µl der Probenmatrix (Sinapinsäure; 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxymizinsäure) gegeben. Ein Mikroliter dieser Lösung (enthielt 100 ng Protein) wurde auf den Probenhalter des MALDI-MS aufgebracht und die Probe im Vakuum kristallisiert. Anschließend wurde die Probe durch Laserbeschuss (Laserenergie: 6.2 µJ) in Ionen überführt. Die so entstandenen Ionen wurden durch eine Ionenoptik gesammelt und auf einer definierten Strecke beschleunigt. Die Geschwindigkeit, die die Ionen auf dieser Beschleunigungsstrecke erhalten, ist abhängig von ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z). Die Ionen wurden in ein ebenfalls evakuiertes Rohr geschossen und fielen an dessen Ende auf einen Detektor. Gemessen wird in diesem „time of flight“- (TOF)-Detektor die Zeitdifferenz zwischen Laserpuls und dem sukzessiven Auftreffen der Ionen unterschiedlicher m/z Werte auf dem Detektor. Für die Erzeugung der Spektren wurden 50 Einzelspektren akkumuliert.

7.9.2. Analyse von Spaltpeptiden

7.9.2.1. Probenvorbereitung

Proteinlösungen (jeweils Eluate der Molekularsiebchromatographie) mit 25 µg GR wurden über Nacht bei 4°C gegen 2 l H₂O_{dd} dialysiert, sodann wurde die Aktivität des Dialysates gemessen und erneut die Proteinkonzentration nach der modifizierten Bradford-Methode (7.4.) bestimmt. Anschließend wurden die Proben lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.9.2.2. Tryptischer Verdau

Die einzelnen Protein- und Kontrollansätze wurden folgendermaßen für die Analyse vorbereitet: Die Proteinlyophilisate wurden in 20 µl 8 M Harnstoff ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$) gelöst. Danach wurden 140 µl 100 mM Tris/HCl, pH 8.5, zugegeben. Die Proteine wurden anschließend mit 7.5 µl 45 µM Dithiothreitol (DTT) versetzt und 20 min bei 50°C im Heizblock reduziert. Der Lösung wurde 7.5 µl 100 mM Iodacetamid beigefügt und nach 15 min bei Rt wurde Trypsin (1 µg gelöst in 10 µl 1 M HCl) den Ansätzen zupipetiert. Dabei wurde 5 % an Trypsin der jeweiligen Proteinmenge (Gehirn-GR und Leber-GR) beigefügt. Nach der Proteolyse im Brutschrank (18 h bei 37°C) wurden die Proben maximal zwei Wochen bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

7.9.2.3. Auftrennung der Spaltpeptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Auftrennung der Spaltpeptide erfolgte mit Hilfe einer Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an einer C18 Phenomenex-Trennsäule. Elutionsmittel A war $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ / 0.1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA), Elutionsmittel B war 0.1 % (v/v) TFA in Acetonitril. Die Säule wurde zunächst mit 2 Säulenvolumina 5 % Elutionsmittel B / 95 % Elutionsmittel A äquilibriert. Die Proben (90 µl der in 7.9.2.2. beschriebenen Verdauansätze) wurden appliziert und entsalzt, indem die Säule mit 3 Säulenvolumina 5 % Elutionsmittel B / 95 % Elutionsmittel A gespült wurde. Anschließend wurden die tryptisch verdauten Peptide mit Hilfe eines linearen Gradienten im Bereich von 5 - 100 % Elutionsmittel B/ 95 - 0 % Elutionsmittel A eluiert und in das Massenspektrometer eingebracht. Die Fließgeschwindigkeit bei der Entsalzung und der Elution betrug 45 µl/min. Gegen Ende der Chromatographie wurde die Säule mit 2 Säulenvolumina 100 % Elutionsmittel B gespült und erneut mit 2 Säulenvolumina 5 % Elutionsmittel B / 95 % Elutionsmittel A äquilibriert.

7.9.2.4. Peptidanalyse mittels Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie

Die Analyse der tryptischen Peptide der Enzyme wurden mit Hilfe eines Triple-Quadropol Massenspektrometers durchgeführt. Die Kapillarspannung betrug dabei 3.5 kV, die Cone-Spannung für Peptide und Proteine zwischen 35 und 70 V. Preßluft (technische Reinheit) fand

als Trocknungsgas mit einem Fluß von 200 l/h und als Sprühgas mit einem Fluß von 20 l/h Verwendung. Die Temperatur der Ionisierungsquelle betrug 70°C. Die Auflösung der erhaltenen Daten im Massenanalysator wurde durch Variation der Ionenenergie optimiert. Vor der Analyse einer jeden Probe wurde zuerst eine Messung ohne Peptidzusatz durchgeführt. Dadurch konnten die durch die Lösungsmittel verursachten Hintergrundsignale detektiert und von den Peptidsignalen abgezogen werden. Die TIC-Chromatogramme wurden mit Hilfe einer speziellen Anwendersoftware (in die MassLynxSoftware integrierte Savitzky-Golay-Funktion) über drei benachbarte Datenpunkte „geglättet“. Sodann wurden die Gipfel automatisch integriert. Ebenso automatisch wurden diese Chromatogramme auf Ionenserien untersucht. Durch diese „software“-gesteuerte Bearbeitung der gewonnenen Rohdaten konnten die Massen genau bestimmt und in Relation zu den Retentionszeiten gebracht werden.

8. Literaturverzeichnis

- Abe K. und Saito H. (1998) Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurones and astrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* **83**, 40-46.
- Acan N.L. und Tezcan E.F. (1989) Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Lett.* **250**, 72-74.
- Acan N.L. und Tezcan E.F. (1991) Kinetic properties of sheep brain glutathione reductase. *Enzyme* **45**, 121-124.
- Acan N.L. und Tezcan E.F. (1995) Inhibition kinetics of sheep brain glutathione reductase by cadmium ion. *Biochem. Mol. Med.* **54**, 33-37.
- Amara A., Coussemarcq M. und Geffard M. (1994) Antibodies to reduced glutathione. *Brain Res.* **659**, 237-242.
- Arcscott L.D., Thorpe C. und Williams C.H.jr. (1981) Glutathione reductase from yeast. Differential reactivity of the nascent thiols in two-electron reduced enzyme and properties of a monoalkylated derivative. *Biochemistry* **20**, 1513-1520.
- Arteel G.E., Briviba K. und Sies H. (1999) Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* **445**, 226-230.
- Back S.A., Gan X., Li Y., Rosenberg P.A. und Volpe J.J. (1998) Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J. Neurosci.* **18**, 6241-6253.
- Baquer N.Z, Hothersall J.S. und McLean P. (1988) Function and regulation of the pentosephosphate pathway in brain. *Curr. Top. Cell Regul.* **29**, 265-289.
- Ben-Yoseph O., Boxer P.A. und Ross B.D. (1994) Oxidative stress in the central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway. *Dev. Neurosci.* **16**, 328-336.
- Ben-Yoseph O., Boxer P.A. und Ross B.D. (1996) Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J. Neurochem.* **66**, 2329-2337.
- Bixel M.G. (1998) Untersuchungen zur Bedeutung des Leucins im Energiestoffwechsel des Gehirns. Dissertation, Universität Tübingen.

- Boggaram V., Larson K. und Mannervik B. (1978) Characterization of glutathione reductase from porcine erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **527**, 337-347.
- Boggaram V., Brobjer T., Larson K. und Mannervik B. (1979) Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B and crystallization of the enzyme. *Anal. Biochem.* **98**, 335-340.
- Boje K.M. und Arora P.K. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* **587**, 250-256.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brodelius P., Larsson P.-O. und Mosbach K. (1974) The synthesis of three AMP-analogues: N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate, and N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* **47**, 81-89.
- Brown N.L., Ford S.J., Pridmore R.D. und Fritzing D.C. (1983) Nucleotide sequence of a gene from the *Pseudomonas* transposon Tn501 encoding mercuric reductase. *Biochemistry* **22**, 4089-4094.
- Bukato G., Kochan Z. und Swierczynski J. (1995a) Purification and properties of cytosolic and mitochondrial malic enzyme isolated from human brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 47-54.
- Bukato G., Kochan Z. und Swierczynski J. (1995b) Different regulatory properties of the cytosolic and mitochondrial forms of malic enzyme isolated from human brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 1003-1008.
- Bunge R.P. (1981) The development of myelin and myelin-related cells. *Trends Neurosci.* **4**, 175-177.
- Burnette W.N. (1981) „Western blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Carlberg I. und Mannervik B. (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **250**, 5475-5480.

- Carlberg I. und Mannervik B. (1981) Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B. *Analyt. Biochem.* **116**, 531-536.
- Carlberg I. und Mannervik B. (1985) Glutathione reductase. *Meth. Enzymol.* **113**, 484-490.
- Celis J.E., Ratz G., Basse B., Lauridsen J.B., Celis A., Jensen N.A. und Gromov P. (1997) High-resolution two-dimensional gel electrophoresis of protein: Isoelectric focusing (IEF) and nonequilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE). In *Cell Biology: A Laboratory Handbook* (Hrsg.: Celis J.E., Carter N., Hunter T., Shotton D., Simons K. und Small J.V.), 2. Auflage, S. 375-385. Academic Press, New York.
- Cesar M. und Hamprecht B. (1995) Immunocytochemical examination of neural rat and mouse primary cultures using monoclonal antibodies raised against pyruvate carboxylase. *J. Neurochem.* **64**, 2312-2318.
- Chance B., Sies H. und Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.
- Chatterjee S., Noack H., Possel H., Keilhoff G. und Wolf G. (1999) Glutathione levels in primary glial cultures: monochlorobimane provides evidence of cell type specific distribution. *Glia*, **27**, 152-161.
- Clancy R.M., Levartovsky D., Leszczynska-Piziak J., Yegudin J. und Abramson S.B. (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3680-3684.
- Clarke D.D. und Sokoloff L. (1999) Circulation and energy metabolism. In *Basic Neurochemistry- Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Hrsg.: Siegel G.J., Agranoff R.W., Albers R.W., Fisher S.K. und Uhler M.D.), S. 637-670, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Colton C.A. und Gilbert D. (1987) Production of superoxide anions by CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* **223**, 284-288.
- Cooper A.J.L. (1997) Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease* (Hrsg.: Rosenberg R.N., Prusiner S.B., DiMauro S., Barchi R.L. und Kunk L.M.), S. 1195-1230, Butterworth-Heinemann, Boston.

- Cooper T.G. (1981) *Biochemische Arbeitsmethoden*, 1. Auflage, S. 250-259, Walter de Gruyter Verlag, Berlin.
- Copin J.C., Ledig M. und Tholey G. (1992) Free radical scavenging systems of rat astroglial cells in primary culture: effect of anoxia and drug treatment. *Neurochem. Res.* **17**, 677-682.
- Cotgreave I.A. und Gerdes R.G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry - glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 1-9.
- Craven D.B., Harvey M.J., Lowe C.R. und Dean P.D.G. (1974) Affinity chromatography on immobilized adenosine 5'-monophosphate. 1. A new synthesis and some properties of an N⁶-immobilized 5'-AMP. *Eur. J. Biochem.* **41**, 329-333.
- D'Allesandri A. (1969) The stability of erythrocyte glutathione reductase. *Helv. Med. Acta* **35**, 118-123.
- Desagher S., Glowinski J. und Premont J. (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* **16**, 2553-2562.
- Douglas K.T. (1987) Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **59**, 103-167.
- Dringen R. und Hamprecht B. (1997) Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res.* **759**, 67-75.
- Dringen R., Kussmaul L. und Hamprecht B. (1998a) Rapid clearance of tertiary butyl hydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione. *Glia* **23**, 139-145.
- Dringen R., Kussmaul L. und Hamprecht B. (1998b) Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res. Protocols* **2**, 223-228.
- Dringen R., Kussmaul L., Gutterer J.M., Hirrlinger J. und Hamprecht B. (1999) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J. Neurochem.* **72**, 2523-2530.
- Fahey R.C., Brown W.C., Adams W.B. und Worsham M.B. (1978) Occurrence of glutathione in bacteria. *J. Bacteriol.* **133**, 1136-1139.

- Fahey R.C., Buschbacher R.M. und Newton G.L. (1987) The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. *J. Mol. Evol.* **25**, 81-88.
- Flohé L. (1989) Structure and catalytic mechanism of glutathione peroxidase. In *Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Implications* (Hrsg.: Taniguchi N., Higashi T., Sakamoto Y. und Meister A.), S. 103-114, Academic Press, San Diego.
- Forssmann W.G. und Heym C. (1974) *Grundriß der Neuroanatomie*. Springer Verlag, Berlin
- Fox B. und Walsh C.T. (1982) Mercuric reductase. Purification and characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *J. Biol. Chem.* **257**, 2489-2503.
- Foyer C.H. und Halliwell B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.
- Frenkel (1972) Isolation and some properties of a cytosol and a mitochondrial malic enzyme from bovine brain. *Arch. Biochem. Biophys.* **152**, 136-143.
- Garcia-Alfonso C., Martinez-Galisteo E., Llobell A., Barcena J.A. und Lopez-Barea J. (1993) Horse liver glutathione reductase - purification and characterization. *Int. J. Biochem.* **25**, 61-68.
- Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P. und Youdim M.B.H. (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochem.* **63**, 793-807.
- Goldenberg D.B. (1990) Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. In *Protein Structure - a Practical Approach* (Hrsg.: Creighton T.E.), S. 225-250, IRL Press, Oxford.
- Greer S. und Perham R.N. (1986) Glutathione reductase from *Escherichia coli*: cloning and sequence analysis of the gene and relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *Biochemistry* **25**, 2736-2742.
- Giulian D. und Baker T.J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.* **6**, 2163-2178.
- Hall A.G. (1999) The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**, 238-245.

- Halliwell B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609-1623.
- Hamprecht B. und Dringen R. (1995) Energy metabolism. In *Neuroglia* (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.), S.473-487, Oxford University Press, New York.
- Hamprecht B. und Löffler F. (1985) Primary glial cultures as a model system for studying hormone action. *Meth. Enzymol.* **109**, 341-345.
- Hanes C.S. (1932) Studies on plant amylases. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* **26**, 1406-1421.
- Herbert W.J. (1978) Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. In *Handbook of Experimental Immunology in Three Volumes*, Volume 3: Application of Immunological Methods (Hrsg.: Weir D.M.), S. A3.1-A3.14, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hirrlinger J. (1999) Untersuchungen zum Glutathionstoffwechsel von Microglia- und Astrogliazellen in Kultur unter oxidativem Streß. Diplomarbeit, Universität Tübingen.
- Hirrlinger J., Gutterer J.M., Kussmaul L., Hamprecht B. und Dringen R. (1999) Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *J. Neurochem.* **73**, Suppl., S77C.
- Hjelle O.P., Chaudhry A.C. und Ottersen O.P. (1994) Antisera to glutathione: characterization and immunocytochemical application to the rat cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 793-804.
- Ho Y.S., Magnenat J.L., Bronson R.T., Cao J., Gargano M., Sugawara M. und Funk C.D. (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased cellular sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* **26**, 16644-16651.
- Hoek J.B. und Rydström J. (1988) Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem. J.* **254**, 1-10.
- Hoyt K.R., Gallagher A.J., Hastings T.G. und Reynolds I.J. (1997) Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons. *Neurochem. Res.* **22**, 333-340.
- Huang J. und Philbert M.A. (1995) Distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Res.* **680**, 16-22.

- Huang T.-M. und Chang G.-G. (1992) Characterization of the tetramer-dimer-monomer equilibrium of the enzymatically active subunits of pigeon liver malic enzyme. *Biochemistry* **31**, 12658-12664.
- Huber P.W. und Brandt K.G. (1980) Kinetic studies of the mechanism of pyridine nucleotide dependent reduction of yeast glutathione reductase. *Biochemistry* **19**, 4568-4575.
- Hull M.R., Long S.P. und Jahnke L.S. (1997) Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species. *Austral. J. Plant Physiol.* **24**, 337-343.
- Hurn B.A.L. und Chantler S.M. (1980) Production of antibodies. *Meth. Enzymol.* **70**, 105-142.
- Husain J. und Juurlink B.H.J. (1995) Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species. *Brain Res.* **698**, 86-94.
- Icen A. (1967) Glutathione reductase of human erythrocytes. Purification and properties. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **96**, Suppl. 2, 1-67.
- Jain A., Martensson J., Stole E., Auld P.A.M. und Meister A. (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1913-1917.
- Janeway C.A.jr. und Travers P. (1995) *Immunologie*. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Juurlink B.H.J. (1993) NADP-linked isozymes are the major forms of isocitrate dehydrogenase in mouse type-1-like astrocytes. *Life Sci.* **52**, 1087-1090.
- Juurlink B.H.J. (1997) Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 151-166.
- Juurlink B.H.J., Thornburne S.K. und Hertz L. (1998) Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. *Glia* **22**, 371-378.
- Karplus P.A. und Schulz G.E. (1987) Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **195**, 701-729.
- Keese M.A., Saffrich R., Dandekar T., Becker K. und Schirmer R.H. (1999) Microinjected glutathione reductase crystals as indicators of the redox status in living cells. *FEBS Lett.* **447**, 135-138.
- Kim Y.S. und Kim S.U. (1991) Oligodendroglia cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J. Neurosci. Res.* **29**, 100-106.

- Kleinig H. und Sitte P. (1984) *Zellbiologie*. S. 363-372, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Knollema S., Hom H.W., Schirmer H., Korf J. und Terhorst G.J. (1996) Immunolocalization of glutathione reductase in the murine brain. *J. Comp. Neurol.* **373**, 157-172.
- Krauth-Siegel R.L (1985) FAD analogues as prosthetic groups of human glutathione reductase. Properties of the modified enzyme species and comparisons with the active site structure. *Eur. J. Biochem.* **148**, 335-344.
- Krauth-Siegel R.L., Enders B., Henderson G.B., Fairlamb A.H. und Schirmer R.H. (1987) Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzii*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur. J. Biochem.* **164**, 123-128.
- Krohne-Ehrich G., Schirmer R.H. und Untucht-Grau R. (1977) Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptide. *Eur. J. Biochem.* **80**, 65-71.
- Kurz G.M. (1992) Cytosolisches Malatenzym: Reinigung aus Rinderhirn sowie Charakterisierung, Regulation und immunocytochemische Lokalisierung in neuronalen Zellkulturen und Gehirnschnitten. Dissertation, Universität Tübingen.
- Kurz G.M., Wiesinger H. und Hamprecht B. (1993) Purification of cytosolic malic enzyme from bovine brain, generation of monoclonal antibodies, and immunocytochemical localization of the enzyme in glial cells of neural primary cultures. *J. Neurochem.* **60**, 1467-1474.
- Kussmaul L., Hamprecht B. und Dringen R. (1999) The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. *J. Neurochem.* **73**, 1246-1253.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lassmann H., Zimprich F., Vass K. und Hickey W.F. (1991) Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J. Neurosci. Res.* **28**, 236-243.
- Latta K. und Augusteyn R.C. (1984) The purification of human lens glutathione reductase. *Exp. Eye Res.* **39**, 343-354.
- Laurent T.C. und Killander J. (1964) A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatogr.* **14**, 317-330.

- Lee C.P. und Ernster L.O. (1989) Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenase 1963-1988: a commentary. *Biochim. Biophys. Acta* **1000**, 371-376.
- Lehmann W.D. (1996) *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Leonhardt H. (1985) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 7. Auflage, S. 233-241, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lindenau J., Noack H., Asayama K. und Wolf G. (1998) Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* **24**, 252-256.
- Ling E.A. (1981) The origin and nature of microglia. In *Advances in Cellular Neurobiology* (Hrsg.: Federoff S. und Hertz L.), Band 2, S. 33-82, Academic Press, New York.
- Linke R. (1998) Immunologische Techniken. In *Bioanalytik* (Hrsg.: Lottspeich F. und Zorbas H.), S. 67-102, Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Löffler F., Lohmann S.M., Walckhoff B., Walter U. und Hamprecht B. (1986) Immunocytochemical characterization of neuron-rich primary cultures of embryonic rat brain cells by established neuronal and glial markers and by monospecific antisera against cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the synaptic vesicle protein synapsin I. *Brain Res.* **363**, 205-221.
- Lopez-Barea J. und Lee C.Y. (1979) Mouse-liver glutathione reductase. *Eur. J. Biochem.* **98**, 487-499.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Makar T.K., Nedergaard M., Preuss A., Gelbard A.S., Perumal A.S. und Cooper A.J.L. (1994) Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* **62**, 45-53.
- Mann P.J.G. (1932) The reduction of glutathione by a liver system. *Biochem. J.* **26**, 785-790.
- Mannervik B. (1973) A branched reaction mechanism of glutathione reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**, 1151-1158.

LITERATURVERZEICHNIS

- Mannervik B., Jacobsson K. und Boggaram V. (1976) Purification of glutathione reductase from erythrocytes by use of affinity chromatography on 2',5'-ADP Sepharose 4-B. *FEBS Lett.* **66**, 221-224.
- Maresca B., Jacobson E., Medoff G. und Kobayashi G. (1978) Cystine reductase in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* **135**, 987-992.
- Martensson J., Lai J.C.K. und Meister A. (1990) High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7185-7189.
- Massey V. und Williams C.H.jr. (1965) On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* **240**, 4470-4480.
- Mata A.M., Pinto M.C. und Lopez-Barea J. (1984) Purification by affinity chromatography of glutathione reductase (E.C. 1.6.4.2.) from *Escherichia coli* and characterization of such enzyme. *Z. Naturforsch. C.* **39**, 908-915.
- Mattson M.P., Lovell M.A., Furukawa K. und Markesbery W.R. (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca^{2+} concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **65**, 1740-1751.
- Maybodi L., Pow D.V., Kharazia V.N. und Weinberg R.J. (1999) Immunocytochemical demonstration of reduced glutathione in neurons of rat forebrain. *Brain Res.* **817**, 199-205.
- McKerrow J.H. und Robinson A.B. (1971) Deamidation of asparaginyl residues as a hazard in experimental protein and peptide procedures. *Anal. Biochem.* **42**, 565-568.
- Medana M., Chan-Ling T. und Hunt N.H. (1996) Redistribution and degeneration of retinal astrocytes in experimental murine cerebral malaria: relationship to distribution of the blood-retinal barrier. *Glia* **16**, 51-64.
- Meiri K.F., Bickerstaff L.E. und Schwob J.E. (1991) Monoclonal antibodies show that kinase C phosphorylation of GAP-43 during axonogenesis is both spatially and temporally in vivo. *J. Cell Biol.*, **112**, 991-1005.
- Meister A. (1974) Glutathione synthesis. *Enzymes* **10**, 671-697.
- Meister A. (1988) On the discovery of glutathione. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 185-188.

- Meister A. und Anderson M.E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
- Minghetti L. und Levi G. (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* **54**, 99-125.
- Mischel R.E., Kim Y.S., Sheldon R.A. und Ferriero D.M. (1997) Hydrogen peroxide is selectively toxic to immature murine neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* **231**, 17-20.
- Misra I. und Griffith O.W. (1998) Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. *Prot. Expr. Purific.* **13**, 268-276.
- Mize C.E. und Langdon R.G. (1961) Hepatic glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1596-1600.
- Montrichard F., Le Guen F., Laval-Martin D.L. und Davioud-Charvet E. (1999) Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa: *Euglena gracilis* Z. *FEBS Lett.* **442**, 29-33.
- Morell P. und Norton W.T. (1980) Myelin. *Scientific Am.* **242**, 88-118.
- Morroff G. und Kosow D.V. (1978) Characterization of human platelet glutathione reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **527**, 327-336.
- Mullineaux P., Enard C., Hellens R. und Creissen G. (1996) Characterisation of a glutathione reductase gene and its locus from pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **200**, 286-294.
- Nakashima K., Miwa S. und Yamauchi K. (1976) Human erythrocyte glutathione reductase. I. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* **445**, 309-323.
- Noack H., Possel H., Rethfeld C., Keilhoff G. und Wolf G. (1999) Peroxynitrite mediated damage and lowered superoxide tolerance in primary cortical glial cultures after induction of the inducible isoform of NOS. *Glia* **28**, 13-24.
- Ochoa S., Mehler A. H., Blanchard M.L., Jukes T.H., Hoffmann C.E. und Regen M. (1947) Biotin and carbon dioxide fixation in liver. *J. Biol. Chem.* **170**, 413-414.
- Ochoa S. Mehler A.H. und Kornberg A. (1948) Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. *J. Biol. Chem.* **174**, 979-1000.
- O'Farrell P. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

- Ögüs A. und Tezcan E.F. (1981) Purification and subunit structure of glutathione reductase from human leukocytes. *Biochem. Med.* **25**, 81-91.
- Okonkwo P.O., Orłowski M. und Green J.P. (1974) Enzymes of the γ -glutamyl cycle in the choroid plexus and brain. *J. Neurochem.* **22**, 1053-1058.
- Ondarza R.N., Escamilla E., Gutiérrez J. und de la Chica G. (1983) CoAS-S Glutathione and GSSG reductases from rat liver. Two disulfide oxidoreductase activities in one protein entity. *Biochim. Biophys. Acta* **341**, 162-171.
- Oppenheimer L., Wellner V.P., Griffith O.W. und Meister A. (1979) Glutathione synthetase: purification from rat kidney and mapping of substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* **254**, 5184-5190.
- Orr M.D. und Vitols E. (1966) Thioredoxin from *Lactobacillus leichmannii* and its role as hydrogen donor for ribonucleoside triphosphate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 109-115.
- Pai E.F. und Schulz G.E. (1983) The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from X-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J. Biol. Chem.* **28**, 1752-1757.
- Panfili E., Sandri G. und Ernster L. (1991) Distribution of glutathione peroxidases and reductases in rat brain mitochondria. *FEBS Lett.* **290**, 35-37.
- Peterson G.L. (1979) Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analyt. Biochem.* **100**, 201-220.
- Philbert M.A., Beiswanger C.M., Waters D.K., Reuhl K.R. und Lowndes H.E. (1991) Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: histochemical localization by mercury orange and o-phthalodialdehyde-induced histofluorescence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**, 215-227.
- Poot M., Teubert H., Rabinovitch P.S. und Kavanagh T.J. (1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.* **163**, 555-560.
- Porter N.A. (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* **105**, 273-282.
- Privat A., Gimenez-Ribotta M. und Ridet J.-L. (1995) In *Neuroglia* (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.), S. 3-22, Oxford University Press, New York.

- Rakauskiene G.A., Cenas N.K. und Kulys J.J. (1989) A „branched“ mechanism of the reverse reaction of yeast glutathione reductase. An estimation of the enzyme standard potential values from the steady-state kinetics data. *FEBS Lett.* **243**, 33-36.
- Rall T.H. und Lehninger A.L. (1952) Glutathione reductase of animal tissues *J. Biol. Chem.* **194**, 119-130.
- Ranscht B., Clapshaw P.A., Price J., Noble M. und Seifert W. (1982) Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2709-2713.
- Reinhart P.H., Pfeiffer B., Spengler S. und Hamprecht B. (1990) Purification of glycogen phosphorylase from bovine brain and immunocytochemical examination of rat primary cultures using monoclonal antibodies raised against this enzyme. *J. Neurochem.* **54**, 1474-1483.
- Rendón J.L., Pardo J.P., Mendoza-Hernández H., Rojo-Dominguez A. und Hernández-Arana A. (1995) Denaturing behaviour of glutathione reductase from Cyanobacterium *Spirulina maxima* in guanidine hydrochloride. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 264-270.
- Reutter F. (1999) Synthese von Lipopeptid-Immunmodulatoren an fester Phase und Identifizierung von Isoformen von Proteinen mit massenspektrometrischen Methoden Dissertation, Universität Tübingen.
- Rice D.W., Schulz G.E. und Guest J.R. (1984) Structural relationship between glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **174**, 483-496.
- Rice M.E. und Russo-Menna I. (1998) Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* **82**, 1213-1223.
- Richman P.G. und Meister A. (1975) Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250**, 1422-1426.
- Richter-Landsberg C. und Vollgraf U. (1998) Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglial cells. *Exp. Cell Res.* **244**, 218-229.
- Ritchie J.M. (1984) Physiological basis of conduction in myelinated nerve fibers. In *Myelin* (Hrsg.: Morell P.), S. 117-146, Plenum Press, New York.
- Rojo-Dominguez A., Hernández-Arana A., Mendoza-Hernández H. und Rendón J.L. (1997) Thermal denaturation of glutathione reductase from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**, 631-639.

- Rutter W.J. und Lardy H.A. (1958) Purification and properties of pigeon liver malic enzyme. *J. Biol. Chem* **233**, 374-382.
- Saez G.T., Bannister W.H. und Bannister J.V. (1990) Free radicals and thiol compounds - The role of glutathione against free radical toxicity. In *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions* (Hrsg.: Vina J.), S. 237-254, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Sankarapandi S., Zweier J.L., Mukherjee G., Quinn M.T. und Huso D.L. (1998) Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**, 312-321.
- Schaedle M. und Bassham J.A. (1977) Chloroplast glutathione reductase. *Plant. Physiol.* **59**, 1011-1012.
- Schirmer R.H., Krauth-Siegel R.L. und Schulz G.E. (1989) Glutathione reductase. In *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects-Part A* (Hrsg.: Dolphin D., Poulson R. und Avramovic O.), S. 553-595, John Wiley & Sons, New York.
- Schmidt R.E., Spencer S.A., Coleman B.D. und Roth K. (1991) Immunohistochemical localization of GAP-43 in rat and human sympathetic nervous system - effects of aging and diabetes. *Brain Res.* **552**, 190-197.
- Schulz G.E., Schirmer R.H., Sachsenheimer W. und Pai E.F. (1978) The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature* **273**, 120-124.
- Scopes R.K. (1989) *Protein Purification: Principles and Methods*, S. 96-98 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin.
- Scotchler J.W. und Robinson A.B. (1974) Deamidation of glutamyl residues: dependence on pH, temperature, and ionic strength. *Anal. Biochem.* **59**, 319-322.
- Scott E.M. (1976) Purification of red cell enzymes by treatment with n-butanol and chloroform. *Prep. Biochem.* **6**, 147-152.
- Sekura R. und Meister A. (1977) γ -Glutamylcysteine synthetase: further purification, "half of the sites" reactivity, subunits, and specificity. *J. Biol. Chem.* **252**, 2599-2605.
- Sensenbrenner M., Lucas M. und Deloulme J.-C. (1997) Expression of two neuronal markers, growth-associated protein 43 and neuron-specific enolase in rat glial cells. *J. Mol. Med.* **75**, 653-663.

- Serafini M.T. und Romeu A. (1989) Steady-state kinetic studies of glutathione reductase. *Rev. Esp. Fisiol.* **45**, 199-202.
- Shames S.L., Fairlamb A.H., Cerami A. und Walsh C.T. (1986) Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry* **25**, 3519-3526.
- Shank R.P., Bennett G.S., Freytag S.O. und Campbell G.L.M. (1985) Pyruvate carboxylase: An astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res.* **329**, 364-367.
- Shigeoka S., Onishi T., Nakano Y. und Kitaoka S. (1987) Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Euglena gracilis* z.. *Biochem. J.* **242**, 511-515.
- Sievers J., Parwaresch R. und Wottge H.U. (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* **12**, 245-258.
- Simpson E.R. und Estrabrook R.W. (1968) A possible mechanism for the transfer of cytosol-generated NADPH to the mitochondrial mixed-function oxidases in bovine adrenal cortex: a malat shuttle. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 977-978.
- Simpson E.R. und Estrabrook R.W. (1969) Mitochondrial malic enzyme: the source of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate for steroid hydroxylation in bovine adrenal cortex mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 384-395.
- Singh S.P., Wishnok J.S., Keshive M., Deen W.M. und Tannenbaum S.R. (1996) The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14428-14433.
- Slivka A., Mytilineou C. und Cohen G. (1987) Histochemical evaluation of glutathione in brain. *Brain Res.* **409**, 273-284.
- Sonderer B., Wild P., Whyler R., Fontana A., Peterhans E. und Schwyzer M. (1987) Murine glia cells in culture can be stimulated to generate reactive oxygen. *J. Leukoc. Biol.* **42**, 463-473.
- Staal G.E.J., Visser J. und Veeger C. (1969) Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 39-48.

- Steele J.C.H.jr. und Reynolds J.A. (1979) Molecular weight and hydrodynamic properties of apolipoprotein b in guanidine hydrochloride and sodium dodecyl sulfate solutions. *J. Biol. Chem.* **254**, 1639-1643.
- Streit W.J., Graeber M.B. und Kreutzberg G.W. (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* **1**, 301-307.
- Streit W.J. (1995) Microglial cells. In *Neuroglia* (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.), S. 85-96, Oxford University Press, New York.
- Tate S.S., Ross L.L. und Meister A. (1973) The γ -glutamyl cycle in the choroid plexus: its possible function in amino acid transport. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 1447-1449.
- Thornburne S.K. und Juurlink B.H.J. (1996) Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *J. Neurochem.* **67**, 1014-1022.
- Tunón P. und Johansson K.-E. (1984) Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2**, 171-179.
- Tutic M, Lu X.A., Schirmer R.H. und Werner D. (1990) Cloning and sequencing of mammalian glutathione reductase cDNA. *Eur. J. Biochem.* **188**, 523-528.
- Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohé R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D. und Flohe´ L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Meth. Enzymol.* **252**, 38-53.
- Verleysdonk S. (1994) Herstellung homogener astroglialer Zellkulturen aus Rattenhirn durch ein Mangelmedium und deren Charakterisierung. Diplomarbeit, Universität Tübingen.
- Vogel R. (1997) Enzymatische und immunocytochemische Untersuchungen zur Lokalisation des mitochondrialen Malatenzyms im Rattenhirn. Dissertation, Universität Tübingen.
- Vogel R., Jennemann G., Seitz J., Wiesinger H. und Hamprecht B. (1998) Mitochondrial malic enzyme: purification from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization in neurons of rat brain. *J. Neurochem.* **71**, 844-852.
- Vogel R., Wiesinger H., Hamprecht B. und Dringen R. (1999) The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neurosci. Lett.* **275**, 97-100.
- Vogel S. (1991) Photometric determination of enzymes in brain sections. Isocitrate dehydrogenases. *Histochemistry* **95**, 629-633.

- Weinberg E.L. und Spencer P.S. (1979) Studies on the control of myelinogenesis. 3. Signalling of oligodendrocyte myelination by regenerating peripheral axons. *Brain Res.* **162**, 273-279.
- Wider G. und Wüthrich K. (1999) NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **9**, 594-601.
- Whittemore E.R., Loo D.T., Watt J.A. und Cotman C.W. (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal cultures. *Neuroscience* **67**, 921-932.
- Williams C.H.jr., Zanetti G., Arscott L.D. und McAllister (1967) Lipoamid dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **242**, 5226-5231.
- Williams C.H.jr. (1976) Flavin-containing dehydrogenases. *Enzymes* **13**, 89-173.
- Winterbourn C.C. und Metodiewa D. (1994) The reactions of superoxide with reduced glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 284-290.
- Woodin T.S. und Segel I.H. (1968) Isolation and characterization of glutathione reductase from *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **167**, 64-77.
- Worthington D.J. und Rosemeyer M.A. (1974) Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **48**, 167-177.
- Worthington D.J. und Rosemeyer M.A. (1975) Glutathione reductase from human erythrocytes. Molecular weight, subunit composition and aggregation properties. *Eur. J. Biochem.* **60**, 459-466.
- Worthington D.J. und Rosemeyer M.A. (1976) Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *Eur. J. Biochem.* **67**, 231-238.
- Yeung K.K. und Carrico R.J. (1976) Purification of malic enzyme by affinity chromatography on immobilized N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate. *Anal. Biochem.* **74**, 369-375.
- Ying W., Han S.-K., Miller J.W. und Swanson A. (1999) Acidosis potentiates oxidative neuronal death by multiple mechanisms. *J. Neurochem.* **73**, 1549-1556.

LITERATURVERZEICHNIS

- Yonezawa M., Back S.A., Gan X., Rosenberg P.A. und Volpe J.J. (1996) Cystine deprivation induces oligodendroglial death: rescue by free radical scavengers and by a diffusible glial factor. *J. Neurochem.* **67**, 566-573.
- Zanetti G. (1979) Rabbit liver glutathione reductase. Purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **198**, 241-246.
- Zanetti G. und Williams C.H.jr. (1967) Characterization of the active center of thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **242**, 5232-5236.
- Zappe H.A., Krohne-Ehrich G. und Schulz G.E. (1977) Low resolution structure of human erythrocyte glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* **113**, 141-152.

9. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Reinigung und Charakterisierung der Glutathionreduktase aus Gehirn, die Lokalisierung des Enzyms in neuronalen Zellen und die Suche nach gewebsspezifischen Isoformen der Glutathionreduktase.

Glutathionreduktase wurde aus Rinderhirn zur Homogenität gereinigt. Das gereinigte Enzym besaß eine spezifische Aktivität von 145 U/mg Protein. Die isolierte GR ist ein Dimer. Die Molekülmasse der Untereinheiten wurde mit 54 kDa bestimmt.

Mit dem entwickelten Reinigungsverfahren wurde neben der Glutathionreduktase das cytosolische Malatenzym zur Homogenität gereinigt. Dieses Enzym wurde in einer spezifischen Aktivität von 40 U/mg Protein erhalten. Die Molekülmasse der Untereinheiten des homotetrameren Malatenzyms beträgt 64 kDa.

Mit dem Reinigungsschema, das für die Glutathionreduktase aus Rinderhirn entwickelt wurde, ließen sich auch die Glutathionreduktase aus Rinderleber und - nach einer Modifikation - die Glutathionreduktase aus Rindererythrocyten reinigen. Die spezifische Aktivität für die gereinigte Glutathionreduktase aus Leber betrug 147 U/mg, für das Enzym aus den Erythrocyten 114 U/mg.

Die Anwesenheit der Glutathionreduktase in astroglia-reichen und neuronenen-reichen Primärkulturen wurde durch Nachweis der spezifischen Aktivität demonstriert. In den beiden neuronalen Kulturtypen wurden keine Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten des Enzyms gefunden.

Gegen die aus Rinderhirn gereinigte Glutathionreduktase wurde ein Antiserum gewonnen, das geeignet war, das Enzym spezifisch durch „Western-Blot“-Experimente und immunocytochemische Anfärbungen in neuronalen Zellen nachzuweisen.

ZUSAMMENFASSUNG

Immuncytochemische Doppelfärbungen neuraler Kulturen gegen Glutathionreduktase und zelltypspezifische Marker identifizierten Microglia-, Oligodendrogliazellen und Neuronen als deutlich Glutathionreduktase enthaltende Zelltypen. Astrogliazellen wiesen nur schwache Immunreaktivität für Glutathionreduktase auf.

Mit mehreren proteinanalytischen und immunologischen Methoden wurde versucht, Unterschiede zwischen den gereinigten Glutathionreduktasen aus Rinderhirn,- leber und - erythrocyten festzustellen. Dabei erwiesen sich die drei Enzyme als äußerst ähnlich. Nur die massenspektrometrische Analyse tryptischer Peptide der Glutathionreduktasen aus Gehirn und Leber läßt auf Unterschiede dieser Enzyme und somit auf Isoformen schließen.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. D. Ammermann

Prof. Dr. C.-F. Bardele

Prof. Dr. V. Braun

Prof. Dr. H.-P. Fiedler

Prof. Dr. K.H. Gaukler

Prof. Dr. F. Götz

Prof. Dr. K.P. Haderl

Prof. Dr. B. Hamprecht

Prof. Dr. h.c. M. Hanack

Prof. Dr. V. Hemleben

Prof. Dr. G. Jung

Prof. Dr. F. Oberwinkler

Prof. Dr. W. Pfeiffer

Prof. Dr. K. Poralla

Prof. Dr. H. Probst

Prof. Dr. B. Schink

Prof. Dr. H.U. Schnitzler

Prof. Dr. F. Schöffel

Prof. Dr. J. Stähle

Prof. Dr. G.J. Wagner

Prof. Dr. H. Wiesinger

Prof. Dr. H. Zähler