

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Vergleich der Glutathionreduktase aus der Darmmukosa des Rindes und pflanzlichen Glutathionreduktasen auf der Basis eines Testsystems mit 5-Dithio-2-nitrobenzoesäure als Nachweisreagenz. Die damit erzielten Ergebnisse sind hier abschließend kurz zusammengefaßt:

1. Die bovine Glutathionreduktase verhält sich gegenüber den Substraten GSSG und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wie die pflanzlichen Glutathionreduktasen: Es wurde ein hoher K_M -Wert für GSSG ($100 \mu\text{M}$) gegenüber einem niedrigen K_M -Wert für $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ($3 \mu\text{M}$) ermittelt. Hohe Konzentrationen von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ über $400 \mu\text{M}$ inaktivieren das Enzym.
2. Inaktivierung von Glutathionreduktasen
 - a) Die Glutathionreduktase des Rindes wird im einfachen Testsystem nach einiger Zeit inaktiviert. Diese Inaktivierung ist jedoch weniger stark ausgeprägt als bei den verglichenen pflanzlichen Glutathionreduktasen.
 - b) Pflanzliche und bovine Glutathionreduktase werden durch das Schwermetallion Cu^{2+} inaktiviert. Die Hemmkonstante für das tierische Enzym liegt bei $2 \mu\text{M}$.
 - c) Pflanzliche und bovine Glutathionreduktase werden durch Ascorbat inaktiviert. Die Hemmkonstante für das bovine Enzym beträgt $7 \mu\text{M}$.
 - d) Durch Kombination von Cu^{2+} -Ionen und Ascorbat ergibt sich ein additiver Effekt. Die Inaktivierung wird verstärkt. (Fentonchemie).
3. Die beobachtete Inaktivierung der Glutathionreduktase durch hohe $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -Konzentrationen wurde bislang als Substratsättigung angesehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen aber dafür, daß auch hier eine Inaktivierung über Sauerstoff beteiligt ist.
4. Bestimmte Substanzen sind in der Lage, die bovine Glutathionreduktase vor Inaktivierung zu schützen:
 - a) Der Chelatbildner EDTA,
 - b) das Serumprotein BSA,
 - c) eine weitere Proteinfraction des Serums (siehe 5.).

5. Im Blutserum des Rindes konnte eine Fraktion ermittelt werden, die der bovinen GR einen effizienteren Schutz vor Inaktivierung gewährt als das im Test eingesetzte BSA. Das Molekulargewicht ist geringer als das des BSA. Die Substanz ist hitzeinstabil. Es scheint sich also um ein Protein zu handeln. In Bezug auf die Funktion (Schutz der Glutathionreduktase) ist es möglich, diese Proteinfraction mit einem aus Pflanzen isolierten, niedermolekularen Faktor zu vergleichen.
6. Dieser Schutzmechanismus scheint ein allgemeines System zu sein, weil er auch auf andere eukaryotische Systeme (Hefe) übertragbar ist.
7. Im Verlauf der Evolution scheint sich die Struktur der Glutathionreduktase verändert zu haben. Die bovine GR erweist sich im Testsystem als weniger empfindlich gegenüber Inaktivierung durch Sauerstoff als die pflanzlichen Enzyme.

VII. S U M M A R Y

Urte Frey

Regulation of glutathione reductase:
a comparison between animal and plant enzymes

In this study bovine glutathione reductase and the corresponding plant enzymes were compared using 5-Dithio-2-nitrobenzoic acid as analytical reagent. The results obtained are summarized as follows:

1. The affinities of bovine glutathione reductase for the substrates GSSG and NADPH + H⁺ are similar to those of plant enzymes: a high K_M for GSSG (100 μM) and a low K_M for NADPH + H⁺ (3 μM) were determined. High concentrations of NADPH + H⁺ above 400 μM inhibit the enzyme.
2. Inactivation of glutathione reductases:
 - a) The bovine enzyme is inactivated in the normal assay, however this inactivation is less pronounced compared to plant glutathione reductases.
 - b) Cupric ions are potent inhibitors of plant and bovine glutathione reductases with inhibitor constant for bovine enzyme of about 2 μM.
 - c) Plant and bovine glutathione reductases are inactivated by ascorbic acid with inhibitor constant for animal enzyme of 7 μM.
 - d) Combination of cupric ions with ascorbic acid enhanced this inhibition, possibly by "Fenton"-chemistry.
3. The observed inhibition of glutathione reductases by high NADPH + H⁺ is discussed so far as substrate inhibition; however this seems to be an inactivation due to oxygen toxicity.
4. The following substances protect glutathione reductases from bovine and plant sources against inactivation:
 - a) the chelator EDTA,
 - b) bovine serum albumin (BSA),
 - c) a different protein fraction from bovine serum (see 5.).

5. Bovine serum contains a protein fraction protecting glutathione reductase against inactivation. This protein is heat labile and seems to be different from bovine serum albumin in its protection ability and molecular weight. It is comparable in its function to the low-molecular plant factor.
6. This protection mechanism is not specific for bovine; it is active also in other eucaryotic systems like yeast.
7. In the course of evolution glutathione reductase had to be adapted to the oxygenic environment. The bovine glutathione reductase was found to be less susceptible to oxygen inactivation compared to plant glutathione reductases, possibly by an altered three-dimensional structure.