

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht die Inaktivierung der Rinder-Glutathionreduktase und deren Stabilisierung durch einen Schutzfaktor im Rinderblut.

Ein gekoppeltes Testsystem mit Ellman's Reagenz bietet die Möglichkeit, die Selbstinaktivierung und deren Aufhebung durch einen Schutzfaktor zu untersuchen und zu quantifizieren.

Rinder-Glutathionreduktase wird im Test ohne Zusatz von Schutzsubstanzen in kurzer Zeit inaktiviert. Diese Inaktivierung läßt sich durch die Reduktion von Metallionen durch Thiolgruppen erklären. Hierbei führen die reduzierten Metallionen zu toxischen Sauerstoffspezies.

Ascorbat und Cu^{2+} -Ionen verstärken die Inaktivierung der Glutathionreduktase, die K_i -Werte betragen $6,3 \mu\text{M}$ für Ascorbat und $0,7 \mu\text{M}$ für Cu^{2+} .

Rinderblut schützt die bovine Glutathionreduktase vor Inaktivierung. Bei der verantwortlichen Substanz handelt es sich um ein Protein. Die folgenden Schritte wurden zur Reinigung und Charakterisierung des Proteins verwendet:

- 1.) Dialyse
- 2.) Gelfiltration
- 3.) DEAE-Cellulose-Chromatographie
- 4.) SDS-Gelelektrophorese
- 5.) Western-Blotting

Mit diesen Nachweisverfahren konnte die Proteinfraction eindeutig als Rinder-Serumalbumin identifiziert werden. Die verwendeten Methoden konnten nicht klären, ob bovines Serumalbumin nur als Metallionenchelator fungiert oder ob es auch als alternatives Proteinsubstrat anzusehen ist. Für BSA wurde ein K_M -Wert von $0,3 \mu\text{M}$ bestimmt.

Rinder-Serumalbumin kann sowohl die Selbstinaktivierung der Glutathionreduktase als auch die verstärkte Inaktivierung durch Cu^{2+} und Ascorbat aufheben.

Folgende Substanzen können ebenfalls als Schutzsubstanzen wirken:

- a) EDTA mit einem K_M -Wert von $26,5 \mu\text{M}$,
- b) Polymin-P mit einem apparenten K_M -Wert von $0,008 \%$ und
- c) Hühnerei-Albumin mit einem K_M -Wert von $0,3 \mu\text{M}$.

Die Inaktivierung wird offensichtlich durch reaktiven Sauerstoff ausgelöst. Da Superoxiddismutase und Katalase nur geringe Schutzwirkung zeigen, ist unklar, ob es sich um Radikale oder Singlettsauerstoff handelt.

Die Bedeutung von Rinder-Serumalbumin als generellem Schutzfaktor vor Sauerstoffinaktivierung wird diskutiert.

VII. S U M M A R Y

Claudia Merschmeyer (1992):

Identification of bovine serumalbumin as a protecting agent for bovine glutathione reductase.

The current study analyzes the inactivation of bovine glutathione reductase and its stabilization by a protein in bovine blood.

A coupled testsystem with bovine glutathione reductase and Ellman's reagent enabled the analysis of protecting factors and the quantitation of their effects.

Bovine glutathione reductase is inactivated within a short time. This result can be explained by reducing action of metal ions with -SH groups. The reduced metal ions may lead to toxic oxygen species.

Ascorbate and Cu^{2+} -ions increase the inhibition of the glutathione reductase with inhibitor constants of $6,3 \mu\text{M}$ for ascorbate and $0,7 \mu\text{M}$ for cupric ions.

Bovine serum protects bovine glutathione reductase against inactivation. The responsible agent was identified as a protein. For purification and characterization the following steps were used:

- 1.) Dialysis
- 2.) Gel filtration
- 3.) DEAE-cellulose-chromatography
- 4.) SDS-gelelectrophoresis
- 5.) Western-blotting

Using these methods, the protein fraction has been identified as bovine serum albumin. The test system could not verify, if BSA acts only as a chelator or as an alternative protein substrate as well.

For BSA a K_M -value of $0,3 \mu\text{M}$ was determined. In the test system, BSA was able to stabilize both the glutathione reductase itself and the glutathione reductase subjected to inhibitory conditions with ascorbic acid and cupric ions.

Protection is achieved also by the following substances:

- a) EDTA with an K_M -value of $26,5 \mu\text{M}$,
- b) Polymin-P with an apparent K_M -value of $0,008 \%$ and
- c) Ovalbumin with a K_M -value of $0,3 \mu\text{M}$.

Obviously, this inactivation is due to activated oxygen. The nature of the oxygen species is unknown, since superoxide dismutase and catalase showed only marginal effects on the inactivation kinetics.

The importance of BSA as a factor for protecting protein against oxygen damage is discussed.