J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 411–417

Multiple Formen der NADPH-abhängigen Glutathion-Reduktase im Serum

Untersuchungen über die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase im Serum, II. Mitteilung

Von G. Weidemann

Institut für klinische Chemie der Städt. Krankenanstalten Nürnberg und

V. Anselstetter

Institut für physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg

(Eingegangen am 15. November 1976/10. März 1977)

Zusammenfassung: Seren mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität wurden gelelektrophoretisch in Agar bzw. Polyacrylamid sowie mittels Gelfiltration untersucht. Beide Trennverfahren ergaben, daß sich die Glutathion-Reduktase-Aktivität in den einzelnen Proben auf bis zu 3 nach Wanderungsgeschwindigkeit und Molekülgröße unterschiedliche Fraktionen verteilt. Dabei entsprechen die Fraktionen mit dem kleinsten bzw. größten Molekulargewicht den am langsamsten bzw. am schnellsten wandernden Banden in der Agarelektrophorese. Vorinkubation der Serumproben mit FAD bzw. Neuraminidase hat keinen Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeiten der 3 Fraktionen. Nach Zusatz von β -Mercaptoethanol zum Serum findet man bei der Gelelektrophorese und der Gelfiltration nur noch die Glutathion-Reduktase-Fraktion mit der langsamsten Wanderungsgeschwindigkeit und dem niedrigsten Molekulargewicht (140 000). Nach Entfernung des Thiois werden die beiden anderen Glutathion-Reduktase-Fraktionen wieder nachweisbar. Weitere Untersuchungen an den nach Agarelelektrophorese isolierten Glutathion-Reduktase-Fraktionen zeigen, daß es sich bei den 3 Fraktionen der Glutathion-Reduktase im Serum um oligomere Formen des Enzyms handelt, die reversibel ineinander übergehen bzw. überführt werden können.

Multiple forms of NADPH-dependent glutathione reductase in serum. Studies on the NADPH-dependent glutathione reductase in serum II.

Summary: Sera with elevated activities of glutathione reductase were investigated by gel electrophoresis in agar or polyacrylamide, and by gel filtration. In both separation methods the glutathione reductase activity in individual samples was resolved, showing up to three fractions differing in rate of migration and molecular size. The fractions with the lowest and highest molecular weight, corresponded respectively to the slowest and fastest migrating bands in agar gel electrophoresis. Preincubation of the serum samples with FAD or neuraminidase had no effect on the rate of migration of the three fractions. After the addition of β -mercaptoethanol to the serum, gel electrophoresis and gel filtration showed only the enzyme fraction with the slowest rate of migration and the lowest molecular weight (140,000). The other two fractions reappeared after removal of the thiol from the serum. Further studies on the isolated (agar gel electrophoresis) fractions showed the existence of oligomeric forms of the enzyme, which are reversibly interconvertible.

Einführung

Die Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2) im Serum ist bisher nur vereinzelt untersucht worden (1–8).

Während bei gesunden Personen nur eine geringe Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum nachweisbar ist, fanden wir bei 2% der Patienten einer intensiv-medizinischen Abteilung eine erhöhte Glutathion-Reduktase-Aktivität (9), die Werte bis zum 15fachen der Norm

erreichte. Die diagnostische Relevanz einer Glutathion-Reduktase-Erhöhung ist bislang immer noch unklar.

Im Rahmen einer systematischen Untersuchung der Glutathion-Reduktase im Serum haben wir zunächst die Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der Enzymaktivität optimiert und Eigenschaften des Enzyms untersucht (10). Bei der Ermittlung der optimierten Reaktionsbedingungen ergaben orientierende

Versuche, daß sich die Glutathion-Reduktase im Serum elektrophoretisch in mehrere Fraktionen auftrennen läßt. Da multiple Formen der Glutathion-Reduktase im Serum bisher noch nicht beschrieben worden sind, haben wir weitere Untersuchungen durchgeführt, über deren Ergebnisse im folgenden berichtet wird.

Material und Methoden

Reagenzien

Agarose und Serum-Albumin (vom Rind), Fa. Behringwerke; Agar Noble, Fa. Difco.

NADPH, NADH, GSSG, FAD, Glutathion-Reduktase aus Hefe, Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27), Alaninaminotransferase (EC 2.6.1.2), Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37), Neuraminidase (EC 3.2.1.18) und Biochemica-Test-Combination MDH von Boehringer, Mannheim.

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Ammoniumpersulfat, N,N,N'-Tetramethylethyldiamin von Serva, Heidelberg. Sephadex G 150 von Pharmacia, Uppsala/Schweden.

Biogel P 200 von BioRad, München.

Polyvalentes Anti-Humanserum von Fa. Fresenius, Bad Homburg.

Ampholine-PAGplates pH 3,5–9,5 von LKB, Bromma/Schweden.

Alle übrigen Chemikalien, analysenrein, wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Geräte

Minicon-B-15Konzentratoren; Fa. Amicon, Oosterhout/Holland. LKB-Multiphor, LKB, Bromma/Schweden.

Methoden

Agargel-Elektrophorese

a) Elektrophoreseegel:
8 g/l Agarose in 50 mmol/l Veronal-HCl-Puffer, pH 8,5.

b) Elektrophoresepuffer:
50 mmol/l Veronal-HCl-Puffer, pH 8,5.

c) Substratgel:
200 mg Agar Noble werden in 25 ml 50 mmol/l Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,0, unter Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen auf 45 °C werden zu 18 ml Gel 750 µl EDTA (25 mmol/l)-Lösung, 200 µl GSSG (200 mmol/l, pH 7,0)-Lösung und 15 µmol NADPH zugesetzt.

Die Trennung der multiplen Formen der Glutathion-Reduktase im Serum erfolgt auf Objektträgern, die mit 2,5 ml Elektrophoreseegel beschichtet wurden. In die ausgestanzte Startrinne, 1 cm vom kathodenseitigen Objektträgerende, werden 40 µl eines Elektrophoreseegel-Serum-Gemisches 1/1 eingefüllt. Die Trennung erfolgt bei 10–12 °C und dauert bei konstanter Stromstärke von 7,5 mA/Objektträger etwa 120 min. Nach der Trennung wird auf das Elektrophoreseegel ein mit 2 ml Substratgel beschichteter Objektträger luftblasenfrei aufgelegt und 45 min bei 25 °C inkubiert. Nach dem Abheben des Substratgels werden die Enzymbanden im langwelligen UV-Licht (365 nm) als dunkle Zonen im hellgrün fluoreszierenden Elektrophoreseegel sichtbar.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde in Glasröhrchen von 8 cm Höhe und 0,6 cm innerem Durchmesser durchgeführt. Es wurde ein von Hjerten et al. (11) modifiziertes kontinuierliches Tris-Glycin Puffersystem verwendet (370 mmol Tris-Glycin, pH 9,3; Gelkonzentration T = 6,08%, Vernetzeranteil C = 2,9%). Für die Elektrophorese wurden nach Maßgabe der Aktivität der Glutathion-Reduktase bis zu 10 µl Serum aufgetragen. Vor dem Auftragen wurde das Serum jeweils 1 + 4 mit einer mit Bromphenolblau angefärbten 2 g/l Glycerin-Lösung verdünnt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke bei Raum-

temperatur nach folgendem Plan durchgeführt: 5 min mit 1 mA/Gel, 10 min mit 2 mA/Gel, 165 min mit 4 mA/Gel. Zum Nachweis der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Gel wurde das Gel zunächst mit einem nach Fairbanks et al. (12) modifizierten Gerät der Länge nach in zwei Hälften geschnitten. Eine Hälfte wurde sofort auf einen Objektträger mit Substratgel luftblasenfrei aufgelegt, während die andere Hälfte mit Coomassie Brilliant Blau auf Protein angefärbt wurde.

Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem LKB-Multiphor auf Ampholine-PAGplates pH 3,5–9,5 durchgeführt. Fokussierdauer: 90 min. Nach der Fokussierung wurde die Gelplatte für 8 min in Puffer-Substratlösung folgender Zusammensetzung (Endkonzentration) inkubiert: Imidazol-HCl-Puffer pH 6,9 (500 mmol/l), EDTA (0,3 mmol/l), NADPH (0,43 mmol/l), GSSG (2,0 mmol/l).

Dokumentation

Zur Dokumentation wurden die Glutathion-Reduktase-Banden nach der Gelelektrophorese und der isoelektrischen Fokussierung im langwelligen UV-Licht (365 nm) durch ein Schött'sches UV-Absorptionsfilter GG 10, 2 mm stark, photographiert. Als Filmmaterial wurde Agepan 25 (Agfa) verwendet. Bei einem Abstand Lichtquelle (MinUVIS, Desaga) zu Objektträger von etwa 15 cm beträgt die Belichtungszeit bei Blende 4 etwa 7 min.

Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurden Biogel P 200 sowie Sephadex G 150 verwendet.

Säule: 1,5 × 80 cm
Äquibrierlösung: 150 mmol/l Natriumchloridlösung mit 300 µmol/l Natriumazid; pH: 7,0, eingestellt mit NaOH
Elutionslösung: a) 150 mmol/l Natriumchloridlösung mit 300 µmol/l Natriumazid; pH: 7,0, eingestellt mit NaOH
b) 150 mmol/l Natriumchloridlösung mit 300 µmol/l Natriumazid und 1 mmol/l 2-Mercaptoethanol; pH: 7,0, eingestellt mit NaOH

Elutionsgeschwindigkeit: 14 ml/h

Fraktionsvolumen: 1 oder 2 ml

Die Glutathion-Reduktase-Aktivität wurde in den Eluatén direkt gemessen, für gelelektrophoretische Untersuchungen wurden die Eluate mit Glutathion-Reduktase-Aktivität durch Ultrafiltration konzentriert.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden auf eine Sephadex G 150 – Säule 1–1,5 ml Serum aufgetragen, das mit folgenden Enzymen als Markern versetzt war:

Lactatdehydrogenase, Molekulargewicht 139 999 (13)
Alaninaminotransferase, Molekulargewicht 115 000 (14)
Malatdehydrogenase, Molekulargewicht 70 000 (15)

Enzymaktivitätsbestimmungen

Glutathion-Reduktase nach Weidemann (10), Lactatdehydrogenase und Alaninaminotransferase mit den optimierten Standardmethoden (16), Malatdehydrogenase mit der Biochemica-Test-Combination 15981 (Boehringer).

Inkubation mit Neuraminidase (23)

0,1 ml Serum wurde mit 20 mU Neuraminidase in 0,04 ml Acetatspuffer 0,5 mol/l pH 5,0 12 h bei 37 °C inkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

Es wurden Seren einer Reihe von Patienten mit erhöhter katalytischer Konzentration von Glutathion-Reduktase-Konzentration (100–900 U/l) zunächst gel-elektrophoretisch untersucht.

Abb. 1. Auftrennung der Glutathion-Reduktase im Serum in der Agargelelektrophorese; 3 Patientenserum mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität.

Nach Auftrennung der Serumproben in der *Agargelelektrophorese* wurden bis zu 3 Fraktionen mit Glutathion-Reduktase-Aktivität gefunden (Abb. 1). Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, variiert das Bandenmuster bei den verschiedenen Patientenserum. In Bezug auf die elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine in Agargel liegt Bande 1 im Bereich der α_2 -Globuline, Bande 2 zwischen der α_2 - und β -Globulinfraktion und Bande 3 zwischen der β - und γ -Globulinfraktion (Abb. 2).

Abb. 2. Agargelelektrophorese eines Serums mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität

- a) Anfarbung mit Amidoschwarz
b) Nachweis der Glutathion-Reduktase-Fraktionen schematische Darstellung.

Untersucht man unter gleichen Bedingungen das Serum gesunder Personen mit normaler katalytischer Konzentration der Glutathion-Reduktase im Serum (bis zu 60 U/l), so ist eine geringe enzymatische Aktivität in Höhe der Banden 2 und 3 nachweisbar; dabei ist Bande 3 immer intensiver ausgeprägt als Bande 2.

Ein dem Ergebnis in der Agargelelektrophorese analoges Muster an Enzymbanden bei normaler und erhöhter katalytischer Konzentration an Glutathion-Reduktase im Serum wurde auch in der *Polyacrylamidgelelektrophorese* erhalten.

Rohextrakte aus Leber, Niere und Thrombocyten sowie Hämolysat ergaben in der Agargelelektrophorese nur eine Glutathion-Reduktase-Bande, deren Wanderungsgeschwindigkeit der Bande 3 der Glutathion-Reduktase im Serum entsprach.

Die aufgetrennten Fraktionen der Glutathion-Reduktase wurden über das bei der enzymatischen GSSG-Reduktion gebildete NADP nachgewiesen, das im Gegensatz zum nicht umgesetzten Cosubstrat im langwelligen UV-Licht nicht fluoresziert. Da die Substratspezifität der Glutathion-Reduktase zu GSSG sehr groß ist und in Abwesenheit von GSSG bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen keine Fluoreszenzlöschung erfolgt, ist die Spezifität des Nachweises der Glutathion-Reduktase über diese direkte Reaktion gesichert.

Wurde NADH anstelle von NADPH als Cosubstrat verwendet, konnten im Serum keine Glutathion-Reduktase-Banden nachgewiesen werden. Das erklärt sich aus der Hemmung der NADH-abhängigen Glutathion-Reduktase im Serum durch die Chloridionen des Puffers. Ersetzt man den Imidazol-Chlorid-Puffer durch einen Imidazol-Phosphat-Puffer, so erhält man 2 bzw. 3 Banden mit geringer Glutathion-Reduktase-Aktivität, die nach der Wanderungsgeschwindigkeit den Banden der NADPH-abhängigen Reaktion entsprechen. Der Grund für die geringe Intensität der Banden dürfte in den noch nicht hinreichend optimierten Reaktionsbedingungen für die

NADH-abhängige Glutathion-Reduktase im Serum liegen, obgleich wir für die NADH-abhängige Reaktion *in vitro* bereits 50% der Aktivität der NADPH-abhängigen Reaktion erreichen konnten (Weidemann, unveröffentlicht).

Da von Untersuchungen der Glutathion-Reduktase aus Erythrocyten durch isoelektrische Fokussierung bekannt ist, daß nach FAD-Abspaltung vom Enzym eine zusätzliche Glutathion-Reduktase-Fraktion auftritt, welche nach Isolierung und Inkubation mit FAD bei der Reelektrofokussierung wieder verschwindet (17), wurde noch folgende Kontrolluntersuchung durchgeführt: Eine Serumprobe wurde vor der Auftrennung durch die Agargel-Elektrophorese bei einer FAD-Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ 60 min bei 37 °C vorinkubiert. Es zeigte sich jedoch im Trennergebnis sowohl hinsichtlich der Zahl als auch der Lokalisation der Glutathion-Reduktase-Banden kein Unterschied im Vergleich zum Serum ohne FAD-Vorinkubation. Somit ist die durch Gel-Elektrophorese nachweisbare Heterogenität der Glutathion-Reduktase im Serum nicht auf einen unterschiedlichen Sättigungsgrad des Enzyms mit FAD zurückzuführen.

Eine Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit nach Inkubation mit Neuraminidase (23), wie sie für einige Isoenzyme im Serum beschrieben wurde (24), war bei keiner der 3 Glutathion-Reduktase-Fractionen zu beobachten. Damit kann die glykosidische Bindung der Glutathion-Reduktase an Neuraminsäure als mögliche Ursache für die Ausbildung multipler Formen des Enzyms ausgeschlossen werden.

Untersucht man Seren mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität mittels *Gelfiltration*, so erhält man wie bei der Gelelektrophorese bis zu 3 Glutathion-Reduktase-Fractionen. Abbildung 3 zeigt ein typisches Elutionsprofil mit zwei deutlichen Gipfeln B und C und einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Gipfel A im ansteigenden Schenkel von B. In der Molekulargewichtsbestimmung

Abb. 3. Elutionsdiagramm der Gelfiltration eines Serums mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität. Gelmaterial: Biogel P 200, übrige Versuchsbedingungen s. „Methoden“.

mit den Enzymen Lactatdehydrogenase, Alaninaminotransferase und Malatdehydrogenase als Markern ergab sich für die Fraktion C ein Molekulargewicht von 140 000, für die Fraktion B ein Molekulargewicht von über 200 000, für die Fraktion A war das Molekulargewicht nicht mehr zu bestimmen (Abb. 4).

Abb. 4. Bestimmung der Molekulargewichte der Glutathion-Reduktase-Fractionen im Serum durch Gelfiltration. Gelmaterial: Sephadex G 150, übrige Versuchsbedingungen s. „Methoden“.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen erhielten wir bei der Untersuchung gereinigter Hefe-Glutathion-Reduktase nur einen Gipfel und ein Molekulargewicht von 120 000, was mit den in der Literatur angegebenen Werten 118 000 (18) und 124 000 (19) übereinstimmt. Bei der Gelfiltration eines Hämolyates eluierte die Erythrocyten-Glutathion-Reduktase im Serum zusammen mit der Lactatdehydrogenase. Für die Glutathion-Reduktase im Hämolyat resultiert daraus ein Molekulargewicht von 140 000, während für gereinigte Erythrocyten-Glutathion-Reduktase bei der Gelfiltration ein Molekulargewicht von 120 000 (20) und 115 000 (21) gefunden wurde.

Die bei der Gelfiltration erhaltenen Fraktionen A, B und C der Glutathion-Reduktase im Serum entsprechen den Banden 1, 2 und 3 in der Gelelektrophorese (Abb. 5). Auffällig ist dabei, daß die Fraktion A mit dem größten Molekulargewicht in der Agargel-Elektrophorese am schnellsten und die Fraktion C mit dem kleinsten Molekulargewicht am langsamsten wandert.

Abb. 5. Auftrennung der Glutathion-Reduktase im Serum durch Gelfiltration (oben) und durch Agargelelektrophorese (unten). Schematische Darstellung.

Daß es sich bei den verschiedenen Fraktionen der Glutathion-Reduktase im Serum sehr wahrscheinlich nicht um Aggregate des Enzyms mit Serumproteinen handelt, zeigt das Ergebnis des folgenden Versuchs: Inkubiert man Serumproben mit polyvalentem Anti-Humanserum und zentrifugiert die Präzipitate ab, so läßt sich im Überstand Albumin nur noch in Spuren nachweisen, während die Aktivität der Glutathion-Reduktase im Überstand voll erhalten ist.

Abb. 6. Gelfiltration eines Serums mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität nach 15 min dauernder Inkubation mit 2-Mercaptoethanol, 10 mmol/l Serum, bei 25°C. Gelmaterial: Sephadex G 150, Elution mit Lösung b (s. „Methoden“).

Nachdem das in Abbildung 3 gezeigte Elutionsprofil auf das Vorliegen oligomerer Formen der Glutathion-Reduktase im Serum zurückzuführen sein könnte und bekannt ist, daß die Erythrocyten-Glutathion-Reduktase über intermolekulare Disulfidbrücken höhere Aggregate bilden kann, die nach Zusatz von Thiolen wieder dissoziieren (22), wiederholten wir die Gelfiltration in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol. Zugleich verfolgten wir das Verhalten der Glutathion-Reduktase im Serum nach Inkubation mit dem Thiol in der Agargelelektrophorese. In der Gelfiltration erhielten wir dabei nur noch die Fraktion C (Abb. 6), in der Agargelelektrophorese fehlten Bande 1 und 2 (Abb. 7). Wird anschließend das Thiol aus der Serumprobe durch Dialyse entfernt und das Serum 24 h bei 37°C inkubiert, werden in der Gelelektrophorese Bande 2 und in Spuren auch Bande 1 wieder nachweisbar.

Abb. 7. Agargelelektrophorese eines Serums mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität vor (b) und nach 15 min dauernder Inkubation mit 2-Mercaptoethanol, 10 mmol/l Serum, bei 25°C (a).

Um die Wirkung von Thiolen für jede enzymatisch aktive Form der Glutathion-Reduktase im Serum gesondert prüfen zu können, eluierten wir die einzelnen Fraktionen aus dem Agar. Diese wurden daraufhin jede für sich mit bzw. ohne Zusatz von 2-Mercaptoethanol reelektrophoretisiert. Während die unbehandelten Fraktionen ihre ursprüngliche Wanderungsgeschwindigkeit zeigten (Abb. 8), verhielten sich die mit Thiol behandelten Fraktionen folgendermaßen: Bande 1 wie auch Bande 2 verschwanden, dafür war die Glutathion-Reduktase-Aktivität nun jeweils in Höhe der Bande 3 nachweisbar (Abb. 9); die Bande 3 selbst blieb unverändert. Diese Ergebnisse wurden in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestätigt, bei der durch Anwendung der Splitgel-Technik ein direkter

Abb. 8. Reelektrophorese in Agargel nach Isolierung der Glutathion-Reduktase-Fractionen aus dem Agargel.
a = Bande 1, b = Bande 2, c = Bande 3.

Abb. 10. Agarelektrophorese der isolierten Bande 3 in Albuminlösung, 30 g/l, vor (a) und nach (b) 72 h Inkubation bei 25°C.

Abb. 9. Agarelektrophorese eines Gemisches der isolierten Banden 1 und 2 vor (b) und nach 15 min dauernder Inkubation mit 10 mmol/l 2-Mercaptoethanol im Gemisch (a).

Vergleich der unbehandelten mit den mit Thiol versetzten Fractionen der Glutathion-Reduktase im Serum auf demselben Gel möglich war.

Bei Untersuchungen über die Stabilität der einzelnen aus dem Agar isolierten Fractionen nicht mit Thiol vorbehandelter Serumproben beobachteten wir, daß die Fraction 3 bei 25 °C nicht länger als 24 h enzymatisch aktiv war. Nach Zusatz von Rinderserumalbumin in

einer Endkonzentration von 25 g/l blieb die Enzymaktivität jedoch mehrere Tage erhalten. Wurde eine Probe dieser isolierten, mit Albumin versetzten Fraction 3 elektrophoretisch geprüft, so zeigten sich die Banden 1, 2 und 3 (Abb. 10). Nach Inkubation der isolierten Fraction 3 mit Albumin und 2-Mercaptoethanol war nur Bande 3 nachweisbar. Aufgrund der Ergebnisse unserer bisherigen Untersuchungen vermuten wir, daß die multiplen Formen der Glutathion-Reduktase im Serum durch Spontanoxidation von SH-Gruppen am Enzymmolekül und Knüpfung intermolekularer S-S-Brücken entstehen. Dem Albumin dürfte dabei lediglich eine protektive Wirkung auf das Enzym zukommen.

Mißt man die Aktivität der Glutathion-Reduktase im Serum in einer Probe vor und nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol, so stellt man in beiden Fällen gleiche Enzymaktivität fest (Tab. 1). Daraus schließen wir, daß Bildung und Spaltung von S-S-Brücken nicht im Bereich des aktiven Zentrums erfolgen.

Tab. 1. Vergleich der katalytischen Konzentrationen von Glutathion-Reduktase in verschiedenen Serumproben mit und ohne Vorinkubation mit 2-Mercaptoethanol. Es wurden jeweils 100 µl Serum mit 20 µl 2-Mercaptoethanol, 60 mmol/l, bzw. 20 µl Natriumchloridlösung, 100 mmol/l, 15 min bei 25 °C inkubiert und anschließend die Glutathion-Reduktase-Aktivität gemessen.

Katalytische Konzentration	Inkubation mit 2-Mercaptoethanol	Inkubation ohne 2-Mercaptoethanol
Probe 1	680 U/l	658 U/l
Probe 2	522 U/l	527 U/l
Probe 3	348 U/l	348 U/l
Probe 4	563 U/l	557 U/l

Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß es sich bei den verschiedenen Fraktionen der Glutathion-Reduktase im Serum, die sich in ihrem elektrophoretischen Verhalten und in ihrer Molekülgröße unterscheiden, um oligomere Formen des Enzyms handelt, die reversibel ineinander übergehen bzw. überführt werden können.

Warum die Fraktion mit dem niedrigsten Molekulargewicht sowohl in der Agargel- als auch in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese am langsamsten wandert, blieb bisher ungeklärt. In der isoelektrischen Fokussierung der Glutathion-Reduktase im Serum zeigen sich 5 Banden mit pI-Werten von 5,3 / 5,6 / 6,9 / 7,2 und 7,9. In Gegenwart von 2-Mercaptoethanol schwindet die Intensität der Banden mit pI 5,3 bzw. 5,6 deutlich zugunsten der Intensität der Banden mit pI 6,9 / 7,2 und 7,9.

Das bedeutet, daß der Übergang der einen multiplen Form der Glutathion-Reduktase in eine andere mit einer Veränderung des pI-Wertes verbunden ist, was zu einer veränderten Beweglichkeit der Glutathion-Reduktase-Fractionen führen könnte. Andererseits ist auch daran zu denken, daß sich beim Übergang der multiplen Formen ineinander die Achsenverhältnisse des Enzymmoleküls ändern, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Formen der Glutathion-Reduktase in den Trägermaterialien der Elektrophorese beeinflusst werden könnten.

Die Herkunft der Glutathion-Reduktase im Serum sowie die Ursache für die Ausbildung unterschiedlicher Muster von Glutathion-Reduktase-Banden in der Gelelektrophorese bei verschiedenen Patienten sind noch unklar.

Literatur

1. Manso, S. & Wroblewski, F. (1958), *J. Clin. Invest.* 37, 214–218.
2. Horn, H.-D. & Bruns, F. H. (1958), *Biochem. Z.* 331, 58–64.
3. Kerppola, W., Nikkila, E. A. & Pitkänen, E. (1959), *Acta Med. Scand.* 164, 357–365.
4. West, M., Berger, C., Romy, H. & Zimmermann, H. J. (1961), *J. Lab. Clin. Med.* 57, 946–954.
5. Franken, F. H. & Stork, W. (1962), *Med. Welt*, 589–595.
6. Kleine, T. O. & Chlond, H. (1966), *Clin. Chim. Acta* 13, 407–411.
7. Lee, K. T., Tan, I. K. & Seet, A. M. (1975), *Clin. Chim. Acta*, 58, 101–108.
8. Wakui, K., Kumata, H., Tadaki, H. & Yamagata, S. (1976), *Clin. Chim. Acta* 118, 17–23.
9. Weidemann, G. (1973), *diese Z.* 11, 134–135.
10. Weidemann, G. (1975), *diese Z.* 13, 123–128.
11. Hjertén, S., Jerstedt, S. & Tiselius, A. (1965), *Anal. Biochem.* 11, 219–223.
12. Fairbanks, Jr., G., Levinthal, C. & Reeder, R. H. (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20, 393–399.
13. Jaenicke, R. & Knof, S. (1968), *Eur. J. Biochem.* 4, 157–163.
14. Saier, M. H. & Jenkins, W. T. (1967), *J. Biol. Chem.* 242, 91–100.
15. Thorne, C. J. R. & Kaplan, N. O. (1963), *J. Biol. Chem.* 238, 1861–1868.
16. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (1972), *diese Z.* 10, 182–192.
17. Rüdiger, H. W., Blume, K. G., Arnold, H. & Löhr, G. W. (1974), *Klin. Wochenschr.* 52, 896–897.
18. Colman, R. F. & Black, S. (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 1796–1803.
19. Mavis, R. D. & Stellwagen, E. (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 809–814.
20. Icen, A. L. (1967), *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 96, 1–67.
21. Staal, G. E. J., Visser, J. & Veeger, C. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 185, 39–48.
22. Worthington, D. J. & Rosemeyer, M. A. (1974), *Biochem. Soc. Trans.* 2, 927–929.
23. Lorentz, K., Muranowski, A. & Ritter, U. (1974), *diese Z.* 12, 468–473.
24. Usategui-Gomez, M., Yeager, E. M. & Tarbutton, P. (1974), *Clin. Chim. Acta* 50, 405–412.

Dr. G. Weidemann
Institut für Klinische Chemie der
Städtischen Krankenanstalten Nürnberg
D-8500 Nürnberg