

Charakterisierung eines Schutzfaktors aus Spinat (*Spinacia oleracea*) in kupfer-
und zinkabhängigen biochemischen Modellreaktionen und dessen Nachweis als
Metallkomplexator

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.- Biol. Frank Wiechmann
geboren am 21.6.1964 in Gehrden

1999

Referent: Prof. Dr. A. Schmidt

Koreferent: Prof. Dr. E. F. Elstner

Tag der Promotion: 16. Juli 1999

Zusammenfassung

Die Arbeit befaßt sich mit einer niedermolekularen Substanz aus Spinat (*Spinacia oleracea*), genannt Faktor, die in zahlreichen Modellreaktionen antioxidativen Charakter aufweist.

- 1.) Der Faktor verhindert die Inaktivierung von Enzymen wie der Glutathionreduktase aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) durch das redoxaktive Kupfer sowie durch das redoxinaktive Zink. Auch die Kupferinaktivierung der Glutaminsynthetase aus Spinat wurde durch den Faktor vollständig aufgehoben. Bei den Kupferinaktivierungen dieser beiden Enzyme spielen „site specific reactions“ eine Rolle, die gegenüber Radikalfängern als schlecht zugänglich gelten.
- 2.) Der Faktor verhindert die Kupferinaktivierung des Superoxid- bildenden Enzymes Xanthinoxidase. Hierdurch kommt es zu einer hohen Superoxidbildung, identisch mit dem Kontrollwert ohne Kupfer. Der Faktor gewährleistet in diesem Fall eine hohe Bildungsrate dieser reaktiven Sauerstoffspezies. Der in diesem Test entstehende Kupfer- Faktorkomplex zeigt keine Superoxiddismutaseaktivität.
- 3.) Der Faktor verhindert die kupferbedingte Autooxidation von Dihydroxyfumarsäure, bei der zahlreiche reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal entstehen.
- 4.) Der Faktor verhindert die kupferbedingte Oxidation sowohl des Protein- wie auch des Lipidanteiles von LDL in sehr geringen Konzentrationen.
- 5.) Der Faktor verhindert die kupferbedingte Umsetzung von durch Singulett-Sauerstoff aus α -Linolensäure erzeugtem Ethylradikal zu Ethylen. Er setzt zusätzlich die Bildungsrate des Ethylradikals herab, was eine Radikalfängerfunktion andeutet.
- 6.) Der Faktor kann die kupferbedingte Oxidation von Cystein nicht verhindern. Allerdings wurde diese Reaktion auch durch EDTA im äquimolaren Verhältnis von Kupfer zu Kupferbindungsstellen nicht verhindert, sondern erst bei 2000- fachem Überschuß.
- 7.) Die Vielschichtigkeit der in diesen Tests auftretenden Reaktionsmechanismen und die Erklärbarkeit der antioxidativen Eigenschaft des Faktors durch Inaktivierung des Metalls belegt eine primär komplexbildende Eigenschaft des Faktors neben einer Radikalfängerfunktion zumindest für Singulett-Sauerstoff.
- 8.) Da diverse Nachweisverfahren für Thiole keine positiven Ergebnisse erbrachten, kann der Faktor nicht mit den üblichen Thiolatkomplexatoren (Phytochelatine, Metallothioneine) identisch sein.
- 9.) Der Faktor ist im alkalischen Bereich stabil. Seine Kupferbindung wird nicht durch Zink beeinflußt. Mithilfe der Dünnschichtchromatographie konnte die Faktoraktivität in eine zinkbindende und eine nicht zinkbindende Komponente zerlegt werden. Beide Komponenten sind kupferbindend.
- 10.) Der Faktor zeigte sich konstitutiv in Wurzeln von etiolierten Erbsenkeimlingen (*Pisum sativum*) und sein Gehalt in den Blättern stieg nach Belichtung sprunghaft an.

Abstract

A low molecular substance from spinach (*Spinacia oleracea*) was isolated, called factor, that shows an antioxidative character in numerous model reactions.

- 1.) The factor prevents inactivation of enzymes like glutathione reductase from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by redox-active copper and redox-inactive zinc ions. Copper inhibition of glutamine synthetase from spinach was completely eliminated by the factor. In case of the copper inhibition of these two enzymes, site specific reactions seem to play a role, showing generally a low accessibility to radical scavengers.
- 2.) The factor prevents copper-inactivation of the superoxide producing enzyme xanthine oxidase. Hence increased superoxide formation can be observed, identical to the control without addition of copper. The factor in this case guarantees formation of these reactive oxygen species at a high rate. The copper-factor-complex formed in this assay didn't show any superoxide dismutase activity.
- 3.) The factor prevents the copper-mediated autoxidation of dihydroxyfumarate leading to formation of numerous reactive oxygen species such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxy radicals.
- 4.) The factor prevents copper-mediated oxidation of the protein- and lipid components of LDL even at very low concentrations.
- 5.) The factor prevents the copper mediated conversion of ethyl radicals, derived from the reaction of singlet oxygen with α -linoleic acid, to ethylene. In addition, it decreases the formation of ethyl radicals, suggesting a function as a radical scavenger.
- 6.) The factor is not able to prevent the copper-mediated oxidation of cysteine. However, this reaction could also not be prevented by EDTA at an equimolar ratio of copper to ligands, but only at a 2000- fold excess.
- 7.) The diversity of the occurring reaction mechanisms in all these assays and the antioxidative properties of the factor by inactivation of metal ions prove a primary chelating property of the factor besides a function as a radical scavenger, at least for singlet oxygen.
- 8.) Because diverse analytical tests for thiols gave negative results, the factor cannot be identical with common thiolate complexators (phytochelatins, metallothioneins).
- 9.) The factor is stable at basic pH values. Its property to bind copper is not influenced by zinc. Using thin layer chromatography the factoractivity could be separated into a zinc-binding and a non-zinc-binding component. Both components are able to bind copper.
- 10.) The factor was constitutively present in roots of young etiolated pea (*Pisum sativum*) plants and the content in leaves increased rapidly after illumination.

Suchbegriffe: Spinat, Kupfer, Komplexator

Keywords: Spinach, copper, chelator

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	4
2.1 Chemikalien und Geräte	4
2.1.1 Chemikalien	4
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	4
2.1.3 Geräte	5
2.2 Biologisches Material	7
2.2.1 Verwendete Organismen	7
2.2.2 Anzucht	7
2.3 Nachweisverfahren	7
2.3.1 Faktorbestimmung mit dem Glutathionreduktasetest	7
2.3.2 Nachweis der Glutaminsynthetase aus Spinat	8
2.3.3 Nachweis der Superoxid- Dismutase	9
2.3.4 Proteinbestimmung	9
2.3.5 Thiolbestimmung	9
2.3.6 Bestimmung von Schwefelwasserstoff	10
2.3.7 Bestimmung von Cu(I)	10
2.3.8 Cysteinnachweis in Lösung mit dem Gaitonde- Reagenz	10
2.3.9 Dünnschichtchromatographische Nachweismethoden	10
2.3.10 Derivatisierung des Faktors	11
2.3.11 Oxidation von LDL (Dienkonjugation)	11
2.3.12 Agarose- Gelelektrophorese	12
2.3.13 Messung der Oxidation von Dihydroxyfumarsäure durch Spaltung von KMB	12
2.3.14 Linolensäure- Oxidation	12
2.3.15 Trennung des Faktors mit HPLC	13
2.3.16 Kapillarelektrophorese (CE)	13
2.4 Präparationen	14
2.4.1 Herstellung metallionenfreier Reagenzien	14
2.4.2 Aufreinigung des Faktors aus Spinat (Kleine Präparation)	14
2.4.3 Aufreinigung des Faktors aus Spinat (Große Präparation)	15
2.4.4 Faktormessung an etiolierten Erbsenpflanzen	15
3 Ergebnisse	16
3.1 Aufreinigung des Faktormoleküls	16
3.2 Haltbarkeit des Faktors	19
3.3 Der Faktor in verschiedenen kupferabhängigen Testsystemen	21
3.3.1 Glutathionreduktasetest	21

3.3.1.1	Eigenschaften des Glutathionreduktasetestes	21
3.3.1.2	Eigenschaften der Glutathionreduktase	22
3.3.1.3	Optimierung des Glutathionreduktasetestes	25
3.3.1.4	Komplexatoren im Glutathionreduktasetest	25
3.3.1.5	Der Faktor im Glutathionreduktasetest	30
3.3.2	Glutaminsynthetasetest	33
3.3.2.1	Eigenschaften des Glutaminsynthetasetestes	33
3.3.2.2	Der Faktor im Glutaminsynthetasetest	35
3.3.3	Thioloxidation	37
3.3.3.1	Eigenschaften der Thioloxidation	37
3.3.3.2	Komplexatoren im Thioloxidationstest	39
3.3.3.3	Der Faktor im Thioloxidationstest	42
3.3.4	Oxidation von Dihydroxyfumarsäure (DHF)	43
3.3.4.1	Eigenschaften der Dihydroxyfumarsäureoxidation	43
3.3.4.2	Faktoreinfluß auf die kupfervermittelte Dihydroxyfumarsäureoxidation	44
3.3.5	Xanthinoxidasetest (Cytochrom c- Reduktion)	46
3.3.5.1	Eigenschaften des Xanthinoxidasetestes	46
3.3.5.2	Der Faktor im Xanthinoxidasetest	47
3.3.6	Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL)	49
3.3.6.1	Eigenschaften der LDL- Oxidation	49
3.3.6.2	Einfluß des Faktors auf die kupfervermittelte LDL- Oxidation	50
3.3.7	Die kupfervermittelte Bildung von Ethylen aus Linolensäure	52
3.3.7.1	Eigenschaften des Linolensäuretestes und der Einfluß des Faktors auf die kupfervermittelte Bildung von Ethylen	52
3.4	Chemie des Faktors	54
3.4.1	Derivatisierung des Faktors mit Monobrombiman	54
3.4.2	Der Faktor in der Dünnschichtchromatographie	56
3.4.3	Spektrum des Faktors	57
3.5	Bildung des Faktors in Erbsenpflanzen	58
3.6	Vorkommen des Faktors im Pflanzenreich	60
4	Diskussion	61
4.1	Die Effekte des Faktors in verschiedenen Testsystemen	70
4.2	Chemie des Faktors	78
4.3	Der Faktor im Stoffwechsel	80
5	Literaturverzeichnis	84

Abkürzungen

AsPOD	= Ascorbatperoxidase
ATP	= Adenosintriphosphat
Cu	= Kupfer
BCS	= Bathocuproindisulfonsäure
BSH	= Bis- Salicyloyl- Hydrazin
DC	= Dünnschichtchromatographie
DHA	= Dihydroxyascorbat
DHAR	= Dihydroxyascorbatreduktase
DHF	= Dihydroxyfumarsäure
DTE	= Dithioerythritol
DTNB	= Dithio- Nitrobenzoesäure
DTT	= Dithiothreitol
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
G-6-P	= Glucose- 6- Phosphat
G6PDH	= Glucose- 6- Phosphat- Dehydrogenase
GR	= Glutathionreduktase
GS	= Glutaminsynthetase
GSH	= reduziertes Glutathion
GSHPx	= Glutathionperoxidase
GSSG	= oxidiertes Glutathion
HEPES	= Hydroxyethyl- Piperazinyl- Ethan- Sulfonsäure
HMW	= heavy molecular weight
HPLC	= high performance liquid chromatography
HPTLC	= high performance thin layer chromatography
i.A.	= im Ansatz
K_i	= Inhibitorkonstante
K_m	= Michaelis- Konstante
KMB	= Ketomethylthiobuttersäure
LDL	= low density lipoprotein
LMW	= low molecular weight
LOX	= Lipoxygenase
MDHA	= Monodehydrogenascorbat
MDHAR	= Monodehydrogenascorbatreduktase
MQ	= Milli- Q

NAD(H)	= Nicotinamid- Dinucleotid
NADP(H)	= Nicotinamid- Dinucleotid-Phosphat
PBS	= phosphate buffered saline
PSI, PSII	= Photosystem I, II
ROS	= reaktive oxygen species
SOD	= Superoxid- Dismutase
TNB	= Thio- Nitrobenzoesäure
Tris	= Tris- Hydroxymethyl- Aminomethan
UF	= Ultrafiltration
X	= Xanthin
XOD	= Xanthinoxidase
Zn	= Zink

1 Einleitung

Kupfer und Zink sind zwei essentielle Elemente für Lebewesen, die sich die Eigenschaften dieser Metalle zunutze machen, um sie in ihrem Stoffwechsel zu verwenden. Kupfer ist in vielen Bereichen des Stoffwechsels vorhanden, von denen nur einige wenige Aspekte hier vorgestellt werden können. Es kann einen ein- Elektron- Valenzwechsel von Cu(I) zu Cu(II) und somit Redox- Reaktionen mit anderen Reaktionspartnern durchführen. Durch Einbindung des Metalls in ein Protein kann die Reaktion sehr spezifisch gestaltet werden, um unerwünschte Seitenreaktionen zu unterdrücken.

Kupfer ist ein wichtiger Bestandteil diverser Enzyme wie zum Beispiel der Ascorbat- Oxidase (1.10.3.3), die Ascorbat zu Dehydroascorbat, aber auch Phenole umsetzt, der Laccase (EC 1.10.3.2), die Polyphenole oxidiert, Amin- Oxidasen deren Substrate beispielsweise Putrescin, Cadaverin, Spermidin und aliphatische Amine darstellen und möglicherweise eine Funktion in der Wachstumsregulation haben (LINDER, 1991). In Wirbeltieren, in denen die Rolle des Kupfers am besten untersucht ist, finden sich Enzyme wie die Dopamin β - Hydroxylase, die bei der Catecholaminbiosynthese beteiligt ist, also eine Rolle bei der Funktion des Nervensystems übernimmt, das α - amidierende Enzym, das die Amidierung von Peptidhormonen durchführt, die Lysyl- Oxidase, die die Quervernetzung von Collagen und Elastin durch Bildung von Allysylin vorbereitet und die Diamin- Oxidase, die Histamin und Polyamine inaktiviert, also u.a. eine Rolle beim Zellwachstum spielt. Zwei weitere Beispiele für ein kupferhaltige Enzyme sind die Phenylalanin- Hydroxylase oder Phenylalanin 4- Monooxygenase (EC 1.14.16.1), hier ist das Säugerenzym Eisen-, das Bakterienenzym (aus *Chromobacterium violaceum*) kupferabhängig, und die Tyrosinase, die bei der Melaninbildung mitwirken. Das Fehlen der Phenylalanin 4- Monooxygenase führt zum Krankheitsbild der Phenylketonurie. Ein weiteres tierisches Kupferprotein ist das Caeruloplasmin, das einen hohen Anteil des extrazellulären Kupfers bindet und Ferroxidaseaktivität aufweist. Der Kupferstoffwechsel findet hier einen Anbindungspunkt zum Eisenstoffwechsel, was möglicherweise die Bindung des oxidierten Fe(III) an Transferrin erleichtert. Ein weiteres Beispiel der Kopplung von Kupfer- und Eisenstoffwechsel ist in Hefe beschrieben, wo ein dem Caeruloplasmin homologes Protein, nachdem es mit Kupfer beladen wurde, die Aufnahme von Eisen in die Zelle fördert.

Sehr wichtige Kupferproteine sind die Cytochrom c- Oxidase (EC 1.9.2.1) (GLERUM et al., 1997), die die Reduktion von O_2 zu H_2O in der mitochondrialen Atmungskette durchführt und die neben Kupfer auch Zink tragende Superoxid- Dismutase, die Superoxid O_2^- mit H^+ zu H_2O und O_2 dismutiert (McCORD und FRIDOVICH, 1969). Ein für Pflanzen außerordentlich wichtiges Protein ist das Plastocyanin, das eine wichtige Rolle im Elektronentransport des Chloroplasten spielt. Es ist ein mobiler Elektronenüberträger, der Elektronen vom Cytochrom f zum Photosystem I transportiert. Plastocyanin ist ein Mitglied einer Familie kleiner (MW 10- 26 kD) redoxaktiver Proteine (Cupredoxine) die alle ein einziges Kupferion tragen.

Weitere Proteine dieser Familie in Pflanzen sind Plantacyanin, Mavicyanin, Stellacyanin, Umecyanin, das „cucumber basic blue protein“ und das „cucumber peeling cupredoxin“ (SIGFRIDSSON, 1998). Cupredoxine kommen auch in Bakterien vor, das bekannteste Beispiel ist das Azurin. Interessanterweise übernimmt bei Mollusken und Arthropoden ein Kupferprotein, das Hämocyanin, den Transport von Sauerstoff zu den Geweben. Ein durch Histidinreste stabilisiertes, binukleares Kupferzentrum kann hierbei durch Valenzwechsel des Metalls Sauerstoff aufnehmen oder abgeben. Die Aufzählung erhebt jedoch keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Generell ist zu sagen, daß Kupfer sehr eng mit dem O₂- Stoffwechsel verbunden ist. Es ist häufig in redoxaktiven Proteinen anzutreffen die entweder nur Elektronen übertragen, oder mit Sauerstoff als Cosubstrat arbeiten. Störungen der Kupferhomöostase machen sich bei allen Organismen bemerkbar, die Kupfer als funktionelles Metall in ihrem Stoffwechsel verwenden. Dies bezieht sich nicht nur auf eine Unterversorgung, sondern auch auf ein Übermaß von verfügbarem Kupfer, da dieses Metall auch zellschädigende Effekte zeigen kann. Diese hängen in hohem Maße mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die im Stoffwechsel jedes aerob lebenden Lebewesen entstehen, zusammen. Kupfer ist in der Lage, Elektronen auf Sauerstoff (O₂) zu übertragen und ihn so zu aktivieren, aber auch die Modulation ungefährlicherer ROS in gefährlichere durchzuführen. Die hauptsächlich durch Kupfer auf zellulärer Ebene hervorgerufenen Schäden sind Lipidperoxidation, Proteinoxidation und DNA- Veränderungen. Kupfer (MULTHAUP et al., 1996), aber auch Eisen (SMITH et al., 1997) wird eine Beteiligung an der Ausbildung der Alzheimer'schen Krankheit angedacht. Auch andere neurodegenerative Erkrankungen scheinen auf Dysfunktion des Kupferhaushaltes zu beruhen. So wird vermutet, daß die Ausbildung von Prionerkrankungen im Zusammenhang mit einer veränderten Kupferbindungsfähigkeit des Prionproteins steht (PRINCE und GUNSON, 1998). Auch die Ausbildung der humanen familiären amyotrophischen Lateralsklerose wird auf fehlerhafte Kupferbindung, in diesem Falle die SOD 1 betreffend zurückgeführt (CORSON et al., 1998; CIZEWSKI CULOTTA et al., 1995). Menkes Syndrom und die Wilson'sche Krankheit sind erbliche Störungen des Kupferhaushaltes, hier sind der Membrantransport und die Kupferspeicherfunktion beeinträchtigt (YUAN et al., 1995; PUFAHL et al., 1997; KAIM und SCHWEDERSKI, 1995). Kupfer zeigt *in vitro* prooxidativen Charakter gegenüber LDL. Oxidiertes LDL begünstigt *in vivo* die Ausbildung von Arteriosklerose. Es wird leicht durch Gewebsmakrophagen und Monocyten aufgenommen. Das Ergebnis sind Schaumzellen, die für die Bildung von „fatty streaks“ in der Gefäßwand nötig scheinen. Die „fatty streaks“ ziehen weitere Makrophagen an, die das Endothel schädigen können. Daraus könnte sich eine arteriosklerotische Läsion entwickeln (KEHRER, 1993).

Auch Zink ist in zahlreichen Komponenten des Stoffwechsels vorhanden. Es ist Bestandteil einer großen Anzahl von Enzymen, beispielsweise der alkalinen Phosphatase, der

Phospholipase C, der Alkohol- Dehydrogenase, der Superoxid- Dismutase, der Carboanhydrase (GROTZ et al., 1998) und der Zinkproteasen wie z.B. der Carboxypeptidase A. In diesen Enzymen hat es entweder strukturelle oder katalytische Aufgaben. Zink eignet sich besonders gut für die Stabilisierung von Proteinen, ohne dabei Schäden durch Redoxwechsel zu verursachen, da Zink nur zweifach positiv geladen vorkommt. In den wenigsten Enzymen hat Zink nur strukturfestigende Aufgaben, meistens trägt das Zinkion direkt zur Enzymkatalyse bei. Hierbei sind zwei Mechanismen zu unterscheiden: Der erste ist z.B. in der Carboanhydrase realisiert. Wasser ist zunächst an das Zink gebunden und wird dann deprotoniert, was zu einer zinkgebundenen OH- Gruppe führt. Dann folgt die Anlagerung des CO₂ mit anschließender Übertragung der gebundenen OH- Gruppe auf das Kohlenstoffatom. Nach einer Konformationsänderung kommt es zum Tausch des gebildeten Hydrogencarbonates gegen Wasser und somit die Wiederherstellung des Ausgangszustandes. Bei dem anderen Reaktionstyp wird eine Carbonylgruppe direkt an das Zink gebunden und polarisiert, was einen nucleophilen Angriff auf das C- Atom der Carbonylgruppe ermöglicht. Auch niedermolekulare Zinkkomplexe können die Hydrolyse von Biopolymeren katalysieren (O`HALLORAN, 1993). Zink ist ebenfalls ein wichtiges Element in einigen DNA- bindenden Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren oder Kernrezeptoren (KREBS et al., 1995). Hier sind Zinkionen Bestandteile struktureller Bereiche die der Erkennung dienen, wie Zinkfingern (KISU et al., 1998), in denen Zinkatome jeweils mit 2 Histidinen und 2 Cysteinen (His₂Cys₂) koordiniert sind. Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor IIIA aus *Xenopus*. In Zinktwists, einer anderen Form von Zinkfingern, sind die Zinkatome durch 4 Cysteine gebunden, wie beim Glucocortinoidrezeptor Glu Rec (FENTON, 1995). In retroviralen Nucleocapsidproteinen ist Zink mit Cys₃His koordiniert. (LOUIE und MEADE, 1998). Ein weiteres Strukturelement von Transkriptionsfaktoren können Zinkcluster sein. Ein Beispiel ist der Hefetranskriptionsfaktor GAL4, bei dem 2 Zinkatome durch 6 Cysteine verbunden sind (FENTON, 1995). Die Aufgabe dieser Proteine ist die Vermittlung intra- und interzellulärer Signale zum Kern, in Verbindung mit der Steuerung der Transkriptionsaktivität. Zink spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation bzw. Koordination des Stoffwechsels.

Aufgrund der Wichtigkeit beider Elemente, Kupfer wie auch Zink, und der damit verbundenen Unvermeidbarkeit, mit ihnen umzugehen, müssen sie im Stoffwechsel sorgsam reguliert werden, um ihre schädigenden Eigenschaften zu unterbinden. Wie dies im Einzelnen realisiert ist, ist nicht immer klar. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer Substanz, Faktor genannt, die aufgrund ihrer Eigenschaften bei der Metallregulation eine Rolle spielen könnte. Diese Substanz, die in Spinat vorkommt, ist in der Lage, das kupfer- und zinksensitive Enzym Glutathionreduktase vor der Metallinaktivierung zu schützen. Das Ziel der Arbeit ist es, Einblicke in die Chemie und die Wirkungsweise des Faktors zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Falls nicht anders bemerkt, wurden Chemikalien für die Analyse verwendet. Acetonitril, AgNO₃, Ammoniaklösung 25%, Barbitursäure, Borsäure, CoCl₂ x 6 H₂O, CuSO₄ x 5 H₂O, Eisessig, FeCl₃ x 6 H₂O, Fluoreszenzindikator F 254, L- Glutamin für die Biochemie, Glycerin, HCl 32%, HgCl₂, Hydroxylaminhydrochlorid, KH₂PO₄, K₂HPO₄ x 3 H₂O, Kieselgel 60 H für die Dünnschichtchromatographie, LiChroPrep Si 60, 40- 63 µM, MnCl₂ x 2 H₂O, Na- Barbiturat, NaCl, di- Natriumhydrogenarsenat, NaOH, Na₂SO₃, NiCl₂ x 5 H₂O, PbCl₂ zur Synthese, Phosphorsäure 85%, Titriplex III (EDTA), Triazol, Trichloressigsäure, Trishydroxymethylaminomethan für die Molekularbiologie und ZnCl₂ wurden von Merck bezogen. Agarose, Bathocuproindisulfonsäure, D- Cystein, L- Cystein, Cysteinethylester, Cystin, Cytochrom c, Dihydroxyfumarsäure, Dithio (bis) nitrobenzoesäure, Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase Typ V aus Bäckerhefe, Glutathion oxidiert, Glutathion reduziert, Glutathionreduktase Typ III aus Bäckerhefe, Homocystein, Imidazol Grad I, α-Keto-γ-methylthiobuttersäure (KMB), α- Linolensäure, N- Acetylcystein, Rose Bengal, Sudan black, Thiazolidin-4-carbonsäure, Tween 20, Xanthin und Xanthinoxidase wurden von Sigma bezogen. Dithiooxamid (Rubeanwasserstoff), Methansulfonsäure, MnCl₂ x 4 H₂O und Na₂S Hydrat wurden von Fluka bezogen. Ninhydrin, p- Aminodimethylanilin, (N,N-Dimethyl-p-phenylendiammoniumdichlorid), Bovines Serumalbumin Fract. V, Coomassie Blue G 250, Dowex 1 x 2, Dowex 50 W x 8 practical Grade, Dowex 50 W x 8 analytical Grade und HEPES wurden von Serva bezogen. CdCl₂ x 2 ½ H₂O, CrCl₃ (rein), Cu (I) Cl (reinst) und Dithizon stammten von Riedel de Haen. Adenosindiphosphat, Glucose-6-Phosphat, Na- Salz, NADP, Dinatriumsalz und NADPH wurden von Boehringer bezogen. Weiterhin wurden folgende Chemikalien weiterer Firmen verwendet: Ethanol, abs. und Isopropanol (Baker), Polymin P (BASF) Coomassie Brilliant blue Microassay (Biorad), Chelating Sepharose (Pharmacia), Monobrombiman (Molecular Probes, Eugene, Oregon) und Dithioerythritol (Roth). Bis- Salicyloyl- Hydrazin wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Formanek vom Botanischen Institut der Universität München und Low Density Lipoprotein (LDL) vom Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München in Weihenstephan zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden verwendet: Merck Universal Indikatorpapier, Merck Pufferkapseln, Schleicher und Schuell Membranfilter 0,45 µM, Millipore Einmalfilter 0,2

μ M, HPTLC Kieselgel Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (Merck) und Amicon Diaflo UF-Membranen YC05 (500 Dalton).

2.1.3 Geräte

- Metrohm 632 pH- Meter
- Microprocessor Conductivity Meter LF-535 (Fa. WTW) mit LDM- Elektrode
- Braun Küchenmixer
- Waring Mixer
- GFL- und Köttermann- Wasserbäder
- Emerson Heizplatte für Dünnschichtplatten
- Ratiolab Halbmikro Kunststoffküvetten
- Pflanzschalen 36 x 56 cm
- Heraeus Trochenschrank
- Memmert Trockenschrank
- LKB- Säulen (Pharmacia)
- Desaga Vielfach- Schlauchpumpe 13 19 00
- Millipore Milli- Q Reinstwasseranlage
- Heidolph Heizrührer
- Biorad Modell 2110 Fraktionssammler
- Pharmacia Frac- 200 Fraktionssammler
- Heraeus Sepatech Biofuge 17 S
- Kontron Centrikon T 124 und T 324 Zentrifugen
- Mettler Chemikalienwaage
- Heraeus Labofuge III
- Uvikon 930 Spektrophotometer
- Sartorius Feinwaage 1801 MP 6-1
- Heraeus Biofuge A Tischzentrifuge
- Hettich Mikrorapid Tischzentrifuge
- Büchi Rotavapor R 110 Rotationsverdampfer
- French Pressure Cell Press (American Instrument Company)
- Desaga DC- Platten- Beschichtungsapparatur
- Nuaire -80°C- Schrank
- Autoklav (Varioklav, München)
- Christ Gefriertrocknungsanlage
- Biorad Protean II Gelapparatur
- Druckluft Ultrafiltrationskammern (Amicon)

- Eismaschine UBE 50-35 (Zegra)
- Whirlmix (Heidolph)
- Temperierbares Wasserbad mit Beleuchtungseinrichtung
- Hellma Roto- Vette Küvettenzentrifuge
- Beckman P/ACE System 5510 Kapillarelektrophorese mit P/ACE Diodenarray- Detektor

- HPLC- Anlage mit der die Reinheitsprüfung durchgeführt wurde:
 - Beckman System Gold 125 Solvent Module
 - Beckman System Gold 168 Detector
 - C 18 Säule 125 x 4,6 mm, Hypersil ODS, 5µm
 - Gold- Software

- HPLC- Anlage, mit der die Derivatisierung durchgeführt wurde:
 - Knauer HPLC Prep 64
 - Knauer Variable wavelength monitor
 - Shimadzu RF 535 Fluorescence HPLC Monitor
 - Borwin- Software

- Gaschromatograph, der für den Linolensäureoxidationsversuch verwendet wurde:
 - Varian Aerograph 3300 Gaschromatograph mit 1/8 inch x 100 cm Aluminiumoxidsäule und Flammenionisationsdetektor
 - Varian 4400 Integrator (für die Linolensäureoxidation)

- Gaschromatograph, der für den Dihydroxyfumarsäureoxidationsversuch verwendet wurde:
 - Varian Aerograph Series 1400 Gaschromatograph
 - Flammenionisationsdetektor
 - Shimadzu C-R 6A Chromatopac Integrator

- Beckman P/ACE System 5510 Kapillarelektrophorese mit Diodenarraydetektor,
 - Quarzglaskapillare mit 50 cm Länge und 50 µm Durchmesser
 - Gold- Software

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Verwendete Organismen

Verwendet wurden Markerbsen der Sorte "Lancet", der Spinat wurde aus dem Lebensmittelhandel bezogen.

2.2.2 Anzucht

Etiolierte Erbsenkeimlinge wurden in 56 cm x 36 cm großen und 6 cm tiefen Pflanzschalen herangezogen. Dazu wurden etwa 150 Erbsen 24 Stunden vorgequollen und dann in ein Blumenerde- Sandgemisch eingesät. In den Boden der Pflanzschale wurden 2,5 l Wasser gegeben. Die Pflanzschalen wurden mit Aluminiumfolie abgedunkelt und bei Raumtemperatur in einen Dunkelschrank gestellt. Nach 8 Tagen hatten die Keimlinge eine Höhe von ca. 15 cm und konnten für den Versuch verwendet werden.

2.3. Nachweisverfahren

2.3.1 Faktorbestimmung mit dem Glutathionreduktasetest

Der Faktor wurde mit einem enzymatischen Testsystem identifiziert, dessen Aufbau an den von HÄUSL (1990) oder FREY (1990) beschriebenen Test angelehnt ist. Er wird in einem Volumen von 1 ml ausgeführt und enthält folgende Komponenten:

- 100 µl 1 M Tris- HCl pH 7,5
- 100 µl 1 mM DTNB
- 10 µl 8 mM NADP
- 10 µl 40 mM Glucose-6-Phosphat
- 10 µl 20 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Bäckerhefe
- 100 µl 0,033 U/ml Glutathionreduktase aus Bäckerhefe
- 100 µl 2 mM GSSG

Verwendet wurde die Glutathionreduktase Typ III aus Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) der Firma Sigma Chemical. Sie diente als Hilfsenzym in sämtlichen analytischen GR- Tests. Die Substanzen wurden vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Das Volumen zu testender Proben wurde variabel gehandhabt und das Gesamtvolumen des Ansatzes ad 1 ml ergänzt. Vorgelegt wurde Wasser und die zu testende Probe, dann die Chemikalien in oben angegebener Reihenfolge. Vor der Zugabe der Glutathionreduktase sollte der Ansatz 3 Minuten lang stehen, um der G6PDH genug Zeit zu geben, ausreichend hohe Konzentrationen von NADPH zu erzeugen. Der Test wurde dann unmittelbar nach Zugabe der Glutathionreduktase mit oxidiertem Glutathion gestartet, um vorzeitige Inaktivierung der GR

zu vermeiden. Der durch die Reduktion des DTNB hervorgerufene Extinktionsanstieg wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 412 nm verfolgt. Zur Auswertung wurde die Extinktionsdifferenz zwischen der 10. und 15. Minute bestimmt. Als Kontrollen wurden ein Ansatz mit 0,1 mM EDTA und ein Ansatz ohne jeglichen Zusatz (einfacher Test) mitbestimmt.

2.3.2 Nachweis der Glutaminsynthetase aus Spinat

Zum GS- Test wurden folgende Nachweisreagenzien benötigt (verändert nach RHODES und STEWART, 1974):

Lösung 1: 100 mM Tris
160 mM L- Glutamin
4,5 mM MnCl_2
0,3 mM ADP
20 mM Hydroxylammoniumchlorid
mit Eisessig auf einen pH- Wert von 6.4 eingestellt

Lösung 2: 200 mM Na- Arsenat
100 mM Tris
mit HCl auf einen pH- Wert von 6,6 einstellen

Lösung 3: 0,25 M Trichloressigsäure
100 mM FeCl_3
in 0,96 M HCl

Wenige Gramm Spinat wurden im Mörser mit wenig 50 mM Tris- HCl pH 7,5 unter Verwendung von etwas Seesand homogenisiert. Der entstandene Brei wurde durch eine Nylongaze abgepreßt. Der Preßsaft wurde dann 3 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/ Minute in einer vorgekühlten Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der das Enzym enthaltende Überstand wurde für den Enzymassay verwendet. Dazu wurde eine geeignete Enzymmenge in 0,1 ml 50 mM Tris- HCl, pH 7,5, einer geeigneten Menge der zu testenden Probe und H_2O ad 200 μl für eine geeignete Zeitspanne vorinkubiert. Auf diesen Ansatz wurden dann 0,9 ml Lösung 1 und 0,1 ml Lösung 2 gegeben, gut gemischt, und weitere 10 Minuten inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann durch Zugabe von 1 ml Lösung 3 gestoppt, wobei sich ein roter Farbkomplex bildet, der bei 500 nm gemessen werden konnte. 1 mol Umsatz entspricht unter diesen Bedingungen bei 1 cm Schichtdicke einer OD von 364.000.

2.3.3 Nachweis der Superoxid- Dismutase

Der Superoxid- Dismutasetest wurde leicht verändert nach McCORD und FRIDOVICH (1969) durchgeführt. Er enthält folgende Bestandteile:

- 50 μ l 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 (50 mM)
- 100 μ l 0,01 U/ml Xanthinoxidase (0,001 U/ml)
- 20 μ l 2,5 mM Cytochrom c (50 μ M)
- 100 μ l 0,5 mM Xanthin (50 μ M)

Der Ansatz wird mit der zu testenden Probe und Wasser ad 1 ml ergänzt und mit Xanthin gestartet. Xanthin wurde zuvor in wenig verdünnter NaOH vorgelöst. Der Extinktionsverlauf der Reaktion wird bei 550 nm am Photometer verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient des gebildeten reduzierten Cytochrom c beträgt $21,5 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

2.3.4 Proteinbestimmung

Die Proteingehalte wurden nach der Methode von BRADFORD (1976) durchgeführt. Zu 100 μ l einer geeigneten Verdünnung der zu messenden Proteinlösung werden 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Dieses hat folgende Zusammensetzung:

- 50 mg Coomassie Blue G- 250
- 25 ml 96% Ethanol
- 50 ml 85 % Phosphorsäure
- Wasser ad 500 ml

Das Reagenz ist nach 1 Tag gebrauchsfertig und sollte kühl und lichtgeschützt aufbewahrt werden. Der Test wurde direkt in Halbmikroküvetten angesetzt und die Extinktion nach genau 5 Minuten bei 595 nm gemessen. Die Proteingehalte wurden aus einer mit Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve abgelesen.

2.3.5 Thiolbestimmung

Die Bestimmung von freien Thiolgruppen wurde nach dem Prinzip von ELLMAN (1959) durchgeführt. 100 μ l der zu bestimmenden Probe wurden in Halbmikroküvetten mit 900 μ l 0,11 mM Ellman's Reagenz (5,5'-dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure), DTNB) versetzt und die Extinktion nach 5 Minuten bei 436 nm oder 412 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{412 \text{ nm}}$ beträgt $13,6 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$.

2.3.6 Bestimmung von Schwefelwasserstoff

Die Bestimmung von Schwefelwasserstoff erfolgte nach der Methode von Siegel. Hierzu benötigt man zwei Reagenzien, deren Zusammensetzung hier aufgelistet ist:

Reagenz 1: 0,02 M N,N-Dimethyl-p-phenyldiammoniumdichlorid in 7,2 M HCl

Reagenz 2: 0,03 M $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 1,2 M HCl

Zu einem Ansatz von 1 ml pipettiert man zunächst 100 μl der Lösung 1, dann 100 μl der Lösung 2. Nach 20 Minuten Inkubation im Dunklen wird die Extinktion des bei Anwesenheit von H_2S gebildeten Methylenblaus bei 670 nm gemessen. Unter diesen Bedingungen (1,2 ml Endvolumen, 1 cm Schichtdicke) beträgt die Extinktion von 1 μmol Methylenblau 13,54.

2.3.7 Bestimmung von Cu(I)

Der Nachweis von Cu(I) in wässriger Lösung wurde mit Bathocuproindisulfonat durchgeführt. Bei einer Konzentration 0,2 mM BCS im Ansatz kann die Veränderung der Kupfer (I)- Konzentration direkt am Photometer bei 480 nm verfolgt werden. Der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{480 \text{ nm}}$ ist $13 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

2.3.8 Cysteinnachweis in Lösung mit dem Gaitonde- Reagenz

1 ml der zu testenden Probe wird mit 1 ml Gaitonde- Reagenz (20 ml konz. HCl, 80 ml Eisessig, 1,25 g Ninhydrin) versetzt und der Ansatz für 5 Minuten im kochenden Wasserbad gehalten. Bei Anwesenheit von Cystein zeigt sich ein kirschroter Farbkomplex. der nach Stabilisierung durch Zugabe von 2 ml abs. Ethanol bei 546 nm gemessen werden kann.

2.3.9 Dünnschichtchromatographische Nachweismethoden

Cystein, Peptide und Aminosäuren wurden mit Gaitonde- Reagenz nachgewiesen. Dazu wurde die Dünnschichtplatte nach dem Besprühen mit dem Reagenz für einige Minuten bei 120 °C gebacken. Cysteinhaltige Substanzen zeigen eine kirschrote Färbung.

Schwermetallionen wurden mit Rubeanwasserstoff (Dithiooxamid) in gesättigter ethanolischer Lösung, sowie mit Dithizon, 0,02% ige ethanolischer Lösung nachgewiesen. Nach dem Besprühen der Platten wurden diese in einer ammoniakgesättigten Kammer nachentwickelt. Mit Dithiooxamid besprühte Platten wurden, zusätzlich für wenige Minuten bei 120°C gebacken.

2.3.10 Derivatisierung des Faktors

Um freie Thiolgruppen im Faktormolekül nachzuweisen wurde eine Derivatisierung mit Monobrombiman (3,7-dimethyl-4-bromomethyl-6-methyl-1,5-diazabicyclo[3.3.0]octa-3,6-dien-2,8-dion) in Anlehnung an die Methode von FAHEY und NEWTON (1987) mit anschließender Trennung mittels HPLC durchgeführt. Dazu wurden zunächst 50 µl Probe mit 110 µl frisch angesetztem Derivatisierungsreagenz folgender Zusammensetzung gemischt:

- 50 µl HEPES (50 mM mit 1,5 mM EDTA) pH 8,0
- 50 µl Acetonitril
- 10 µl Monobrombiman (48 mM in Acetonitril)

Die Reaktionsansätze wurde für 30 Minuten im Dunklen gehalten und sofort durch Zugabe von 100 µl 65 mM Methansulfonsäure gestoppt. Anschließend wurde die Trennung von 50 µl Ansatz an einer Merck LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 4 x 250 mm durchgeführt. Folgende Laufmittel wurden benötigt:

- A: 10 % Methanol, 0,25 % Eisessig
- B: 90 % Methanol, 0,25 % Eisessig

Die Trennung erfolgte nach folgendem Elutionsprotokoll:

- In 10 Minuten von 0 – 8 % B (linearer Gradient)
- In 5 Minuten von 8 – 14 % B (linearer Gradient)
- In 2,5 Minuten von 14 auf 100 % B (linearer Gradient)
- 11 Minuten 100 % B (isokratisch)
- In 1 Minute von 100 auf 0 % B
- 1,5 Minuten 0 % B Equilibrieren (isokratisch)

Die Fluoreszenz der derivatisierten Substanzen wurde mit einem Fluoreszenzdetektor während der Anregung (bei 380 nm) bei 480 nm nachgewiesen. Parallel wurde die Absorptionsänderung im Eluat bei 280 nm gemessen.

2.3.11 Oxidation von LDL (Dienkonjugation)

Die LDL- Oxidation wurde nach einer von ESTERBAUER et al. (1989) beschriebenen Methode durchgeführt. LDL wurde über eine Biorad 10 DG- Säule entsalzt. Anschließend wurde mit dem Coomassie Brilliant Blue Microassay von Biorad eine Proteinbestimmung durchgeführt. Der Testansatz enthielt 25 µg LDL/ml Ansatzvolumen und 1,67 µM CuSO₄ in PBS (0,9% NaCl in 20 mM Phosphatpuffer). Die Dienkonjugation kann über 6 Stunden bei 234 nm am Spektralphotometer verfolgt werden.

2.3.12 Agarose- Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde mit einem 0,8 %igem Agarosegel in einer Biorad Vertikalgelapparatur durchgeführt. Als Elektrodenpuffer diente ein 50 mM Barbitalpuffer pH 8,6. Zur Probenvorbereitung wurden in einem Endvolumen von 100 µl 30 µg entsalztes LDL, 3,36 µM CuSO₄ in PBS in Gegenwart unterschiedlicher Mengen des Faktors für 24 h inkubiert. Danach werden die im Ansatz enthaltenen Proteine mit 50 µl Sudan- Black-Färbelösung (200 mg Sudan black in 5ml Ethanol, 3ml Glycerin 87 %, 2 ml Bidest) für 30 Minuten gefärbt.

2.3.13 Messung der Oxidation von Dihydroxyfumarsäure durch Spaltung von KMB

Die durch Cu²⁺ hervorgerufene Oxidation von Dihydroxyfumarsäure (DHF) erzeugt reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, Superoxid und Hydroxylradikale. Diese lassen sich durch das Indikatormolekül α -Keto- γ -methylthiobuttersäure (KMB) nachweisen. Diese Substanz zerfällt unter dem Einfluß der erwähnten Sauerstoffspezies unter Bildung von Ethylen, welches gaschromatographisch nachgewiesen werden kann.

Die Reagenzien wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Da DHF in Gegenwart von Sauerstoff einer starken Autooxidation unterliegt, wurde es erst unmittelbar vor der Zugabe zum Ansatz gelöst. Der Ansatz enthält folgende Komponenten:

- 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4
- 1,5 mM KMB
- 0,5 mM DHF
- 10 mM CuSO₄

Die Größe der Versuchsansätze betrug 2 ml, sie wurden in geeichten, mit Gummistopfen gasdicht verschlossenen Reagenzgläsern 30 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. 1 ml des Gasüberstandes wurde dann an einem zuvor geeichten Gaschromatographen (Varian Aerograph 1400, Shimadzu C-R6A Chromatopac) mit einer Aluminiumoxidsäule (1/8 Zoll x 100cm) gemessen. Die Injektionstemperatur betrug 60 °C, die Säulentemperatur 80°C. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) bei 225°C.

2.3.14 Linolensäure- Oxidation

Die Oxidation von α - Linolensäure wurde nach der Methode von HEISER et al. (1998) durchgeführt. Bei Belichtung des Farbstoffes Rose Bengal entsteht Singulett-sauerstoff, der unter dem Einfluß von Kupferionen die Bildung von Ethylen und Ethan aus Linolensäure

bewirkt. Die Bildungsrate von Ethan und Ethylen können gaschromatographisch bestimmt werden. Die Versuchsansätze (2 ml Volumen) hatten folgende Zusammensetzung:

- 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2
- 20 μ M Rose Bengal
- 3,55 mM α - Linolensäure
- 5 μ M CuSO₄

Da die Linolensäure in Wasser schlecht löslich ist, muß 100 μ l davon tropfenweise in ein Gemisch aus 100 μ l Tween 20 in 2 ml 20 mM Boratpuffer pH 9,0 eingerührt werden. Dabei bildet sich eine weiße Emulsion, die nach der Zugabe von 260 μ l 1 M NaOH aufklart und anschließend mit 20 mM Boratpuffer pH 9,0 auf 5 ml aufgefüllt wird.

Die Versuchsansätze wurden in geeichten, mit Gummistopfen gasdicht verschlossenen Reagenzgläsern für 30 Minuten in einem Schüttelwasserbad mit unterseits angebrachter Beleuchtungseinrichtung bei 37 °C inkubiert. Die Beleuchtungsstärke hierbei betrug 500 μ E / m² x sec. Anschließend erfolgte die Bestimmung von Ethan und Ethylen an einem geeichten Gaschromatographen (Varian 3300 mit Varian 4400 Integrator) mit einer Aluminiumoxidsäule (1/8 Zoll x 100cm). Die Injektionstemperatur betrug 80°C, die Säulentemperatur 60°C. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) bei 225°C. Es wurden jeweils 1 ml des Gasgemisches analysiert.

2.3.15 Trennung des Faktors mit HPLC

Die Reinheit des Faktorpräparates wurde mittels HPLC überprüft. Der Faktor wurde an einer C 18 reversed- phase- Säule (Hypersil ODS, 5 μ m, 125 x 4,6 mM) mit 0,1 % Eisessig getrennt. Die Dauer des Laufes betrug 3,5 Minuten. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarraydetektor bei 230 und 280 nm.

2.3.16 Kapillarelektrophorese (CE)

Für die Kapillarelektrophorese des Faktors wurde eine Quarzkapillare von 50 mm Länge und 50 μ m Durchmesser verwendet. Die Kapillare wurde vor jedem Lauf 2 Minuten mit 100 mM NaOH gespült, dann 2 Minuten mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 8 oder pH 6,4) equilibriert. Etwa 1 μ l (entsprechend einer Auftragsdauer von 5 Sekunden) der Faktorklösung wurden bei einer Stromstärke von 120 –130 μ A (entsprechend einer Spannung von ca. 20 kV) aufgetrennt. Der Nachweis der getrennten Substanzen erfolgte mit einem Diodenarraydetektor bei 200 und 280 nm.

2.4 Präparationen

2.4.1 Herstellung metallionenfreier Reagenzien

Hierzu wurde das Reagenz mit wenig Chelating Sepharose (Pharmacia) versetzt, die vorher mit Wasser ethanolfrei gespült wurde. Nach einigen Minuten leichtem Schütteln wurde die Sepharose sedimentiert und der Überstand verwendet.

2.4.2 Aufreinigung des Faktors aus Spinat (Kleine Präparation)

1 kg gewaschener und von Mittelrippen befreiter Spinat wurde mit 100 ml deionisiertem Wasser im Kühlraum gemixt. Das entstandene Homogenat wurde durch Abpressen durch eine Lage Nylongaze von Grobpartikeln befreit. Der so gewonnene Rohextrakt wurde dann gekocht, bis die Proteine vollständig koaguliert waren und die Restflüssigkeit klar war. Die ausgefallenen Proteine wurden dann durch Filtration durch eine Lage Nylongaze von der den Faktor enthaltenden Flüssigkeit getrennt. Die Flüssigkeit wurde übernacht im Kühlraum gegen 2 l Wasser dialysiert. Das leicht saure Dialysewasser, dessen Leitfähigkeit nicht über 2300 μS betragen sollte, wurde danach auf eine gekühlte Kationentauschersäule (Dowex 50 Wx8, 100- 200 mesh, protonierte Form 19 x 2,8 cm) aufgetragen. Die Flußrate der Säule betrug 2 ml/ Minute. Die Säule wurde mit 200 ml Wasser nachgespült und dann mit 560 ml 300 mM NaCl- Lösung eluiert. Es wurden 80 Fraktionen mit je 7 ml aufgefangen. Die Faktoraktivität der Fraktionen wurde mit dem GR- Test bestimmt, wobei die Testansätze aufgrund des niedrigen pH- Wertes des Eluates mit wenig 10 M NaOH vorneutralisiert werden mußten.

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit MQ- Wasser auf 2200 ml aufgefüllt. Mit dieser Lösung wurde eine zweite Kationentauschersäule gleicher Größe unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben beladen. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 0- 1 M NaCl eluiert, dessen Volumen 400 ml betrug. Die aktiven Fraktionen wurden wiederum mit dem GR- Test bestimmt, vereinigt und mit Wasser auf 2200 ml aufgefüllt. Der pH dieser Lösung wurde mit NaOH auf 7,5 – 8 eingestellt und dann bei Raumtemperatur auf eine Anionentauschersäule (Dowex 1x2, 200- 400 mesh, Chloridform, 46 x 2,5 cm) mit einer Flußrate von 1 ml/ Minute aufgetragen. Die Säule wurde mit 200 ml Wasser nachgespült und dann mit 560 ml 400 mM NaCl eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und konnten entweder durch Eindampfen am Rotationsverdampfer oder durch Kochen eingeeengt werden. Das NaCl wurde anschließend durch Ultrafiltration in einer Amicon Druckzelle mit einer Amicon YC05- Membran mit einem Ausschlußmolekulargewicht von 500 Dalton entfernt. Zur Konservierung des Präparates wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,1 M zugegeben.

2.4.3 Aufreinigung des Faktors aus Spinat (Große Präparation)

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden jeweils 10 kg frischer Spinat gewaschen, entrippt und im Kühlraum mit etwa 1 l Wasser homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Baumwolltücher abgepreßt und der Durchlauf bis zum Kochen erhitzt. Dann wurden die ausgefallenen Proteine abfiltriert und die so erhaltene klare Flüssigkeit übernacht gegen 30 l Wasser dialysiert. Danach wurde das Dialysewasser mit 300 g protoniertem und neutral gewaschenem Dowex 50 Wx8 200- 400 mesh, practical grade versetzt und 30 Minuten unter Rühren in der Kälte adsorbieren gelassen, was anschließend mit dem GR- Test überprüft wurde. Der so beladene Ionentauscher wurde mit Wasser neutral gewaschen und bis zum Packen der Säule aufbewahrt. Mit dem gesamten beladenen Ionentauscher der ersten drei Tage wurde dann eine 1 l Glassäule mit 6 cm Durchmesser gepackt. Die Elution dieser Säule erfolgte mit 10 l 300 mM NaCl. Aufgefangen wurden 100 Fraktionen zu 100 ml bei einer Flußrate der Säule von 10 ml/ Minute. Die Aktivität der Fraktionen wurde durch den GR- Test festgestellt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mit Wasser auf ein Endvolumen von 30 l verdünnt und mit 450 g protoniertem und neutral gewaschenem Dowex 50 Wx8 200-400 mesh, analytical grade versetzt, und 30 Minuten lang in der Kälte gerührt. Nachdem die Anbindung des Faktors an den Ionentauscher überprüft wurde, wurde das Säulenmaterial abfiltriert, gewaschen und in eine weitere Glassäule gefüllt. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 0- 1 M NaCl eluiert, das Volumen des Gradienten betrug 4,6 l. Gesammelt wurden 46 Fraktionen zu 100 ml. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, eingeengt und in einer Amicon Ultrafiltrationszelle mit einer Amicon YC05- Membran ultrafiltriert. Danach wurde die Probe mit 1,5 Teilen Isopropanol versetzt und über eine Kieselgelsäule (30 cm lang, 2,6 cm im Durchmesser, gefüllt mit LiChroPrep Kieselgel 60) weiter aufgereinigt und entsalzt. Das Laufmittel war 60 % Isopropanol. Die Fraktionen wurden gefriergetrocknet und anschließend deren Aktivität bestimmt. Die aktiven Fraktionen wurden in wenig Wasser aufgenommen und auf mit Kieselgel 60 beschichtete Dünnschichtplatten aufgetragen und aufgetrennt. Die Dünnschichtplatten wurden mit einer Desaga- Apparatur mit einer Schichtdicke von 0,3 mm hergestellt. Das Laufmittel war 70 % Isopropanol. Der Faktor konnte leicht mit Wasser wieder von dem Kieselgel gelöst werden. Das Volumen der Faktorlösung wurde durch Lyophyllisation erneut verringert.

2.4.4 Faktormessung an etiolierten Erbsenpflanzen

Die mit den etiolierten Erbsenkeimlingen besetzten Pflanzschalen wurden zu Beginn des Versuches unter eine mit Neonlicht ausgestatteten Beleuchtungsapparatur gesetzt (8 Sylvania Universal White ES Standard F63W/ 125-St Neonröhren, Abstand 40 cm). In stündlichen Abständen wurden je 1 g Blatt- und Wurzelmaterial mit 1– 1,5 ml Wasser gemörsert, dann das Volumen der Probe mit Wasser auf 3 ml ergänzt und 50 µl für die Proteinbestimmung entnommen. Die Probe wurde gekocht bis die Proteine denaturiert waren. Anschließend wurde das Volumen erneut mit Wasser auf 3 ml ergänzt. Die ausgefallenen Proteine wurden dann durch Zentrifugation entfernt. 100 µl des Überstandes wurden dann im GR- Standardtest auf Faktoraktivität getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Aufreinigung des Faktormoleküls

Auf der folgenden Grafikseite sind die Elutionsprofile einer kleinen Präparation zusammengefaßt. Dazu wurden jeweils 200 µl der Säulenfraktionen im GR- Standardtest eingesetzt. Aufgetragen sind jeweils die der kontinuierlichen Messung der GR- Aktivität entnommenen Extinktionsdifferenzen bei 412 nm zwischen der 10. und der 15. Minute in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen. Die Anwesenheit von Faktoraktivität äußert sich hierbei in einer hohen ΔE_{412} (siehe auch Abb. 17). Die erste Abbildung (1a) zeigt das Elutionsprofil der 1. Kationentauschersäule (Dowex 50 Wx8). Wichtig ist, daß das Säulenmaterial in der protonierten Form vorliegt, da das Faktormolekül offenbar die pH- Verschiebung auf der Säule zur Bindung benötigt. Der Faktor ist in derart gebundener Form zumindest für einige Tage stabil. Die Elution erfolgte hier mit 300 mM NaCl. Der Faktor eluiert nach etwa 200 ml in einem relativ breiten Peak. Dieser Peak bildet an der Oberseite ein Plateau, bedingt durch die zu hohe Faktorkonzentration. In diesem Bereich verlaufen die mit dem GR- Assay gemessenen Kinetiken linear, sodaß keine höheren ΔE - Werte entstehen können. Auffällig ist die im Vergleich zu den anderen Profilen relativ niedrige maximale Extinktionsdifferenz. Dieser Effekt ist reproduzierbar und vermutlich auf eine erhöhte NaCl- Konzentration im Testansatz, die durch die Vorneutralisierung mit NaOH bedingt ist, zurückzuführen. Die NaCl- Konzentration beträgt allein durch die Vorneutralisierung 70 mM. Möglicherweise spielen auch andere, parallel eluierende Hemmstoffe eine Rolle.

Die zweite Abbildung (1b) zeigt das Elutionsprofil der 2. Kationentauschersäule (Dowex 50 Wx8). An die Säule wurde ein linearer Gradient von 0 – 1 M NaCl angelegt. Auch hier eluiert der Faktor bei etwa 200 ml. Auch hier war eine Vorneutralisierung der Proben mit NaOH, aber mit einer geringeren Konzentration als bei der 1. Säule erforderlich. Nach diesem Trennungsschritt konnte in den vereinigten aktiven Faktorfraktionen kein Glutathion mehr nachgewiesen werden. In den Elutionsprofilen der Kationentauschersäulen sind vor dem Faktorpeak noch andere Substanzen zu erkennen, die Einfluß auf den Aktivitätstest ausüben. Wie die dritte Abbildung (1c) zeigt, ist dies bei der Anionentauschersäule (Dowex 1x2, Cl⁻ - Form) kaum noch zu bemerken. Hier eluiert der Faktor nach 250 ml in einem symmetrischen Peak, der wie bei den beiden Kationentauschersäulen abgeflacht ist.

Durch die sich im Folgenden anschließende Ultrafiltration an einer Membran mit dem Ausschlußmolekulargewicht 500 Dalton konnte das Faktormolekül aufkonzentriert und gleichzeitig entsalzt werden. Jedoch war im Filtrat Faktoraktivität nachweisbar, was einen Hinweis auf das etwaige Molekulargewicht des Faktors gibt, das demzufolge in dieser Größenordnung liegen sollte. Das so gewonnene Faktorkonzentrat wurde zur Stabilisierung auf eine NaOH- Konzentration von 100 mM gebracht und konnte bei 4°C gelagert werden. Es wurde dann mittels HPLC einer Reinheitsprüfung an einer C 18 reversed phase- Säule

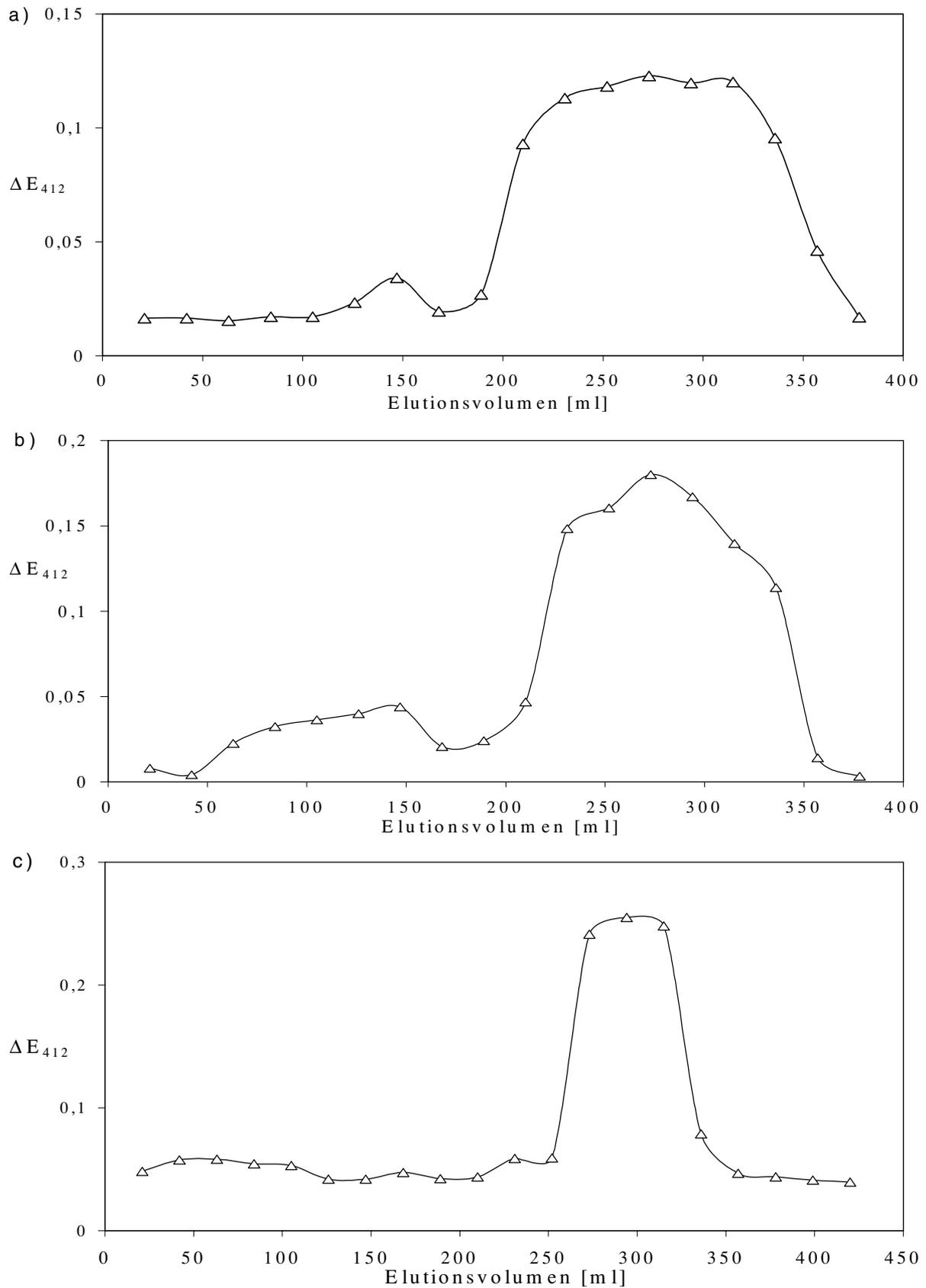


Abb. 1: Elutionsprofile der Faktoraufreinigung, Aktivitätsbestimmung mit dem GR-Standardtest (siehe Abschnitt 2.3.1)

a) 1. Kationentauschersäule, b) 2. Kationentauschersäule, c) Anionentauschersäule.

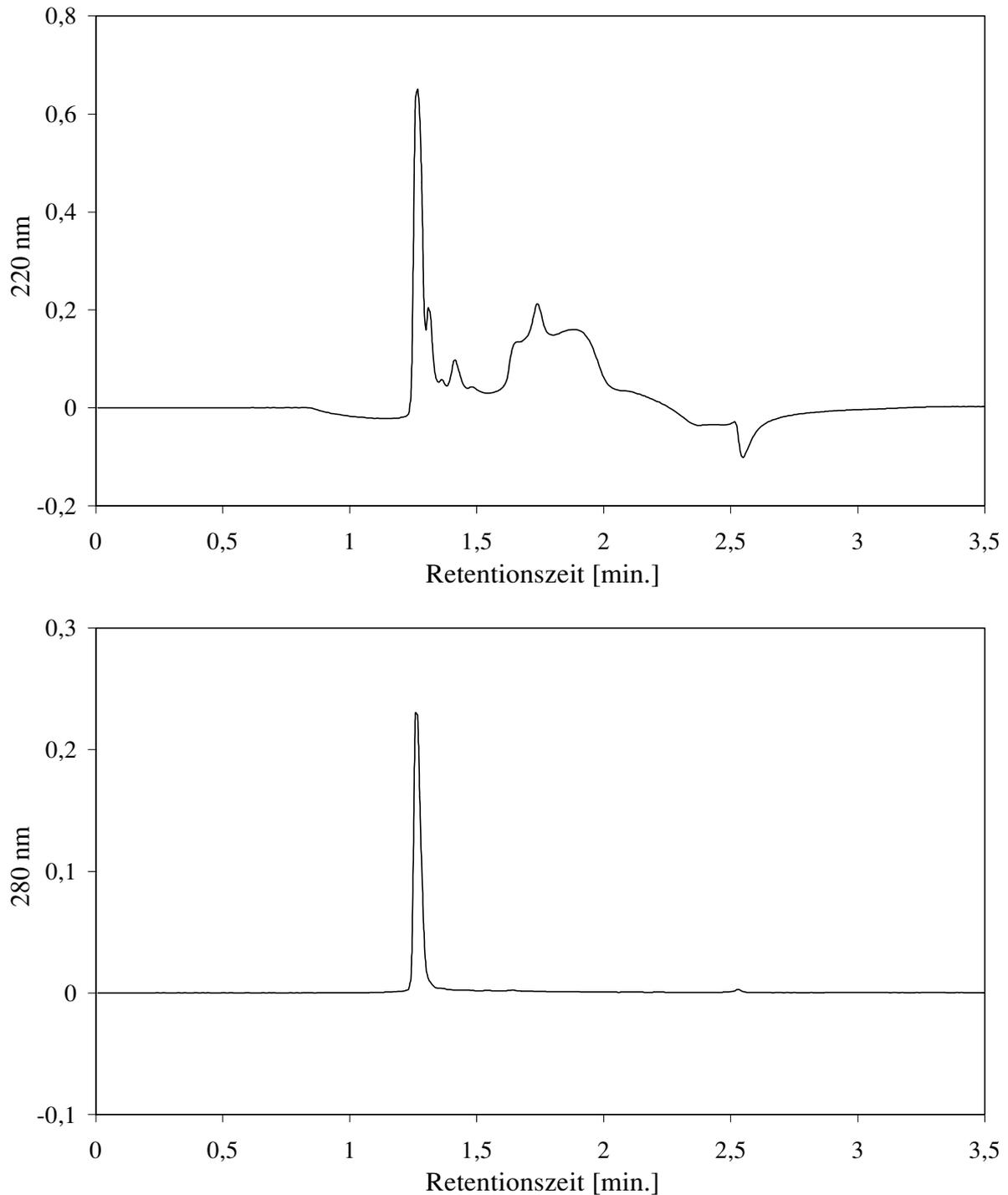


Abb. 2: Elutionsprofil der Faktorpräparation in der HPLC

unterzogen. Abbildung 2 zeigt die Elutionsprofile bei 220 und 280 nm. Es zeigt sich, daß die Präparation noch nicht komplett rein ist. Der Faktorpeak konnte jedoch aufgrund von Vergleichen mit Elutionsprofilen anderer aktiver und inaktiver Fraktionen dieser und anderer Präparationen identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um den höchsten Peak, der im Elutionsprofil sichtbar ist. Er findet sich sowohl bei 220 wie auch bei 280 nm. Der Faktor eluiert nach 1 Minute und 15 Sekunden von dieser Säule. Im Elutionsprofil bei 220 nm zeigen sich darüber hinaus noch mindestens sieben weitere, sich überlagernde Peaks. Dieser

Säulenlauf bildet die Grundlage für eine einheitliche Mengenangabe des Faktors. *Eine OD₂₀₇-unit ist hierbei die Faktormenge, die in diesem System bei einer Wellenlänge von 207 nm eine OD von 1 hervorruft.*

3.2 Haltbarkeit des Faktors

Für die erfolgreiche Lagerung des Faktors ist es unabdingbar, Bedingungen zu finden, unter denen der Faktor am stabilsten ist. Dazu wurden Faktorproben bei verschiedenen Temperaturen unter Zusatz von NaCl, NaOH und HCl für eine Woche gelagert und anschließend im GR- Test eingesetzt. Die Konzentration an Salz, Base und Säure wurde in den Proben auf 0,1 M eingestellt. Vor dem Einsatz im GR- Test wurden die Proben mit HCl bzw. NaOH neutralisiert, die NaCl- Probe mit einem adäquaten Volumen MQ- Wasser ergänzt, was in allen Ansätzen zu einer gleichmäßigen NaCl- Konzentration führt. Weiterhin wurde ein Ansatz mit H₂O, der bei 4° C gelagert wurde, mitbestimmt. Die Faktorkonzentration wurde so gewählt, daß eine Abhängigkeit von der Faktormenge erkennbar wird. Innerhalb der drei Testgruppen ist die Abnahme der Faktoraktivität mit steigender Temperatur zu erkennen (Abbildung 3). Die geringste Restaktivität zeigt sich bei neutralem pH, also bei den Ansätzen mit NaCl oder H₂O, gefolgt von den mit Säure inkubierten Testansätzen. Deutlich zeigt sich, daß der Faktor unter alkalischen Bedingungen die größte Stabilität aufweist. Weiterhin ist es günstig, den Faktor bei -20 °C einzufrieren. Diese Aufbewahrungsart ist sehr effektiv. Der Faktor kann über Monate auf diese Art gelagert werden, ohne daß er nennenswert an Aktivität verliert. Faktor hingegen, bei neutralem pH für 16 Monate bei -20 °C gelagert, verliert über 99% der ursprünglichen Aktivität. Versuche, bei denen bei der Dialyse vorsorglich NaOH zum Wasser zugegeben wurde, führten regelmäßig zum beschleunigten Pilzwachstum und wurden deshalb nicht weiter verfolgt.

Obwohl im längerfristigen Bereich Aktivitätsverluste erkennbar werden ist der Faktor stabil, wenn er kurzzeitig gekocht wird. Es lassen sich keinerlei Aktivitätsverluste feststellen, wenn man Faktorkonzentration für 15 Minuten unter Volumenverringerung einkocht und den Volumenverlust anschließend wieder bis zum Ausgangsvolumen ergänzt. Der Vergleich eines derart behandelten Ansatzes mit einem nicht gekochten Faktor im GR- Test zeigt nur sehr geringe Aktivitätsunterschiede (Abbildung 4). Im Test wurden Faktormengen eingesetzt, die keinen vollständigen Schutz der Glutathionreduktase bewirken können, aber dennoch eine deutliche Schutzwirkung erkennen lassen. In diesem Bereich sind Aktivitätsunterschiede am besten zu sehen. Die Volumenverringerung durch Eindampfen wurde regelmäßig praktiziert, um die bei Säulenaufreinigungen entstehenden großen Volumina zu verringern. Dabei machte es sich positiv bemerkbar, wenn diese vorher mit NaOH leicht alkalisch eingestellt wurden. Zusätzlich traten aufgrund der Anwendung dieser Methode keine Probleme mit Mikroorganismen mehr auf, da das Kochen in einer gesättigten alkalischen Salzlösung sehr ungünstige Lebensbedingungen darstellen.

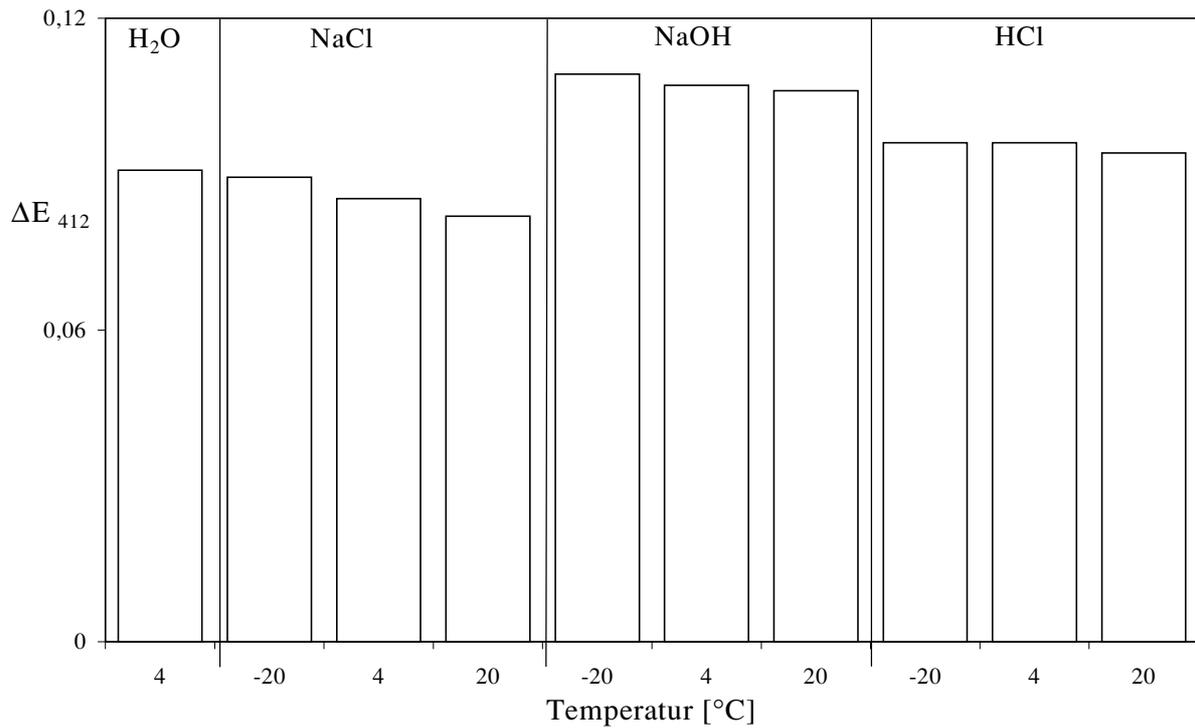


Abb. 3: Haltbarkeit des Faktors bei unterschiedlichen Bedingungen

7 Tage lang unterschiedlich vorbehandelte (0,1 M HCl, 0,1 M NaOH, 0,1 M NaCl, je bei 4°C, -20°C und 20°C, sowie H₂O bei 4°C) und vor Versuchsbeginn neutralisierte und volumenangepaßte Faktorpräparate im GR- Standardtest.

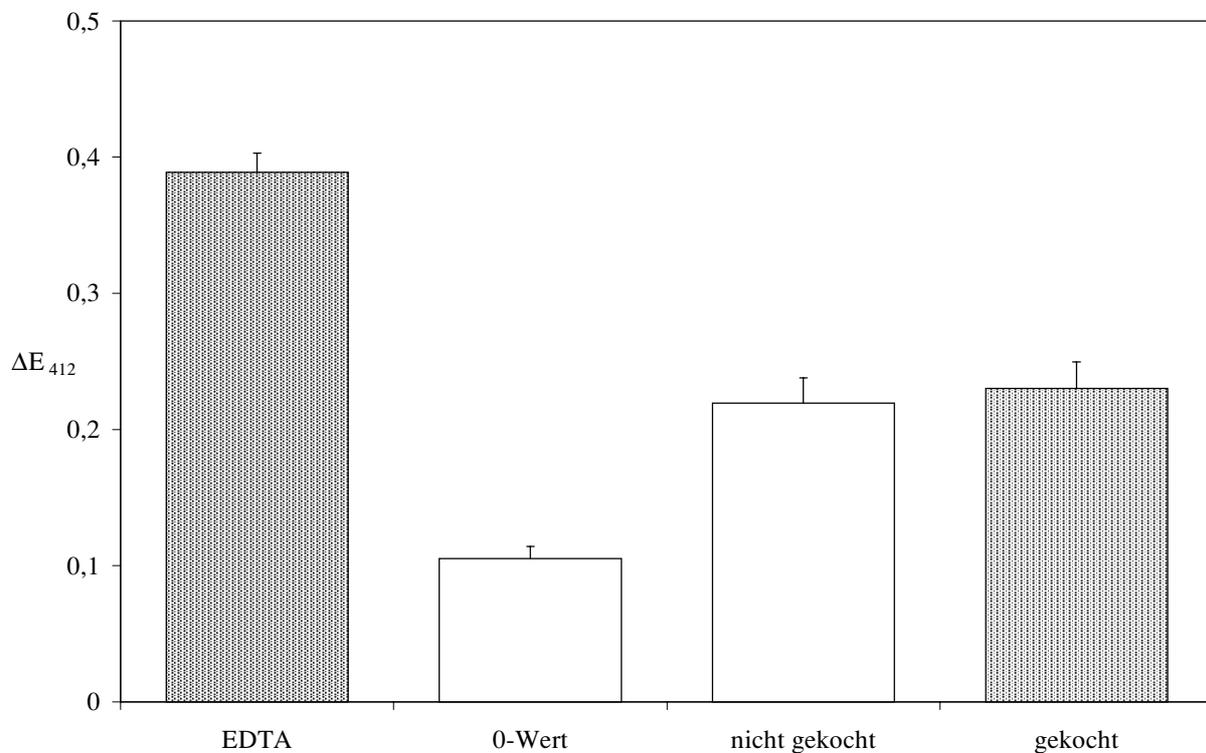


Abb. 4: Beeinflussung der Faktoraktivität durch Kochen

Für 15 Minuten gekochtes sowie ungekochtes Faktorpräparat nach Volumenausgleich im GR- Standardtest. Kontrolle durch 0,1 mM EDTA, der 0-Wert enthält keine Zusätze.

3.3 Der Faktor in verschiedenen kupferabhängigen Testsystemen

3.3.1 Glutathionreduktasetest

3.3.1.1 Eigenschaften des Glutathionreduktase- Testes

Die Zentralreaktion des zyklisierenden Testes ist die Umsetzung von oxidiertem Glutathion (GSSG) mit NADPH zu reduziertem Glutathion (GSH) und NADP durch die Glutathionreduktase. Die Reaktion wird durch eine vorgeschaltete NADP- Reduktion durch die Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase (G6PDH) mit Reduktionsequivalenten in Form von NADPH versorgt. Das durch die GR gebildete GSH wird durch Oxidation mit Ellman's Reagenz (Dithio-bis-nitrobenzoesäure, DTNB) wieder regeneriert und erneut der Reaktion zugeführt, wobei die gelb gefärbte Thionitrobenzoesäure (TNB) entsteht, die photometrisch quantifizierbar ist. Um die Inaktivierung durch anwesende Kupferionen beobachten zu können, ist die Konzentration der Glutathionreduktase so gewählt, daß sie für das Testsystem limitierend wirkt. Das untenstehende Schema zeigt zusammenfassend das Funktionsprinzip des Testes.

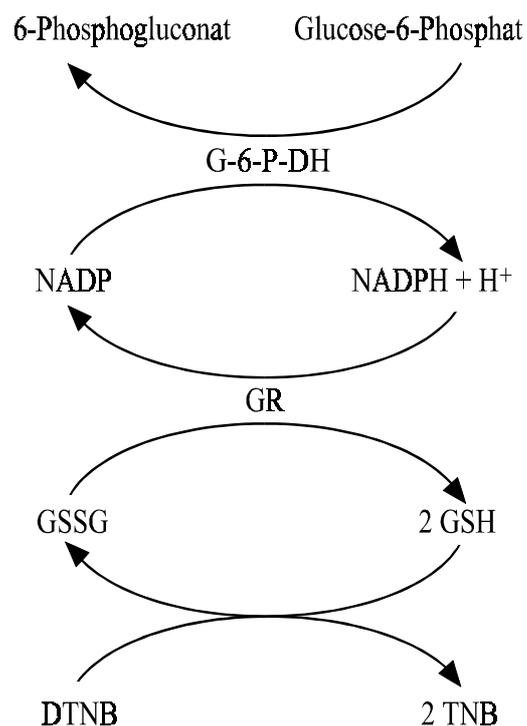


Abb. 5: Glutathionreduktasetest

Die folgende Abbildung 6 zeigt den Verlauf der Kinetiken, die mit diesem Test erhalten werden. Der Reaktionsverlauf wurde bei 412 nm aufgezeichnet. Der „einfache Test“, bei dem keine schützenden Komponenten zugegeben werden, zeigt eine gekrümmte Kinetik (1). Hier findet eine mit der Zeit zunehmende Inaktivierung der GR statt. Die andere Kinetik (2) zeigt die Aktivität einer geschützten GR. Die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt hier über den gesamten Testzeitraum erhalten, was sich in einem geradlinigen Verlauf äußert.

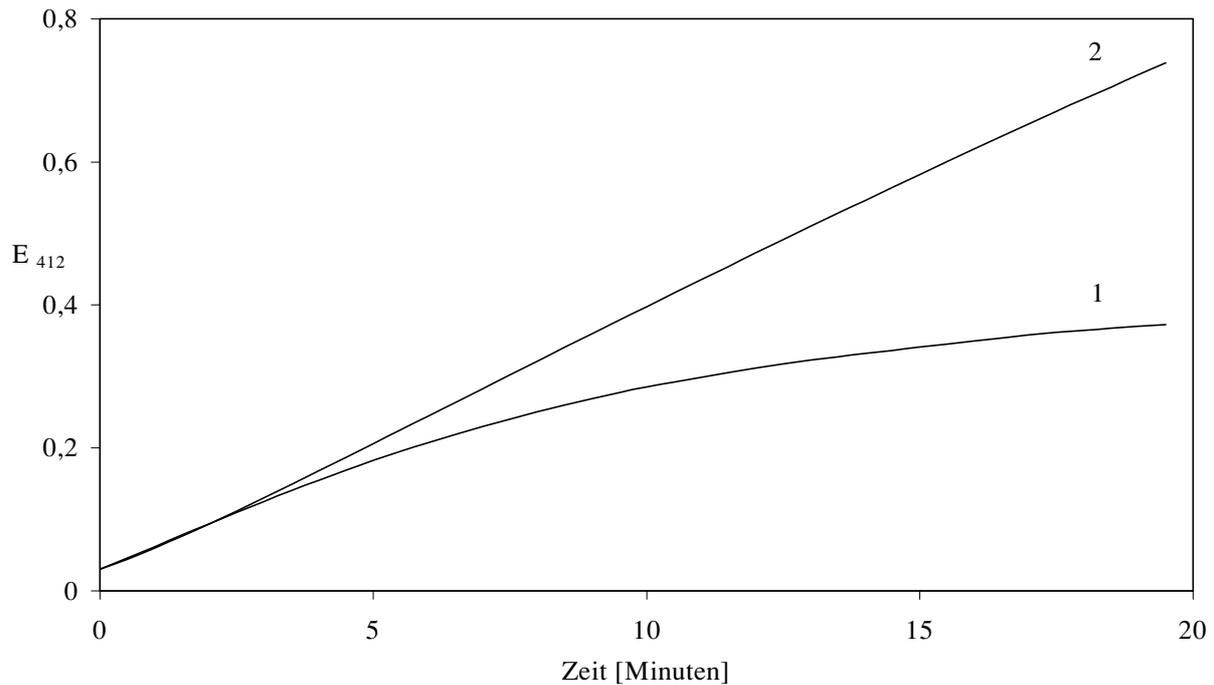


Abb. 6: Typischer Verlauf der Glutathionreduktase- Reaktion

GR-Standardtest nach 3.3.1.3, jedoch mit 0,0015 U GR. 1 ohne Zusatz, 2 mit 0,1mM EDTA.

3.3.1.2 Eigenschaften der Glutathionreduktase

Der GR- Test mit der Glutathionreduktase aus Bäckerhefe ist empfindlich gegenüber der Inaktivierung durch Kupferionen. Der Lineweaver- Burk- Plot der Kupferabhängigkeit zwischen 5 nM und 1 μ M ergibt einen K_i - Wert von 17,9 nM (Abbildung 7).

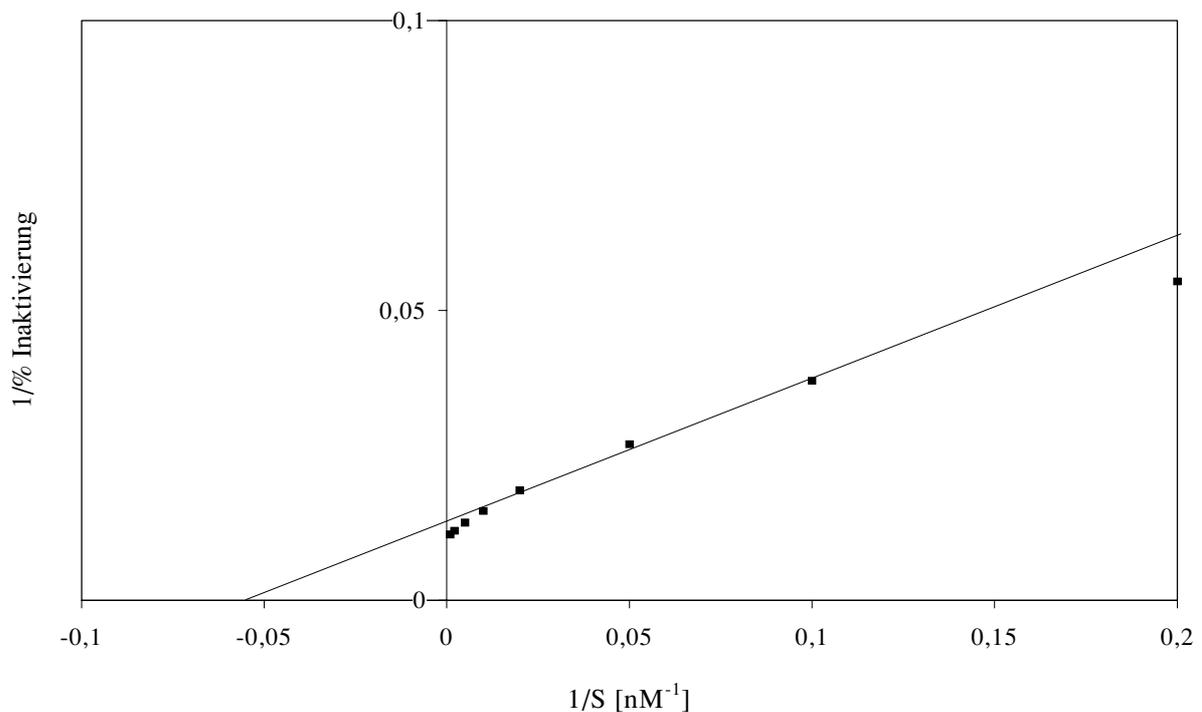


Abb. 7: Kupferinaktivierung der Glutathionreduktase im GR-Standardtest in der Auftragung nach Lineweaver -Burk

Der Kurvenverlauf ist nicht ganz linear, sondern nimmt mit abnehmenden $1/S$ - Werten leicht ab. Berücksichtigt man die höheren Konzentrationen stärker, ergibt sich ein K_i - Wert von etwa 35 nM. Die Inaktivierung der GR findet auch statt, wenn man kein Kupfer in Form von Kupfersalzen zugibt. Das für die Inaktivierung verantwortliche Metall entstammt möglicherweise den Chemikalien oder dem verwendeten Wasser, aber auch die Glutathionreduktase selbst könnte bereits mit Kupferionen behaftet sein.

Auch die Beschaffenheit des Puffersystems nimmt Einfluß auf die Inaktivierung der Glutathionreduktase, wie der Vergleich von Tris- und Phosphatpuffer gleicher Konzentration und gleichen pH Wertes zeigt. Phosphatpuffer scheint die GR in geringerem Maße fortschreitend zu inaktivieren als ein vergleichbarer Tris- Puffer. Dennoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit in etwa vergleichbar mit dem Ansatz mit Tris- Puffer, und ist deutlich geringer als in einem EDTA und Tris enthaltenden Ansatz.

Um die Glutathionreduktase als den für Kupferionen empfindlichen Bestandteil des GR- Testsystems zu identifizieren, wurden beide im Test verwendeten Enzyme separat untersucht. Die G6PDH wird nicht durch Kupfer (II) in einer Konzentration von 0,1 mM inaktiviert. Die Glutathionreduktase jedoch zeigt die Empfindlichkeit gegenüber Kupfer (II) auch dann, wenn das NADPH- bildende System, bestehend aus G6PDH, G6P und NADP durch eine Festkonzentration von NADPH ersetzt wird. Bei diesem Test wurde auf die Zugabe von DTNB verzichtet. Die Abbildung 8 zeigt den Verbrauch von NADPH bei 340 nm bei unterschiedlichen Kupferkonzentrationen. Eine Beeinflussung durch Kupfer ist also nur bei der GR, nicht aber bei der G6PDH feststellbar. Weiterhin ist der Glutathionreduktasetest auch durch andere Schwermetalle inaktivierbar. Ag^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} und Cd^{2+} hemmen selbst in geringen Konzentrationen sehr stark, Mn^{2+} , Ni^{2+} Cr^{3+} und Co^{2+} nur schwach. Auch Zn^{2+} hemmt in höheren Konzentrationen den Test. So wird die Aktivität bei einer Konzentration von 0,2 mM zu 99,5% reduziert. Die Abbildung 9 zeigt die Hemmung durch $ZnCl_2$ in der Auftragung nach Lineweaver- Burk. Der K_i für die Zinkinaktivierung liegt bei etwa 10 μ M.

Die Kenntnis des Einflusses von Natriumchlorid auf das Glutathionreduktase- Testsystem ist von Bedeutung für die Beurteilung von Säulenchromatographieläufen, bei denen NaCl als Elutionsmittel verwendet wird. Bei 300 mM NaCl im Ansatz geht die Aktivität auf 29% im Vergleich zum ungeschützten Standardtest zurück. Es handelt sich hierbei möglicherweise um keine echte Metallinaktivierung, der mit den Effekten in Gegenwart von Schwermetallen vergleichbar wäre, sondern um Salzeffekte.

Die GR wird im Standardtest vom vorhandenen Sauerstoffangebot beeinflusst. Reduziert man den Sauerstoffgehalt in den Reagenzien, die für dem Test Verwendung finden, durch Begasung mit Stickstoff für eine Dauer von 5 Minuten, zeigen die Extinktionsdifferenzen lediglich 75,8 % der unter Normalbedingungen gefundenen Werte.

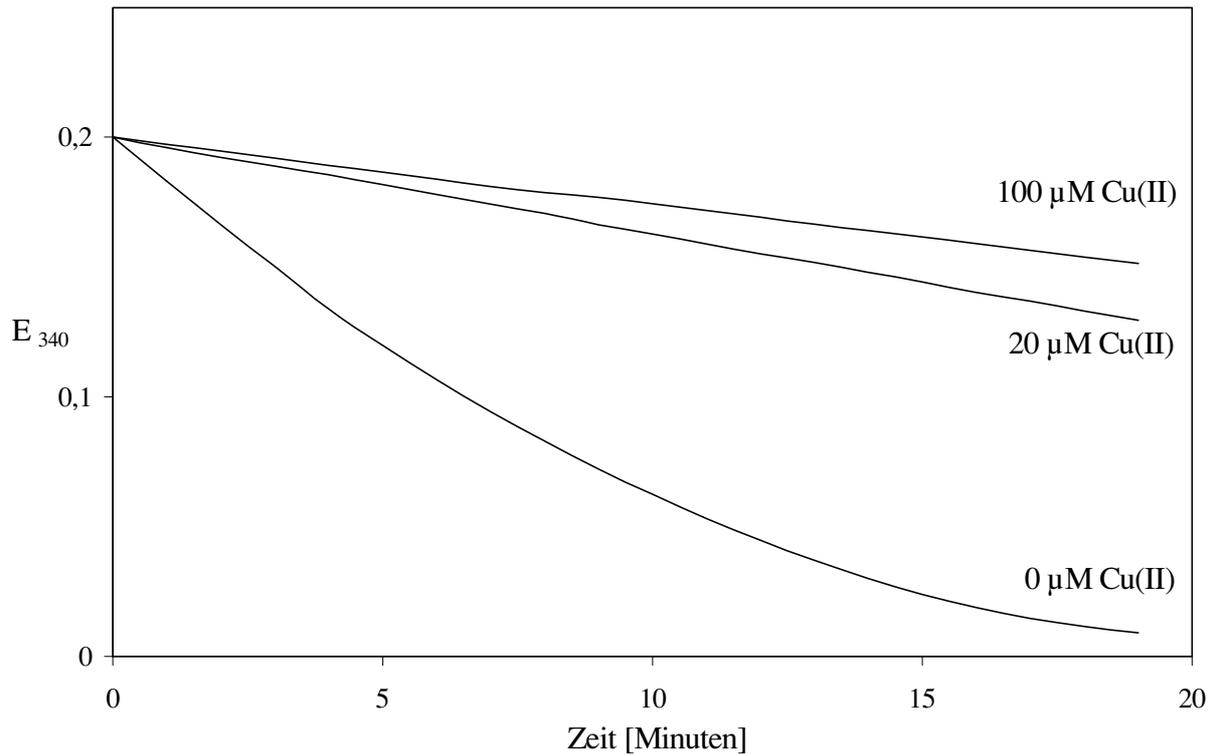


Abb. 8: Einfluß verschiedener Kupferkonzentrationen auf die GR im Test ohne NADPH-reduzierendes System und DTNB, gemessen über die NADPH- Oxidation bei 340 nm.

Zusammensetzung: 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 40 µM NADPH; 0,1 mM GSSG; 0,004 U GR; CuSO_4 in den angegebenen Konzentrationen.

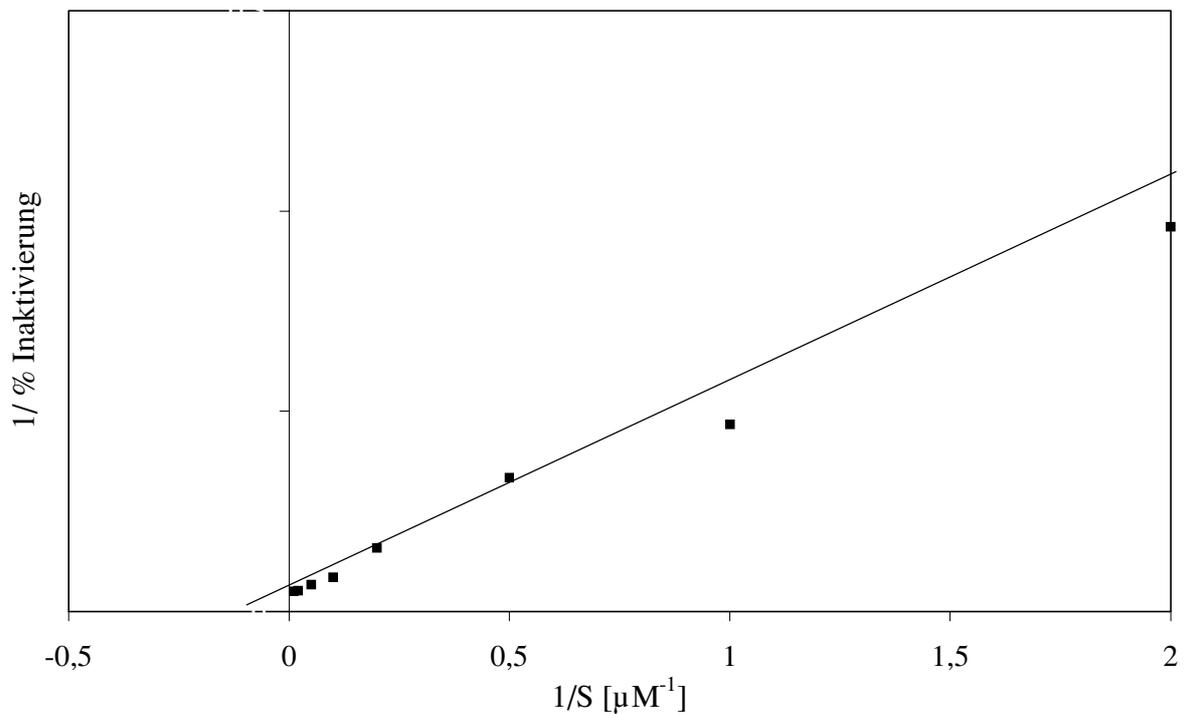


Abb. 9: Zinkinaktivierung der Glutathionreduktase im GR- Standardtest in der Auftragung nach Lineweaver Burk

3.3.1.3 Optimierung des Glutathionreduktasetestes

Für den zyklisierenden Test wurden folgende Optimalkonzentrationen bestimmt und als Standardtest verwendet:

- Tris: 100 mM
- G6PDH: 0,2 Units/ ml
- DTNB: 0,1 mM
- Glutathionreduktase: 0,0033 U/ ml
- NADP: 0,08 mM
- GSSG: 0,2 mM
- Glucose-6-Phosphat: 0,4 mM

Der K_m - Wert der GR für GSSG beträgt $22,7 \mu\text{M}$. Das pH- Optimum des Testes liegt bei 7,5. Ersetzt man den Tris- Puffer durch einen Phosphat- Puffer gleichen pH- Wertes und gleicher Konzentration, läßt sich eine geringere Inaktivierung der GR beobachten.

3.3.1.4 Komplexatoren im Glutathionreduktasetest

Bei GR- Testreihen wird als Standard neben dem einfachen Test als Kontrolle ein Testansatz mit $0,1 \text{ mM}$ EDTA gemessen. Die Kinetik verläuft wie die in Abbildung 6 gezeigte Kinetik 2. Der K_m – Wert der GR aus Hefe für EDTA beträgt $1,17 \mu\text{M}$. Die Abbildung 10 zeigt die Auftragung nach Lineweaver- Burk.

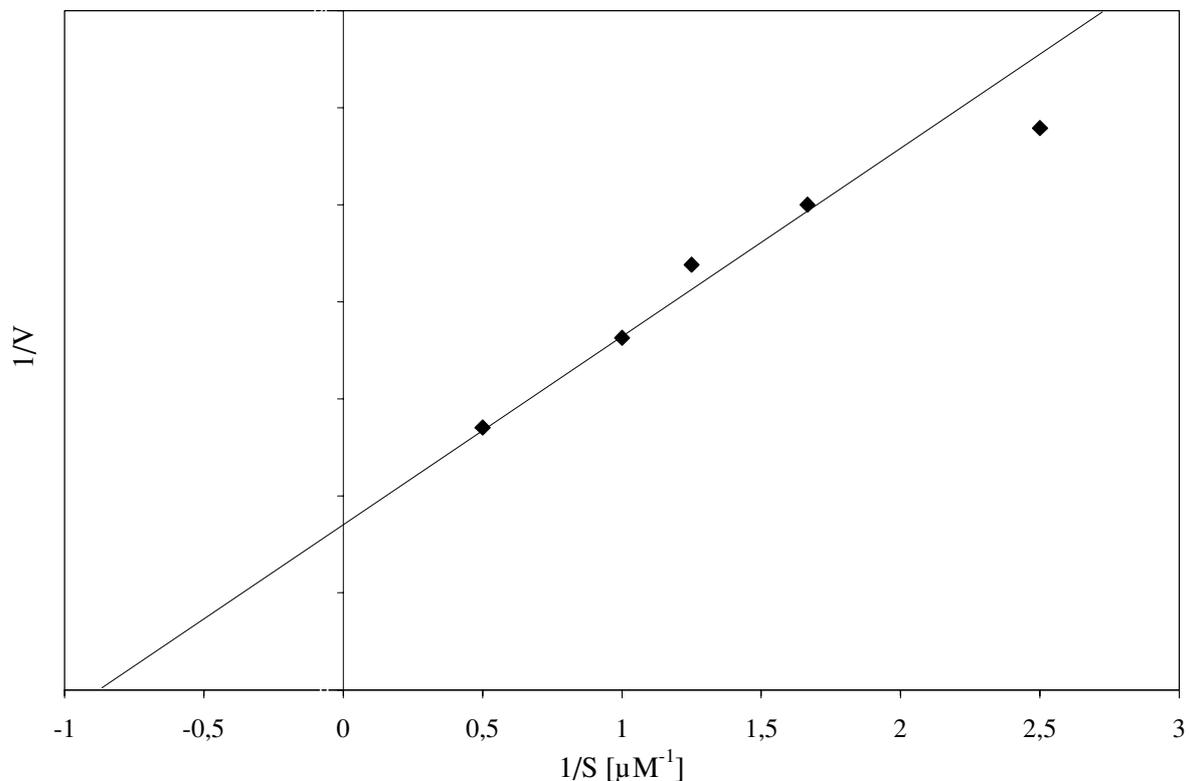


Abb. 10: EDTA- Abhängigkeit der GR aus Bäckerhefe in der Auftragung nach Lineweaver-Burk. Der GR Standardtest nach 3.3.1.3 enthält EDTA- Konzentrationen im Bereich von $0,4 \text{ mM}$ bis 2 mM .

Auch andere Komplextoren sind in der Lage, die Glutathionreduktase vor der Inaktivierung zu schützen. Der Cu(II)- spezifische Komplextor BSH zeigt diesbezüglich einen deutlichen Effekt. Dieser ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Konzentrationen sind so hoch gewählt, daß eventuelle Hemmeffekte sichtbar werden sollten. Da die gemessenen Extinktionsdifferenzen zwischen der 10. und der 15. Testminute für jeden Komplextor in etwa identisch sind, sind diese allerdings nicht zu erkennen. Es sind jeweils 3 vergleichbare Konzentrationen dargestellt, wobei zu berücksichtigen ist, daß EDTA einen 1:1 Komplex bildet, BSH nominal einen 2:1 Komplex (Cu: BSH). BSH zeigt eine deutlich geringere maximale Extinktionsdifferenz als EDTA. Möglicherweise spielen bei der Hemmung der GR noch andere zweiwertige Ionen, die im Testansatz vorhanden sind, eine Rolle. Diese könnten durch EDTA gebunden werden, nicht jedoch durch BSH. Andererseits könnte auch ein Affinitätsunterschied die Ursache für diesen Effekt sein.

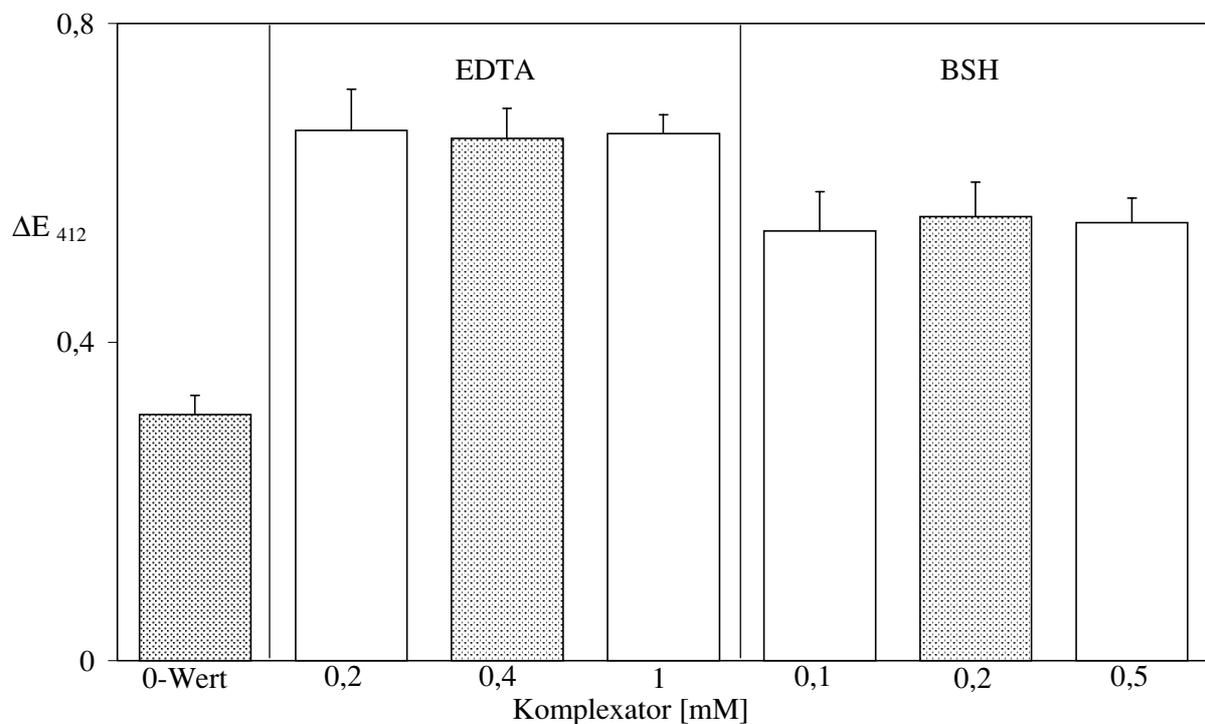


Abb. 11: BSH und EDTA im Glutathionreduktasetest

Verschiedene EDTA- und BSH- Konzentrationen im GR- Standardtest, 0-Wert ohne Komplextorzusatz. Die Balken zeigen die Extinktionsdifferenzen zwischen der 10. und 15. Minute.

Ein weiterer Komplextor, der im GR- Test eingesetzt wurde ist der spezifische Cu(I)-Komplextor Bathocuproindisulfonat. Wie die Abbildung 12 zeigt, linearisiert dieser die Kinetik, kann also die GR schützen, setzt aber gleichzeitig die Reaktionsgeschwindigkeit sehr stark herab. Die G6PDH zeigt sich im Test ohne NADP- reduzierendes System und DTNB nicht oder nur wenig beeinflussbar durch BCS.

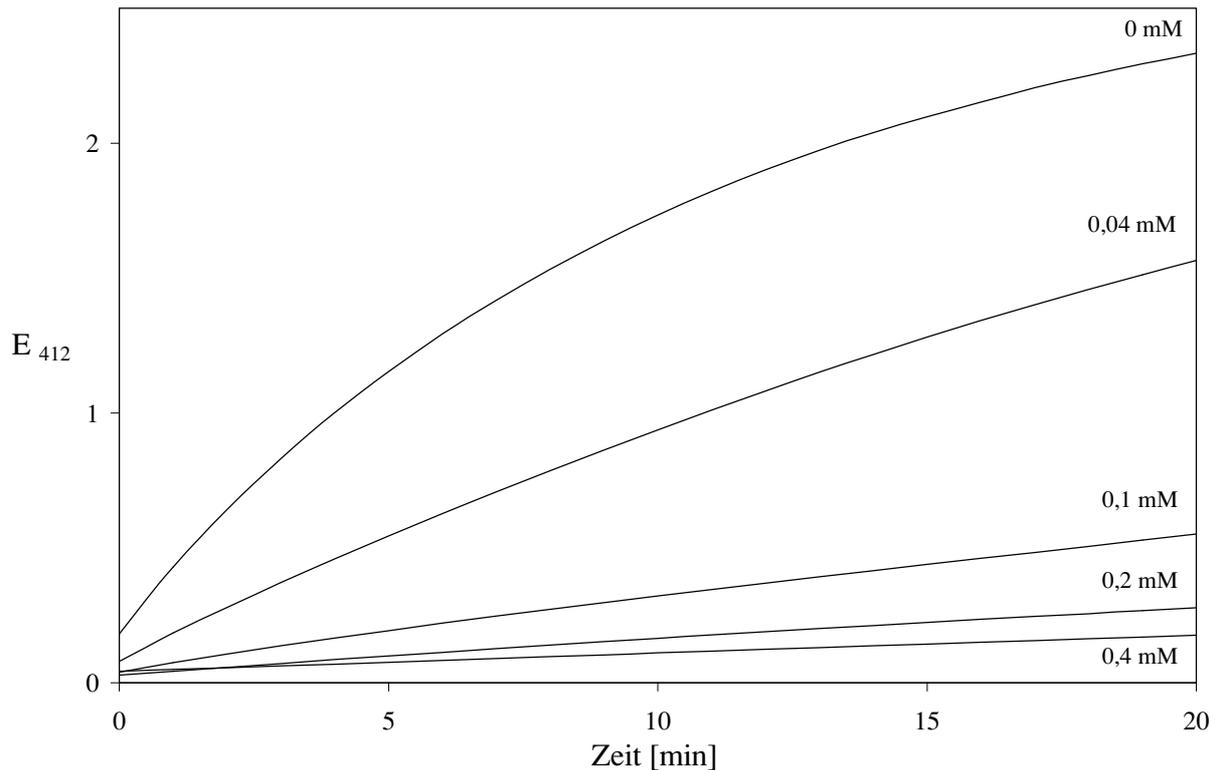


Abb. 12: Bathocuproindisulfonsäure im Glutathionreduktasetest
BCS- Konzentrationen von 0,04 mM bis 0,4 mM im GR- Standardtest.

Bei einer BCS- Konzentration von 0,1 mM findet im GR- Standardtest schon eine starke Hemmung statt. Bei 0,4 mM BCS ist der GR- Standardtest fast vollständig gehemmt. Aufgrund der geringen Hemmbarkeit der G6PDH durch BCS kann dieses Enzym nicht für die starke Hemmung des GR- Standardtestes verantwortlich gemacht werden. Bietet man Glutathiontestansätzen, die eine konstante Konzentration von 0,1 mM BCS enthalten, unterschiedliche, niedrige CuSO_4 - Mengen an, würde man vielleicht erwarten, daß sich die Hemmeffekte beider Komponenten addieren. Wie die Abbildung 13. zeigt, steigt statt dessen die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Kupferkonzentration an. Dies könnte so erklärt werden, daß sich nur das freie BCS- Molekül hemmend auswirkt, nicht aber der BCS- Kupfer-Komplex. Die Konzentration des freien BCS wird durch die Bindung mit dem zuvor reduzierten Kupfer herabgesetzt, was zu einer geringeren Hemmung führt.

Der Bindung von Kupfer müßte bei diesem Komplexator eine Reduktion des Kupfers vom zweiwertigen in den einwertigen Zustand vorausgehen, da BCS nur Cu(I) binden kann. Als Reduktionsmittel wurde in erster Linie NADPH identifiziert. Die Oxidation von NADPH durch $50 \mu\text{M}$ CuSO_4 in Gegenwart von 0,2 mM BCS wurde anhand der Bildung des Kupfer-BCS- Komplexes bei 480 nm gemessen. Die Abbildung 14 zeigt das Ergebnis. In einem identischen Ansatz ohne BCS, gemessen bei 340 nm konnte hingegen keine Oxidation von NADPH festgestellt werden.

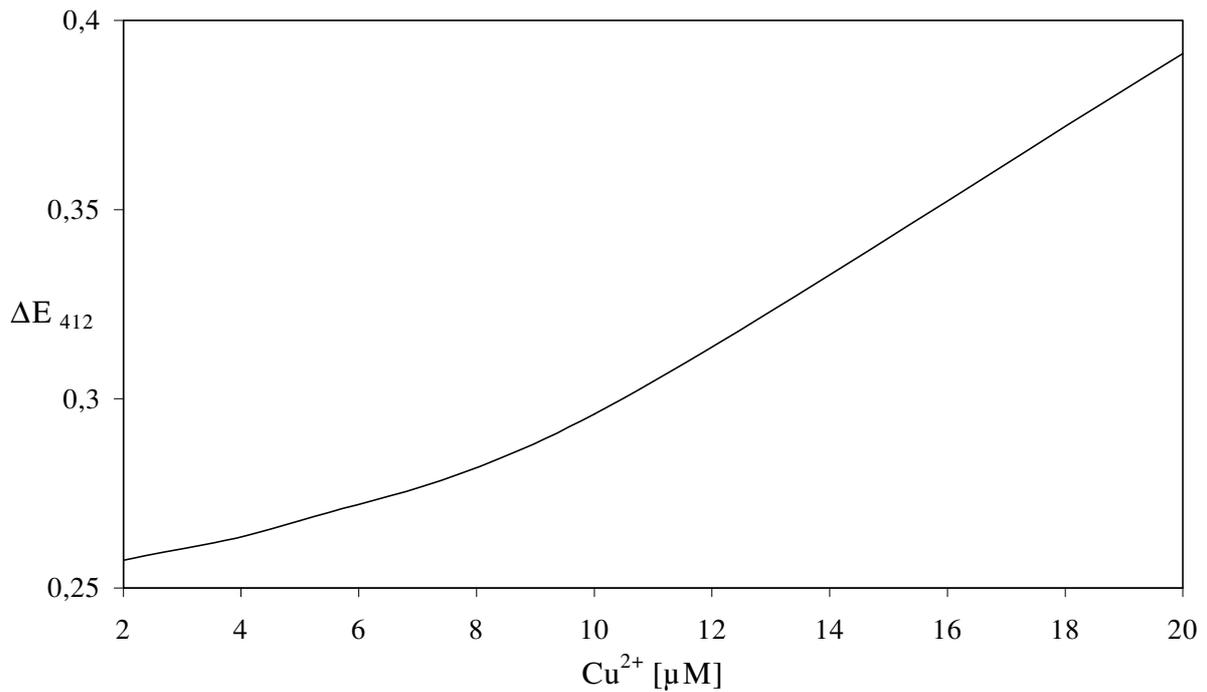


Abb. 13: Wechselwirkung von BCS und Cu(II) im Glutathionreduktasetest

Verschiedene CuSO₄- Konzentrationen im GR- Standardtest mit einer erhöhten GR- Konzentration von 8,25 mU und 0,1 mM BCS. Aktivitätsbestimmung der GR über die Extinktionsdifferenz ΔE_{412} zwischen der 10. und der 15. Minute.

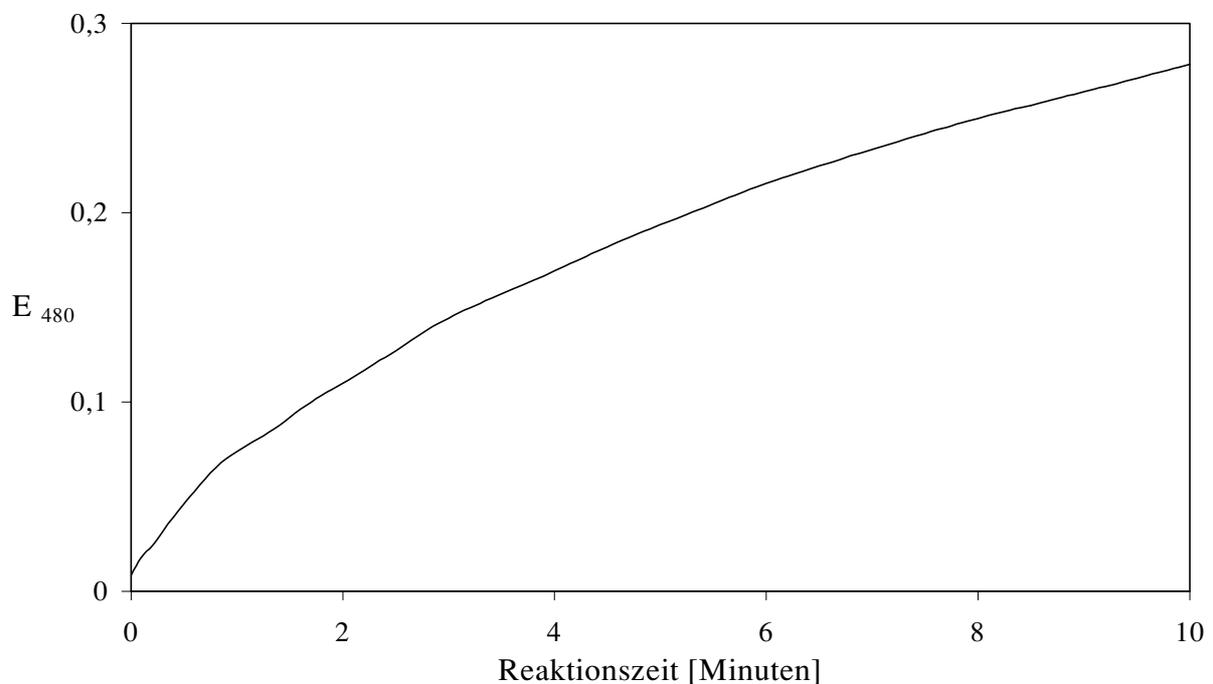


Abb. 14: Bildung von Kupfer (I) durch NADPH

Konzentrationen im Test: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1mM NADPH; 50 μM CuSO₄; 0,2 mM BCS. Gemessen wurde die Bildung des Cu-BCS- Komplexes bei 480 nm.

Die ansteigende Kurve in Abbildung 14 zeigt die Bildung von Cu(I) im Test. In Gegenwart von BCS wird Kupfer (II) durch NADPH zu Kupfer (I) reduziert, nicht aber in Abwesenheit von BCS.

Auch Polymin P schützt die Glutathionreduktase vor der Inaktivierung durch Kupfer. Diese Schutzwirkung beruht ebenfalls auf der kupferbindenden Eigenschaft dieser Substanz. Als flexibles, Aminogruppen tragendes Molekül zeigt es ähnliche Eigenschaften gegenüber Kupferionen wie Ammoniak, welches in der Lage ist einen blauen Tetraamminkupferkomplex $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ mit Kupfer zu bilden. Versetzt man 10 ml 0,4 mM CuSO_4 mit 20 μl 10% Polymin P bildet sich auch hier ein blauer Komplex. Das Spektrum des entstehenden Komplexes zeigt die Abbildung 15. Die gestrichelte Linie stellt das Absorptionsspektrum des Polymin P in wässriger Lösung dar, die durchgezogene Linie das des Polymin-Kupferkomplexes. Auffällig ist, daß der Einzelpeak des Polymins bei 214 nm bei Zugabe des Kupfers verschwindet und statt dessen ein zweigipfeliges Spektrum mit Peaks bei 193 nm und 272 nm entsteht. Weiterhin steigt die Absorption oberhalb von 500 nm leicht an.

Polymin ist nicht spezifisch für Kupfer, sondern ist im GR- Test in der Lage, die GR auch vor der Inaktivierung durch Zink zu schützen. Im GR- Standardtest übertrifft Polymin P EDTA in der Schutzwirkung, was in Abbildung 16 deutlich wird.

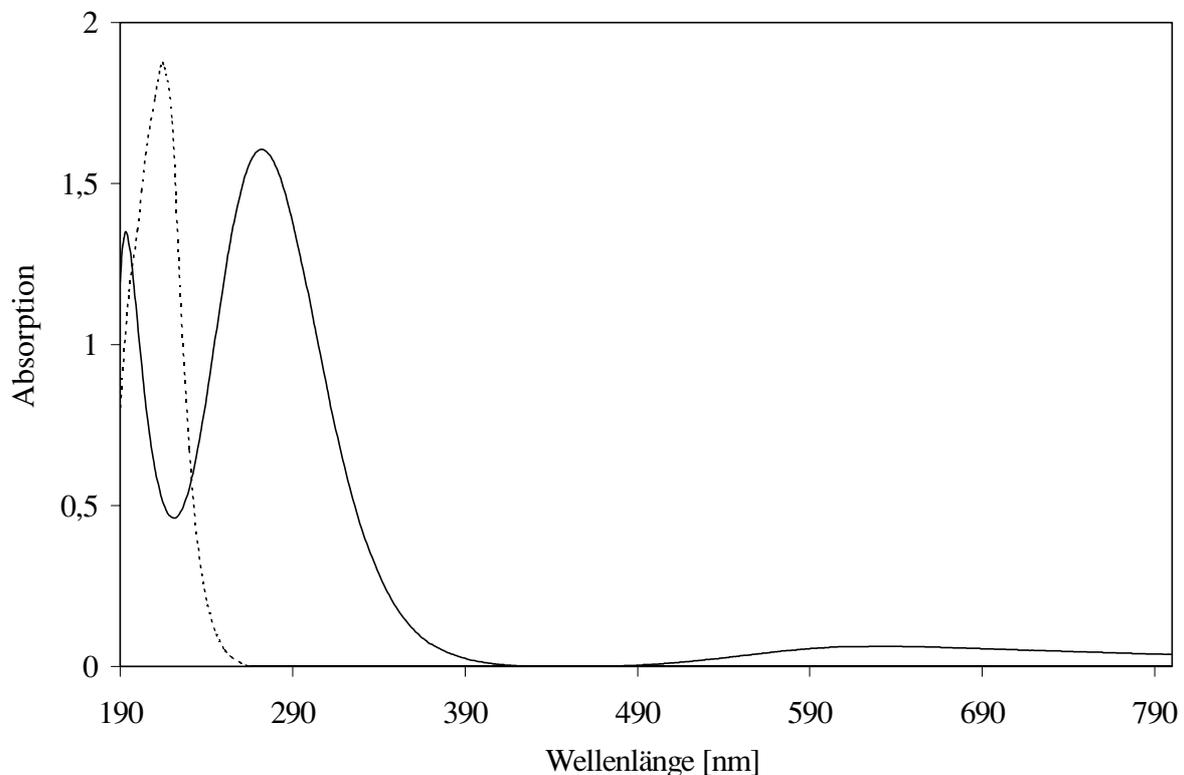


Abb. 15: Spektrum des Komplexes aus Polymin P und Kupfer (II) in wässriger Lösung. Polymin P (gestrichelte Linie) und Kupfer- Polymin- Komplex (durchgezogene Linie).

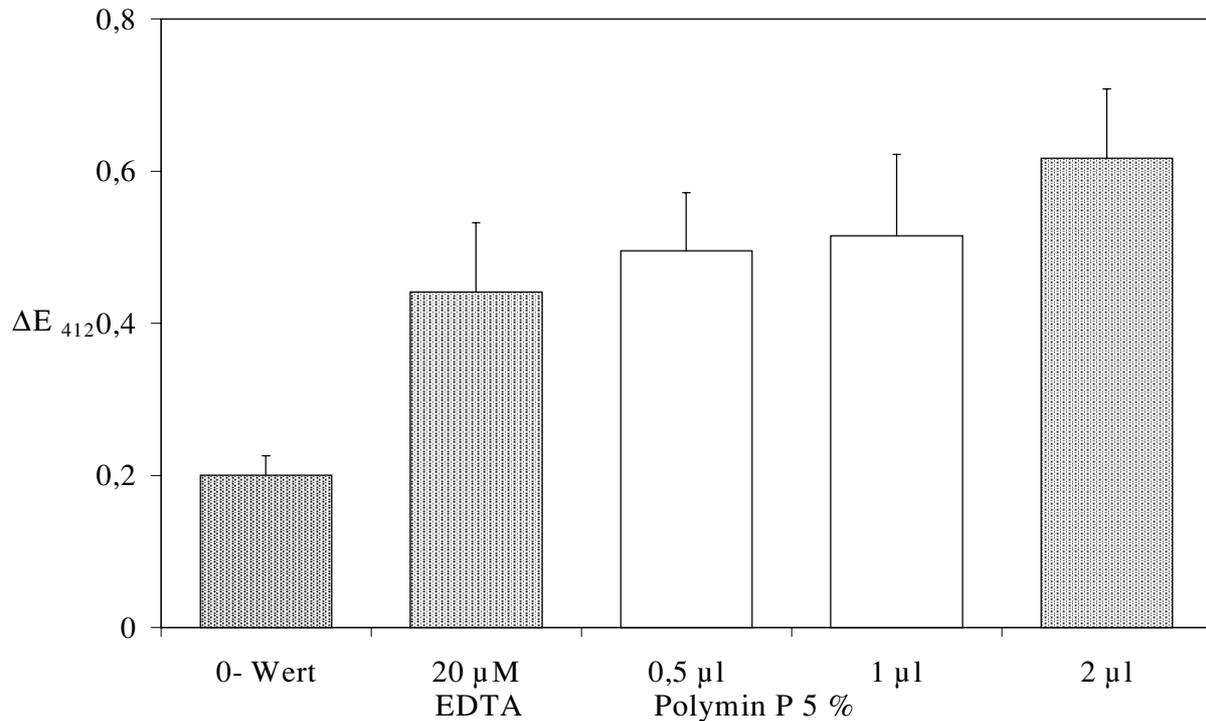


Abb. 16: Polymin P im GR- Test

Der GR- Standardtest in Gegenwart von Polymin P, EDTA und ohne Zusatz (0- Wert). Aktivitätsbestimmung der GR über die Extinktionsdifferenz ΔE_{412} zwischen der 10. und der 15. Minute.

3.3.1.5 Der Faktor im Glutathionreduktasetest

Der Test wurde mit einem Faktorpräparat durchgeführt, das aus einer kleinen Präparation stammt. Der Faktor liegt hier in einer hochkonzentrierten Form vor (520 OD₂₀₇₋ units/ ml) und das Präparat enthält 100 mM NaOH. Bei den eingesetzten Faktormengen von nur wenigen μ l ist davon auszugehen, daß Salzeffekte nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der pH des Testansatzes verschiebt sich durch die Faktorzugabe nicht. Die Kinetik in Gegenwart von 10 μ l Faktor (5,2 OD₂₀₇₋ units) vergleichend mit 0,1 mM EDTA zeigt die Abbildung 17. Sowohl EDTA wie auch der Faktor ist in der Lage, die Glutathionreduktase vollständig zu schützen. Beide Reaktionsverläufe sind deutlich linearisiert. Am Verlauf der Kinetik ist kein Unterschied zwischen EDTA und Faktor feststellbar. Auch in der Testvariante ohne NADP-reduzierendes System und DTNB zeigt der Faktor einen deutlichen Effekt (Abbildung 18). Das NADP-reduzierende System wurde ersetzt durch 30 μ M NADPH. Kurve 3 zeigt einen Testansatz ohne CuSO₄, Kurve 1 einen Ansatz mit 5 μ M CuSO₄, Ansatz 2 ist identisch mit Ansatz 1, jedoch zusätzlich mit 5 μ l Faktor (2,6 OD₂₀₇₋ units). Wie bereits erwähnt, hemmt Cu(II) die Glutathionreduktase, was sich in diesem Testsystem in Form von einer flachen Kinetik äußert. Der Faktor ist in der Lage, die Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von Cu(II) deutlich zu steigern, aber nicht auf den Wert des ungeschützten Testes ohne Kupferzusatz.

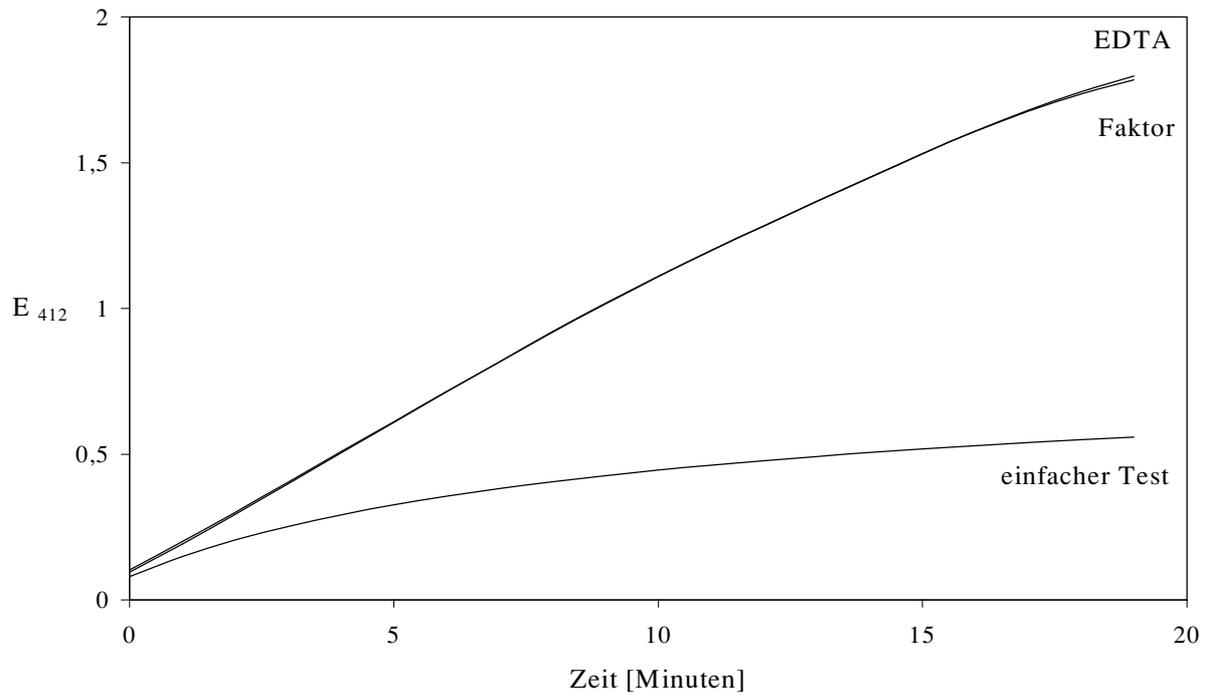


Abb. 17: Der Faktor im Glutathionreduktasetest

Der GR- Standardtest mit 5,2 OD₂₀₇₋ units Faktor oder 0,1 mM EDTA sowie ohne Zusatz (einfacher Test).

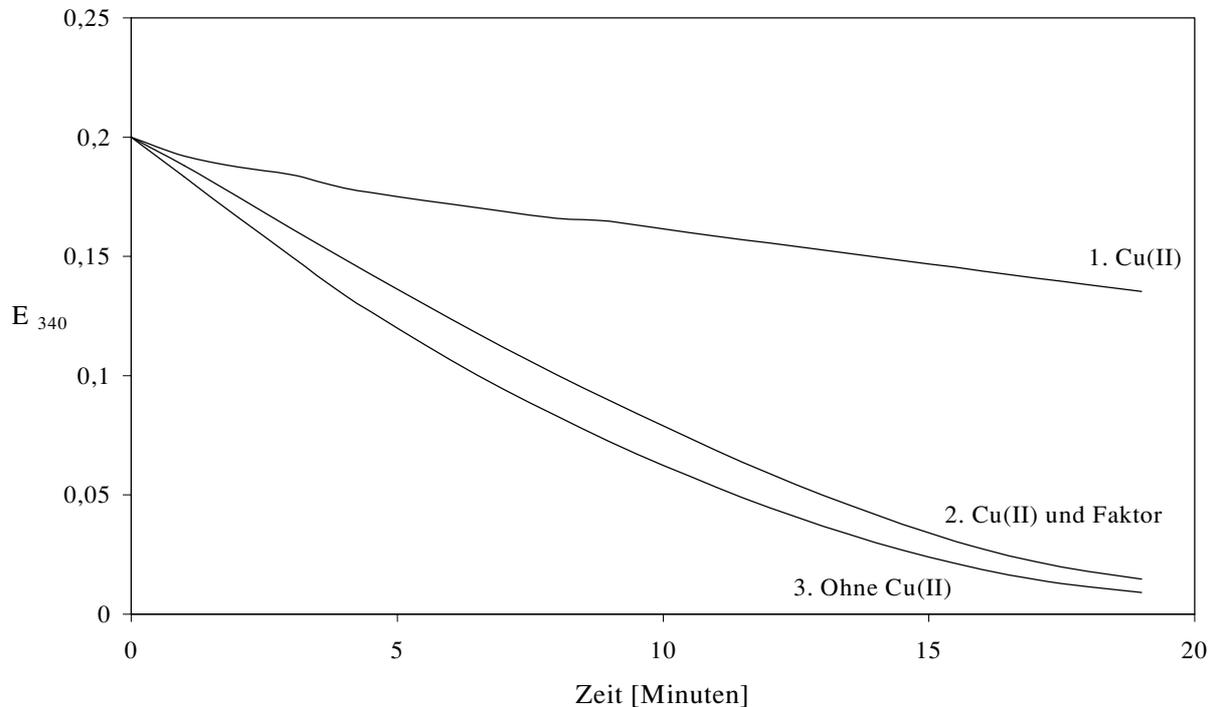


Abb. 18: Faktorwirkung im GR- Test ohne NADP- reduzierendes System

Zusammensetzung: 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 30 μ M NADPH; 0,1 mM GSSG; 3,33 mU GR;

1. mit 5 μ M CuSO₄, 2. mit 5 μ M CuSO₄ und 2,6 OD₂₀₇₋ units Faktor, 3. ohne Zusatz von Cu oder Faktor. Gemessen wurde die NADPH- Oxidation bei 340 nm.

Der GR- Test kann auch dazu herangezogen werden, die Faktormenge zu quantifizieren. Es handelt sich hierbei aber nicht um eine Quantifizierung im herkömmlichen Sinne, bei der die Stoffmenge bestimmt wird, sondern eine relative Quantifizierung, die sich an der Bindungskapazität von bestimmten Faktorlösungen orientiert. Auf diese Weise hat man die Möglichkeit, verschiedene Faktorlösungen zu vergleichen und zu standardisieren. Dies ist allerdings nur bei höher aufgereinigten Faktorproben sinnvoll, um den Einfluß von hemmenden Substanzen auszuschließen. Dazu wird eine Testreihe mit verschiedenen Metallkonzentrationen erstellt, die je 1 μl der zu testenden Faktorprobe enthält. Der Faktor bindet einen bestimmten Anteil des Metalls. Der Vergleich der ΔE - Werte dieser Proben mit dem des einfachen Testes führt zu der Menge des gebundenen Metalls. Bei grafischer Auftragung läßt sich diese recht genau bestimmen. Die folgenden Abbildungen 19 und 20 zeigen die Bestimmung der Bindungskapazitäten für Cu(II) und Zn(II) eines Faktorpräparates aus der großen Präparation. Die Bindungskapazität für Cu (II) beträgt hier 5,8 nmol Cu(II)/ μl Faktorlösung (3,84 nmol Kupfer/ OD 207- unit), für Zn(II) beträgt sie 110 nmol Zn(II)/ μl Faktorlösung (72,85 nmol Zink/ OD 207- unit). Daraus ergibt sich ein Verhältnis der Bindungskapazitäten Cu: Zn von 1:19. Auch in allen anderen durchgeführten Bestimmungen der Bindungskapazitäten ergaben sich Verhältnisse von etwa 1:20, selbst wenn die Höhe der Bindungskapazitäten unterschiedlich waren.

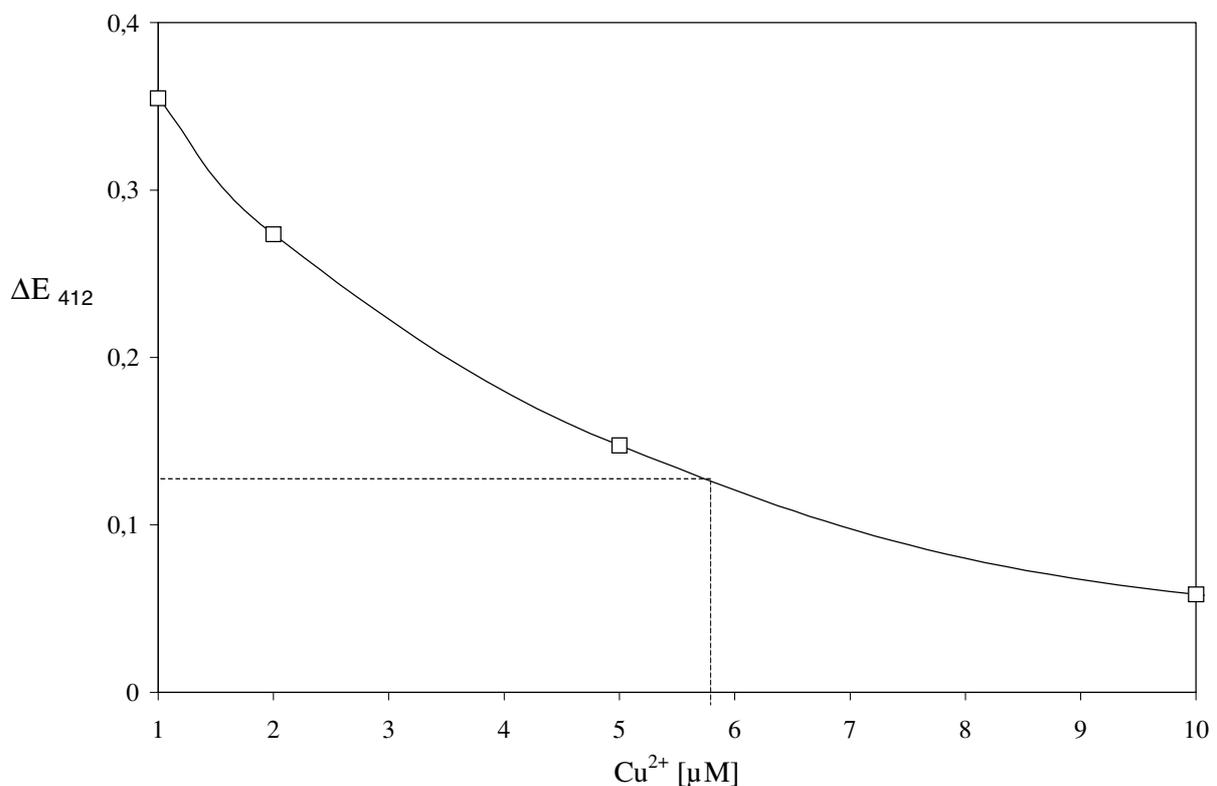


Abb. 19: Bestimmung der Bindungskapazität von Cu(II) mithilfe des GR- Standardtestes

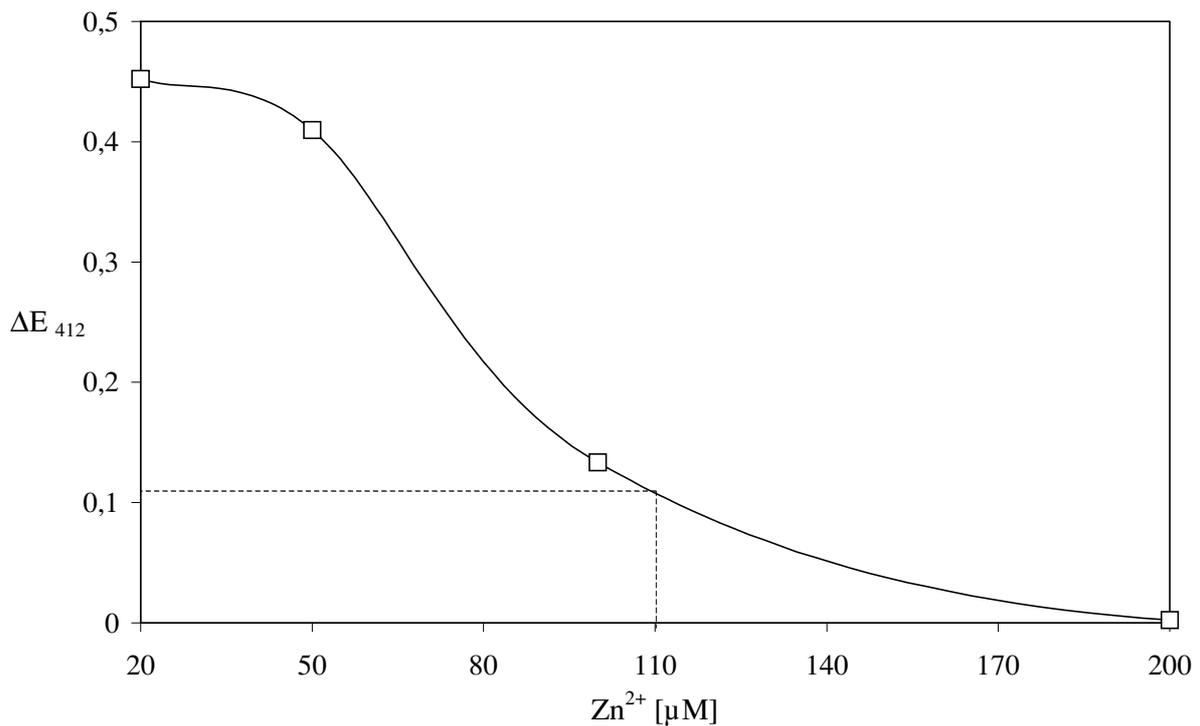


Abb. 20: Bestimmung der Bindungskapazität von Zn(II) mithilfe des GR- Standardtestes

3.3.2 Glutaminsynthetasetest

3.3.2.1 Eigenschaften des Glutaminsynthetasetestes

Die Glutaminsynthetase katalysiert die Bildung von Glutamin aus Glutamat und Ammonium unter Verbrauch von ATP. Sie ist das Schlüsselenzym für den Einbau von reduziertem Stickstoff in organische Verbindungen. Die GS kann als Seitenreaktion aus Glutamin und Hydroxylamin γ -Glutamylhydroxamat bilden, das mit Fe(III) im Sauren einen rotbraunen Farbkomplex bildet, welcher bei 500 nm photometrisch bestimmt werden kann. Das bei dieser Reaktion entstehende ATP wird anstelle von Phosphat mit Arsenat aufgebaut. Diese Substanz ist instabil und zerfällt spontan, wodurch ADP wieder regeneriert wird.

Die GS wird wie die Glutathionreduktase durch Kupferionen inaktiviert. Dies wird in der Abbildung 21 deutlich. Der Test wurde ohne Vorinkubation ausgeführt. Die Inaktivierung kann durch höhere Konzentrationen als 50 μ M Cu(II) kaum mehr verstärkt werden.

Die Glutaminsynthetase ist ebenfalls durch andere Schwermetallionen inaktivierbar. Besonders deutlich wird dies bei der Anwesenheit von Quecksilber. Sie wird jedoch durch Eisen, Mangan, Kobalt, Zink, Blei und Nickel nur wenig beeinflusst. Dies zeigt Tabelle 1. Die Metallkonzentrationen in den Testansätzen betragen 50 μ M während der Vorinkubation. Die Dauer der Vorinkubation betrug 1 Minute.

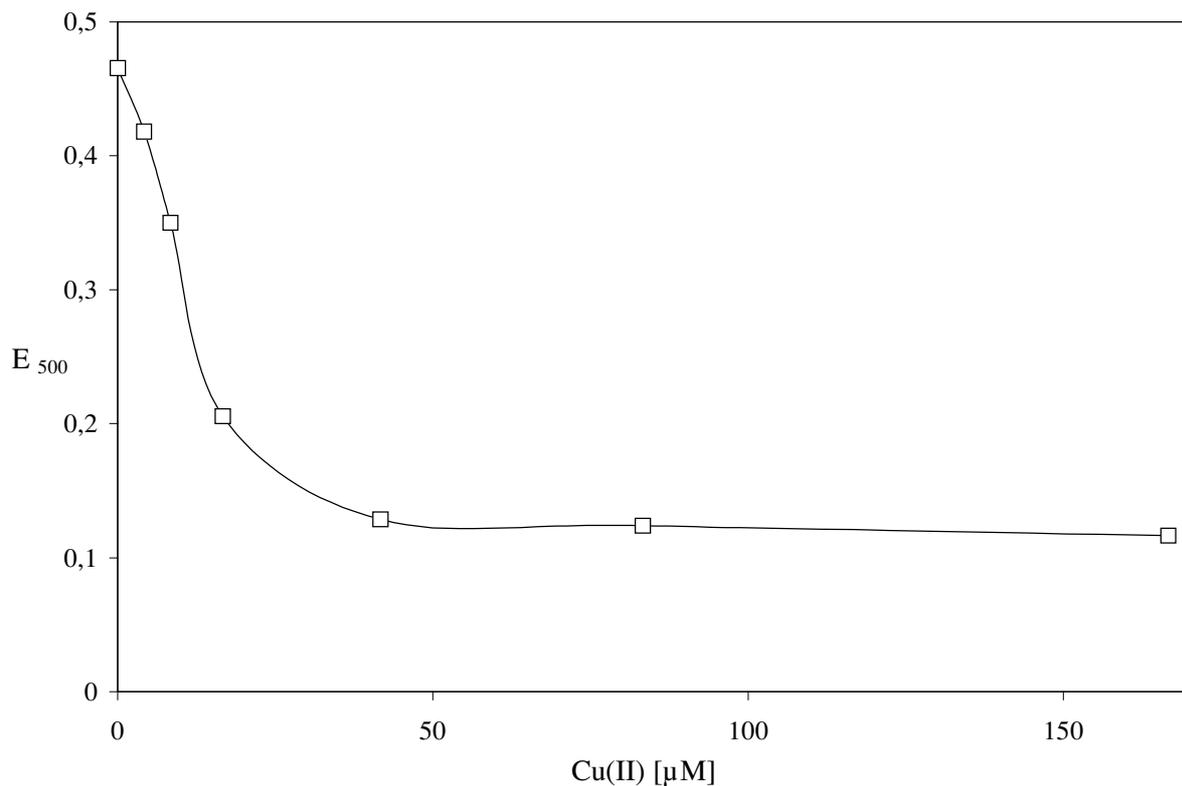


Abb. 21: Cu(II)- Inaktivierung der Glutaminsynthetase aus Spinat

GS- Standardtest (siehe Abschnitt 2.3.2) in Gegenwart von verschiedenen CuSO_4 - Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten ohne Vorinkubation.

Metall (50 μM)	Ohne	Fe^{3+}	Mn^{2+}	Co^{2+}	Hg^{2+}	Zn^{2+}	Pb^{2+}	Ni^{2+}
Aktivität %	100	99,3	91,3	88,9	34,7	97,3	98,0	84,0

Tab. 1: Schwermetallempfindlichkeit der Glutaminsynthetase

EDTA kann dieser Inaktivierung durch Kupfer vorbeugen, deshalb wird bei bestimmten Fragestellungen standardmäßig EDTA zu den GS- Testansätzen zugesetzt. Aber auch andere Faktoren können die Aktivität der Glutaminsynthetase beeinflussen. Die Abbildung 22 zeigt den Einfluß von DTE, NADPH und Belichtung auf den Test. Die Konzentrationen betragen 50 μM für Cu(II) und 10 mM für DTE. NADPH wurde durch das auch im GR- Test verwendete NADP- reduzierende System, bestehend aus Glucose-6-Phosphat, NADP und G6PDH, bereitgestellt. Die Belichtung erfolgte während einer 9- minütigen Vorinkubation im hellen Tageslicht (ohne Sonneneinstrahlung). Zunächst ist zu beobachten, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in sämtlichen Testansätzen bei Belichtung vermindert ist. Dieser Effekt ist noch relativ gering bei den Testansätzen mit DTE, hier beträgt die Reduktion der Aktivität 21,7 %. Besonders hoch ist die Aktivitätsverminderung, wenn Cu mit dem NADPH reduzierenden –System kombiniert wird (47,7 %). Im Vergleich zu den Pufferwerten wird auch hier die Inaktivierung der GS durch Cu- Ionen im Hellen wie im Dunklen deutlich. DTE

und GSH (Daten nicht gezeigt) können diesen Effekt vollständig aufheben, sogar über den Pufferwert erheben, NADPH hingegen nicht. DTE allein verbessert die Reaktionsgeschwindigkeit der GS am stärksten, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß im Test vorhandene, aus den Reagenzien oder dem verwendeten Wasser stammende Kupferionen an die Thiolgruppen gebunden werden. Eine Thiolaktivierung des Enzymes ist bei höheren Pflanzen nicht bekannt.

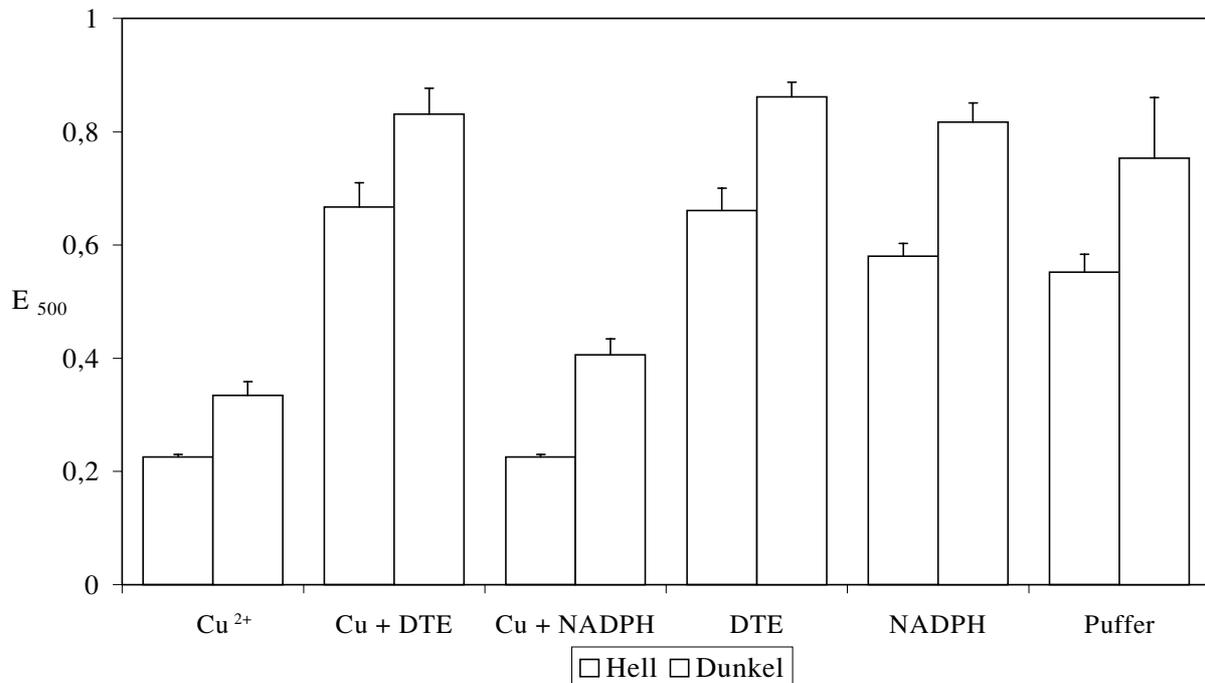


Abb. 22: Einfluß verschiedener Substanzen auf die Glutaminsynthetase aus Spinat

GS- Standardtest mit 5- minütiger Inkubationszeit und 9- minütiger Vorinkubation im Dunklen und im hellen Tageslicht. Konzentrationen der Zusätze: CuSO₄ 50 µM; DTE 10 mM; NADPH wird durch die G6PDH aus G6P und NADP erzeugt (Konzentrationen wie im GR- Standardtest).

3.3.2.2 Der Faktor im Glutaminsynthetasetest

Der Faktor zeigt auch im Glutaminsynthetasetest eine Schutzwirkung gegenüber der Inaktivierung der Glutaminsynthase durch Kupferionen. Der Glutaminsynthetasetest ist ebenso wie der Glutathionreduktasetest als Nachweissystem für das Faktormolekül einsetzbar. Die Aktivitätsprofile von Säulenchromatographietrennungen zeigen in beiden Testsystemen gleiche Aktivitätsverteilungen. Es ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die aktive Komponente in beiden Testsystemen identisch ist. Die Abb. 23 zeigt den inhibierenden Effekt von 16,7 µM Cu(II) auf die Glutaminsynthetase und die schützende Wirkung des Faktors vor der Inaktivierung. Bei einem Testvolumen von 1,2 ml betrug die absolute Kupfermenge im Test 20 nmol. Der Test wurde ohne Vorinkubation durchgeführt bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten. Der Test weist bei Zugabe von 20 nmol CuSO₄ noch 46,7 % der ursprünglichen Aktivität auf. Damit zeigt sich der GS- Test als weniger

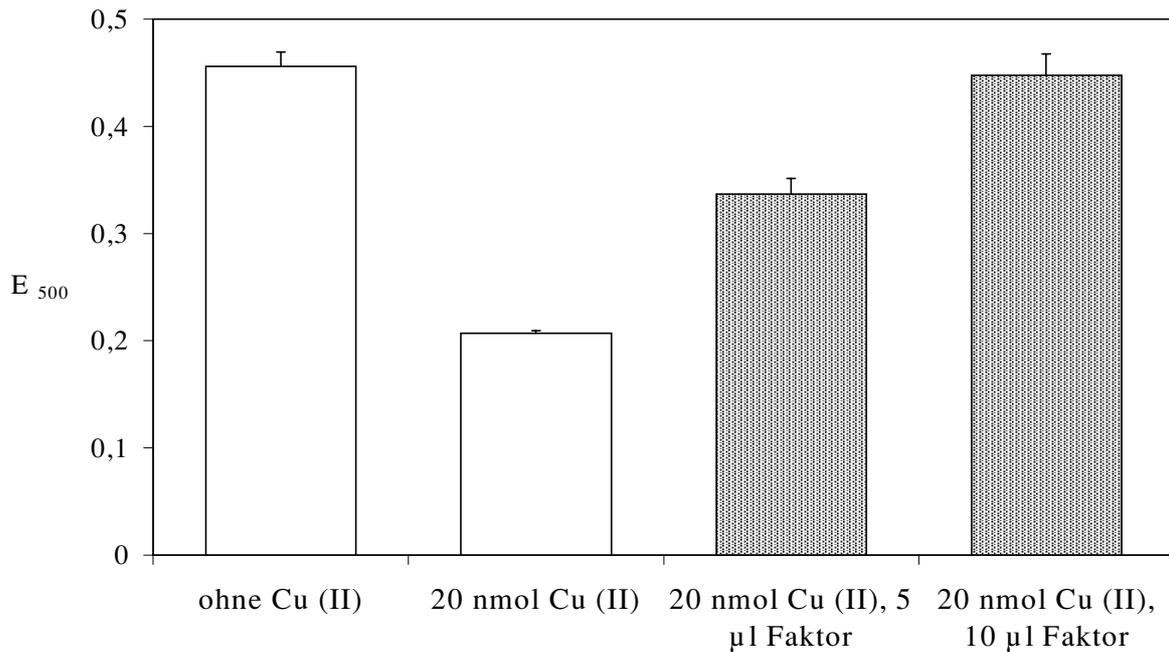


Abb. 23: Der Faktor im Glutaminsynthetasetest

GS- Standardtest ohne Vorinkubation und mit 5- minütiger Inkubationszeit in Gegenwart der angegebenen Zusätze. (10 µl Faktor entsprechen 5,2 OD₂₀₇- units)

empfindlich für die Kupferinaktivierung als der GR- Test, der bei einer Kupferkonzentration von 16,7 µM vollständig inaktiviert wird. 5 µl Faktor (2,6 OD₂₀₇- units) steigern die Aktivität auf 73 %, 10 µl auf 97 %. Das Enzym wird dadurch annähernd vollständig geschützt. Durch Extrapolation der Daten ergibt sich daraus eine Bindungskapazität für diese Faktorcharge von 1,94 nmol Kupfer/ µl Faktorklösung (3,73 nmol Kupfer/ OD₂₀₇- unit). Dieser Wert entspricht etwa dem im GR- Test gefundenen Wert für diese Charge (2 nmol Kupfer/ µl Faktorklösung entsprechend 3,85 nmol Kupfer/ OD₂₀₇- unit).

Vergleicht man die mit dem GR- Test und dem GS- Test gewonnenen Aktivitätsprofile eines Säulenlaufes einer Anionentauschersäule einer kleinen Faktorpräparation miteinander, so zeigt sich, daß die aktiven Fraktionen im gleichen Bereich zu finden sind. Getestet wurden in beiden Tests je 200 µl des Eluates. Der GS- Test enthält 20 µM Cu(II) bei einer Reaktionszeit von 10 Minuten. Die Abbildung 24 zeigt den Aktivitätspeak, bestimmt mit dem GS- Test über dem des GR- Testes. Das mit dem GR- Test gewonnene Aktivitätsprofil zeigt das typische, durch Sättigung des Testes mit Faktor bedingte Plateau im aktiven Bereich. Das Aktivitätsprofil des GS- Testes weist diesen Effekt möglicherweise ebenfalls auf, denn eine leichte Abflachung ist auch hier zu erkennen. Im Bereich bis 300 ml Elutionsvolumen, der hier nicht gezeigt ist, ist mit beiden Nachweismethoden keine weitere Aktivität nachweisbar. Dies legt den Schluß nahe, daß die Aktivität in beiden Testsystemen durch dieselbe Substanz vermittelt wird.

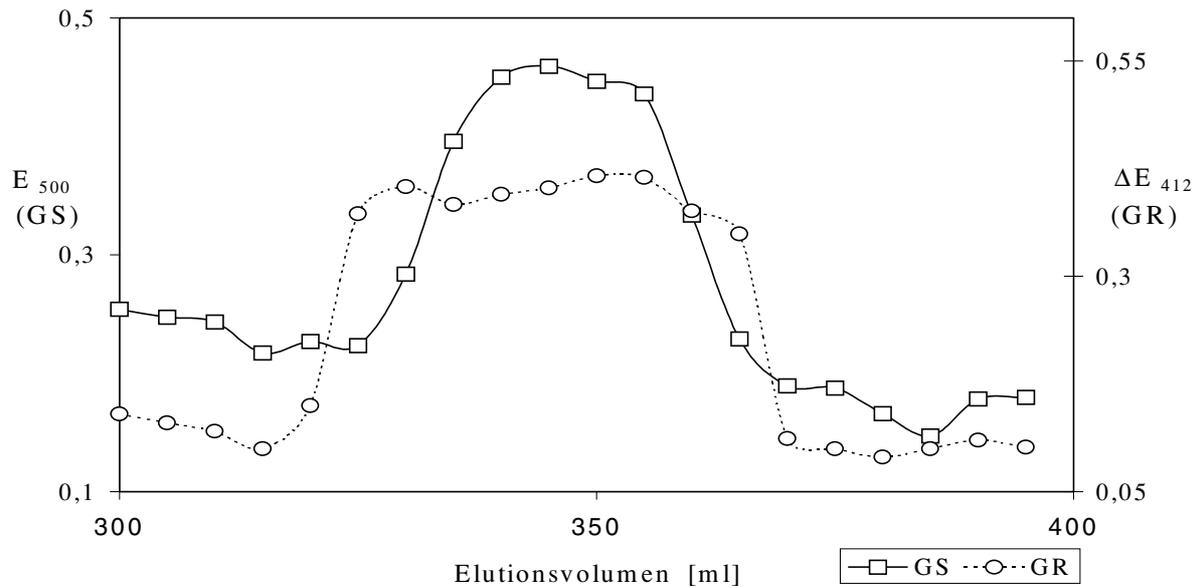


Abb. 24: Vergleich der Aktivitätsprofile mit dem GR- und GS- Test

Fractionen einer Anionenaustauschersäule (je 200 μ l) im GR- Standardtest, gemessen bei 412 nm, sowie im GS- Standardtest mit 20 μ M CuSO_4 bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten, gemessen bei 500 nm.

3.3.3 Thioloxidation

3.3.3.1 Eigenschaften der Thioloxidation

Die Untersuchungen zu der Oxidation von Thiolen beruht auf einem von KRÄMER und SCHMIDT (1984) beschriebenen Verfahren zur Messung der Cysteinoxidase. Nicht nur die Aktivität der Cysteinoxidase sondern auch die Anwesenheit von Kupfer (II) –Ionen führt zur Oxidation von Cystein, dabei spielt es in beiden Fällen keine Rolle, ob es sich um D- oder L Cystein handelt. Die Abnahme der CysteinKonzentration kann durch eine Thiolbestimmung verfolgt werden. Während der Reaktion wurde kein Zerfall des Cysteinmoleküles, bei dem H_2S freigesetzt wird, festgestellt. Das Reaktionsprodukt ist, wie die Abbildung 25 zeigt, Cystin. Die in zeitlichen Abständen von 15 Minuten gemessenen Spektren eines Testansatzes, der nur Cystein und 1 μ M Kupfer enthält, zeigen dies. Deutlich sichtbar ist die Verschiebung des Spektrums, wobei sich der breite Peak im Bereich von 210 - 270 nm zurückbildet und der für Cystin typischen Peak bei 209 nm übrigbleibt. Der Vergleich des Spektrums nach 75 Minuten mit dem der Cystin- Referenz zeigt in diesem Bereich deutliche Übereinstimmung. Der sich zurückbildende Bereich zwischen 210 und 270 nm ist nach dieser Zeit noch als Schulter erkennbar, die Reaktion ist also noch nicht vollständig. Die Geschwindigkeit der Cysteinoxidation ist von der Kupferkonzentration abhängig. Den Reaktionsverlauf, verfolgt anhand des Rückganges der Thiolgruppen zeigt die Abbildung 26. Die Reaktion ist bei einer Kupferkonzentration von 10 μ M nach 5 Minuten vollständig abgelaufen, bei 6,67 μ M nach 15 Minuten, bei 3,33 μ M dauert sie schon deutlich länger als die maximale Testdauer von 30 Minuten.

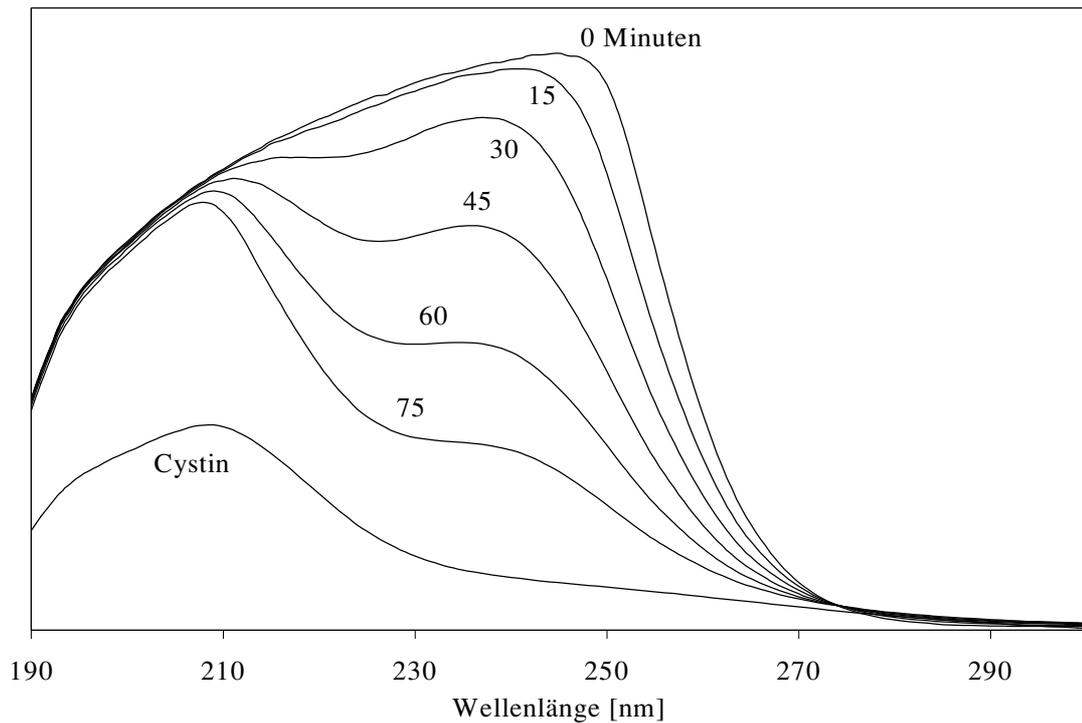


Abb. 25: Bildung von Cystin aus Cystein im Cysteinoxidationstest

Zeitabhängige Veränderung des Absorptionsspektrums während der Oxidation von 1 mM Cystein durch $1 \mu\text{M}$ CuSO_4 , Vergleich mit $0,2 \text{ mM}$ Cystin.

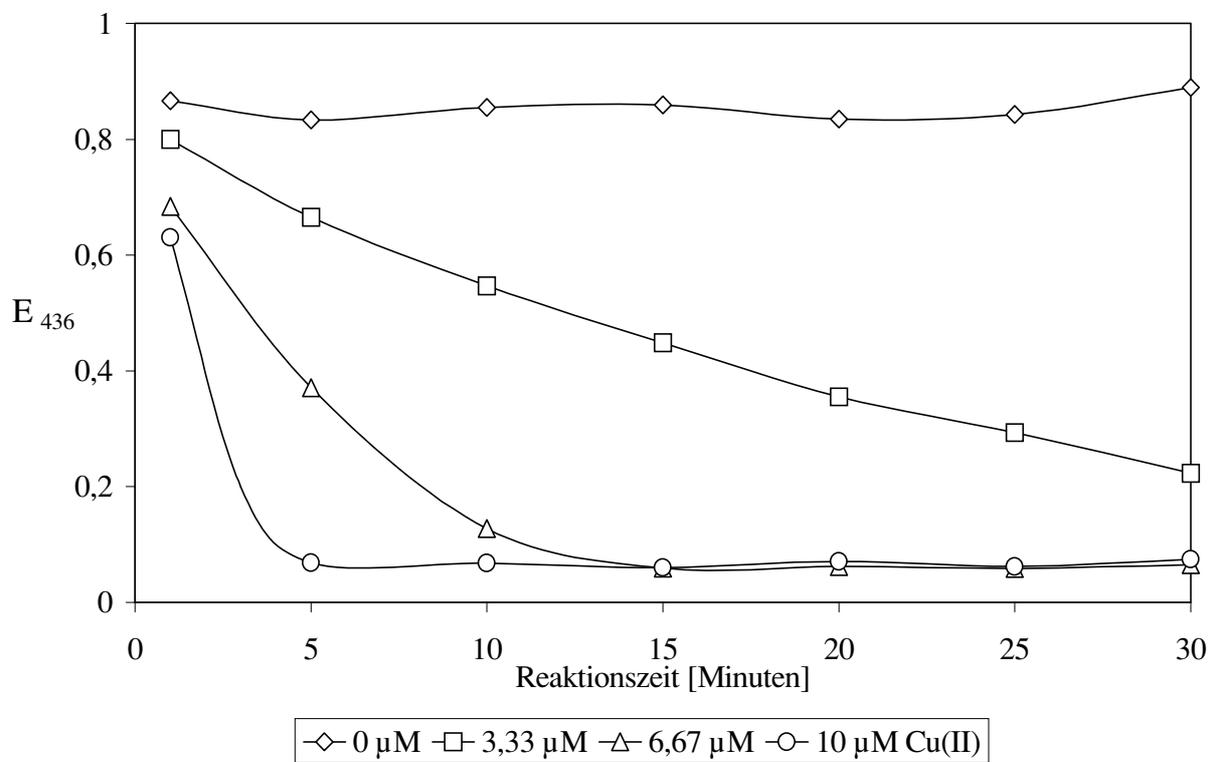


Abb. 26: Reaktionsverlauf der Cysteinoxidation bei verschiedenen Kupferkonzentrationen

Oxidation von 1 mM Cystein durch angegebene CuSO_4 -Konzentrationen im Tris-gepufferten Test bei pH 8,0.

3.3.3.2 Komplexatoren im Thioloxidationstest

Außer Cystein sind auch andere Thiole unter bestimmten Bedingungen durch Kupfer (II) oxidierbar. Im Standardtest, der nur 100 μM Tris pH 8,0 sowie 10 μM Cu und Thiol enthält, werden Cystein (D wie auch L- Form) und Cysteinethylester oxidiert, Dithioerytritol (DTE), Glutathion (GSH), N-Acetylcystein und Homocystein jedoch nicht. Letztgenannte Substanzen werden erst in Gegenwart von ausreichend hohen Cu(II)- Konzentrationen und dem Cu(I)-spezifischen Komplexator Bathocuproindisulfonsäure (BCS) oxidiert.. Nach dem Massenwirkungsgesetz ist das Verhältnis von Cu(II) zu Cu(I) die treibende Kraft für die Thioloxidation. BCS entzieht das durch Reduktion von Cu(II) gebildete Cu(I) dem Gleichgewicht, sodaß die Oxidation auch dieser Thiole ablaufen kann. Die Abbildung 27 zeigt die Kopplung von Cu(I)- Zunahme, gemessen bei 480 nm und Thiolgruppenabnahme, gemessen bei 412 nm am Beispiel des Glutathions. Der Test enthielt neben den angegebenen Cu(II) Konzentrationen 1 mM GSH und 0,4 mM BCS. Er wurde mit 100 mM Tris pH 8,0 gepuffert und die Testdauer betrug, damit die Reaktion weitestgehend vollständig abgelaufen ist, 30 Minuten. Da der BCS- Cu- Komplex bei 412 nm eine geringere Absorption als bei 436 nm aufweist, wurde der Test bei 412 nm durchgeführt und die Werte rechnerisch korrigiert.

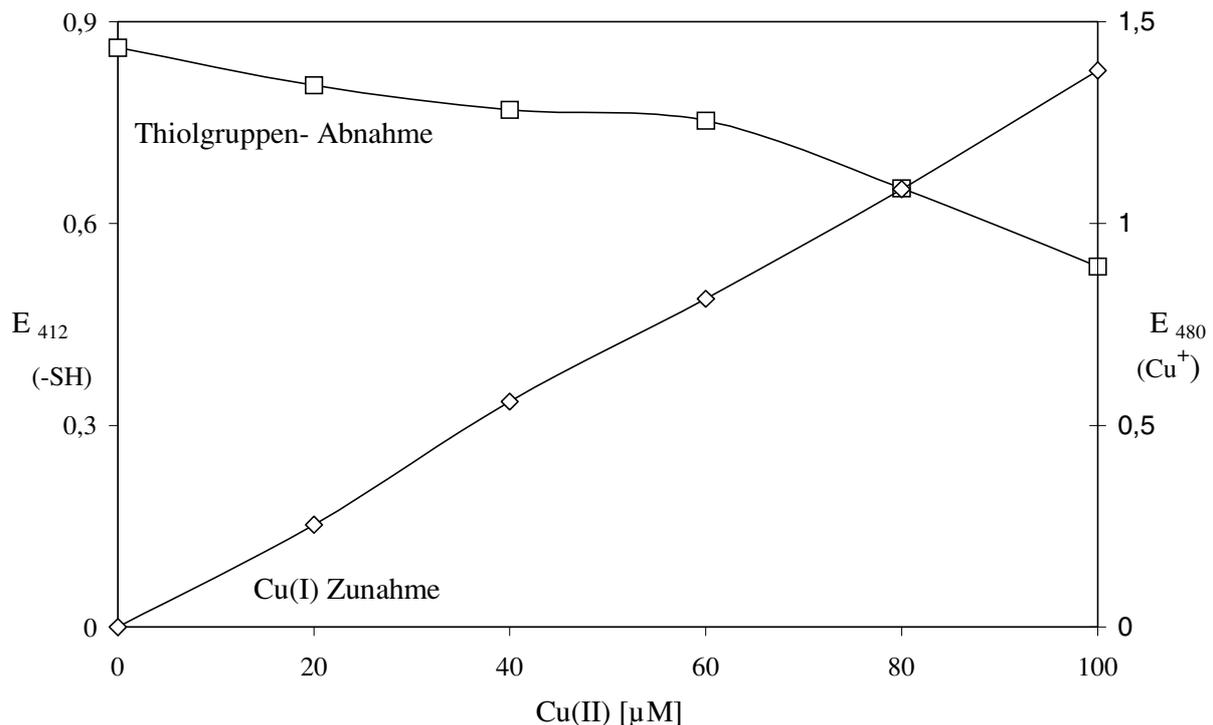


Abb. 27: Kopplung von Thiolgruppenabnahme im GSH und Cu(I)- Zunahme

Oxidation von 1 mM GSH in Gegenwart von 0,4 mM BCS bei pH 8,0. Bestimmung der Cu(I)-Bildung durch BCS, der Thiolgruppenabnahme durch DTNB.

Die Cu(I)- Zunahme ist mit der Cu(II)- Konzentration linear korreliert. Sind die angebotenen Cu(II)- Ionen komplett zu Cu(I) umgesetzt, stoppt die Reaktion und somit auch die Thioloxidation. Daraus leitet sich eine umgekehrt proportionale Beziehung zum Gehalt der

verbleibenden Thiolgruppen ab. Wenn der spezifische Cu(I)- Komplexator BCS einen fördernden Einfluß auf die Oxidation von Thiolen aufweist, sollte nach dem oben angeführten Modell die Anwesenheit von Cu(II)- Komplexatoren die Reaktion hemmen, da das Verhältnis von Cu(II) zu Cu(I) klein wird. Dies ist auch der Fall. Die Abhängigkeit der Cysteinoxidation von der EDTA- Konzentration zeigt die Abbildung 28.

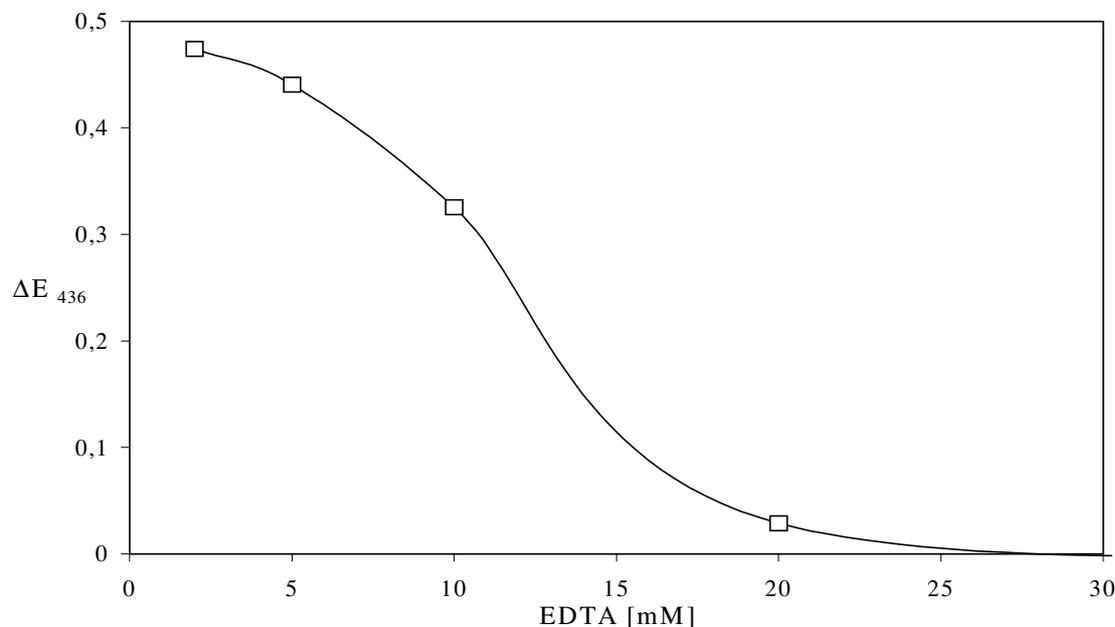


Abb. 28: EDTA- Abhängigkeit der Cysteinoxidation

Bestimmung der Thiolgruppenabnahme in den ersten 5 Minuten bei der Oxidation von 1 mM Cystein durch 10 μ M CuSO₄ bei pH 8,0 in Abhängigkeit von der EDTA- Konzentration.

Bei einer angebotenen Kupferkonzentration von 10 μ M wird die Cysteinoxidation. durch etwa 20 mM EDTA annähernd vollständig unterbunden. Daraus resultiert ein Konzentrationsverhältnis von Cu zu EDTA von 1:2000. Das bedeutet, daß es sich bei der Cysteinoxidation um ein System handelt das eine wesentlich höhere Affinität zu Kupferionen aufweist als EDTA. Dieser Test verhält sich anders als die anderen behandelten Testsysteme, bei denen sich die Kompensation des Hemmeffektes mit etwa equimolaren Konzentrationen von Kupfer und Metall beobachten läßt. Allerdings gibt es einen Fall, bei dem EDTA in relativ niedriger Konzentration eine Schutzwirkung gegen die Oxidation von Cystein zeigt: In Gegenwart der Puffersubstanz Imidazol zeigt sich ein deutlicher Effekt von EDTA in einem Konzentrationsbereich, der in der Größenordnung der angebotenen Kupferkonzentration liegt. Bei anderen Puffern wie Tris- oder Kaliumphosphatpuffer tritt dies nicht auf. Imidazol allein ist jedoch nicht in der Lage, diesen Effekt vollständig hervorzurufen, er tritt nur in Kombination mit EDTA auf. Möglicherweise ist die Bildung eines Mischkomplexes aus Cu, EDTA und Imidazol die Ursache hierfür. Die Abbildung 29 zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit der Cysteinoxidation in Abhängigkeit von der

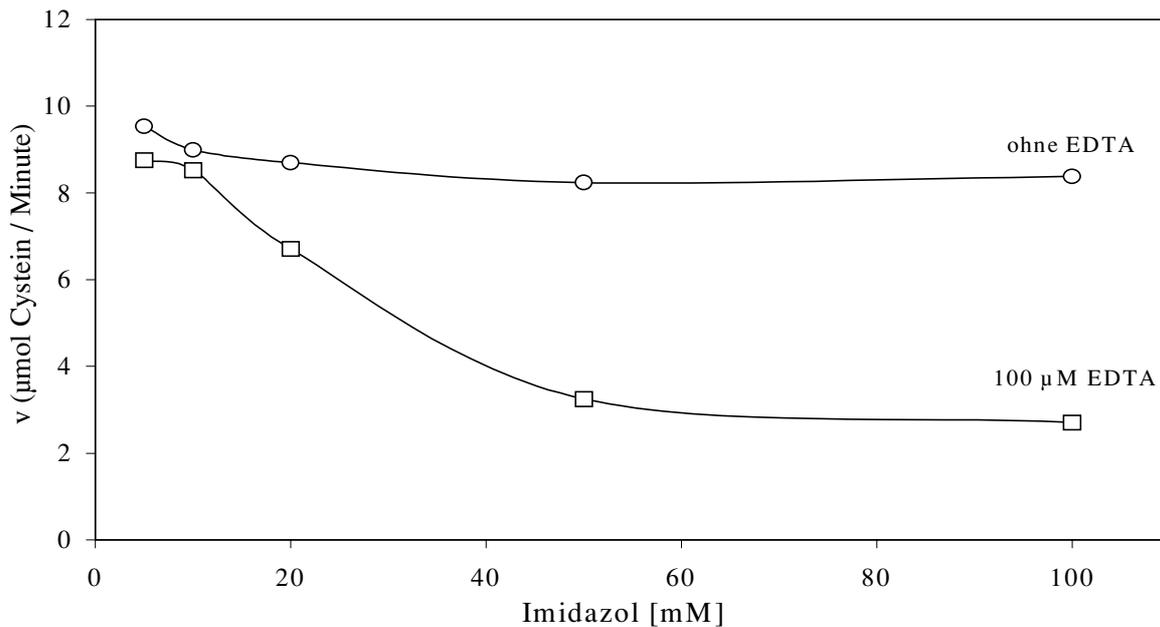


Abb. 29: Imidazol- Abhängigkeit der Cysteinoxidation mit und ohne EDTA

Oxidation von 1 mM Cystein bei pH 8,0 durch 5 μM CuSO_4 mit und ohne EDTA in Gegenwart von verschiedenen Imidazolkonzentrationen.

Imidazolkonzentration bei einer Kupferkonzentration von 5 μM . Bei einer EDTA-Konzentration von 100 μM ist davon auszugehen, daß es den Versuchsansatz nicht limitiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit verringert sich mit steigender Imidazolkonzentration in Gegenwart von EDTA im Bereich bis 50 mM Imidazol deutlich. Ohne EDTA ist der Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich geringer. Bei Konzentrationen oberhalb von etwa 50- 60 mM ist in beiden Ansätzen kein weiterer Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit zu erkennen. Das chemisch ähnliche 1,2,4- Triazol zeigt diesen Effekt nicht. Wie bei EDTA ist auch bei anderen Komplexatoren erst bei sehr hohen Konzentrationen ein Schutzeffekt bemerkbar. Rinderserumalbumin zeigt selbst in einer recht hohen Konzentration von 4 mg/ml im Test nur sehr geringen Schutzeffekt. Auch der spezifische Cu(II)- Komplexator BSH bietet bei einer Konzentration von 10 mM noch keinen vollständigen Schutz bei einer Kupferkonzentration von 10 μM . Da 1 Mol BSH 2 Mol Kupfer binden, beträgt das Verhältnis von Cu zu Cu- Bindungsstellen hier 1:2000. Dieser Wert ist dem mit EDTA gefundenen Wert vergleichbar. Eine weitere Erhöhung dieses Verhältnisses im Test wird durch die geringe Löslichkeit des BSH verhindert. Der spezifische Cu(I)-Komplexator BCS jedoch ist in der Lage, nach der anfänglichen Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) die weitere Oxidation von Cystein zu unterbinden. Hierfür ist 1 mM BCS bei einer Kupferkonzentration von 10 μM erforderlich. Da 2 Mol BCS 1 Mol Cu(I) binden, ist das erforderliche Verhältnis von Cu zu Cu- Bindungsstellen 1:50. Übereinstimmend sind bei allen getesteten Substanzen sehr hohe Konzentrationen vonnöten, um die Kupferwirkung zu verhindern.

3.3.3.3 Der Faktor im Thioloxidationstest

Um den Effekt des Faktors auf die kupfervermittelte Oxidation von Cystein im Vergleich zu dem von EDTA zu beurteilen, wurden Faktor und EDTA in Testansätzen mit und ohne CuSO_4 (10 nmol) eingesetzt. Die Testreihe war mit 100 mM Imidazol pH 8 gepuffert, die Cysteinkonzentration betrug 1 mM. Das Faktorstoffvolumen entsprach einer Faktormenge, die im GR- Test 20 nmol Kupfer bindet (5,2 OD₂₀₇₋ units). In Abbildung 30 ist die zeitabhängige Abnahme der Thiolgruppen dargestellt.

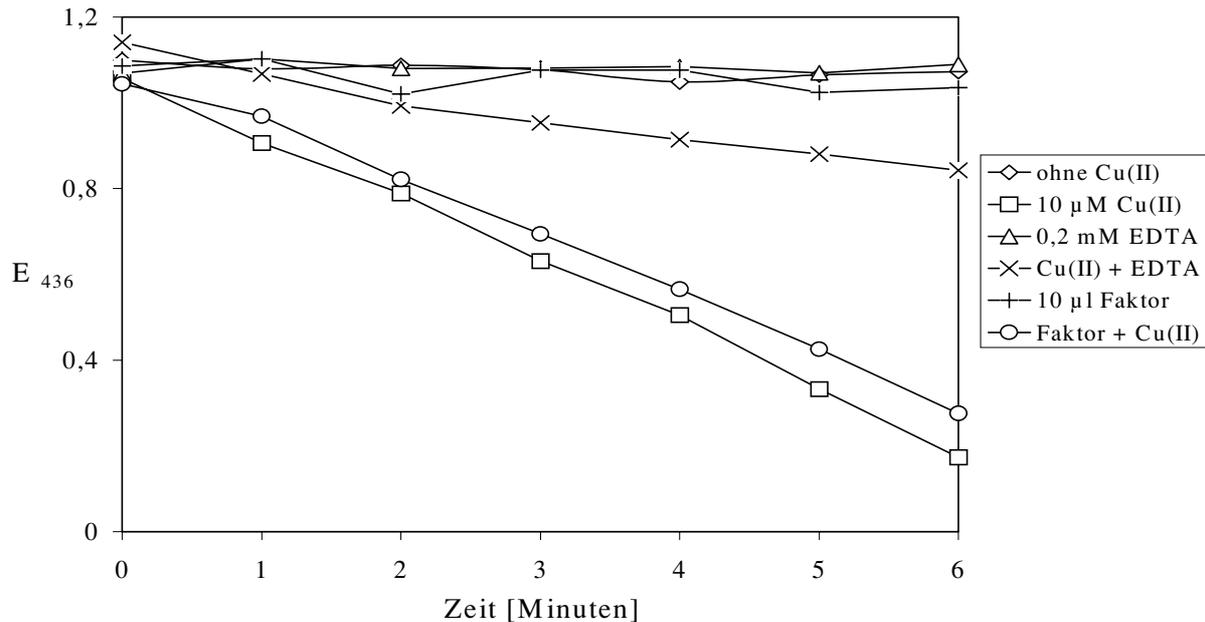


Abb. 30: Der Faktor in der Cysteinoxidation

Oxidation von 1 mM Cystein im Imidazol- gepufferten Test (100 mM, pH 8,0) in Gegenwart verschiedener Zusätze bei einem Testvolumen von 1 ml. 10 µl Faktor entsprechen 5,2 OD₂₀₇₋ units.

Die Abnahme der Thiolgruppen ist in Gegenwart von Kupfer sehr stark, ohne Kupfer findet sie nicht statt, ebenso nicht bei EDTA und Faktor, jeweils ohne Kupferzugabe. Der Faktor zeigt bei einem Bindungsstellenverhältnis Kupfer: Faktor von 1:3 nur einen leichten Effekt. Der Schutz vor der Oxidation ist bei EDTA schon deutlich besser, zum einen bedingt durch das etwas höhere Verhältnis von Kupfer zu Kupferbindungsstellen von 1:20, zudem macht sich der bereits gezeigte Effekt von Imidazol in Kombination mit EDTA bemerkbar. Der Faktor verhält sich in diesem Testsystem ähnlich wie andere getestete Komplexatoren, zeigt also bei Konzentrationen, bei denen die Bindungskapazität in der Größenordnung der Kupferkonzentration liegt, kaum Einfluß auf die Cysteinoxidation. Faktormengen, die ein Bindungsstellenverhältnis von 1:2000, wie bei EDTA oder BSH erforderlich, im Test erzeugen würden, waren aufgrund mangelnder Quantität nicht einsetzbar.

3.3.4 Oxidation von Dihydroxyfumarsäure (DHF)

3.3.4.1 Eigenschaften der Dihydroxyfumarsäureoxidation

Das Dihydroxyfumarsäuremolekül liegt in der Endiolform vor. Da diese Konfiguration im Molekül recht instabil ist, ist es daher schon durch geringe Mengen an Cu(II) leicht oxidierbar. Die Endiolgruppe wird zum Dicarbonyl aufoxidiert, wobei reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) entstehen (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989; KUKREJA et al., 1988; ROHNERT et al., 1998). Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage, α -Keto- γ -methylthiobuttersäure (KMB) zu spalten, wobei Ethylen gebildet wird (v. KRUEDENER et al., 1995; HIPPELI et al., 1997; ELSTNER, 1990; HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989), welches gaschromatographisch nachgewiesen werden kann. Der Test spricht auch auf andere Übergangsmetalle an, besonders interessant in Hinsicht auf die Eigenschaften des Faktors ist jedoch das Verhalten des Testes in Gegenwart von Zink. Die Abbildung 31 zeigt die Abhängigkeit des Testes von der Zinkkonzentration.

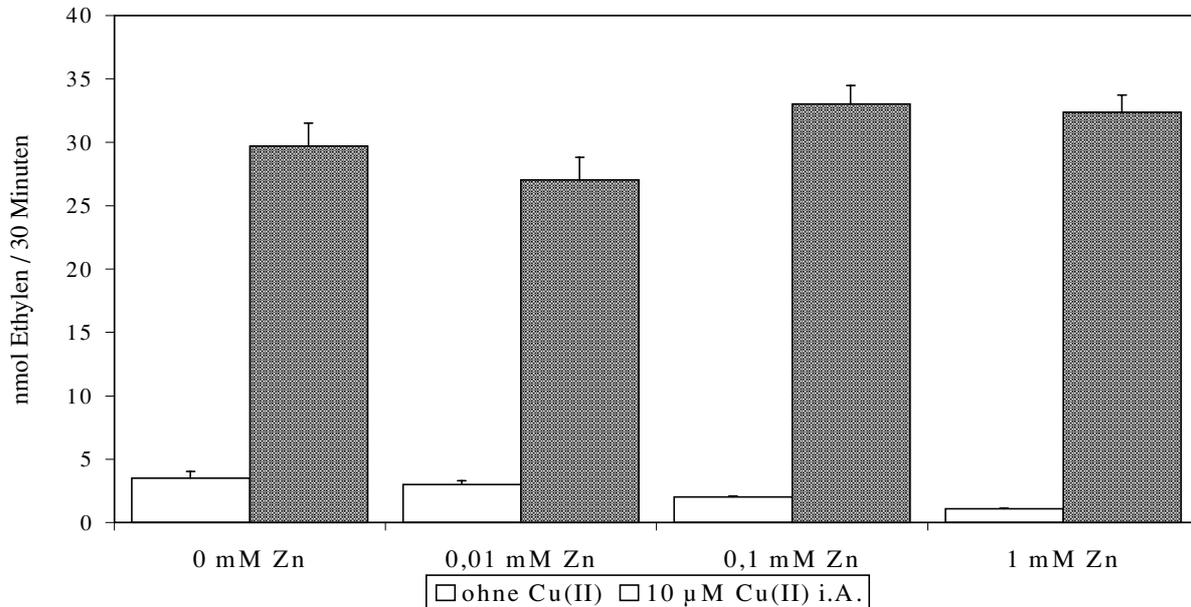


Abb. 31: Zinkabhängigkeit der Dihydroxyfumarsäureoxidation

Bildung von Ethylen aus 1,5 mM KMB durch Oxidation von 0,5 mM DHF in Gegenwart der angegebenen Metalle im phosphatgepufferten System bei pH 7,4.

Das erste Wertepaar zeigt die von Zink unbeeinflusste Reaktion mit und ohne Kupfer. Es dient als Kontrolle und zeigt die Verantwortlichkeit des Kupfers für die Bildung des Ethylens. Das zweite Wertepaar zeigt Kupfer und Zink in equimolaren Verhältnissen, die beiden weiteren Paare Verhältnisse von Cu: Zn von 1:10 und 1:100. Selbst bei so hohen Zn(II) Konzentrationen kann keine deutliche Beeinflussung des Testes in Gegenwart von Cu(II) beobachtet werden. Die Testreihe ohne Kupferzusatz jedoch zeigt eine konzentrationsabhängige Abnahme der Ethylenbildung, die allerdings als relativ gering

ausfällt. Zink zeigt in diesem Testsystem nicht die gleichen, sondern eher gegenteilige Effekte wie die Kupferionen bzw. verhält sich indifferent.

3.3.4.2 Faktoreinfluß auf die kupfervermittelte Dihydroxyfumarsäureoxidation

Der Faktor nimmt erheblichen Einfluß auf die kupferinitiierte Entwicklung von Ethylen aus Ketomethylthiobuttersäure. Er ist offenbar in der Lage, die Oxidation von DHF, die durch Kupfer vermittelt wird, zu unterbinden. Somit können keine reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die den Zerfall von KMB bewirken. Die Abbildung 32 zeigt den Einfluß verschiedener Faktormengen auf das Testsystem. Die gestrichelte, horizontal verlaufende Linie zeigt die Grundrate ohne Zusatz von Kupfersulfat. Sehr deutlich ist eine Abstufung in Abhängigkeit von der Faktormenge zu sehen. Die Abhängigkeit ist bis zu einem Faktorvolumen von 5 μl (7,55 OD₂₀₇- units) in etwa linear. In Gegenwart von etwa 4,3 μl Faktor (6,49 OD₂₀₇ – units) ist die DHF vollständig geschützt. Bei einem Testvolumen von 2 ml befinden sich 20 nmol CuSO₄ im Ansatz. Daraus ergibt sich eine Bindungskapazität von 4,7 nmol Kupfer/ μl Faktor (3,11 nmol Kupfer/ OD₂₀₇- unit). Dies entspricht in der Größenordnung etwa dem, was auch mit dem GR- Test gemessen werden kann (3,84 nmol Kupfer/ OD₂₀₇- unit), obwohl der Wert hier etwas geringer ausfällt.

Da der Test sich als wenig beeinflussbar durch Zink erweist, stellt er ein geeignetes System dar, um die Fragestellung zu beantworten, ob die Kupferbindungsfähigkeit des Faktors durch die Anwesenheit von Zink beeinflusst wird. Dazu wurden je 5 μl Faktor (7,55 OD₂₀₇- units) mit einer festen Kupfermenge von 20 nmol in Gegenwart von unterschiedlichen Zinkchloridkonzentrationen getestet. Die Faktormenge ist so bemessen, daß die gesamte angebotene Kupfermenge vom Faktor gebunden werden kann. Geht man beim Faktor von einer etwa 20- fach höheren Bindungskapazität für Zink aus, kann die eingesetzte Faktormenge etwa 470 nmol Zink binden. Die maximal im Test eingesetzte Zinkmenge ist 2 μmol , also mehr als das vierfache der maximal bindbaren Menge. Die Abbildung 33 zeigt das Ergebnis. Die Kontrolle 1 zeigt die Ethylenentwicklung ohne Zusatz von Metall, stellt also die Grundrate dar. Kontrolle 2 zeigt die Ethylenentwicklung in Gegenwart von Kupfer ohne Zusatz von Faktor und Zink. In den weiteren Balken ist zu erkennen, daß die Kupferwirkung durch den Faktor mehr als vollständig kompensiert wird und selbst bei sehr hohen Zinkkonzentrationen kommt es nur zu einer minimalen Freisetzung von Kupfer aus dem Komplex. Diese ist bei einer Zinkkonzentration von 0,1 mM am größten, die Werte nehmen darüberhinaus aber wieder ab, was möglicherweise auf den leichten Hemmeffekt sehr hoher Zinkkonzentrationen zurückzuführen ist. Dabei bleiben die Werte in jedem Fall unterhalb der Grundrate. Es kommt aber nicht zu einer massiven Freisetzung von Kupfer, die auf eine Konkurrenz von Kupfer und Zink um eine Bindungsstelle hindeuten würde. Der Effekt von Kupfer würde auch bei Anwesenheit hoher Zinkkonzentration sichtbar werden. Kupfer und Zink binden entweder an unterschiedlichen Stellen oder aber an derselben Stelle, dann aber Kupfer mit wesentlich höherer Affinität.

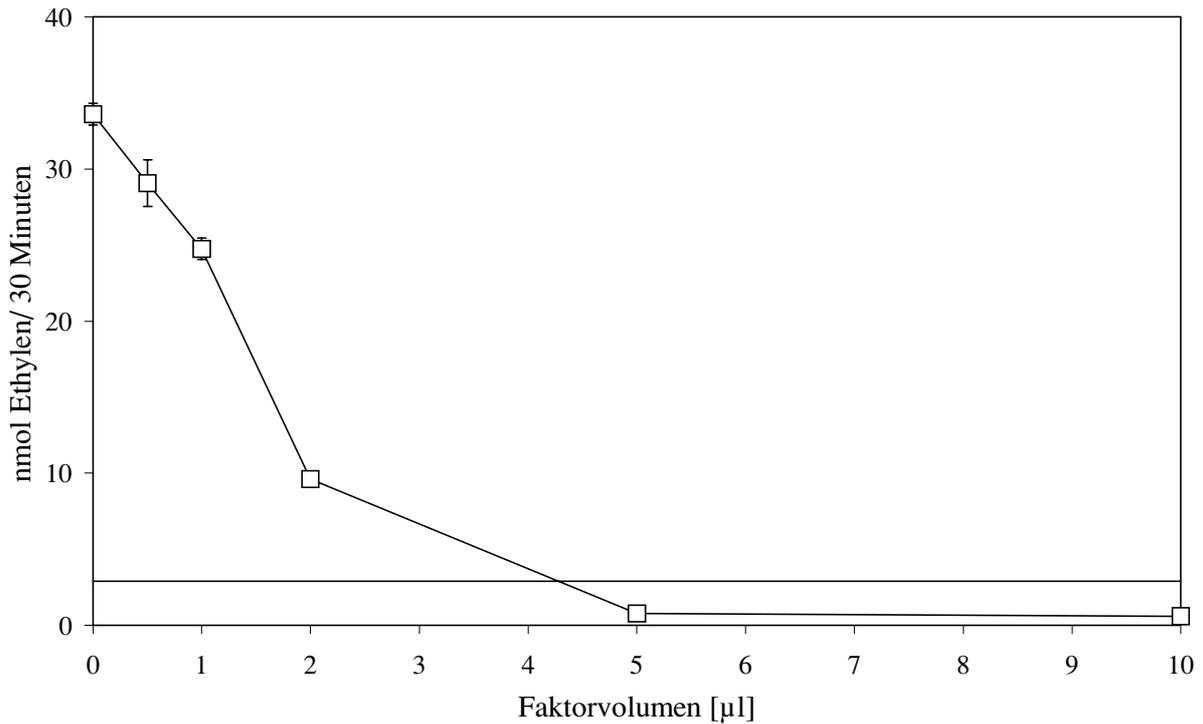


Abb. 32: Einfluß des Faktors auf die DHF- Oxidation

Verschiedene Faktorvolumina im DHF- Standardtest. Die gestrichelte Linie bezeichnet die Ethylenbildung ohne Zusatz von Metall.

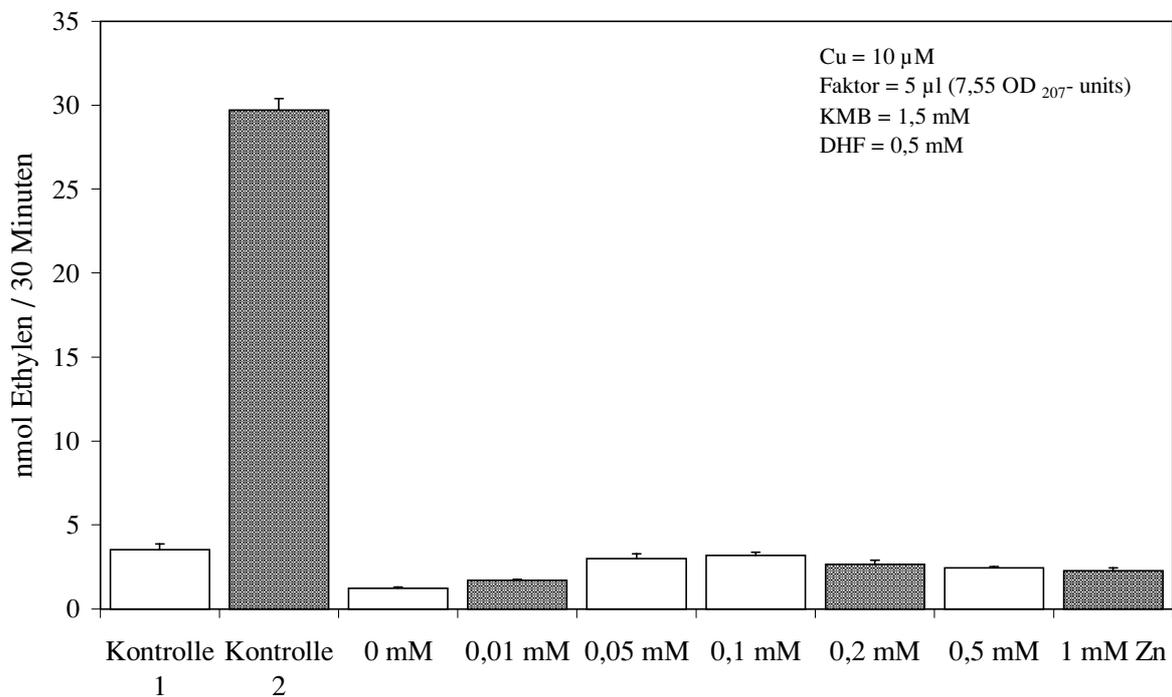


Abb. 33: Einfluß von Zink auf die Faktor- Kupfer- Bindung

DHF- Oxidation in Gegenwart von Kupfer und Faktor in Gegenwart von unterschiedlichen Zinkkonzentrationen. Kontrolle 1 bezeichnet einen Ansatz ohne Faktor und Metallzusatz, Kontrolle 2 einen Ansatz mit 10 µM Kupfer, aber ohne Faktor und ohne Zink. 5 µl Faktor entsprechen 7,55 OD₂₀₇- units.

3.3.5 Xanthinoxidasetest (Cytochrom c- Reduktion)

3.3.5.1 Eigenschaften des Xanthinoxidasetestes

Der Xanthinoxidasetest wurde in Anlehnung an die von McCord und Fridovich (1969) beschriebene Methode zur Messung der Superoxiddismutase durchgeführt. In diesem Testsystem wird durch die Aktivität der Xanthinoxidase O_2 zum Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$ reduziert, das wiederum in der Lage ist, Cytochrom c zu reduzieren. Die Reduktion des Cytochrom c führt zu einer Extinktionszunahme bei 550 nm, die photometrisch verfolgt werden kann. Die Anwesenheit von Superoxiddismutase im Test führt zum Abbau des Superoxids. Dieses Enzym enthält Kupfer und Zink, aber auch Enzyme mit Mangan oder Eisen sind bekannt. Es setzt 2 Moleküle $O_2^{\cdot-}$ mit 2 H^+ zu O_2 und H_2O_2 um. Aber auch die Anwesenheit von Cu(II) verhindert die Reduktion des Cytochrom c und somit einen Extinktionsanstieg, indem es die Xanthinoxidase hemmt und somit schon die Bildung des Superoxides verhindert. Die Abbildung 34 zeigt den einfachen Test ohne Additive (Kinetik 1) und den Verlauf in Gegenwart von 1 μM $CuSO_4$ (Kinetik 2).

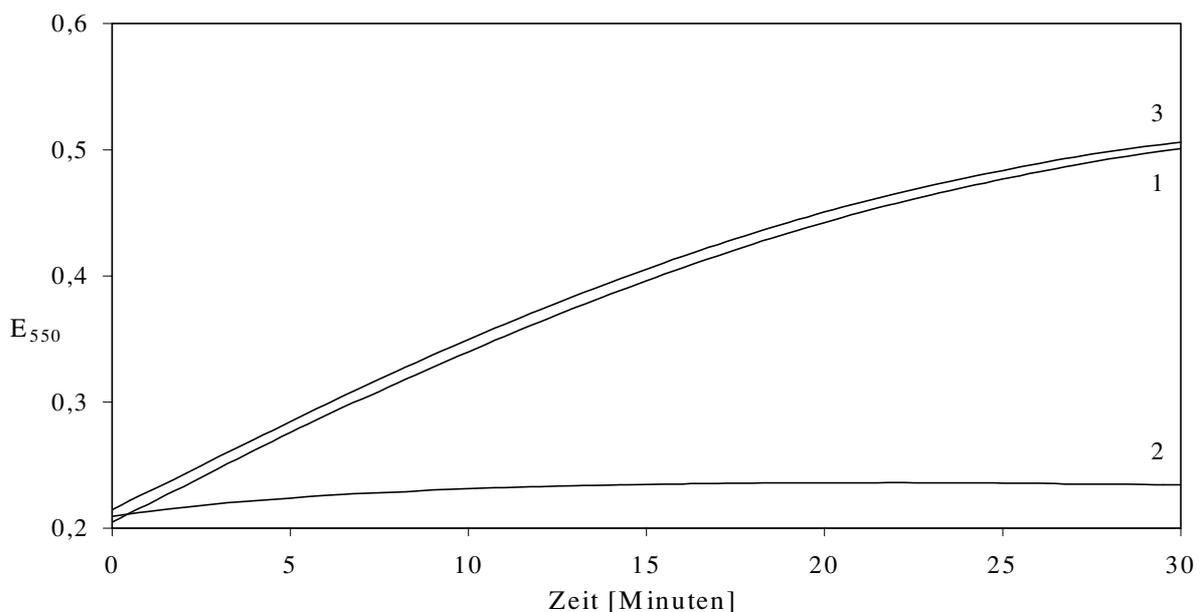


Abb. 34: Cytochrom c- Reduktion durch das Xanthin/ Xanthinoxidasesystem

X/XOD- Standardtest ohne Additive (1), mit 1 μM $CuSO_4$ (2), mit 1 μM $CuSO_4$ + 0,1 mM EDTA (3).

Die Reaktionsgeschwindigkeit in Kinetik 1 nimmt, ähnlich wie bei dem GR- Test ständig ab. Kinetik 3 zeigt den Verlauf in Gegenwart von 1 μM $CuSO_4$ und 0,1 mM EDTA. Die Reaktionskinetik verläuft praktisch identisch mit der des einfachen Testes. EDTA kann durch Komplexierung der Kupferionen möglicherweise die Xanthinoxidase vor Inaktivierung schützen. Allerdings kann der Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit selbst durch Zugabe von EDTA in Abwesenheit von Cu(II) nicht vermindert oder gar beseitigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von 10 μM $FeCl_3$ und 20 μM $ZnCl_2$ beeinflussen den Verlauf des Testes nicht. Die Kinetiken gleichen denen des einfachen Testes (Daten nicht gezeigt).

3.3.5.2 Der Faktor im Xanthinoxidasetest

Der Faktor zeigt im Xanthinoxidasetest einen deutlichen Effekt. Vergleicht man diesen Effekt mit der EDTA- Wirkung, so zeigen sich keinerlei Unterschiede. Die Abbildung 35 zeigt, daß Cu(II) in einer Konzentration von 1 μM den Test zu 83,6 % hemmt. Die dargestellten Werte sind die Extinktionsdifferenzen in den ersten 10 Minuten. Bei einem Ansatzvolumen von 1 ml befinden sich 1 nmol CuSO_4 im Test. Die eingesetzte Faktormenge bindet etwa 10 nmol Kupfer im GR- Test, die EDTA- Konzentration betrug 100 μM . Es wird deutlich, daß sowohl EDTA wie auch der Faktor die Kupferwirkung in den Ansätzen mit und ohne zusätzlich zugesetztem Kupfersulfat komplett unterbinden kann. Weiterhin zeigt sich, daß der Faktor, wie auch der Faktor- Kupferkomplex keine Superoxiddismutaseaktivität zeigt.

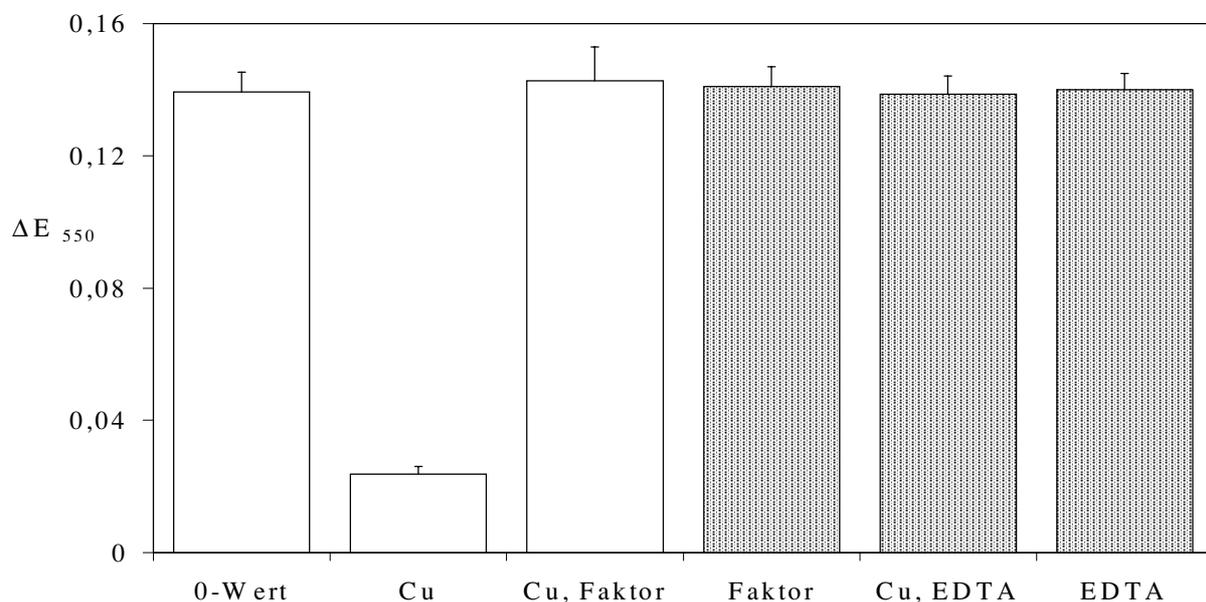


Abb. 35: Faktor und EDTA in der Cytochrom c- Reduktion durch das X/XOD- System

Konzentrationen der Zusätze: CuSO_4 1 μM , EDTA 0,1 mM, Faktor 5 μl (2,6 OD_{207} - units) i.A., 0-Wert ohne Zusatz. Bestimmung der ΔE_{550} zwischen der 1. und 10. Minute des Testes.

In Anbetracht der Fähigkeit des Faktors, Kupfer und Zink zu binden, wurde untersucht, ob der entstehende Komplex oder der Faktor in Anwesenheit von Eisen Superoxiddismutase (SOD)-Aktivität zeigt. Dazu wurde eine Faktormenge, die 4 nmol Kupfer bindet, mit Cu(II), Zn(II) und Fe(III) im Xanthinoxidasetest eingesetzt und die Extinktionsdifferenz zwischen der 1. und der 10. Minute bestimmt. Die Metallkonzentrationen betragen 1 μM Kupfer, 20 μM Zink und 10 μM Eisen. Die Kupferkonzentration wurde so gewählt, daß sie komplett vom Faktor gebunden werden kann, daß keine Hemmung der Xanthinoxidase stattfinden kann. Zink wurde in erhöhter Konzentration zugegeben. Das Verhältnis von Kupfer zu Zink beträgt 1:20. Die Abbildung 36 zeigt, daß von den eingesetzten Metallen nur Kupfer eine deutlich inaktivierende Wirkung auf den Test hat. Zink zeigt nur einen sehr geringen Effekt, Eisen gar keinen. Die Kombination von Kupfer und Zink zeigt in etwa einen additiven Effekt der

Wirkungen beider Metalle. Die Ansätze mit Faktor wurden alle nicht inaktiviert, die ΔE -Werte liegen im Bereich des 0- Wertes. Die entstehenden Komplexe zeigen alle keine SOD-Aktivität, auch der Mischkomplex aus Kupfer, Zink und Faktor nicht. Hier steht die kupferkomplexierende Eigenschaft des Faktors im Vordergrund, Superoxid wird unter diesen Bedingungen nicht abgebaut.

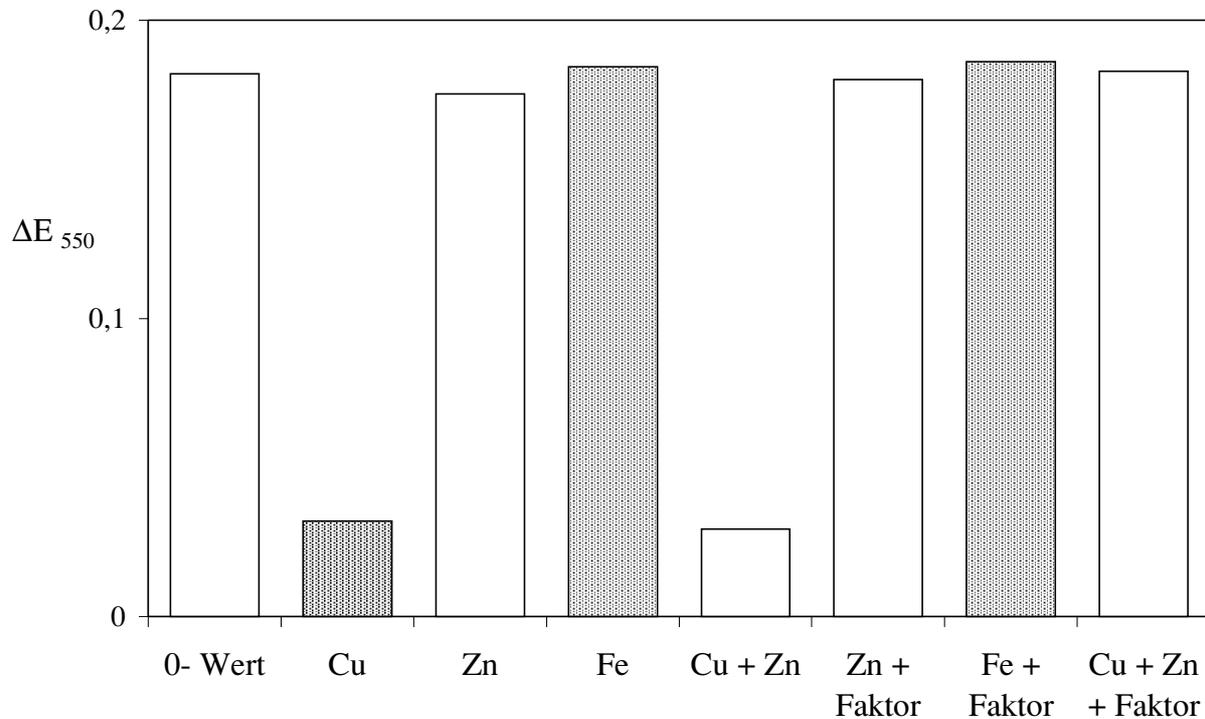


Abb. 36: Einfluß von Faktorkomplexen auf die Cytochrom c- Reduktion

Konzentrationen: CuSO_4 1 μM , ZnCl_2 20 μM , FeCl_3 20 μM , Faktor 2 μl i.A. (1,04 OD_{207^-} units/ ml), 0-Wert ohne Zusätze. Bestimmung der ΔE_{550} zwischen der 1. und 10. Minute des Testes.

Auch dieses Testsystem ist dazu geeignet, die Bindungskapazität des Faktors für Kupfer zu bestimmen. Dazu wurden die Extinktionsdifferenzen von Testansätzen mit verschiedenen Faktormengen in Gegenwart von 1 nmol CuSO_4 bestimmt und mit dem des einfachen Testes verglichen. Die Abbildung 37 zeigt die Abhängigkeit der Reaktion vom zugesetzten Volumen einer Faktorcharge. Die horizontal gestrichelte Linie zeigt das Niveau des einfachen Testes. Oberhalb von etwa 0,6 μl Faktor (entsprechend 0,31 OD_{207^-} units) ist mit steigender Faktorkonzentration keine weitere Schutzfunktion zu erzielen, der Test ist gesättigt. Das Niveau liegt leicht überhalb dem des einfachen Testes, was durch die Bindung von Kupfer zu erklären ist, das aus den Testbestandteilen stammt. Die Bindung von 1 nmol Kupfer wird mit der Zugabe von 0,54 μl Faktor (0,28 OD_{207^-} units) erreicht. Daraus ergibt sich eine Bindungskapazität von 1,85 nmol Kupfer/ μl Faktor (3,56 nmol Kupfer/ OD_{207^-} unit). Dies entspricht etwa den im GR- und GS- Test gefundenen Werten.

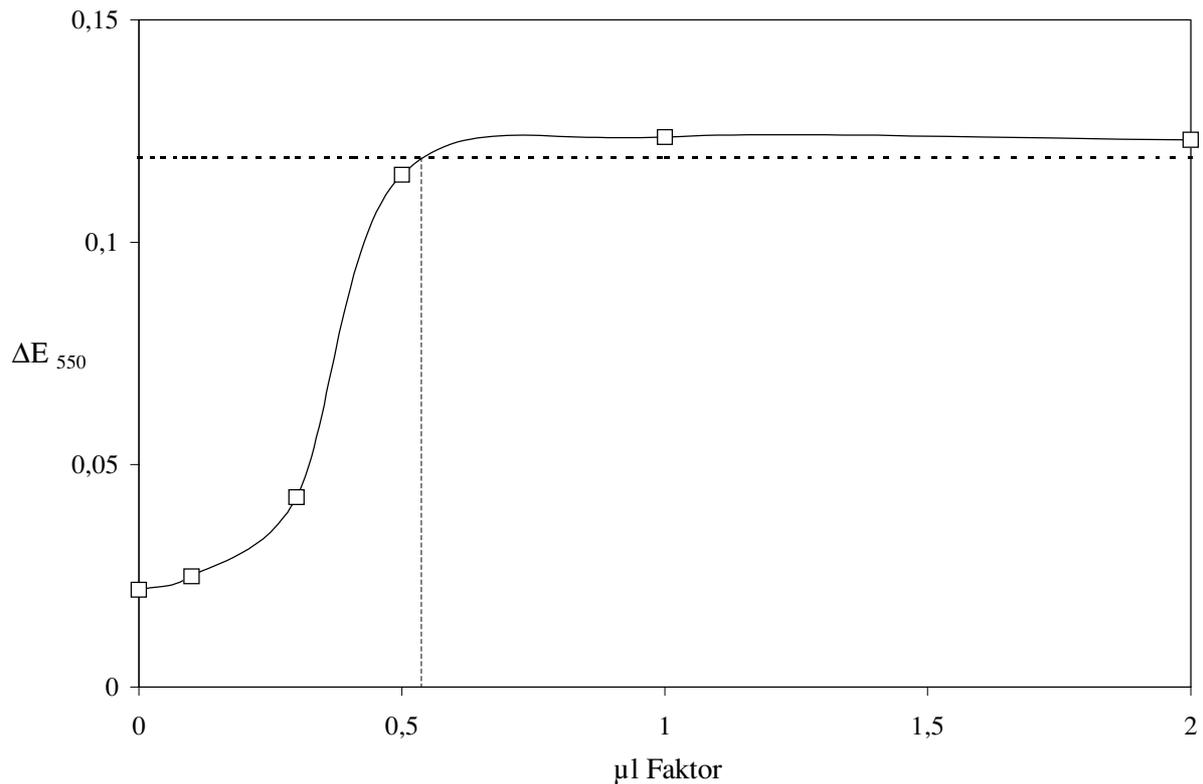


Abb. 37: Bestimmung der Bindungskapazität für Kupfer mit der Cytochrom c- Reduktion
1 μl Faktor entspricht 0,52 OD_{207} - units.

3.3.6. Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL)

3.3.6.1 Eigenschaften der LDL- Oxidation

Sowohl der Protein- wie auch der Lipidanteil des LDL ist in Gegenwart von Cu(II) - Ionen Oxidationsprozessen unterworfen. Der Proteinanteil, ApoB-100 verändert seine Mobilität im elektrischen Feld durch Zunahme der negativen Ladung am Molekül. Dies kann durch Gelelektrophorese gezeigt werden. Der Lipidanteil wird durch Kupferionen verändert, indem konjugierte Diene gebildet werden. Durch die dadurch bedingte stärkere Delokalisation des π -Elektronensystems kommt es zu einer Zunahme der Absorption bei 234 nm, die photometrisch zu verfolgen ist. Es zeigt sich ein typischer, dreiphasiger Reaktionsablauf, der in Abbildung 38 dargestellt ist (nach Esterbauer, et al.,1989). Die Länge der lag- Phase (1) und ist im starkem Maße vom Gehalt von Antioxidantien abhängig. Auch ohne Zusatz von oxidationshemmenden Substanzen entsteht, bedingt durch den Gehalt an endogenen Antioxidantien, eine lag- Phase. In der darauffolgenden Propagationsphase (2) kommt es zur Bildung der Diene und somit zu einem starken Anstieg der Extinktion. Die dritte Phase, die Dekompositionsphase führt wieder zu einem Extinktionsabfall, bedingt durch den Zerfall der Reaktionsprodukte.

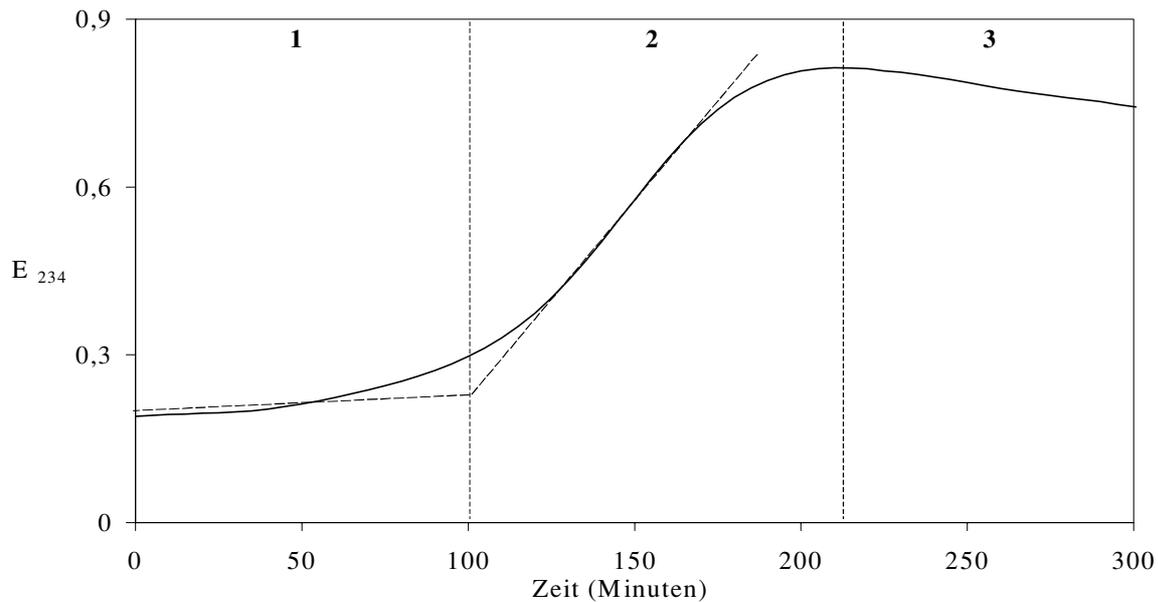


Abb. 38: Typischer Verlauf der Cu(II)- bedingten Dienkonjugation im LDL

Dienbildung bei einer LDL- Konzentration von 25 µg/ml, bedingt durch 1,67 µM CuSO₄ , gemessen über 6 h bei 234 nm, Ansatz in PBS.

3.3.6.2 Einfluß des Faktors auf die kupfervermittelte LDL- Oxidation

Ein weiteres Testsystem, mit dem Faktoreffekte sehr gut aufzuzeigen sind, ist der Nachweis der Dienkonjugation im LDL. Der Faktor zeigt hier schon in geringsten Konzentrationen einen deutlichen Effekt (Abbildung 39). Die lag- Phase des Testes mit Cu(II) betrug 100 Minuten. Bei Anwesenheit von Faktor wurde die exponentielle Phase in keinem Fall erreicht. Die CuSO₄- Menge im Test beträgt 1,67 nmol. Bereits 0,17 µl Faktor (0,26 OD₂₀₇- units) sind in der Lage, die Bildungsrate konjugierter Diene unter den 0- Wert abzusenken. Dies läßt vermuten, daß bereits geringe Mengen von Kupferionen im Test anwesend waren. Es errechnet sich in diesem Testsystem ein Bindungskapazität von über 9,8 nmol Kupfer/ µl Faktor (6,49 nmol Kupfer/ OD₂₀₇- unit), vermutlich liegt sie noch höher. Das ist eine annähernd doppelt so hohe Bindungskapazität wie sie mit anderen Testsystemen (z.B. GR-Test) feststellbar ist.

Auch im Agarosegelversuch ist der Einfluß des Faktors deutlich zu erkennen (Abbildung 40). Die Spuren 1 und 2 zeigen den Unterschied in der Laufweite zwischen unbehandeltem und durch Kupfer oxidiertem LDL. Die sich anschließende Faktor- Konzentrationsreihe zeigt, daß 0,1 µl Faktor (0,15 OD₂₀₇- units) die geringste Menge ist, die das LDL vor der Oxidation durch 0,336 nmol CuSO₄ noch schützen kann. Dabei ist keine Probe zu erkennen, in der das eingesetzte LDL nur anoxidiert, aber nicht vollständig durchoxidiert ist. Der Faktor- Konzentrationsbereich, in dem entschieden wird, ob eine komplette Oxidation des LDL stattfindet oder nicht, ist sehr klein. Es errechnet sich eine Bindungskapazität für dieses Faktorpräparat, die zwischen 3,36 und 6,72 nmol Kupfer/ µl Faktor (2,23- 4,45 nmol Kupfer /

OD 207- unit) liegt. Diese Werte sind mit der im GR- Test gefundenen Bindungskapazität vergleichbar.

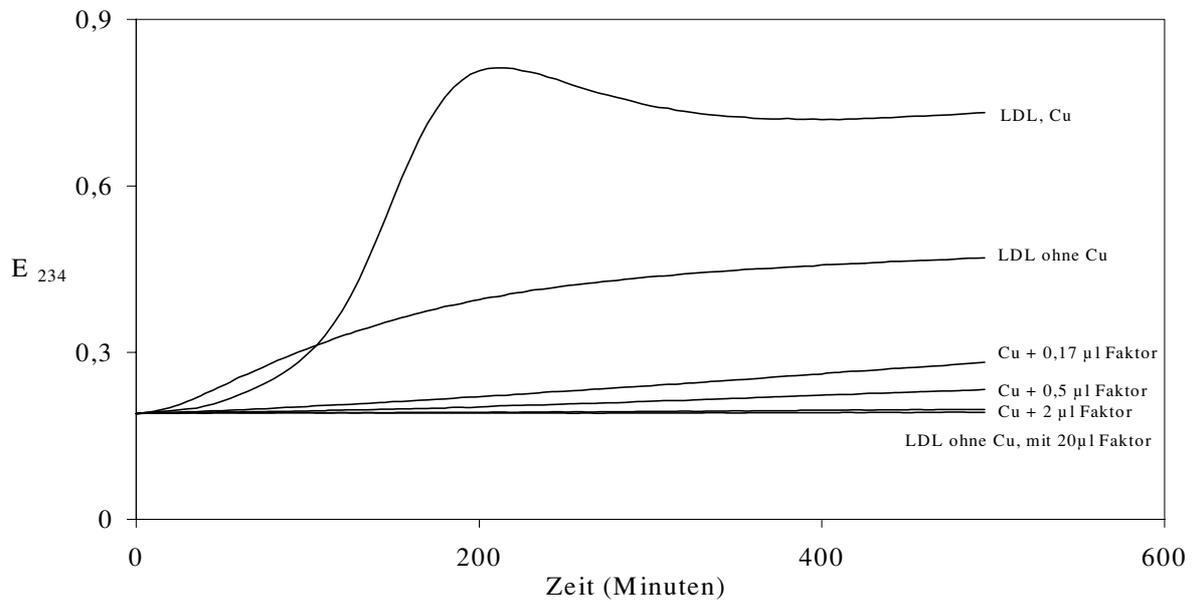


Abb. 39: Einfluß des Faktors auf die kupfervermittelte Dienkonjugation im LDL

LDL- Test mit 25 µg /ml LDL, 1,67 µM CuSO₄, Ansatz in PBS. Faktormengen von 0,17 µl (0,26 OD₂₀₇₋ units) bis 2 µl (3,02 OD₂₀₇₋ units).

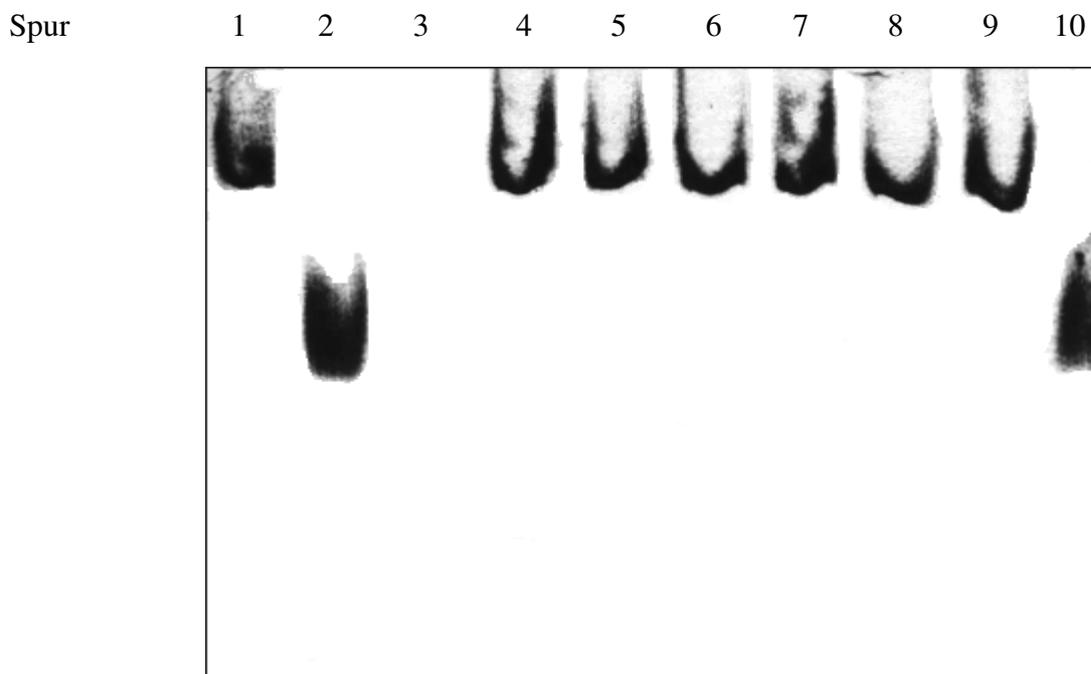


Abb. 40: Agarosegeltrennung von LDL, vorinkubiert in Gegenwart von Kupfer und Faktor

Spurbelegung: 1) LDL; 2) LDL/ Cu; 3) frei; 4) LDL/ 2µl Faktor; 5) LDL/ Cu/ 2µl Faktor; 6) LDL/ Cu/ 1µl Faktor; 7) LDL/ Cu/ 0,5µl Faktor; 8) LDL/ Cu/ 0,2µl Faktor; 9) LDL/ Cu/ 0,1µl Faktor; 10) LDL/ Cu/ 0,05 µl Faktor; (1µl Faktor entspricht 1,51 OD₂₀₇₋ units).

3.3.7. Die kupfervermittelte Bildung von Ethylen aus Linolensäure

3.3.7.1 Eigenschaften des Linolensäuretestes und der Einfluß des Faktors auf die kupfervermittelte Bildung von Ethylen

α - Linolensäure zerfällt in Gegenwart von ROS nach vorausgehender Peroxidation unter Bildung von Ethan. Diese ROS, insbesondere Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), werden in diesem Testsystem durch Belichtung des Farbstoffes Rose Bengal erzeugt. Sie reagieren mit den Doppelbindungen der Linolensäure und in dessen Folge wird das Molekül unter Bildung von Ethan fragmentiert. Hierbei werden auch geringe Mengen Ethylen gebildet. Bei Anwesenheit von Cu(II) verändert sich das Verhältnis von Ethan zu Ethylen mit zunehmender Kupferkonzentration auf Kosten des Ethans. Die Bedingungen, im besonderen die Kupferkonzentration, sind im Linolensäureversuch so gewählt, daß Ethan und Ethylen etwa im gleichem Maße gebildet werden (HEISER et al., 1998). Das ist etwa bei 5 μM Cu(II) der Fall. Bei Anwesenheit von Kupfer wird das hierbei intermediär entstehende Ethylradikal zum Ethylen oxidiert. Die Veränderung des Verhältnisses läßt Rückschlüsse über die frei verfügbare Cu(II)- Menge zu. Um den generellen Einfluß des Faktors auf das Testsystem zu beurteilen, wurden zunächst verschiedene Faktormengen in einer Testreihe ohne Kupferzusatz eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 41 dargestellt. Ohne Kupfer wird so gut wie kein Ethylen gebildet. Dies wird auch durch den Faktor nicht geändert. Auffällig jedoch sind die verminderten Ethan- Bildungsraten in allen Ansätzen, die Faktor enthalten. Dies deutet neben der Fähigkeit des Faktors, Komplexe zu bilden, noch weitere antioxidative Eigenschaften an. Die volle Wirkung des Faktors tritt erst in der Testreihe mit Kupfer zu Tage. Die Bildung von Ethylen wird mit zunehmender Faktorkonzentration zunehmend zurückgedrängt, bis schließlich bei Zugabe von größeren Faktormengen als 1 μl (1,51 OD₂₀₇- units) annähernd kein Ethylen mehr gebildet wird. Wie bei der Testreihe ohne Kupferzusatz geht auch die Ethanbildung bei höheren Faktorkonzentrationen deutlich zurück. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 zusammengefaßt. Die im Ansatz eingesetzte Kupfermenge ist 10 nmol. Daraus errechnet sich eine Bindungskapazität von 10 nmol Kupfer/ μl Faktor (6,62 nmol/ OD₂₀₇- unit). Dieser Wert entspricht etwa dem im LDL- Versuch gefundenen Wert, er ist etwa doppelt so hoch wie der im GR- Test ermittelte Wert.

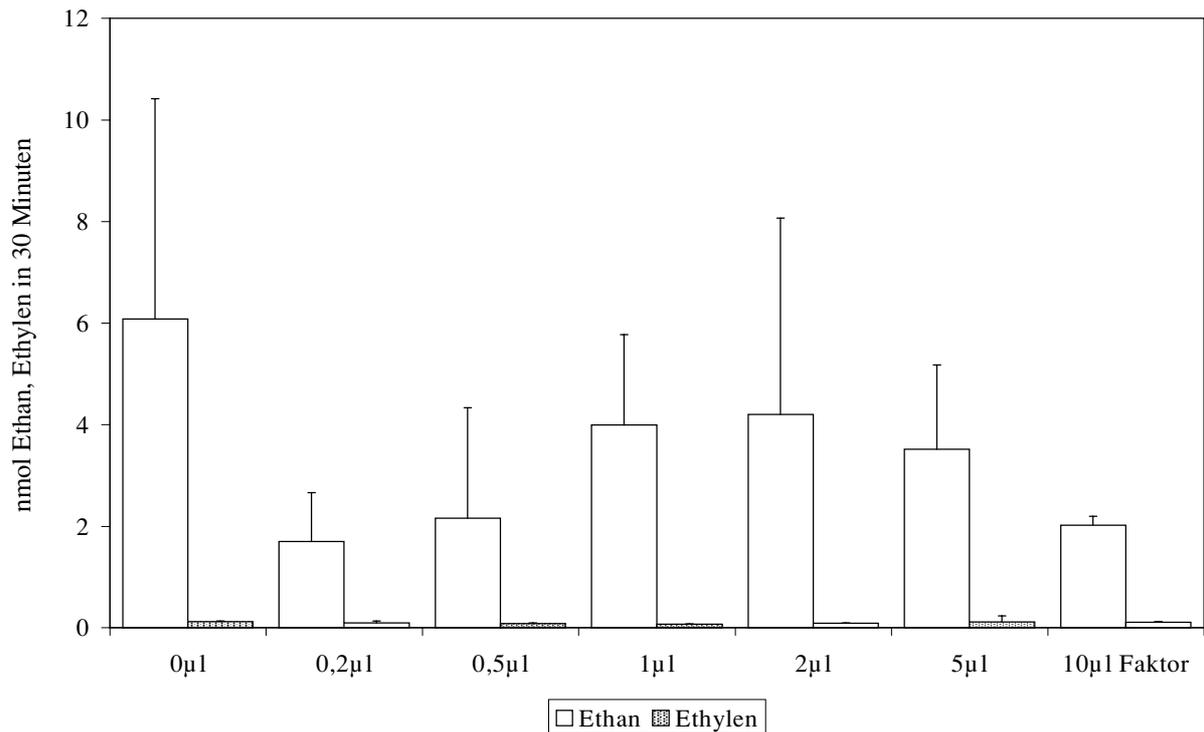


Abb. 41: Der Faktor in der Linolensäureoxidation ohne Kupfer

Ethan- und Ethylenbildung aus 3,55 mM α -Linolensäure nach Inkubation im Licht mit 20 μ M Rose Bengal in Gegenwart von verschiedenen Faktormengen und in Abwesenheit von Kupferionen. 1 μ l Faktor entspricht 1,51 OD₂₀₇ – units.

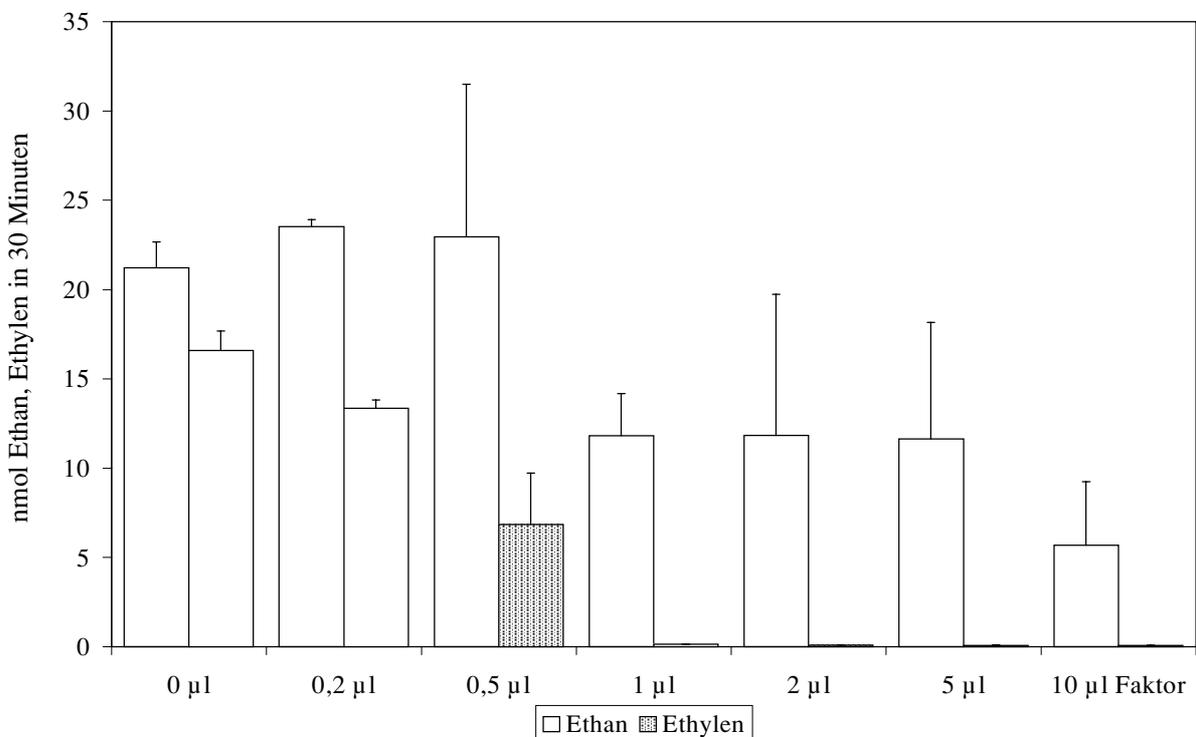


Abb. 42: Der Faktor in der Linolensäureoxidation mit Kupfer

Ethan- und Ethylenbildung aus 3,55 mM α -Linolensäure nach Inkubation im Licht mit 20 μ M Rose Bengal und 5 μ M CuSO₄ in Gegenwart von verschiedenen Faktormengen. 1 μ l Faktor entspricht 1,51 OD₂₀₇ – units.

3.4 Chemie des Faktors

3.4.1 Derivatisierung des Faktors mit Monobrombiman

Reduzierte Schwefelverbindungen können nach Derivatisierung mit Monobrombiman durch Fluoreszenzdetektion bei einer HPLC- Trennung identifiziert werden. Auch organische Schwefelverbindungen können auf diese Art nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob das Faktormolekül gebundenen Schwefel enthält, wurde es der Derivatisierung mit anschließender chromatographischer Trennung unterzogen. Die dabei maximal analysierbare Faktormenge war sehr gering, dennoch konnte der Faktor nach der HPLC- Trennung identifiziert werden. Parallel wurde die OD bei 280 nm aufgezeichnet. Die Chromatogramme sind in der Abbildung 43 zusammengefaßt. Die linke Y- Achse (schwarz) bezeichnet die 280 nm- Werte, die rechte Y- Achse (rot) die Fluoreszenz- Werte. Im Chromatogramm d zeigten sich nach der Derivatisierung des Faktors diverse Peaks. Die Bezeichnung der Peaks und die zugehörige Retentionszeit in Minuten sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Peak (Bezeichnung)	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	η	κ
Retentionszeit (min.)	1,23	1,87	2,43	5,32	6,03	10,47	12,13	13,43

Tab. 2: Retentionszeiten der im Derivatisierungsversuch auftretenden Substanzen

Der Peak α und der Doppelpeak β sind unspezifisch, sie treten in jedem Chromatogramm auf und sind auf Säuleneffekte zurückzuführen. Die Säule wies unter Umständen eine vom vorausgehenden Lauf gebundene Verunreinigung auf, die beim Start eines neuen Säulenlaufes über die Säule geschleppt wurde. Die Fluoreszenzpeaks η und κ sind auf das Derivatisierungsgemisch zurückzuführen. Sie treten deshalb nur in derivatisierten Proben auf (b und d). Nicht derivatisierte Proben weisen keine Fluoreszenzpeaks auf. Peak γ tritt nur in allen faktorhaltigen Proben auf (a, c und d). Da der Faktor bei 280 nm absorbiert und kein weiterer Peak vorhanden ist, der bei 280 nm absorbiert, ist anzunehmen, daß es sich bei diesem Peak um den Faktorpeak handelt. Nach der Derivatisierung des Faktors treten beim Fluoreszenzmonitoring die neuen Peaks δ , ϵ und ζ auf. Diese sind eindeutig durch Derivatisierung von in der Probe vorhandenen Substanzen bedingt. Diese Substanzen scheinen jedoch nicht mit dem Faktor identisch zu sein. Der Faktor in der derivatisierten Probe (d) verhält sich verglichen mit der nicht derivatisierten Probe (c) völlig identisch. Über dem Faktorpeak ist bei der Derivatisierung (d) kein Fluoreszenzpeak entstanden. Dies deutet darauf hin, daß der Faktor keine Bindungsstellen zur Derivatisierung, also keine reaktive Schwefelgruppe aufweist. Zwischen der 16. und 31. Minute, dem Zeitbereich, der hier nicht gezeigt wird, eluiert in den derivatisierten Proben (b und d) noch eine Gruppe teilweise sehr hoher Peaks, die durch das Derivatisierungsgemisch erzeugt werden.

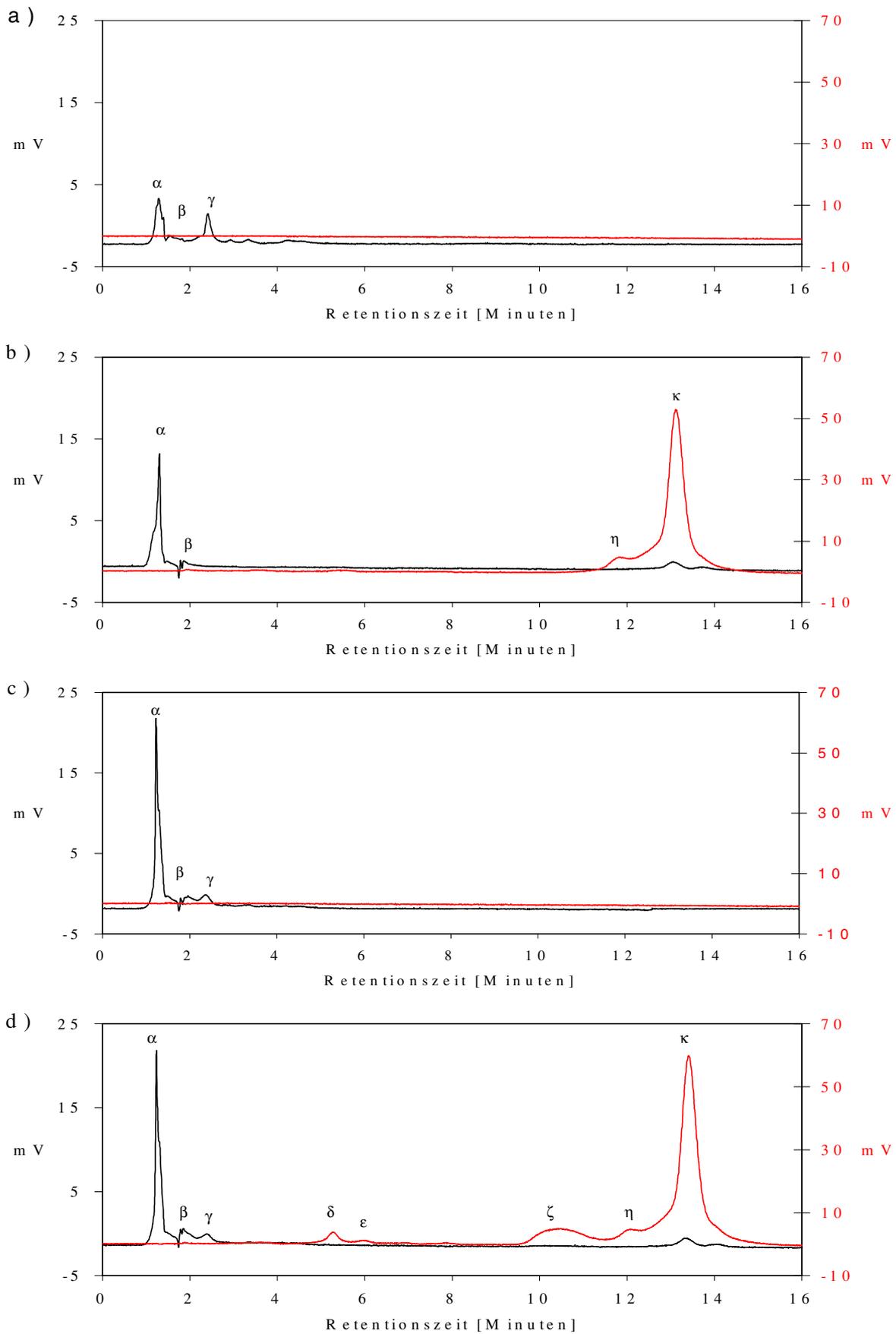


Abb. 43: Ausschnitte der Chromatogramme des Derivatisierungsversuches;

a) Faktor allein, b) Kontrolle ohne Faktor, c) Faktor, nicht derivatisiert, d) Faktor, derivatisiert

3.4.2 Der Faktor in der Dünnschichtchromatographie

Der Faktor läßt sich in der Dünnschichtchromatographie an einer HPTLC- Platte (Kieselgel 60 mit F 254 Fluoreszenzindikator, 10 cm x 10 cm) trennen. Die besten Ergebnisse wurden mit 70 % Isopropanol als Laufmittel erzielt. Diese Methode bringt jedoch einige Probleme mit sich: Zunächst wird der GR- Test durch das wässrige Eluat, das aus der Beschichtung der Platten gewonnen werden kann, beeinflußt. Als hierfür verantwortliche Komponente wurde zunächst der Fluoreszenzindikator F 254 ermittelt, der in bei 20 °C gesättigter, wässriger Lösung den Test zu 55 % hemmt. Ein Ausweichen auf Plattenmaterial ohne Fluoreszenzindikator bietet hier einen geeigneten Lösungsansatz. Weiterhin jedoch enthält das wässrige Eluat eine die Glutathionreduktase schützende Komponente, die auch in den Platten ohne Fluoreszenzindikator vorhanden ist. Dieser Effekt ist auf das Bindemittel zurückzuführen, das oftmals nach einem beendeten DC- Lauf als gelbliche Bande in der Nähe der Laufmittelfront sichtbar wird. Diese Substanz scheint ebenfalls Kupfer binden zu können, da sich, ähnlich wie beim Polymin P, in Anwesenheit von Kupfer (II)- Ionen ein grünlicher Komplex bildet, dessen Farbe als Mischfarbe von Blau und Gelb zu interpretieren ist. Folglich mußte die DC mit Platten durchgeführt werden, deren Schicht aus reinem Kieselgel besteht. Mit diesem Plattenmaterial konnten aus einem Faktorgemisch 2 unterschiedliche Faktorfraktionen getrennt werden, die sich in ihrem Rf- Wert und ihrer Bindungsfähigkeit für Zink (II)- Ionen unterscheiden. Die Abbildung 44 zeigt die Effekte beider Faktoren in GR- Tests unter Zugabe von Kupfer und Zink.

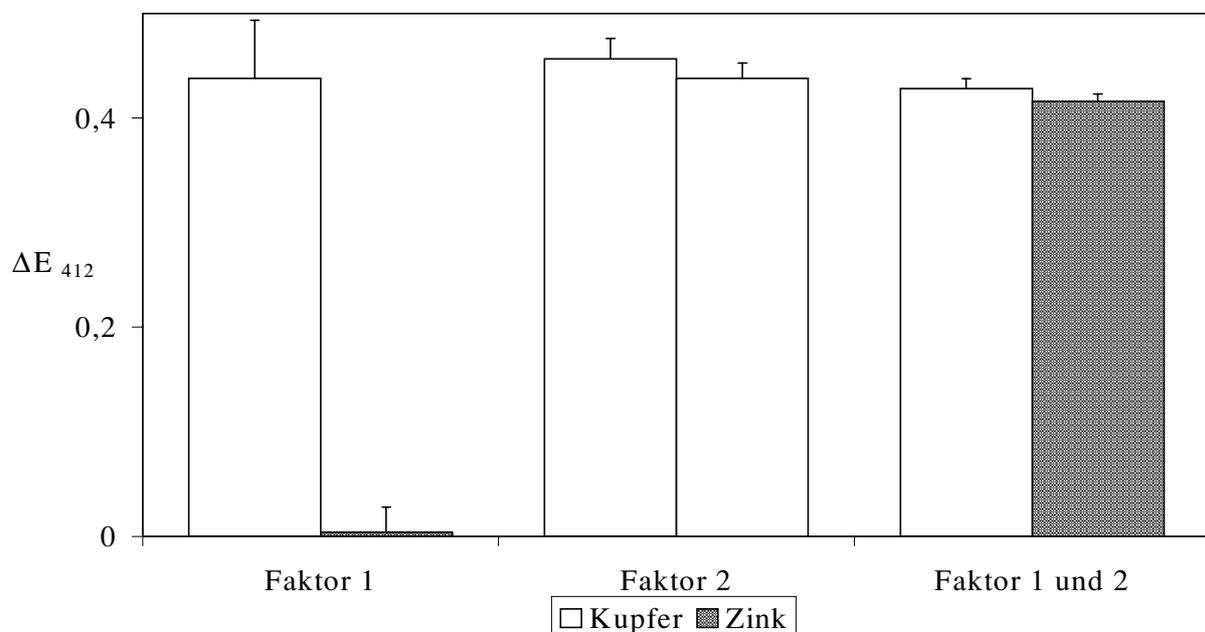


Abb. 44: Kupfer- und Zinkbindung zweier Faktorfraktionen

Zwei aus der DC eluierte Faktorfraktionen im GR- Standardtest (siehe Abschnitt 3.3.1.3) in Gegenwart von 100 μM ZnCl_2 oder 100 nM CuSO_4 . Die Faktoren wurden nicht quantifiziert.

Der Faktor 1, der einen Rf- Wert von 0,12 aufweist, ist in der Lage Kupfer zu binden, nicht aber Zink in einer Konzentration von 0,1 mM. Faktor 2, mit einem Rf- Wert von 0,22 bindet sowohl Kupfer wie auch Zink. Beide Faktoren gemeinsam binden erwartungsgemäß beide Metalle.

Beide Faktoren sind durch Färbung mit dem Gaitonde- Reagenz auf der Platte nachzuweisen. Die Färbung fällt allerdings sehr schwach aus, sie ist leicht gelblich- bräunlich, aber keineswegs kirschrot, wie bei Cystein oder leuchtend gelborange wie bei Glutathion. Manchmal fehlt sie ganz. Auch in Lösung ist der Faktor nicht durch Erhitzen im kochenden Wasserbad mit dem Gaitonde- Reagenz nachweisbar.

Inkubiert man Faktorlösung mit Kupfer, trennt das Gemisch dann an einer HPTLC- Platte mit 70 % Isopropanol, ist kein Metall in den Faktorbanden mit Dithizon oder Rubeanwasserstoff (Dithiooxamid) nachzuweisen. Anders verhält sich EDTA, hier kann das Metall als schwarze Bande mit Dithiooxamid nachgewiesen werden. Die Bindung des Metalls an den Faktor wird möglicherweise durch die denaturierenden Verhältnisse im Laufmittel verhindert.

3.4.3 Spektrum des Faktors

Das Spektrum entstammt einem HPLC- Säulenlauf einer aktiven Fraktion. Es wurde durch Monitoring eines Faktorpeaks unter Verwendung eines mit Laufmittel abgeglichenen Diodenarraydetektors erstellt. Es zeigt ein hohes Maximum bei 207 nm und eine breite Schulter mit einem Nebenpeak bei 220 nm. Die beiden Dreiecke markieren die bei der analytischen HPLC verfolgten Wellenlängen 220 nm und 280 nm. Es wird deutlich, daß die Empfindlichkeit des Nachweises noch um etwa den Faktor 2,5 gesteigert werden kann.

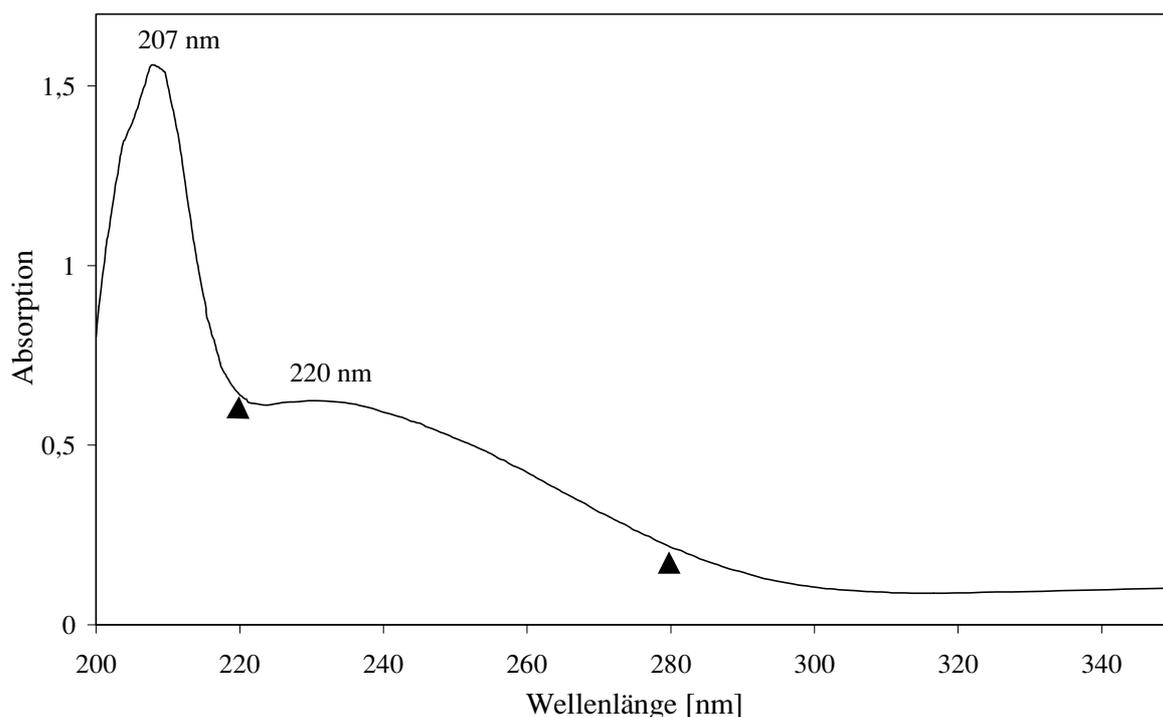


Abb. 45: Absorptionsspektrum des Faktors

3.5 Bildung des Faktors in Erbsenpflanzen

Die Bildung von Faktoraktivität während der Belichtung von etwa 15 cm hohen etiolierten Erbsenpflanzen wurde über 6 h untersucht. Blatt- und Wurzelextrakte wurden separat untersucht. Wie in der Abbildung 46 zu sehen ist, ist in der Wurzel die Faktoraktivität bereits vor dem Beginn der Belichtung (Bedingungen siehe Abschnitt 2.4.4) vorhanden. Im Blatt hingegen ist diese zunächst niedrig, steigt aber nach Aufhebung des Dunkelzustandes sehr schnell an. Der in dieser Reihe eingeklammerte 5h- Wert stellt möglicherweise ein Präparationsartefakt dar. Die Proteingehalte in der Wurzel betragen generell etwa ein Zehntel derer im Blatt. Dies bedeutet, daß das Verhältnis von Faktor/ Protein in der Wurzel wesentlich größer ist als im Blatt.

Weiterhin wurde die Entwicklung der Faktoraktivität im oberirdischen Anteil der etiolierten Pflanzen untersucht. Dazu wurden Sproß und Blatt gemeinsam verarbeitet. Gemessen wurde in diesem Fall nicht der direkt gewonnene, gekochte und volumenstandardisierte Rohextrakt, sondern das nach einem Tag daraus gewonnene Dialysewasser. Da die Dialyse eine hohen Fehler bedingt, wird kein kontinuierlicher Kurvenverlauf erkennbar, die Tendenzen werden durch die gestrichelte Linie verdeutlicht. Die Abbildung 47 zeigt, daß auch hier die Faktoraktivität erst nach Beginn der Belichtung ansteigt, zwischen 6 und 8 Stunden ein Maximum durchläuft um dann wieder abzufallen.

Betrachtet man die langfristige Entwicklung der Faktoraktivität an nicht etiolierten, sich also normal entwickelnden Erbsenpflanzen, stellt sich die Situation, speziell was die Faktorbildung in den Wurzeln anbetrifft, komplett anders dar. Das Ergebnis ist in der Abbildung 48 dargestellt. Hier wurde ebenfalls je 100 µl Dialysewasser getestet. Das Maß der Aktivität ist als % Faktoraktivität bestimmt, wobei 0 % die Aktivität des einfachen Testes (0- Wert), 100 % die des durch EDTA geschützten Testes darstellt. Der höchste Faktorgehalt ist zunächst in der Erbse selbst, also den Kotyledonen meßbar. Dieser bleibt relativ konstant erhalten, solange bis die Kotyledonen infolge der auftretenden Fäulnis nicht mehr analysierbar waren. Der Faktoraktivität in den oberirdischen Anteilen steigen in den ersten Tagen des Versuchszeitraumes stark an und erreicht ein Niveau von etwa 80 % über den gesamten Testzeitraum. Die Faktorentwicklung in der Wurzel nimmt einen extrem anderen Verlauf. Der Faktorgehalt unterscheidet sich zu Beginn des Versuches nicht von dem der oberirdischen Teile, er folgt aber nicht dem rapiden Anstieg, der dort zu beobachten ist, sondern nimmt nur sehr leicht zu, um nach etwa 2 Wochen wieder langsam abzunehmen. Es werden nur etwa 20 % des maximalen Schutzes erreicht. Nach knapp 2 Monaten bildeten die Pflanzen Blüten aus, deren Faktorgehalt ebenfalls getestet wurde. Für den Test wurden nur die weißen Blütenblätter, nicht aber die Kelchblätter verwendet. Die erreichte Schutzfunktion liegt in der Größenordnung, die auch bei den oberirdischen Teilen gefunden wurde, bei etwa 70 %.

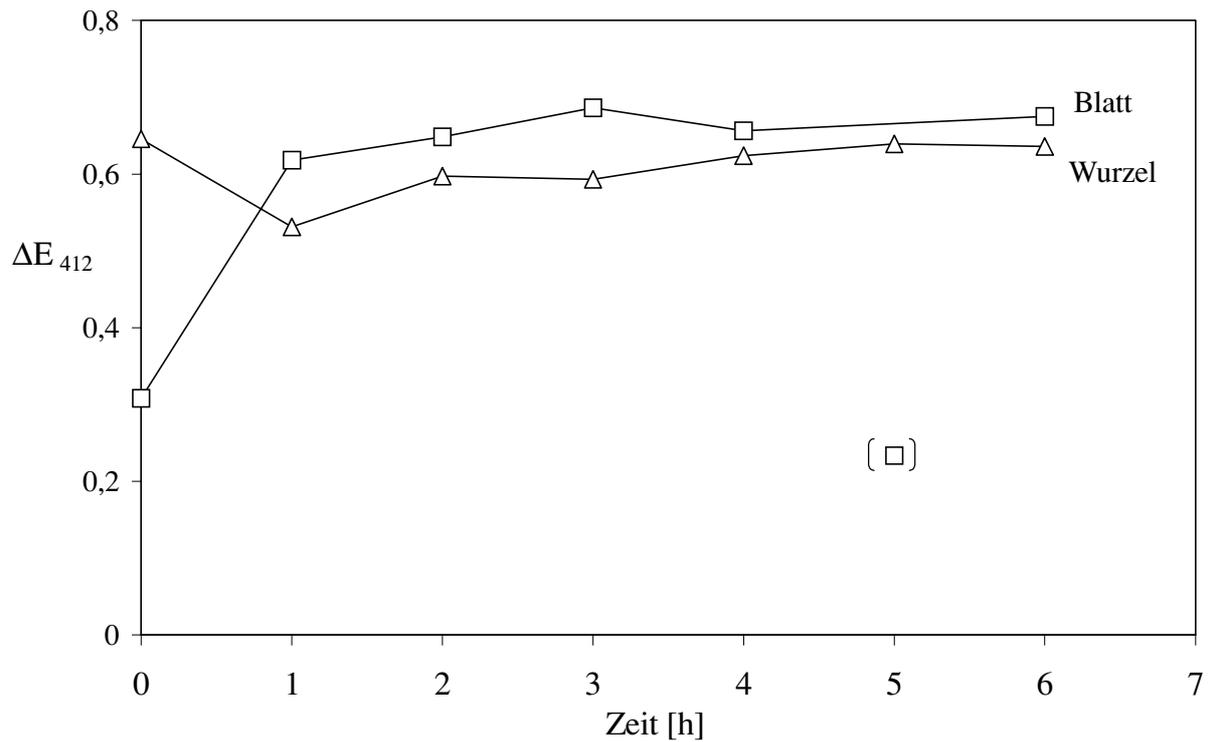


Abb. 46: Entwicklung der Faktoraktivität in Blatt und Wurzel etiolierter Erbsenpflanzen
Messung von gekochten, volumeneingestellten und abzentrifugierten Rohextrakten (je 100 μ l) im GR-Standardtest.

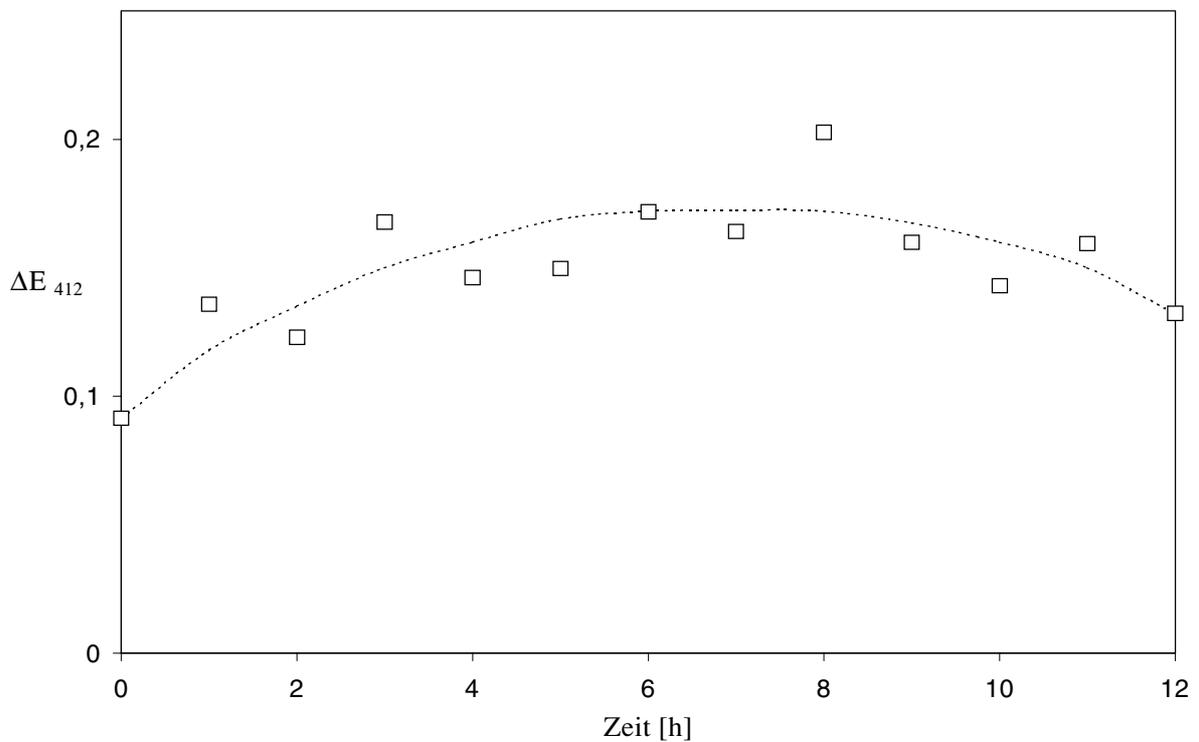


Abb. 47: Entwicklung der Faktoraktivität in den oberirdischen Teilen etiolierter Erbsenpflanzen
Messung von Dialysewasser (je 100 μ l) aus der Dialyse von gekochten, volumeneingestellten und abzentrifugierten Rohextrakten im GR-Standardtest.

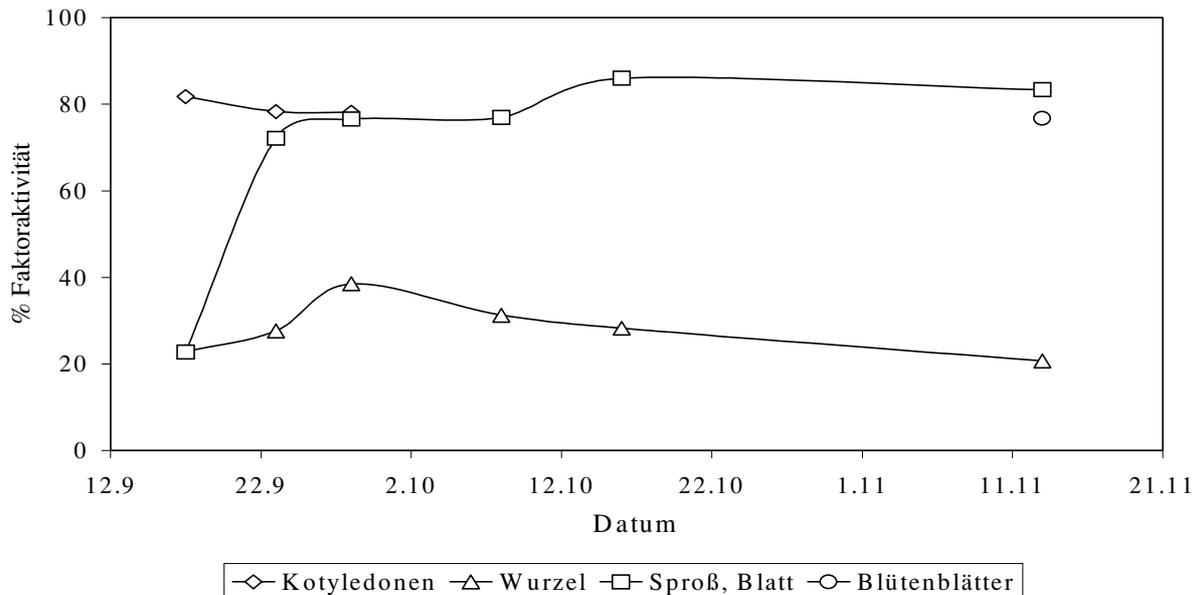


Abb. 48: Faktorbildung in der Erbse (Bedingungen siehe Abb. 47)

3.6 Vorkommen des Faktors im Pflanzenreich

Um herauszufinden, in welchen Pflanzen ebenfalls Faktoraktivität anzutreffen ist, wurde das Dialysewasser von gekochten Rohextrakten im GR- Standardtest eingesetzt. Um zu entscheiden, ob Faktoraktivität vorhanden ist, wurde die Linearität der Kinetik bestimmt. Dazu wurde die Anfangssteigung der ersten 5 Minuten mit der zwischen der 10. und 15. Minute auftretenden Steigung verglichen, indem der Quotient $\Delta E (5-0 \text{ Minuten}) / \Delta E (15-10 \text{ Minuten})$ errechnet wird. Bei einer vollkommen linearen Kinetik ist der Quotient 1, der des einfachen Tests liegt etwa bei 3. Ebenfalls kann die hemmende Wirkung anderer Inhaltsstoffe beurteilt werden, indem man den $\Delta E (5-0 \text{ Minuten})$ - Wert des einfachen Tests mit dem der Probe vergleicht. Ist der Probenwert sehr niedrig, etwa unter 0,1, kann keine zuverlässige Aussage mehr über die Faktoraktivität gemacht werden. Faktoraktivität wurde bei *Hypericum perforatum* (Johanniskraut), *Allium cepa*, *Arctium spec.* (Klette), *Rumex acetosa* (Sauerampfer), *Plantago major* (Wegerich), *Equisetum spec.* (Schachtelhalm) und *Allaria spec.* (Knoblauchsrauke) nachgewiesen. Bei *Zea mays* (Mais), *Conocephalum*, *Polytrichum*, *Urtica dioica* (Brennnessel), *Achillea spec.* (Schafgarbe), *Veronica spec.* (Ehrenpreis) und *Papaver rhoeas* (Klatschmohn) wurde der Faktoreffekt nicht sehr deutlich, möglicherweise durch hemmende oder den Test überlagernde Substanzen. Extrakte aus *Betula* (Birke), *Taraxacum officinale* (Löwenzahn), *Pteridium* (Adlerfarn), *Dryopteris* (Wurmfarn), *Potentilla* (Fingerkraut), *Oxalis* (Sauerklee), *Oreganum* (Dost) und *Scutellaria* (Helmkraut) hemmten den Test so stark, daß keine GR- Aktivität mehr nachweisbar war. Der Hemmstoffgehalt scheint während der Vegetationsperiode zuzunehmen. So war in Extrakten, die aus im späten Juli gesammelten Pflanzen angefertigt wurden, bedingt durch Überlagerungseffekte im Test, keine Faktoraktivitäten mehr meßbar. Bei *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) fehlte die Faktoraktivität ganz.

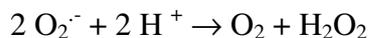
4 Diskussion

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können in jedem aerob lebenden Organismus durch Aktivierung in Form von Reduktion oder Übertragung von Anregungsenergie auf molekularen Sauerstoff entstehen. Atmosphärischer Sauerstoff liegt im Triplett- Zustand ($^3\text{O}_2$) vor. Obwohl er zwei ungepaarte Elektronen besitzt und somit ein Biradikal darstellt, ist er in dieser Form relativ reaktionsträge, da die beiden Elektronen parallelen Spin besitzen. Eine Reaktion mit einem vollbesetzten Atomorbital ist deshalb nicht möglich, weil die beiden Elektronen darin einen antiparallelen Spin aufweisen und somit bei einer Verbindung der Orbitale das Pauli- Prinzip nicht erfüllt werden kann. Wie bereits erwähnt kann molekularer Sauerstoff in einer Reihe von chemischen oder physikalischen Prozessen modifiziert werden, wobei sich seine Reaktivität drastisch verändern kann. Das Superoxidradikal O_2^- entsteht durch Übertragung eines einzelnen Elektrons von einem geeigneten Donator auf molekularen Sauerstoff $^3\text{O}_2$. Das Hydroxyperoxyradikal HOO^\cdot stellt die protonierte Form des Superoxidradikals dar. Durch weitere Reduktion des Superoxids, beispielsweise durch SOD-vermittelte Dismutation (und Protonierung) entsteht Wasserstoffperoxid H_2O_2 , eine relativ stabile Verbindung. Bei reduktiver Spaltung des Wasserstoffperoxides in einem ein- Elektron-Schritt, beispielsweise durch ein reduziertes Metall entstehen das Hydroxylanion HO^- und das Hydroxylradikal HO^\cdot . Letzteres ist hochreaktiv und hat eine sehr kurze Lebensdauer von wenigen Mikrosekunden. Ein ähnlich reaktives und kurzlebiges Molekül, der Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ entsteht beim Transfer von Anregungsenergie beispielsweise von einem photoaktivierenden Farbstoff auf $^3\text{O}_2$. Das Auftreten dieser ROS im zellulären Stoffwechsel ist normal und wird von einer Vielzahl von Komponenten hervorgerufen. Da die Aktivität der ROS, insbesondere der Hydroxylradikale und des Singulett-Sauerstoffes schädigende Wirkungen entfalten können, wird deren Bildung durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen auf niedrigem Niveau gehalten.

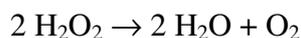
Die Bildungsorte in pflanzlichen Zellen befinden sich im Chloroplasten, in Mitochondrien, Peroxisomen, Glyoxysomen, ER, Plasmalemma und Zellwänden (ELSTNER und OSSWALD, 1994). In pflanzlichen Zellen wird der Chloroplast als Hauptbildungsort für ROS angesehen (ASADA, 1994, zitiert von FOYER et al., 1994), bedingt durch die physiologischen Eigenschaften dieses Organells, insbesondere der Energiewandlung vom Licht in chemische Energie und der damit verbundenen höheren Verfügbarkeit von Sauerstoff durch die Wasserspaltung. Die lichtgetriebene Elektronentransportkette beinhaltet mehrere Orte, an denen Sauerstoff aktiviert werden kann. Der größte Teil des Superoxides wird wahrscheinlich durch Ferredoxin gebildet (FURBANK und BADGER, 1983, zitiert von FOYER et al., 1994; ELSTNER und OSSWALD, 1994). Es existieren auch Mechanismen, die das PS II in die Bildung von ROS einbinden (ARO et al., 1993). Das PS II ist dafür

bekannt, unter bestimmten Bedingungen Singulett-Sauerstoff erzeugen zu können. Hierbei wird die Energie des durch Licht angeregten, sich im Triplettzustand befindlichen Chlorophylls auf Triplett-Sauerstoff übertragen. Aktivierter Sauerstoff steht unter der Kontrolle einer Reihe von Enzymen und anderer antioxidativ wirkender Komponenten. Singulett-Sauerstoff kann aufgrund seiner kurzen Lebensdauer nicht enzymatisch abgebaut werden, deshalb wird der Lichtsammelapparat durch Phosphorylierungsreaktionen reguliert, um die Entstehung von Triplett-Chlorophyll zu minimieren. Angeregtes Chlorophyll kann seine Energie auch in Form von Wärme abgeben. Einmal entstandener Singulett-Sauerstoff kann durch Quencher oder Scavenger wie beispielsweise β -Carotin, Phenole wie z.B. α -Tocopherol (Vitamin E) oder einige Alkaloide unschädlich gemacht werden (LARSON, 1988). Singulett-Sauerstoff bildet durch Addition an C-C-Doppelbindungen Hydroperoxide, an konjugierte Doppelbindungen Endoperoxide und kann, sofern sich benachbart zu einer C-C-Doppelbindung ein Elektronendonator wie N oder S befindet, ein Dioxetan bilden, das aufgrund seiner Instabilität in zwei Carbonylgruppen tragende Moleküle zerfällt (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989).

Entstandenes Superoxid kann im Chloroplasten durch die Superoxiddismutase (EC 1.15.1.1) nach folgender Reaktion zu O_2 und Wasserstoffperoxid H_2O_2 umgesetzt werden:



Wasserstoffperoxid ist eine recht langlebige Verbindung, ist demzufolge relativ unreaktiv im zellulären Milieu. Es kann jedoch -SH Gruppen enthaltende regulatorische Enzyme wie die Fructosebisdiphosphatase inaktivieren (KAISER, 1976; CHARLES und HALLIWELL, 1980) und über Phospholipidmembranen diffundieren (LAW et al., 1983). Es findet daher als Signalmolekül bei der Pathogenabwehr Verwendung (LEVINE et al., 1994). Das entstandene Wasserstoffperoxid kann dann auf mehreren Wegen weiter umgesetzt werden. Zum einen ist hier die Katalase (EC 1.11.1.6) zu nennen, ein lichtempfindliches Enzym (STREB et al., 1997; FOYER et al., 1994), das Wasserstoffperoxid zu Wasser und O_2 umsetzt:



Da Katalase im Chloroplasten nicht vorkommt (RENNENBERG, 1982; KALT-TORRES et al., 1984, FOSTER und HESS, 1980), ist sie nur in begrenztem Maße dazu befähigt, dort entstandenes Wasserstoffperoxid zu detoxifizieren, ihre Aufgabe besteht eher darin, im Rahmen der Photorespiration in den Peroxisomen durch die Aktivität der Glycolatoxidase-reaktion entstandenes Wasserstoffperoxid abzubauen (SMITH et al., 1985). Im Chloroplasten wird der überwiegende Anteil des Wasserstoffperoxides durch ein System aus Ascorbatperoxidase (AsPOD, EC 1.11.1.11), Dehydroascorbatreduktase (DHAR, EC

1.8.5.1), Monodehydroascorbatreduktase (MDHAR EC 1.6.5.4) und Glutathionreduktase (GR, EC 1.6.4.2) entgiftet. Dieses System existiert auch im Cytosol, möglicherweise auch in Mitochondrien, Glyoxysomen und Peroxysomen (NOCTOR et al., 1998). Die Ascorbatperoxidase, die es im Chloroplasten in einer frei im Stroma vorkommenden und einer membrangebundenen Form gibt, reduziert hierbei das H_2O_2 mittels Ascorbat zu Wasser, wobei Monodehydroascorbat (MDHA) entsteht. MDHA kann dann entweder durch Ferredoxin (Mehler- Peroxidase- Reaktion), oder durch die Monodehydroascorbatreduktase, die mit NAD(P)H arbeitet, wieder zu Ascorbat reduziert werden. Alternativ kann MDHA zu Ascorbat und Dehydroascorbat (DHA) disproportionieren. DHA wird dann durch die Dehydroascorbatreduktase auf Kosten von reduziertem Glutathion (GSH) zu Ascorbat reduziert. Das dabei entstehende oxidierte Glutathion (GSSG) wird dann durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase (GR) wieder reduziert (nach FOYER et al., 1994, NOCTOR et al., 1998) . Weiterhin können Peroxide durch eine Enzymgruppe abgebaut werden, die diese mittels verschiedener Substrate wie beispielsweise Thioredoxin (CHAE et al., 1994) reduzieren können. Es handelt sich um die Peroxidasen. Eine Enzymfamilie, die vor nicht allzulanger Zeit in Pflanzen gefunden wurde, sind die Glutathionperoxidasen (GPx oder GSHPx, EC 1.11.1.9). Diese, in manchen Fällen die seltene Aminosäure Selenocystein enthaltenden Enzyme können die Reduktion von H_2O_2 , organischen Hydroperoxiden und Lipid- Hydroperoxiden mit reduziertem Glutathion katalysieren. Ob dies ihre Aufgabe *in vivo* ist, ist bislang nicht geklärt (ESHDAT et al., 1997). Nur wenige Beispiele sind bereits charakterisiert, wie eine GSHPx aus Aloe vera, die selenhaltig ist (SABEH et al., 1993) oder eine Phospholipid- Hydroperoxid- Glutathion- Peroxidase (Cit- SAP) aus Citrus, bei der das Selenocystein durch Cystein ersetzt ist (BEEOR- TZAHAR et al., 1995). Dennoch häufen sich Berichte in denen cDNAs verschiedener pflanzlicher Peroxidasen identifiziert und beschrieben werden. So beschreiben SUGIMOTO et al. (1997) eine Sequenz, die eine Phospholipid- Hydroperoxid- Glutathionperoxidase aus Spinat codieren könnte. BAIER und DIETZ (1999) beschreiben andere Proteine, die die gleiche Reaktion, nämlich die Umsetzung von Alkylhydroperoxiden zu den homologen Alkoholen katalysieren, die Thioredoxin-abhängigen Peroxid- Reduktasen (Peroxiredoxine), deren Gensequenzen aus Spinat und Gerste bekannt sind (BAIER und DIETZ, 1996). Auch Glutathion- S- Transferasen zeigen zusätzlich zu ihrer GSH- Transferaseaktivität, die für die Entgiftung von beispielsweise Herbiziden wichtig ist, Glutathionperoxidaseaktivität (ESHDAT et al., 1997). Die Entgiftung von H_2O_2 und anderen Hydroperoxiden beweist ihre Wichtigkeit, wenn man beachtet, daß sie die Vorstufe von Hydroxylradikalen darstellen, die äußerst reaktiv sind und die Zerstörung von verschiedenen organischen Molekülen bewirken können. Sie gehen beispielsweise aus

einer Reaktion von einem reduzierten Übergangsmetall (Me) wie z.B. Fe²⁺ oder Cu⁺ mit H₂O₂ hervor (Fenton- Reaktion).



Hydroxylradikale reagieren mit organischen Molekülen entweder durch Wasserstoffabstraktion oder sie addieren an Doppelbindungen und erzeugen eine radikalische Kohlenstoffverbindung. Da Hydroxylradikale wie Singulett-Sauerstoff nur sehr kurzlebig sind und sofort mit in der Nähe befindlichen Komponenten reagieren, stehen sie nicht unter enzymatischer Kontrolle. Der durch HO[·] und ¹O₂ hervorgerufene Schaden läßt sich nur durch die Anwesenheit einer Anzahl niedermolekularer Substanzen vermindern. Hierzu gehören die Carotinoide und phenolische Komponenten wie z.B. Vitamin E, Flavonoide und Phenolsäuren. Auch stickstoffhaltige Substanzen wie Alkaloide, Chlorophyllderivate, Aminosäuren und Amine können beteiligt sein (LARSON, 1988). Viele dieser Substanzen wirken als Radikalfänger oder Quencher, Hemmstoffe für Enzyme, die freie Radikale bilden, oder als Komplexbildner (ELSTNER, 1990).

Sehr wichtig für die Vorbeugung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ist die ausgewogene Funktion der Elektronentransportkette. Diese ist jedoch nur gewährleistet, wenn ausreichend Elektronenakzeptoren in Form von NADP zur Verfügung stehen und die Photophosphorylierung abläuft. Diese Situation kann durch eine Vielzahl metabolischer Blockierungen beeinträchtigt werden. So resultiert beispielsweise ein Lichtüberschuß bei verhältnismäßig zu geringem CO₂- Angebot, beispielsweise durch geschlossene Stomata, aber auch eine Vielzahl anderer Faktoren in einem verminderten Verbrauch von NADPH im Calvin- Zyklus, was zu einer „Überreduktion“ der Komponenten der Elektronentransportkette führt (HIPPELI und ELSTNER, 1995). Dieser „Elektronenstau“ kann teilweise abgemildert werden, indem Elektronen vom Ferredoxin auf Sauerstoff übergehen (Mehler- Reaktion, pseudozyklischer Elektronentransport), das gebildete Superoxid wird dann durch die Superoxiddismutase zu H₂O₂ umgesetzt und über die Mehler- Peroxidase- Reaktion bzw. das Ascorbat- System entsorgt. Die Glutathionreduktase und Monodehydroascorbatreduktase, die über ihren NADPH- Verbrauch an den photosynthetischen Elektronentransport angekoppelt sind, regenerieren dann das Ascorbat. Ein weiterer Vorgang, der in diesem Zusammenhang als Abbauweg für überschüssige Reduktionsäquivalente angesehen werden kann, ist die Photorespiration (STREB et al., 1997). Bei diesem, durch die Oxigenaseaktivität der Ribulosebiphosphat- Carboxylase eingeleiteten Stoffwechselweg werden die überschüssigen Elektronen im Rahmen der Glycolatoxidase-reaktion ebenfalls auf Sauerstoff übertragen, was zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt, der durch die in den Peroxisomen vorhandene Katalase abgebaut werden kann. Schwere Störungen des Elektronenflusses führen

zu einer vermehrten Bildung von Singulett-Sauerstoff am PS II. Der für die Ladungstrennung benötigte Anregungszustand des Reaktionszentrums P 680 kann nicht schnell genug abgebaut werden, wenn kein reduzierter Primärakzeptor zur Verfügung steht. Die Anregungsenergie kann dann auf Triplett-Sauerstoff übertragen werden, wobei Singulett-Sauerstoff entsteht. Dieser kann in Folge wiederum das P 680 angreifen. Der schnelle Turnover des D1-Proteins im PS II-Komplex im Rahmen der Photoinhibition ist wahrscheinlich ebenfalls durch eine Inaktivierung durch $^1\text{O}_2$ bedingt (ARO et al., 1993).

Verschiedene Umwelteinflüsse wie hohe Lichtintensitäten oder UV-Strahlung, suboptimale Temperaturen, pH-Werte und Salzgehalte, übermäßiges Wasserangebot oder Trockenheit, Luftverschmutzung, Schwermetalle, und mechanische Einflüsse, aber auch künstlich hervorgerufene Zustände, z.B. Exposition der Pflanzen in O_2 - O_3 - H_2S - oder SO_2 -angereicherte oder CO_2 -armen Gasgemischen oder Behandlung der Pflanzen mit Herbiziden wie Dichlorphenyl-dimethylharnstoff (DCMU) oder Paraquat (Methylviologen) können, besonders in Kombination (FOYER et al., 1994; LUPI et al., 1998), die Pflanze in Stress-Situationen führen, die je nach Stärke, bei der Pflanze bis zum totalen metabolischen Verlust und zum Zelltod führen können. Stress geht in den meisten Fällen mit einem erhöhten Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies einher (ELSTNER et al., 1988; FOYER und HARBINSON, 1994, zitiert von FOYER et al., 1994; LAW et al., 1983). Dies kann auch der Fall sein, wenn die Pflanze von einem Pathogen befallen wird und Abwehrreaktionen zeigt (LEVINE et al., 1994; AUH und MURPHY, 1995). Die dahinterstehenden Mechanismen sind in weiten Bereichen ungeklärt. Die Antwort auf verschiedene Stressoren ist oftmals ähnlich, die Zelle antwortet in der Regel mit einer Erhöhung des antioxidativen Potentials in Form von Enzymen, und niedermolekularen, antioxidativ wirkenden Verbindungen (FOYER et al., 1997; SMITH et al., 1989; MCKERSIE et al., 1993; RAO et al., 1995; GAMBLE und BURKE, 1984; YE et al., 1997; SHARMA et al., 1996; PATRA und PANDA, 1998). Die Zusammensetzung der Einzelkomponenten jedoch scheint unterschiedlich und abhängig von der Stärke und Art des Stresses, der Pflanzensorte und dessen Toleranz zu sein. Der mögliche Stressor, der in dieser Arbeit diskutiert wird, ist der Einfluß von Metallen, im besonderen Kupfer und Zink auf die Pflanze im Hinblick auf die Eingliederung einer Substanz, Faktor genannt, in den Stoffwechsel sowie dessen Wirkungsweise. Der Faktor wird nach HÄUSL (1990) als die Aktivität definiert, die die Glutathionreduktase aus Hefe vor der Inaktivierung im GR-Assay schützen kann.

Zink ist ein essentielles Mikronährelement, dessen Mangel eine Wachstumshemmung, besonders der Blätter hervorruft (MENGEL, 1991). Es ist Bestandteil vieler Enzyme wie beispielsweise der Cu-Zn-SOD oder der Carboanhydrase und von Transkriptionsfaktoren. Zink tritt nur in der zweifach positiv geladenen Form auf und ist unter physiologischen

Bedingungen nicht zum Valenzwechsel befähigt. Deshalb kann es strukturstabilisierende Funktionen übernehmen, ohne unerwünschte Redoxprozessen hervorzurufen (BERG und SHI, 1996). Zink ist cytotoxisch, wenn es im Übermaß verabreicht wird, möglicherweise indem es durch Adsorption an Biomoleküle dessen Strukturen verändert oder andere funktionelle Metalle wie z.B. Eisen oder Magnesium verdrängt.

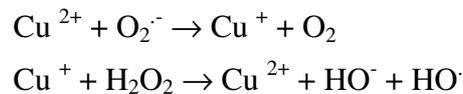
Kupfer ist ein essentielles Mikronährelement für Pflanzen dessen Mangel zu massiven Entwicklungsstörungen führt. In Blattzellen findet sich 60- 90% des Gesamtkupfers im Chloroplasten. (LOLKEMA und VOOIJS, 1986). Es ist Bestandteil einer ganzen Reihe redoxaktiver Komponenten im Zellstoffwechsel. Die wahrscheinlich wichtigsten sind die Cytochrom c- Oxidase (EC 1.9.2.1) der Mitochondrien, das Plastocyanin, das in der Elektronentransportkette des Chloroplasten den Elektronentransfer vom Cytochrom b/f-Komplex zum Photosystem II übernimmt, die Phenoloxidasen und die Cu-Zn-SOD. Kupfer nimmt generellen Einfluß auf die Lipidzusammensetzung bezüglich des Sättigungsgrades der Fettsäurereste in der Chloroplastenmembran und bewirkt in geringen Mengen die Bereitstellung einer geeigneten Lipidumgebung für die Anlagerung von Plastochinon an das PS II (DROPPA und HORVÁTH, 1990). Die Beteiligung von Kupfer als Bestandteil des Photosystems II ist kontrovers (BARON et al., 1995). Ein Übermaß an dieses Metalls kann jedoch zu Zellschädigungen beruhend auf der Inhibition einer Reihe von Stoffwechselfvorgängen durch oxidative Vorgänge führen.

Ziele für die Kupferwirkung sind vornehmlich Membranen, Enzyme und Nukleinsäuren. OUARITI et al. (1997) dokumentieren durch Cadmium und Kupfer hervorgerufene Veränderungen der Lipidkomposition sowie Lipidverluste in Primärblättern und Wurzeln von Tomatenpflanzen und postulieren durch diese Metalle bedingte, erhöhte Abbauraten für Lipide. Kupfer zeigte dabei stärkere Effekte als Cadmium. In Hartweizen (CISCATO et al., 1997) und Reis (LIDON et al., 1993) wurden nach erhöhtem Kupferangebot in der Kulturlösung Strukturveränderungen in den Grana- Stapeln des Chloroplasten in Kombination mit verringerten Photosyntheseraten beschrieben, der Reis wurde chlorotisch. WECKX und CLIJSTERS (1996) beschreiben eine höhere Permeabilität der Cytoplasmamembran für Kaliumionen in *Phaseolus vulgaris*. Kupfer inhibiert den photosynthetischen Elektronentransport. Wahrscheinlich verändert es u.a. die Donorseite des PS II und unterbindet somit den Elektronentransport vom Tyr_z, einem redoxaktiven Tyrosinrest am D1-Protein, zum P 680 innerhalb des Komplexes (BARON et al., 1995). Die Akzeptorseite des PS II scheint ebenfalls durch Kupfer blockiert zu werden (BASZYNSKI et al., 1982). Auch das PS I scheint einer Hemmung durch Kupfer auf der Ebene des Ferredoxins zu unterliegen und somit die Reduktion von O₂ voranzutreiben (DROPPA und HORVÁTH, 1990; ASADA

und BADGER, 1984). Weitere Störungen des photosynthetischen Elektronentransportes resultieren aus der verstärkt auftretenden Lipidperoxidation in den Thylakoiden. Es handelt sich hierbei um eine radikalische Kettenreaktion, die durch mehrere Faktoren initiiert werden kann. Zunächst kann sie durch eine durch Cadmium (SOMASHEKARAI AH et al., 1992) oder Kupfer stimulierten Lipoxygenase (LOX, EC 1.13.11.12), die durch ihre Aktivität Peroxy-, Alkoxy- und Hydroxylradikale erzeugt (OUARITI et al., 1997), gestartet werden. Auch die Aktivität von Kupferionen in einer von der Aktivität der LOX unabhängigen Reaktion (WECKX und CLIJSTERS, 1996; MAZHOUDI et al., 1997) oder Radikale anderer Herkunft, z.B. photodynamisch erzeugt, können die Kettenreaktion initiieren. Der Prozeß beginnt mit einer Wasserstoffabstraktion von einer CH₂-Gruppe des Fettsäureanteils des Moleküls durch ein Radikal. Dadurch entsteht ein Kohlenstoffradikal. Sollten die beiden benachbarten C- Atome C-C- Doppelbindungen tragen, wie das in mehrfach ungesättigten Fettsäuren oftmals der Fall ist, kommt es durch eine intramolekulare Umlagerung zur Bildung eines konjugierten Dienes mit Verschiebung des Radikalzentrums. Das Radikal reagiert weiter unter Aufnahme von O₂. Das dadurch entstandene Peroxylradikal kann nun eine weitere Wasserstoffabstraktion von einem anderen Fettsäurerest vornehmen. In Gegenwart von Übergangsmetallen können sich die Lipidperoxide zersetzen (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989). Lipidperoxidation kann auch von Singulett-Sauerstoff ausgehen (KNOX und DODGE, 1985, zitiert von HIPPELI und ELSTNER 1995). Membranreparierende Enzyme wie Phospholipasen und Glutathionperoxidasen können den Prozeß durch Abbau der Alkylhydroperoxide vermindern. Als Folgeerscheinung der Lipidperoxidation kommt es zur Zerstörung der Pigmente, die mit deren Entfärbung einhergeht (ELSTNER und OSSWALD, 1994), was Chlorose zur Folge hat. Möglicherweise ist die Chlorose auch auf die Hemmung einiger an der Pigmentsynthese beteiligter Enzyme durch Kupfer zurückzuführen (DROPPA und HORVATH, 1990), ähnlich wie für Cadmium beschrieben (SOMASHEKARAI AH et al., 1992).

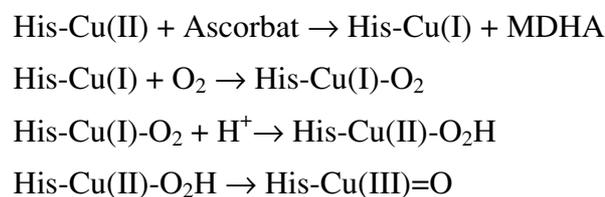
Enzyme können ebenfalls durch die Anwesenheit von Kupferionen gehemmt, ja sogar irreversibel zerstört werden. So wird möglicherweise der Calvin- Zyklus durch Kupfer inhibiert (MAKSYMIEC et al., 1994; CISCATO et al., 1997; LIDON et al., 1993; DROPPA und HORVÁTH, 1990). KANE et al. (1998) beschreiben die kupferbedingte Oxidation von Ribulose- Bisphosphat zu Pentodiulose- Bisphosphat, einem potenten Hemmstoff der Ribulosebisphosphat- Carboxylase mit möglicher physiologischer Bedeutung. Auch zahlreiche Enzyme aus anderen Bereichen des Stoffwechsels werden durch Kupfer beeinträchtigt (FUCCI et al., 1983). Oftmals sind Oxidationsvorgänge an der Inaktivierung

beteiligt. So kann Kupfer durch Superoxid reduziert werden, und anschließend Wasserstoffperoxid spalten (kupferkatalysierte Haber- Weiss- Reaktion)



Bei dieser Reaktion, die auf Fentonchemie basiert, entsteht das hochreaktive Hydroxylradikal. Das Kupfer wirkt dabei wie ein Katalysator. Diese Reaktion ist in biologischen Systemen unwahrscheinlich (SANDMANN und BÖGER, 1980). Alternativ zum Superoxid können jedoch auch andere Reduktionsmittel wie Ascorbat das Kupferion reduzieren (SAMUNI et al., 1983). Ascorbat ist im Chloroplasten in millimolaren Konzentrationen vorhanden und dient als Substrat der Ascorbatperoxidase bei der Detoxifikation. Dieser Reaktionstyp erhält aber erst seine besondere Brisanz, wenn das Kupferion in gebundener Form am Metall vorliegt. Da das Hydroxylradikal nur eine sehr kurze Lebensdauer besitzt, kann es keine langen Wege zurücklegen. Befindet es sich aber direkt am Wirkort, ist eine Reaktion mit in der Nähe befindlichen Gruppen wahrscheinlich. Diese „site specific“ Reaktionen bewirken oftmals sehr spezifische Veränderungen an den Proteinmolekülen. Viele der auftretenden Metallinaktivierungen werden auf diese Art interpretiert. Auffällig ist, daß bei Anwesenheit von freien Cu- Ionen die Schutzfunktion von Ascorbat ins Gegenteil verkehrt werden kann (SAMUNI et al., 1983).

Auch andere Mechanismen für die Oxidation von Aminosäureresten durch Kupfer werden diskutiert: UCHIDA und KAWAKISHI (1990) schlagen für Histidinreste in dem Peptid Angiotensin I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) einen Mechanismus vor, der ohne die Bildung von Hydroxylradikalen unter Auftreten eines Oxokupfer(III)- Komplexes abläuft. Folgende Reaktionssequenz wird beschrieben (verändert nach UCHIDA und KAWAKISHI, 1990):



Die Kupfer(III)- Verbindung bildet dann ein azaoxometallacyklisches Intermediat, aus dem das Kupfer dann in monovalenter Form entlassen wird. Anschließend kommt es zur Ausbildung einer 2-Imidazolstruktur. Die Reaktion ist nicht abhängig von intermediär gebildetem H_2O_2 , wie für die nach dem Fentonmechanismus ablaufende, metallkatalysierte Oxidation postuliert (STADTMAN, 1990b) und kommt ohne die Bildung des Hydroxylradikals aus, was die Unwirksamkeit von Radikalfängern wie Mannitol plausibel

macht. Radikalfänger zeigen sich in intermediär H_2O_2 bildenden „site specific reactions“ vom Fenton-Typ ebenfalls oft ohne Einfluß, was häufig durch die Nähe von Bildungs- und Reaktionsort der entstehenden Hydroxylradikale erklärt wird. Das Imidazololprodukt wurde nicht gebildet, wenn Angiotensin I mit Fentons Reagenz ($FeSO_4/H_2O_2$) oxidiert wurde. Das System Ascorbat/ $Cu(II)/O_2$ kann offenbar in anderen Testsystemen auch H_2O_2 - abhängige und somit durch Katalase hemmbare Reaktionen hervorrufen (STADTMAN, 1990b), sodaß zu vermuten ist, daß der „zur Anwendung kommende“ Reaktionsmechanismus auch vom vorgefundenen Substrat abhängig ist, was wiederum die Frage eröffnet, ob noch andere Reaktionsmechanismen metallkatalysierter Reaktionen existieren. Dies scheint der Fall zu sein: HANNA und MASON (1992) berichten von „site specific“ Reaktionen von $Cu(I)$ und H_2O_2 , die über eine $Cu(III)$ - Zwischenstufe ablaufen sollen. KARLSTRÖM und LEVINE (1991) beschrieben die Inaktivierung der Protease des HIV I durch Kupfer oder Quecksilber unter anoxigenen Verhältnissen durch einen nicht näher charakterisierten Mechanismus. Dabei waren die Anwesenheit zweier Cysteinreste oder DTT essentiell. Die Autoren spekulierten, daß die Dimerstruktur des Enzymes zerstört und die DTT- vermittelte Hemmung durch ein DTT- Kupfer- Chelat oder Thiylradikal hervorgerufen werden könnte.

Eine weitere, durch Kupfer zu beeinträchtigende Molekülklasse sind die Nucleinsäuren. Kupfer ist in den Chromosomen vorhanden (UEDA et al., 1998) und bindet an DNA (GEIERSTANGER et al., 1991). Es kann Basenveränderungen und Strangbrüche hervorrufen (TKESHELASHVILI et al., 1991). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, daß einige niedermolekulare Kupferkomplexe in Kombination mit einem Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure oder Glutathion DNA- Stränge schneiden können (UEDA et al., 1998). Auch REED und DOUGLAS (1991) beschreiben DNA- Strangbrüche und Basenmodifikationen, die an Plasmid- DNA durch Kupferkonzentrationen von $1 \mu M$ und GSH in einer dosisabhängigen Weise hervorgerufen werden. Auch Kupfer in Verbindung mit H_2O_2 zeigte diesen Effekt. Thiole allein können ebenfalls Strangbrüche hervorrufen, allerdings in millimolaren oder höheren Konzentrationen (REED und DOUGLAS, 1991). Möglicherweise hat auch Sulfid ähnliche Wirkung. Vorausgesetzt, diese beschriebenen Phänomene hätten physiologische Bedeutsamkeit, könnten auch für das Glutathion ähnlich wie beim Ascorbat cytotoxische Aspekte diskutiert werden, in der Weise, daß Kupfer in der Lage zu sein scheint, die Bedeutung dieser Substanzen von in der Zellentgiftung unentbehrlichen Substanzen zu Zellgiften zu modulieren.

In Anbetracht der Bedeutsamkeit, aber auch der Schädlichkeit des Kupfers für den Organismus, scheint es unwahrscheinlich, daß die mit Kupfer zusammenhängenden Vorgänge nicht unter sorgsamer Kontrolle stehen. Ähnlich sollte in der Zelle mit anderen essentiellen Schwermetallen wie Eisen oder Zink umgegangen werden, obwohl letztgenanntes offenbar

keine Schäden durch Redoxprozesse hervorruft. Versuche, in denen Pflanzen einem Überangebot von Schwermetallen ausgesetzt werden, sollen Aufschluß darüber geben, welche Elemente des Stoffwechsels darauf reagieren. Oft finden sich zahlreiche Enzyme, die bei der Detoxifikation von ROS eine Rolle spielen in erhöhtem Maße wieder. In *Phaseolus vulgaris* wurden erhöhte Aktivitäten von Katalase und Ascorbatperoxidase, nicht aber SOD durch Kupfer induziert (WECKX und CLIJSTERS, 1996). Andere Autoren kommen aber zu anderen Ergebnissen (MAZHOU DI et al., 1997), sie fanden bei Tomaten Katalaseaktivität unverändert in Blättern und Sproß, aber verringert in Wurzeln, Ascorbatperoxidase unverändert in Wurzel und Sproß, verringert aber in Blättern und erhöhte Guajacolperoxidaseaktivität in Wurzel und Sproß. Dies macht deutlich, daß generalisierte Aussagen nicht leicht zu treffen sind, da verschiedene Pflanzen offenbar auch verschiedene Strategien verfolgen, um die Kupferbelastung gering zu halten. Solche Untersuchungen sind allerdings weniger dazu geeignet, den Umgang der pflanzlichen Zelle oder des Organismus mit Zink oder Kupfer unter normalen metabolischen Bedingungen zu betrachten. Hierzu ist nahezu nichts bekannt.

4.1 Die Effekte des Faktors in verschiedenen Testsystemen

Die Wirkung des Faktors wurde im Rahmen dieser Arbeit in mehreren physiologisch relevanten Testsystemen demonstriert. Gemeinsam waren allen die Abhängigkeit von Kupferionen. Die Aufhebung der durch Kupfer hervorgerufenen Hemmung der Glutathionreduktase aus Hefe und der Glutaminsynthetase aus Spinat konnte gezeigt werden. Die Glutathionreduktase aus Hefe wird durch die Anwesenheit von Kupfer- oder Zinkionen gehemmt. Auch eine Redoxinterkonversion mit damit verbundener Inaktivierung, die durch NADPH an der GSSG- Bindungsstelle hervorgerufen wird, ist bekannt (PINTO et al., 1985). Die Kupferhemmung des Hefeenzymes wurde von RAFTER (1982) als reversiblen, durch EDTA zu verhindernden Prozeß beschrieben. Die Hemmung konnte ebenfalls durch Disulfide wie Ellman's Reagenz (DTNB) und Nicotinat- Disulfid teilweise rückgängig gemacht werden, nicht aber durch GSSG in einer Konzentration von 9 mM. Das kupfergehemmte Enzym zeigte erhöhte Diaphoraseaktivität. Als Hemmechanismus wurde die Bindung von Cu (II) an zwei an der Glutathionbindestelle des aktiven Zentrums befindlichen Cysteinreste vorgeschlagen, die den Elektronenfluß vom NADPH zum Redoxfarbstoff Dichlorphenolindophenol (Diaphoraseaktivität) erleichtert (RAFTER,1982). HÄUSL (1990) fand, daß das Enzym in diesem Zustand noch weiter inaktiviert werden kann. Die Anwesenheit von ROS- erzeugenden Komponenten führen zu einer irreversiblen Hemmung, wahrscheinlich durch eine umgebungsspezifische Fenton- Reaktion. Da in dieser Arbeit auf deren Zugabe verzichtet wurde, kann man davon ausgehen, daß hier primär die reversible

Hemmung anzutreffen ist. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Hemmung der GR auch unter verminderter Sauerstoffverfügbarkeit, die eine Aktivierung von gelöstem O₂ unwahrscheinlich macht, zu beobachten war. Die Hemmung der GR zeigte sich im Test mit, wie auch ohne Ellman's Reagenz oder NADP- reduzierendem System (G-6-P, G6PDH, NADP) sodaß die GR als tatsächliche kupferempfindliche Testkomponente identifiziert wurde. Die Hemmung zeigte sich auch ohne daß Kupferionen in Form von Salzen zum Test zugesetzt wurden. Die für die Inaktivierung verantwortlichen Ionen entstammten möglicherweise dem verwendeten Tris-Puffer (also der Tris- Puffersubstanz oder der zum Einstellen verwendeten Salzsäure). Phosphatpuffer zeigte eine geringere zeitlich fortschreitende Inaktivierung, also eine lineare Kinetik, aber eine Reaktionsgeschwindigkeit, die in etwa der mit Tris- Puffer entspricht und deutlich unter der der geschützten GR liegt. Das verwendete Wasser zeigte nur geringen Effekt auf die Inaktivierung.

Die gefundenen K_i- Werte für Cu finden keine Übereinstimmung mit den bei HÄUSL (1990) und RAFTER (1982) angegebenen Werten. RAFTER gibt einen Wert von 1 µM an, HÄUSL 0,12 µM (= 120 nM). Letzterem steht hier größenordnungsmäßig ein etwa 10- fach geringerer K_i- Wert von 17,9 nM gegenüber. Möglicherweise ist dies durch die unterschiedlichen Testsysteme bedingt. RAFTER benutzte ein Tris- gepuffertes, DTNB- unabhängiges System mit sehr hohen GSSG- Konzentrationen (3 mM), HÄUSL ein phosphatgepuffertes System mit mehr Glucose-6-Phosphat (Faktor 5), weniger GSSG (Faktor 2) und mehr Glutathionreduktase (etwa Faktor 10) jeweils verglichen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Test, bei sonst ähnlichen Bedingungen. Die große Diskrepanz bei der GR-Menge bei etwa gleichen Kurvenverläufen deutet an, daß der Test möglicherweise nicht optimal ausbalanciert war und scheint der Grund für die unterschiedlichen K_i- Werte zu sein. Kinetische Daten, die mit dem DTNB enthaltenden Test erhalten wurden, sollten mit einiger Vorsicht behandelt werden, da bei der Reaktion von GSH mit DTNB das gemischte Disulfid GS-TNB entstehen kann, das ebenfalls als Substrat der GR dienen kann, aber hierzu eine andere Affinität als GSSG aufweist (SMITH et al., 1989). Berücksichtigt man nun noch reaktivierende Effekte von DTNB (RAFTER, 1982) oder möglicherweise GS-TNB, sowie mögliche metallbindende Effekte dieser Substanzen, die Kupferionen an das aktive Zentrum transportieren könnten, wird die Situation völlig unüberschaubar. Daß das Zusammenspiel der am Test beteiligten Substanzen und der getesteten Zusätze nicht simpel zu sein scheint und nicht alle ablaufenden Reaktionen detailliert bekannt sind wird auch deutlich wenn man sieht, wie unter verminderter Sauerstoffverfügbarkeit, entgegen allen Erwartungen, die meßbare Aktivität abnimmt, oder wie durch Anwesenheit von Bathocuproindisulfonsäure die Reduktion von Kupfer durch NADPH vorangetrieben wird. Trotzdem ist der GR- Test das geeigneteste System um den Faktor in Säulenpräparationen zu identifizieren, wenn man nicht

auf genaue Aktivitätsbestimmungen angewiesen ist. Hier ist das Testsystem aufgrund der hohen Empfindlichkeit der GR und den damit verbundenen sehr geringen Kupferkonzentrationen sehr schnell faktorergesättigt. Ein etwas besseres Bild macht diesbezüglich der Glutaminsynthetaseassay, da die GS weniger empfindlich auf Kupfer reagiert. Der Test läuft im Rahmen einer Säulentestung nicht so schnell in den Bereich, wo keine differenzierte Antwort mehr möglich ist, läßt also eher eine Quantifizierung zu. Der empfindlichste Test für die Faktorwirkung ist die LDL- Oxidation. Diese hat allerdings den Nachteil, daß sie recht lange dauert und große Mengen an LDL verbraucht und somit als Schnelltest für Säulenpräparationen ungeeignet ist.

Auch Zink konnte die Hefe- GR inaktivieren, allerdings in wesentlich höheren Konzentrationen. Der K_i - Wert liegt bei 10 μM . Zinkinaktivierungen sind beispielsweise für das Enzym aus Erbsenwurzeln beschrieben (BIELAWSKI und JOY, 1986b). Auch das Spinatenzym ist empfindlich gegenüber Zink (HALLIWELL und FOYER, 1978). 0,2 mM ZnSO_4 hemmen das Enzym vollständig, die Hemmung konnte jedoch bei Anwesenheit von GSSG, nicht aber NADPH (0,2 mM) fast vollständig aufgehoben werden. Das aktive Zentrum stellt vermutlich mit Cysteinen und Histidin ebenfalls für Zink eine geeignete Bindestelle dar, was die Zinkhemmung trotz der fixierten Oxidationsstufe des Metallions plausibel macht.

Eine Reihe von Komplexatoren wie EDTA, Bathocuproindisulfonsäure (BCS), Bis-Salicyloyl- Hydrazin (BSH) und Polymin P, ein langkettiges, Aminogruppen tragendes Molekül, konnten alle die zeitlich fortschreitenden Inhibition der Hefe- GR verhindern. Hierbei stellte sich heraus, daß im überwiegendem Maße tatsächlich Kupfer das für die Inaktivierung verantwortliche Element ist, da Bathocuproindisulfonsäure ausschließlich Cu(I) bindet und Bis- Salicyloyl- Hydrazin spezifisch für Cu(II) ist. Polymin P entfaltete hierbei die größte Schutzwirkung. Ein interessanter Effekt zeigte sich beim Einsatz von BCS. Es entfaltete eine hemmende Wirkung auf die GR, die mit steigender Cu(II)- Konzentration aufgehoben werden konnte. Offenbar beschränkt sich der hemmende Einfluß nur auf das freie BCS, der Cu-BCS- Komplex verhält sich dagegen indifferent.

Der Faktor kann, ebenso wie die Komplexatoren, die GR vor der Inaktivierung schützen. Dabei ist es egal, ob er im Test mit oder ohne Ellman's Reagenz und NADP- reduzierendem System eingesetzt wird. Er verhält sich in diesem Testsystem wie die anderen Komplexatoren, am ehesten vergleichbar mit EDTA.

Die Hemmung von Glutathionreduktase durch Kupfer und Zink scheint eine recht weit verbreitete Erscheinung zu sein. Ob sie jedoch *in vivo* Bedeutung besitzt, ist nicht bekannt. Einerseits sind die Metallkonzentrationen, die zu einer Hemmung führen können, sehr niedrig, andererseits ist GR- Aktivität im Chloroplasten hoch (HALLIWELL und FOYER, 1978). Weiterhin kann es möglich sein, daß, wie das Beispiel Erbse zeigt (BIELAWSKI und

JOY, 1986b), chloroplastidäre Isoenzyme mit geringerer Empfindlichkeit anzutreffen sind. Die Glutathionreduktase ist ein wichtiges Enzym, das, wie bereits erwähnt, seine Aufgabe in der Aufrechterhaltung eines hohen GSH/GSSG- Verhältnisses hat, denn ein hohes GSH/GSSG- Verhältnis ist wichtig für die H_2O_2 - Entgiftung durch das Ascorbatperoxidase-System, obwohl hier die Bedeutung der GR in gewissem Maße durch die Aktivität der MDHAR oder der Mehler- Peroxidase- Reaktion in Abrede gestellt werden könnte.

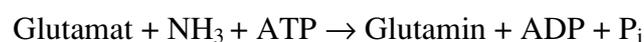
Hohe GSSG- Gehalte vermindern die Aktivität vieler thiolgesteuerter Enzyme, wie z.B. die der Fructosebiphosphatase oder der Seduheptulose-1-7-bisphosphatase (WOLOSIUK und BUCHANAN, 1977). Sie unterliegen einer Regulation von GSSG und Thioredoxin, die unterschiedliche Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Belichtungssituation hervorrufen sollen. Andererseits könnte ein hohes GSH/GSSG- Verhältnis in der Dunkelheit durch die Aktivität von z.B. der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (FOYER und HALLIWELL, 1976), die die GR mit NADPH versorgt, aufrecht erhalten werden, was eine derartige Regulation in Frage stellen könnte (RENNENBERG; 1982). Am Beispiel von isolierten Spinachchloroplasten wurde gezeigt, daß es im Licht wie im Dunklen zu keinen Veränderungen GSH/GSSG- Verhältnisses kommt (LAW et al., 1983). Dennoch sind bei einem Abfall des GSH/GSSG- Verhältnisses, etwa stressbedingt, Situationen denkbar, bei der diese Effekte zum Tragen kommen.

GSH ist ebenfalls an der Steuerung der Genexpression in Hinsicht auf Stressadaptation (FOYER et al., 1997) beispielsweise bei der Bildung von Phytoalexinen beteiligt (ALSCHER, 1989). Glutathion ist ein Depot und eine Transportform für reduzierten Schwefel, der beispielsweise für die Proteinbiosynthese benötigt wird (RENNENBERG, 1982; BIELAWSKI und JOY, 1986a). In der Literatur finden sich Konzentrationsangaben für den Chloroplasten zwischen 1 und 3,5 mM (RENNENBERG, 1982) manchmal werden auch höhere Werte genannt: Etwa 5 mM für das Stroma (NOCTOR et al., 1998) oder zelluläre Konzentrationen bis zu 10 mM (SMITH et al., 1989).

GSH spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Stoffwechselschlacken oder Xenobiotica wie Herbiziden, die durch Kopplung an GSH inaktiviert werden. Die Reaktion wird durch die Glutathion- S- Transferase katalysiert. GSH ist ebenfalls direkt oder mittelbar an der Entgiftung von Schwermetallen beteiligt. In Bäckerhefe wurde ein Transporter gefunden, der Cadmium in an GSH gebundener Form (Bis- glutathionato- Cadmium) in einem ATP- abhängigen Vorgang in die Vakuole befördert und dieses Metall somit entgiftet (LI et al., 1997). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für *Leishmania tarentolae* und Arsen(III) postuliert (DEY et al., 1996). Hier soll ein $As(GS)_3$ - Konjugat durch eine Transport- ATPase ausgeschleust werden. Das Ausschleusen von giftigen Metallen ist ein weitverbreiteter Mechanismus bei Bakterien (SILVER, 1996), hier jedoch möglicherweise unabhängig von

Glutathion. Höhere Pflanzen und eukaryotische Algen (ZENK, 1996) entledigen sich überschüssigen Metalls durch die Bildung von Phytochelatinen (PCs). Hierbei handelt es sich um cysteinreiche Peptide mit einer allgemeinen Formel $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, wobei $n = 2-11$ (ZENK, 1996). Sie werden auch unter dem Begriff Typ III Metallothioneine geführt (SHAW et al., 1992). Die Vorstufe dieser cysteinreichen Peptide ist wiederum das Glutathion. Phytochelatine werden sehr schnell, im Bereich von 5-15 Minuten nach Gabe von Schwermetallen (KELTJENS und VAN BEUSICHEM, 1998) gebildet, ein Vorgang, der starke Konzentrationsabnahmen von Glutathion zur Folge haben kann (DE VOS et al., 1992). Die primäre Lokalisation der Phytochelatine sind vermutlich das Cytosol und die Vakuole (RAUSER, 1995). Ein Modell für die Wirkungsweise der Phytochelatine am Beispiel des bestuntersuchten Metalls, Cadmium, wurde von RAUSER (1995) beschrieben. Intrazelluläres Cadmium wird entweder an Phytochelatin gebunden als low molecular weight (LMW)-Komplex in einem ATP-verbrauchenden Prozeß in die Vakuole transportiert oder in freier Form, mit einem Antiporter im Tonoplasten gegen Protonen aus der Vakuole getauscht. Hier wird das Cadmium dann, unter Beteiligung von freiem Sulfid und freien Glu-Cys-Peptiden in einen high molecular weight (HMW)-Komplex eingebunden und endgelagert. Phytochelatine werden oftmals als das für Schwermetallentgiftung verantwortliche Element im Stoffwechsel angeführt (ZENK, 1996), ihnen wird auch eine erhöhte Cadmiumtoleranz bei *Arabidopsis thaliana* zugeschrieben (HOWDEN et al., 1995). Diese Beschreibung läßt die Frage aufkommen, ob der Faktor mit den Phytochelatinen identisch ist. Die Phytochelatine lassen sich durch Ellman's Reagenz nachweisen (GRILL et al., 1987), die Derivatisierung mit Monobrombiman mit anschließender Trennung durch HPLC zeigt jedoch etwa 100-fach größere Empfindlichkeit (STEFFENS, 1990). Die Ergebnisse der Faktorcharakterisierung bezüglich dieser Aspekte, sowie die durch HÄUSL (1990) gefundenen Daten zeigen deutlich, daß der Faktor nicht mit den Phytochelatinen identisch ist.

Auch die Glutaminsynthetase (GS, EC 6.3.1.2) ist ein Enzym, das durch „mixed function oxidation systems“ inaktiviert wird, was in zahlreichen Quellen beschrieben wird (NAKAMURA und STADTMAN, 1984; LEVINE et al., 1981; MARTIN et al., 1997; HUMANES et al., 1995). Die Glutaminsynthetase ist das erste Enzym, das an der Assimilation von Ammonium beteiligt ist (ACASTER und WEITZMAN, 1985). Es katalysiert folgende Reaktion:



Das Enzym aus *E. coli* ist am intensivsten untersucht. Es wird im Stoffwechsel sehr fein reguliert. Über ein Kaskadensystem werden die Konzentrationen von bis zu 40 Metaboliten miteinander verrechnet, und so eine genaue, der Stoffwechsellage angemessene Aktivität

erzielt (STADTMAN, 1990a). Die Aktivität des Enzymes aus Spinat scheint ebenfalls einer Reihe von Einflüssen unterworfen zu sein. Zunächst zeigte sich die Aktivität im Licht schwächer als im Dunklen. Dies ist möglicherweise der Anwesenheit von zerstörten Chloroplastenfragmenten zuzuschreiben, da die Tests mit nur wenig vorgereinigten Rohextrakten durchgeführt wurden. Die Chloroplastenfragmente, die keine intakte Elektronentransportkette mehr aufweisen, könnten möglicherweise bei der Bildung reaktiver, die GS zerstörende Sauerstoffspezies eine Rolle spielen. DTE ist in der Lage, die GS leicht zu aktivieren, dies deutet möglicherweise das Vorhandensein einer Thiolsteuerung an. Den deutlichsten Effekt zeigte DTE, wenn es mit Kupfer eingesetzt wurde. Das Enzym war unter diesen Bedingungen im Dunklen vollständig geschützt, und im Hellen noch deutlich im Bereich des Kontrollwertes. NADPH zeigte annähernd keinen Effekt als Schutz vor der Kupferinaktivierung. Der DTE- Effekt könnte einerseits auf eine komplexierende Wirkung zurückzuführen sein, andererseits könnte die Reduktion des Enzymes der ausschlaggebende Grund sein. Der Faktor zeigt hier seine schützenden Eigenschaften ebenso wie im GR- Test. Ein drittes, durch Kupfer inaktivierbares Enzym ist die Xanthinoxidase (XOD, EC 1.2.3.2) (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989). Sie wird häufig zur Erzeugung von Superoxid in SOD- Assays verwendet. Kupfer hat in diesem System duale Wirkung: Die erste ist die eben erwähnte Hemmung der XOD, die zweite der Abbau des gebildeten Superoxides (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989). Beide Wirkungen können allein anhand der Cytochrom c- Reduktion nicht unterschieden werden. Die Anwesenheit von Kupfer führt hier also, im Gegensatz zu den anderen Testsystemen, zu einer Verminderung der Radikalbildung durch Hemmung des dafür verantwortlichen Enzymes (XOD) oder durch den Abbau des $O_2^{\cdot -}$. Auch Kupferkomplexe können Superoxiddismutaseaktivität zeigen (AMAR et al., 1982). Um herauszufinden, ob der Faktor die Fähigkeit besitzt, Superoxid abzubauen wurde er in diesem Testsystem eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Inaktivierung der XOD durch den Faktor verhindert werden konnte, was sich in einer hohen, der Kontrolle angeglichenen Superoxidbildung zeigte. Daraus läßt sich schließen, daß der Faktor die Wirkung der Kupferionen verhindert, mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Bildung eines Cu-Faktor-Komplexes. Dieser Komplex, der während des Testes entsteht, nimmt keinen Einfluß auf die Superoxidentwicklung im Test, zeigt folglich keine Superoxiddismutaseaktivität. Zink(II) und Eisen(III) nehmen in keiner Weise Einfluß auf den Test. Das Testverhalten im durchgeführten Rahmen läßt sich so generalisieren: Ist Kupfer im Test, ohne daß Faktor zugefügt ist, ist die Superoxidbildung und demzufolge die Cytochrom c- Reduktion niedrig, ist Faktor im Test ist die Superoxidbildung generell hoch, egal ob es sich um einzelne Metalle oder um Kombinationen handelt. Es ließ sich in keinem Fall eine SOD- Aktivität für den Faktor oder den Faktor- Kupferkomplex nachweisen. Der Faktor schützt in diesem

Testsystem die XOD sowie dessen Produkt, Superoxid vor kupferbedingten Effekten, fördert hier also die Bildung von Radikalen. EDTA konnte den Faktor in diesem Testsystem ersetzen. Der Einfluß des Faktors auf kupferabhängige Reaktionen von Lipiden wurde in zwei Testsystemen beobachtet. Das erste System, die kupfervermittelte LDL- Oxidation ist ein dem medizinischen Bereich entliehenes Modell, das aber für die Beurteilung der Wirkungsweise des Faktors wichtige Informationen bereitstellt. Neben der kupferbedingten oxidativen Modifikation des Proteinanteiles zeigte sich die zunehmende Bildung von Lipidhydroperoxiden mit der allgemeinen Struktur $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHOOH}-$ (ESTERBAUER et al., 1989), determiniert durch die Zunahme der Absorption bei 234 nm. LYNCH und FREI (1993) beschreiben die Oxidation von LDL durch Kupfer als einen von O_2^- und H_2O_2 sowie freie Hydroxylradikalen unabhängigen Vorgang, der von der Verfügbarkeit von freien Cu(II) - Ionen und Lipidhydroperoxiden abhängt. Als Mechanismus wurde unter anderem eine Fenton- Reaktion diskutiert, bei der Hydroxylradikale entstehen, die allerdings H_2O_2 benötigen würde und somit unwahrscheinlich erscheint. Die wahre Natur des Oxidans bleibt verborgen, dennoch scheinen O_2^- und H_2O_2 sowie freie Hydroxylradikale unwahrscheinlich. Eine Erklärung für die Faktorwirkung könnte nach diesen Ergebnissen eine metallkomplexierende Eigenschaft des Faktors sein, die die Initiation der Lipidperoxidation verhindert, indem es die dazu nötigen Metallionen entfernt. Eine andere Interpretationsmöglichkeit besteht darin, daß der Faktor die radikalische Kettenreaktion unterbricht, also als Radikalfänger wirkt. Gegen die Eigenschaft als Radikalfänger, zumindest was O_2^- betrifft, spricht das Verhalten des Faktors im Xanthinoxidasetest. Zieht man die durch den Linolensäureversuch gewonnenen Ergebnisse hinzu, verdichtet sich der Eindruck, daß der Faktor dennoch beide Eigenschaften trägt. Das Reaktionsprinzip des Testes ist folgendes: α -Linolensäure wird durch Singulett-Sauerstoff, der aus der Reaktion von Triplett-Sauerstoff mit dem belichteten Farbstoff Rose Bengal entsteht, in einem 2-stufigen Reaktionsmechanismus modifiziert. Zunächst tritt Peroxidation der Linolensäure ein und in Folge dessen kommt es zur Spaltung am ω -3- Ende des Moleküls unter Bildung eines Ethylradikals. Diese Reaktion ist kupferunabhängig. Nachfolgend reagiert das Ethylradikal zum Ethan. In der Gegenwart von Cu(II) jedoch wird das Ethylradikal zum Ethylen oxidiert, wobei Cu(I) entsteht. In diesem Experiment findet eine Verschiebung des Verhältnisses von Ethan zu Ethylen in Abhängigkeit von der Konzentration der frei zur Verfügung stehenden Kupferionen statt (HEISER et al., 1998). Die Summe der beiden C2- Moleküle wird durch die Kupferkonzentration nur in geringem Maße beeinflusst. Der Einfluß, den der Faktor hier ausüben könnte, wäre zum einen die Rückstellung der Reaktion zum Ethan, bedingt durch die Komplexbildung des freien Kupfers und somit dessen Redoxinaktivierung, zum anderen das

Herabsetzen der Bildungsrate des Ethylradikals und somit der gesamten meßbaren Menge des Ethylens und Ethans durch Interaktion mit dem Singulett-Sauerstoff. Beide Effekte sind zu beobachten und vereinbar mit den in den anderen Testsystemen gewonnenen Ergebnissen.

Ein weiteres ROS-bildendes System, an dem Kupfer beteiligt ist, ist die Autooxidation von Dihydroxyfumarsäure (DHF). Durch Anwesenheit von Kupferionen entstehen hierbei Superoxid, Wasserstoffperoxid und OH[•]-Radikal. Diese ROS zersetzen Ketomethylthiobuttersäure (KMTB) unter Bildung von gaschromatographisch bestimmtem Ethylen. Auch hier zeigte der Faktor seine antioxidative Wirkung. Der Test ist nur in geringem Maße durch Zink zu beeinflussen und stellt somit ein geeignetes System dar, um kompetitive Effekte von Zink und Kupfer zu untersuchen. Kupfer ließ sich selbst durch ein hohes Übermaß von Zink nicht aus dem Komplex freisetzen. Erklärungen hierfür könnten zwei unabhängige Bindungsstellen für Kupfer und Zink am Molekül sein, sodaß es überhaupt nicht zu einer Konkurrenz kommen kann, oder Kupfer wird wesentlich fester an den Faktor gebunden als Zink.

Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Testsystemen zeigte der Faktor in dem wohl unphysiologischsten der verwendeten Assays, der kupferinduzierten Thioloxydation mit Cystein nur eine äußerst geringe antioxidative Wirkung. Dies könnte mehrere Gründe haben. Zum einen könnte der Faktor vielleicht durch entstehende Thiylradikale inaktiviert werden, zum anderen hat Cystein möglicherweise eine höhere Affinität zu Kupferionen als der Faktor. Auch EDTA kann erst in sehr hohem Überschuß von 2000 Molekülen Komplexator zu 1 Molekül Metall schützen, was letztere Vermutung unterstützt. Die antioxidative Wirkung von EDTA, nicht aber des Faktors, wird durch Anwesenheit von Imidazol deutlich erhöht, vielleicht durch Bildung eines Mischkomplexes. Imidazol allein zeigt kaum Wirkung. Sollte Imidazol eine Art Schutzmolekül für EDTA darstellen, so ist nicht leicht einsehbar, warum es diese Wirkung nicht beim Faktor ebenfalls zeigt. Weiterhin sollte sich dann die Anwesenheit von Imidazol ohne Komplexator im Test in irgendeiner Weise bemerkbar machen. Letzterer Interpretationsmöglichkeit sollte deshalb der Vorzug gegeben werden. Auch die Ergebnisse dieses Testsystems sprechen nicht gegen die Hypothese, der Faktor sei ein Komplexbildner, da er sich ähnlich verhält wie EDTA. Interessanterweise zeigten sich die meisten getesteten Thiole (DTE, GSH, N-Acetylcystein und Homocystein) nicht sehr reaktionsfreudig in diesem Test. Erst wenn man reduziertes Cu(I) mit dem spezifischen Komplexbildner BCS aus dem Gleichgewicht entfernte, kamen die Oxidationen dieser Thiole zustande. NADPH ist unter diesen Bedingungen ebenfalls oxidierbar.

4.2 Chemie des Faktors

Die chemische Natur des Faktors ist unklar und bleibt Subjekt der Spekulation. Da die Substanz durch Ninhydrin anfärbbar ist (HÄUSL, 1990) könnte sich hierbei um ein Peptid handeln, das bei einem Molekulargewicht von etwa 600 D (HÄUSL, 1990), aus etwa 5- 6 Aminosäuren bestehen könnte. Die bei HÄUSL (1990) gefundene Beteiligung von Thiolgruppen konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Weder die Färbung mit Gaitonde- Reagenz in Lösung wie auf der Dünnschichtplatte, noch der Nachweis von Thiolen mit Ellman's Reagenz und auch die Derivatisierung mit Monobrombiman erbrachten positive Ergebnisse. Eventuell beteiligter Schwefel könnte möglicherweise maskiert, als Dithiol oder methyliert (als Methionin) vorliegen und sich auf diese Art dem Nachweis entziehen. Die Derivatisierung mit Monobrombiman zeigte einige Thiolgruppen tragende, verunreinigende Komponenten. Diese konnten jedoch auch in der Dünnschichtchromatographie mit Gaitonde- Reagenz nachgewiesen werden. Aufgrund der Wanderungsweiten konnten sie jedoch deutlich vom Faktor abgegrenzt werden. Unterhalb von $R_f = 0,5$ traten keine Gaitonde- positiven Verbindungen auf.

Auch die Beteiligung bestimmter Aminosäuren an dem vermeintlichen Peptid ist spekulativ. Kupfer ist in Komplexen im allgemeinen mindestens 4- fach koordiniert (v. GENTZKOW et al., 1983), Zink ist in Proteinen oft 4- fach koordiniert (FENTON, 1995). Kupfer und Zink finden sich beide im Zwischenbereich zwischen „harter“ und „weicher“ Koordination, Kupfer eher zu „weich“, Zink eher zu „hart“ tendierend. Im Allgemeinen bilden hart koordinierende, das heißt wenig polarisierbare Metalle mit „harten“ Elektronenpaardonatoren und weich koordinierende, leicht polarisierbare Metalle mit „weichen“ Liganden stabile Bindungen aus. Die Bindung „weich/weich“ besitzt eher den Charakter einer kovalenten Bindung, „hart/hart“ eher den einer ionischen Bindung (KAIM und SCHWEDERSKI, 1995). Weiche Donatoren sind eher Schwefel und Stickstoff, hart eher sauerstoffhaltige Donatoren (FENTON, 1995). Die wichtigsten Aminosäure- Liganden in Proteinen sind Histidin, Methionin, Cystein, Selenocystein, Tyrosin, Aspartat und Glutamat. Kupfer koordiniert besonders gerne mit Histidin, Methionin und Cystein, Zink mit Histidin, Cystein Glutamat und Aspartat (KAIM und SCHWEDERSKI, 1995). Da Cystein als Bestandteil des Faktors nicht nachweisbar war, käme hier eventuell Histidin in Frage, was auch bei der Reaktion mit Singulett-Sauerstoff eine Rolle spielen könnte. Das Spektrum des Faktors gibt keinen eindeutig positiven Hinweis auf die Beteiligung von aromatischen Aminosäuren. Es zeigt neben einem Absorptionsmaximum bei 207 nm eine weit auslaufende Schulter bis etwa 300 nm, dessen Maximum bei etwa 230 nm liegt, aber im Bereich von 280 nm zwar eine erkennbare, aber keine deutlich überhöhte Absorption. Die Frage, ob es sich bei dem Faktor um ein Peptid handelt, kann nicht schlüssig beantwortet werden. Auch eine zyklische Peptidstruktur unter Beteiligung von nicht

proteinogenen Aminosäuren, wie sie für die Microcystine (DAWSON, 1997; MERILUOTO et al., 1989) beschrieben ist, ist nicht auszuschließen. Bei diesen Substanzen handelt es sich um cyanobakterielle cyclische Heptapeptide, die in hohem Maße hepatotoxisch sind. Für den Fall, daß nicht ausschließlich proteinogene Aminosäuren an der Struktur des Faktors beteiligt sind, ist es aussichtslos, Überlegungen über Strukturbestandteile anzustellen.

Der Faktor ist ein Komplexator von Kupfer und Zinkionen. Er zeigte in jedem Testsystem Ergebnisse, die mit komplexbildenden Eigenschaften vereinbar sind. Gewiß gibt es sicher für jeden einzelnen Assay Substanzen, die den gleichen Effekt hervorrufen können wie der Faktor. Dennoch fällt es schwer, eine Substanz zu definieren, die in Anbetracht der Vielzahl der in den unterschiedlichen Testsystemen vorkommenden, bereits beschriebenen Reaktionsmechanismen gleiche Wirkung wie der Faktor zeigen würde, aber kein Komplexbildner ist. Auch in Anbetracht der Aufhebung der durch Zinkionen hervorgerufenen Effekte läßt sich schließen, daß der Faktor nicht bloß die Wirkungen von bereits stattgefundenen Redoxprozessen, die Zink aufgrund der festen Oxidationsstufe nicht durchführen kann, abmildert oder rückgängig macht, sondern diese bereits im Vorfeld verhindert. Dennoch zeigt der Faktor, zusätzlich zu seinen komplexbildenden Eigenschaften Wirkung gegenüber ROS, zumindest Singulett-Sauerstoff. Ob ein Cu-Faktor-Komplex in der Lage ist, die Radikalbildung zu modulieren wie z.B. der Fe-EDTA-Komplex (ELSTNER, 1990) oder zu blockieren, wie z.B. der GSH-Cu-Komplex (HANNA and MASON, 1992) ist nicht klar. Jedenfalls konnte in keinem der verwendeten Tests eine Stimulation der oxidativen Prozesse durch den Faktor oder den Faktor-Cu-Komplex beobachtet werden.

Eine auffällige Eigenschaft des Faktors ist die stark unterschiedliche Bindungskapazität für Kupfer und Zink im GR-Test. Ein Verhältnis von 1:20 [Cu: Zn] ist recht ungewöhnlich und bei einer Molekülgröße des Faktors von etwa 600 Dalton schlecht vorstellbar. Selbst, wenn mehrere Faktormoleküle ein Kupferion binden, müßten bei 4 Faktormolekülen/ Kupfer noch 5 Zinkionen von einem Faktormolekül gebunden werden. Es ist auch kaum anzunehmen, daß ein Komplex, dessen Bindungsstellen von vier unabhängigen Einzelmolekülen stammen, stabil ist. Den stark unterschiedlichen Bindungskapazitäten für Kupfer und Zink könnte ein unterschiedliches Verhalten des Faktors gegenüber den beiden Metallen zugrundeliegen. Kupfer könnte beispielsweise als 1:1-Komplex gebunden werden, die Zinkbindung hingegen auf eine Faktor-Faktor-Wechselwirkungen beruhen, bei der zusätzliche Bindungsstellen gebildet werden. Eine größere Anzahl Faktormoleküle und Zinkionen würden sich bei solch einem Modell zu einem großen Komplex zusammenlagern, dessen Struktur in sich durch die Zinkionen stabilisiert werden könnte. In Anbetracht des niedrigen Molekulargewichtes ist es allerdings sehr fraglich, ob derart hohe Diskrepanzen in den Bindungskapazitäten wirklich mit diesem Modell erklärt werden können.

Unterschiedliche Affinitäten von Cu und Zn sollten für die Diskussion dieses Effektes nicht herangezogen werden, da Zink Kupfer im DHF- Test nicht verdrängen konnte, Kupfer also vermutlich den stärkeren Komplex bildet. Eine weitere Erklärung könnte die Wechselwirkung mit anderen Komponenten des Glutathionreduktasetestes sein, dann sollte sich die hohe Zinkbindungskapazität in anderen Testsystemen möglicherweise nicht reproduzieren lassen. In Anbetracht dessen, daß der Faktor nicht zur völligen Homogenität aufgereinigt werden konnte, wie in der HPLC- Analyse gezeigt wurde, erscheint es auch möglich, daß andere in den Präparationen vorhandene Bestandteile Einfluß auf die Bindungskapazitäten nehmen.

4.3 Der Faktor im Stoffwechsel

Über das Verhalten des Faktors im Stoffwechsel ist nur wenig bekannt. Dennoch erscheint eine Spekulation über mögliche Funktionen dieser Substanz in der Pflanze sinnvoll. An dieser Stelle sei nochmals betont, daß besonders Kupfer in freier Form im Stoffwechsel großen Schaden anrichten kann, besonders wenn die Pflanze streßbedingt dazu noch reaktive Sauerstoffspezies erzeugt. Der Faktor scheint eine Substanz zu sein, der neben einer Schutzfunktion gegen kupferinduzierte und vorangetriebene Redoxprozesse möglicherweise noch andere, für den Stoffwechsel wichtige Funktionen bereithält. So könnte die Tatsache, daß ein zinkbindender und ein nichtbindender Faktor getrennt werden konnte, ein Hinweis darauf sein, daß der Faktor eine Rolle in der Zinkregulation spielt. Möglicherweise sind beide Formen des Faktors chemisch ähnlich und ineinander überführbar, beispielsweise durch eine enzymatisch hervorgerufene oder eine Redoxinterkonversion. Dennoch scheint die Fähigkeit, Kupfer zu binden eine für den Stoffwechsel durchaus sinnvoll erscheinende Eigenschaft zu sein.

Kupfer und Zink werden bei Landpflanzen in der Regel über die Wurzel aufgenommen. Dabei können sie sich gegenseitig beeinflussen, möglicherweise durch Competition am gleichen Transporter (LINDER, 1991). Auch Kupfer- und Eisenaufnahme scheinen miteinander gekoppelt zu sein (ROBINSON et al., 1993). GROTZ et al. (1998) konnten Gene für Zinktransporter aus *Arabidopsis* identifizieren, die auf Zinkmangel ansprechen und so ihren Beitrag zur Zinkhomöostase erbringen könnten. Unmittelbar nach dem Eintritt in die Zelle sollten die aufgenommenen Ionen in eine „inerte“ Form durch Aufnahme in einen Komplex überführt werden. Dies scheint auch der Fall zu sein. Neben einer möglichen Einbindung von Kupfer in Phytochelatine wurden bei toleranten Pflanzen auch andere Proteine beschrieben, die Kupfer in der Wurzel binden (LINDER, 1991). Bei Experimenten, in denen Pflanzen einem erhöhten Angebot von Kupfer ausgesetzt wurden, zeigte die Wurzel oftmals den höchsten Kupfergehalt (OUARITI et al., 1997; BASZYNSKI et al., 1982; OUZOUNIDOU et al., 1998; KELTJENS und VAN BEUSICHEM, 1998), hauptsächlich

durch Bindung des Metalls im Apoplasten an die Zellwand (LINDER, 1991, LOLKEMA und VOOIJS, 1986; KELTJENS und VAN BEUSICHEM, 1998). Intrazelluläres Kupfer oder Zink könnte an den Faktor gebunden werden, da er in Wurzeln von Erbsenpflanzen konstitutiv vorhanden zu sein scheint. Aufgenommenes Kupfer oder Zink wird dann in die oberirdischen Pflanzenteile weitergeleitet. Hierbei sollte es ebenfalls komplex gebunden sein. Der Faktor könnte diese Aufgabe möglicherweise aufgrund seiner geringen Größe gut bewältigen. Auch in den Blättern könnte die Bindung des Kupfers an den Faktor eine Rolle spielen. Der Faktorgehalt steigt nach der Belichtung von etiolierten Erbsenpflanzen sehr schnell an. Dies deutet darauf hin, daß der Faktor eine Schutzfunktion gegen Schäden, die aus der Kombination Kupfer- Licht mit den bereits beschriebenen Folgen erwachsen könnten, ausübt.

Der Faktor spielt möglicherweise bei der Regulation des Turnover von kupfersensiblen Enzymen eine Rolle. Ein ausführlich beschriebenes Beispiel hierfür ist die Glutaminsynthetase aus *E. coli*. Diese wird, nachdem sie durch eine „site specific“ Reaktion inaktiviert wurde (LEVINE, 1983a,b) proteolytisch abgebaut. Es zeigte sich, daß ein Verlust von 2 Histidinresten (RIVETT und LEVINE, 1990) und die chemische Modifikation eines Arginins (CLIMENT und LEVINE, 1991) am Enzym die Abbaurate verzehnfacht. LEE et al. (1988) beschreiben zwei Proteasen aus *E. coli*, die die durch „mixed function“ Oxidationssysteme inaktivierte Glutaminsynthetase abbauen. Andere Proteasen, ebenfalls aus *E. coli* verhalten sich indifferent. So scheint es, als ob der Turnover dieses Enzymes spezifisch über die Kupferinaktivierung geregelt ist.

Der Faktor könnte Einfluß auf die Giftigkeit von Paraquat haben, da diese durch Metallchelatoren herabgesetzt wird (CHANG und KAO, 1997). In *Chlorella* nimmt der Faktorgehalt der Zelle nach Paraquatzugabe jedoch deutlich ab (HÄUSL, 1990). Dennoch könnte der Faktor möglicherweise die Folgen von oxidativem Stress mildern oder zur Ausbildung von Streßtoleranz beitragen. In vielen Fällen wird Toleranz gegen Metallstreß den Phytochelatinen zugeschrieben, doch bei genauerer Betrachtungsweise wird dies in Einzelfällen bestritten, sogar ins Gegenteil verkehrt. Die durch die kupferinduzierte Synthese der Phytochelatine hervorgerufene Abnahme des Glutathiongehaltes bei *Silene cucubalus* wirkt sich schädlich aus (DE VOS et al., 1992). Die Toleranzausprägung kann andere Gründe haben, beispielsweise Restriktion der Aufnahme von Kupfer (LOLKEMA und VOOIJS, 1986) oder spezielle Eigenschaften von Membranen (CISCATO et al., 1997). Tolerante Pflanzen benötigen mehr von dem Metall, gegen das sie tolerant sind, als nicht tolerante (LOLKEMA und VOOIJS, 1986). Dies könnte entweder eine geringere Aufnahme des Metalls oder das Vorhandensein eines zusätzlichen intrazellulären „sink“ andeuten. Am Beispiel von Spinatpflanzen konnte bei erhöhten Gaben von Kupfer eine Anreicherung dieses Metalls in

den Geweben beobachtet werden, ohne daß große physiologische Abweichungen in den Chloroplasten festzustellen waren (BASZYNSKI et al., 1982). Vielleicht ist der Faktor hierfür verantwortlich. Offenbar kann das Phänomen „Schwermetalltoleranz“ auf unterschiedlichen physiologischen Mechanismen basieren.

Der Faktorgehalt ist mit dem Schwefelstoffwechsel koreliert. HÄUSL (1990) stellte nach Umwaschen von *Chlorella* in Schwefelmangelmedium ansteigenden Faktorgehalt bei fallendem Glutathiongehalt fest, sowie fallenden Faktorgehalt und ansteigenden Glutathiongehalt nach Zugabe von Sulfat zu S- Mangelkulturen. Möglicherweise kann der Glutathionpool allein, eher wohl in Kombination mit anderen Substanzen eine gewisse Kupfermenge binden, die bei dessen Abbau vom Faktor übernommen wird. Komplexe von Kupfer und GSH bzw. GSSG und Kupfer wurden beschrieben (MEHRA und MULCHANDANI, 1995; JOUINI et al. 1986; HANNA und MASON, 1992), ihre physiologische Bedeutsamkeit in Pflanzen ist aber nicht bekannt.

Der Faktor könnte eine Depotfunktion haben, die eine bestimmte Kupfer- oder Zinkmenge in verfügbarer Form bereithält, um sie für die Synthese für zink- oder kupferhaltige Enzyme oder Plastocyanin zu verwenden oder beim Einbau dieser Metalle in die Apoproteine mitwirken. Er könnte also ein Element der Metallhomöostase sein. Die Synthese von Cu-Zn SOD bei Hefe ist von einem hochspezifischen, kupferliefernden Chaperon abhängig (CIZEWSKI CULOTTA et al., 1997). Das Vorkommen homologer Gensequenzen beim Menschen läßt auf ein weitverbreitetes Prinzip schließen, das möglicherweise auch bei Pflanzen zum Tragen kommt. Auch das Chaperon muß sein Kupfer irgendwoher bekommen. Möglicherweise kommt faktorgebundenes Kupfer als Quelle in Betracht. Auch andere Moleküle werden als Lieferant von Metallen diskutiert. Hier sind vor allem die Metallothioneine zu nennen, cysteinreiche Proteine, die zunächst bei tierischen Organismen (Class I) und Hefen (Class II) beschrieben wurden. Sie binden Metalle wie u.a. Cadmium (II) (SHAW et al., 1992), Zink (II) (MARET et al., 1997; MARET und VALLEE, 1997) und Kupfer (I) (PRESTA et al., 1995; FABISIAK et al., 1999; OIKAWA et al., 1995). Für Zink-Metallothionein wurde ein Mechanismus beschrieben, nach dem, grob vereinfacht, bei Änderung des Redoxzustandes, vermittelt durch den Abfall des GSH/GSSG Verhältnisses, Zink aus dem Komplex freigesetzt wird (MARET und VALLEE, 1998). Weiterhin steht dieses Zink aus dem Komplex dann für die Integration in die Apof orm zinkhaltiger Proteine zur Verfügung (JACOB et al., 1998). Der Autor postuliert dann Substanzen, die das freigewordene Zink aufnehmen und weiterverteilen. JIANG et al. (1998a,b) konnten zeigen, daß durch das Glutathion- Redoxpaar oder durch ATP freigesetztes Zink in zinkfreie Apo-Sorbitol- Dehydrogenase transferiert werden kann. Auf dieser Ebene können Verbindungen zwischen Zink-, ATP- und Glutathion- und NADH- Haushalt geknüpft werden. Solche

Mechanismen könnten auch in Pflanzen präsent sein, zumal Transkripte, aber auch die Genprodukte in Pflanzen gefunden wurden (GARCÍA-HERNANDEZ et al., 1998; MURPHY et al., 1997; FOLEY et al., 1997; ROBINSON et al., 1993). Der Faktor könnte bei solchen Prozessen beteiligt sein.

Auch Phytochelatine kommen als Metalldepot in Frage. Möglicherweise sind sie, da sie ebenfalls cysteinreich sind, einer ähnlichen Redoxsteuerung unterworfen. Der Faktor könnte eine Alternative zu diesen redoxgesteuerten Systemen sein, die ihr Metall unter oxidativem Stress vielleicht verlieren würden. Das Beispiel *Arabidopsis* zeigt die Unabhängigkeit der Cu- und Zn- Homöostase von Phytochelatinen: Eine Phytochelatin- defiziente Mutante wächst normal und zeigt sich nur gegenüber Cadmium sensitiv (HOWDEN et al., 1995). Auch bei *Silene cucubalus* scheinen Phytochelatine für die Kupfertoleranz nicht ausschlaggebend zu sein (DE VOS et al., 1991). Dies kann jedoch nicht generalisiert werden, es kann von Art zu Art unterschiedlich sein. So werden Phytochelatine für die Kupfertoleranz in *Mimulus guttatus* als essentiell angesehen (SALT et al., zitiert von HOWDEN et al. 1995).

Zink wird in Vakuolen durch einen Zink- Malat- shuttle angereichert, Kupfer wird in kupfertoleranter *Silene cucubalus* nicht in der Vakuole endgelagert (LOLKEMA und VOOIJS, 1986). Es ist fraglich, ob einmal in der Vakuole festgelegtes Kupfer oder Zink wieder mobilisiert werden könnte. An Faktor gebundenes Metall könnte vielleicht enzymatisch aus dem Komplex herausgelöst werden, etwa durch Peptidasen, die den Faktor einfach hydrolysieren. Auch chemische Modifikation der Liganden wären denkbar. Enzyme, die diese Reaktion durchführen könnten, sind jedoch aufgrund der mangelnden Kenntnis der Struktur des Faktors nicht bekannt. Der Faktor könnte auch ein Endlager für Kupfer oder Zink darstellen.

Es ist bemerkenswert, daß pflanzliche Organismen ein solches Molekül besitzen, vor allem in Anbetracht dessen, daß schon mehrere Systeme vorhanden sind, die die eben angeführten Aufgaben scheinbar ebenso gut erledigen können. Vielleicht beruhen die Unterschiede eher auf zeitlichen oder örtlichen Faktoren denn auf chemischen, möglicherweise spielt die Regulierbarkeit der unterschiedlichen Systeme eine Rolle, oder es ist einfach vorteilhaft, bestimmte Funktionen im Stoffwechsel mehrfach zu belegen. Derzeit ist nicht zu entscheiden, ob eine Rollentrennung dieser kupferbindenden Moleküle vorhanden ist und wenn ja, wie sie aussieht und welche Eigenschaften hierfür ausschlaggebend sind. Viele der in dieser Arbeit aufgeworfenen Fragen lassen sich erst nach der Aufklärung der chemischen Struktur des Faktormoleküles zufriedenstellend beantworten.

5 Literaturverzeichnis

ACASTER, M.A. u. WEITZMAN, P.J.D. (1985): Kinetic analysis of glutamine synthetases from various plants. FEBS-Letters **189** (2), 241-244

ALSCHER, R.G. (1989): Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. Physiol. Plant. **77**, 457-464

AMAR, C., VILKAS, E. u. FOOS, J. (1982): Catalytic activity studies of some copper (II)-histidine-containing dipeptide complexes on aqueous superoxide ion dismutation. J. Inorg. Biochem. **17**, 313-323

ARO, E.-M., VIRGIN, I. u. ANDERSSON, B. (1993): Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim Biophys. Acta **1143**, 113-134

ASADA, K. u. BADGER, M.R. (1984): Photoreduction of $^{18}\text{O}_2$ and $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ with concomitant evolution of $^{16}\text{O}_2$ in intact spinach chloroplasts: Evidence for scavenging of hydroperoxide by peroxidase. Plant Cell Physiol. **25** (7), 1169-1179

AUH, C.-K., u. MURPHY, T.M. (1995): Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor stimulated rose cells. Plant Physiol. **107**, 1241-1247

BARON, M., ARELLANO, J.B. u. GORGE, J.L. (1995): Copper and photosystem II: A controversial relationship. Physiol. Plant. **94**, 174-180

BASZYNSKI, T., KRÓL, M., KRUPA, Z., RUSZOWSKA, M., WOJCIESKA, M. u. WOLINSKA, D. (1982): Photosynthetic apparatus of spinach exposed to excess copper. Z. Pflanzenphysiol. **108**, 385-395

BAIER, M. u. DIETZ, K.-J. (1996): Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. Plant Mol. Biol. **31**, 553-564

BAIER, M. u. DIETZ, K.-J. (1999): Alkyl hydroperoxide reductases: the way out of the oxidative breakdown of lipids in chloroplasts. Trends in plant science **4** No.5, 1360-1385

- BEEOR-TZAHAR, T., BEN-HAYYIM, G., HOLLAND, D., FALTIN, Z. u. ESHDAT, Y. (1995): A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Letters* **366**, 151-155
- BERG, J.M. u. SHI, Y. (1996): The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc. *Science* **271**, 1081-1085
- BIELAWSKI, W. u. JOY, K.W. (1986a): Reduced and oxidized glutathione and glutathione-reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta* **169**, 267-272
- BIELAWSKI, W. u. JOY, K.W. (1986b): Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of pea. *Phytochemistry* **25** (10), 2261-2265
- 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
- CHAE, H.Z., CHUNG, S.J. u. RHEE, S.G. (1994): Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **269** (44), 27670-27678
- CHANG, C.J. u. KAO, C.H. (1997): Paraquat toxicity is reduced by metal chelators in rice leaves. *Physiol. Plant.* **101**, 471-476
- CHARLES, S.A. und HALLIWELL, B. (1980): Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose bisphosphatase. *Biochem. J.* **189**, 373-376
- CISCATO, M., VALCKE, R., VAN LOVEN, K., CLIJSTERS, H. u. NAVARI-IZZO, F. (1997): Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiol. Plant.* **100**, 901-908
- CIZEWSKI CULOTTA, V., JOH, H.-D., LIN, S.-J., SLEKAR, K.H. u. STRAIN, J. (1995): A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J. Biol. Chem.* **270**, No 50, 29991-29997

CIZEWSKI CULOTTA, V., KLOMP, L.W.J., STRAIN, J., CASARENO, L.B., KREMS, B. u. GITLIN, J.D. (1997): The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **272**, No. 38, 23469-23472

CLIMENT, I. u. LEVINE, R.L. (1991): Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of arginine-344 to γ -glutamyl semialdehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **298** (2), 371-375

CORSON, L.B., STRAIN, J., CIZEWSKI CULOTTA, V. u. CLEVELAND, D.W. (1998): Chaperone-facilitated copper binding is a property common to several classes of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6361-6366

DAWSON, R.M. (1997): The toxicology of microcystins. *Toxicon* **36**, 953-962

DE VOS, C.H.R., VONK, M.J., VOOIJS, R. u. SCHAT, H. (1992): Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant. Physiol.* **98**, 853-858

DEY, S., OUELLETTE, M., LIGHTBODY, J., PAPADOPOULOU, B. u. ROSEN, B.P. (1996): An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2192-2197

DROPPA, M. u. HORVÁTH, G. (1990): The role of copper in photosynthesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* Vol. **9** Issue 2, 111-123

ELLMAN, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77

ELSTNER, E. F. (1990): *Der Sauerstoff*, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim

ELSTNER, E.F. u. OSSWALD, W. (1994): Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, **102B**, 131-154

ESHDAT, Y., HOLLAND, D., FALTIN, Z. u. BEN-HAYYIM, G. (1997): Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* **100**, 234-240

ESTERBAUER, H., STRIEGL, G., PUHL, H. u. ROTHENEDER, M. (1989): Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Free Rad. Res. Comms., **6**, No.1 67-75

FABISIAK, J.P., TYURIN, V.A., TYURINA, Y.Y., BORISENKO, G.G., KOROTAEVA, A., PITT, B.R., LAZO, J.S. u. KAGAN, V.E. (1999): Redox regulation of copper-metallothionein. Arch. Biochem. Biophys. **363**, No 1, 171-181

FAHEY, R.C. u. NEWTON, G.L. (1987): Determination of low- molecular- weight thiols using monobromobimane fluorescent labeling and high- performance liquid chromatography. Meth. Enzymol. **143**, 85-96

FENTON, D.E. (1995): Biocoordination chemistry. Oxford Scientific Publications

FOLEY, R.C., LIANG, Z.M. u. SINGH, K.B. (1997): Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. Plant Mol. Biol. **33**, 583-591

FOSTER, J.G. u. HESS, J.L. (1980): Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. Plant Physiol. **66**, 482-487

FOYER, C.H. u. HALLIWELL, B. (1976): The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta **133**, 21-25

FOYER, C.H., LELANDAIS, M. u. KUNERT, K.J. (1994): Photooxidative stress in plants. Physiol. Plant. **92**, 696-717

FOYER C.H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J. u. SCOTT, I.M. (1997): Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. Physiol. Plant. **100**, 241-254

FREY, U. (1990): Regulation der Glutathionreduktase: Ein Vergleich von tierischen und pflanzlichen Enzymen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

FUCCI, L., OLIVER, C.N., COON, M.J. u. STADTMAN, E.R. (1983): Inactivation of key metabolic enzymes by mixed function oxidation reactions: Possible implications in protein turnover and ageing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 1521-1525

GAMBLE, P.E. u. BURKE, J.J. (1984): Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. Plant Physiol. **76**, 615-621

GARCÍA HERNÁNDEZ, M., MURPHY, A. u. TAIZ, L. (1998): Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **118**, 387-397

GEIERSTANGER, B.H., KAGAWA, T.F., CHEN, S.-H., QUIGLEY, G.J. u. HO, P.S. (1991): Base-specific binding of copper(II) to Z-DNA. J. Biol. Chem, **266** (30), 20185-20191

V. GENZKOW, W., FORMANEK, H. u. KNAPEK D.E. (1983): Inhibierung der durch Kupfer katalysierten oxidativen Alterung von Polyolefinen. Siemens Forsch.- u. Entwickl.-Ber. Bd. **12**, Nr. 3, 149-154, Springer- Verlag

GLERUM, D.M., MUROFF, I., JIN, C. u. TZAGOLOFF, A. (1997): Cox15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. J. Biol. Chem. **272**, No 30, 19088-19094

GRILL, E., WINNACKER, E.-L. und ZENK, M.H. (1987): Phytochelatins, a class of heavy metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 439- 443

GROTZ, N., FOX, T., CONNOLLY, E., PARK, W., GUERINOT, M.L. u. EIDE, D. (1998): Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 7220- 7224

HALLIWELL, B. u. FOYER, C.H. (1978): Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. Planta, **139**, 9-17

HALLIWELL B. u. GUTTERIDGE, J.M.C. (1989): Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford 2nd Edition

HANNA, P.M. u. MASON, R.P. (1992): Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. *Arch. Biochem. Biophys.* **295** (1), 205-213

HÄUSL, P. (1990): Untersuchung zum spezifischen Schutz vor Sauerstoffinaktivierung am Beispiel der Glutathionreduktase bei Pflanzen, Grün- und Blaualgen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

HEISER, I., OSSWALD, W.F. u. ELSTNER, E.F. (1998): Photodynamic ethane and ethylene formation from α -linolenic acid catalyzed by cytokinins and copper ions. *J. Plant Physiol.* **152**, 230- 234

HIPPELI, S. u. ELSTNER, E.F. (1995): Mechanisms of oxygen activation during plant stress: Biochemical effects of air pollutants. *J. Plant. Physiol.* **148**, 249- 257

HIPPELI, S., ROHNERT, U., KOSKE, D. und ELSTNER, E.F. (1997): OH-radical-type reactive oxygen species derived from superoxide and nitric oxide: A sensitive method for their determination and differentiation. *Z. Naturforsch.* **52c**, 564-570

HOWDEN, R., GOLDSBROUGH, P.B., ANDERSEN, C.R. u. COBBETT, C.S. (1995): Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* **107**, 1059-1066

HUMANES, L., GARCÍA-FERNÁNDEZ, J.M., LÓPEZ-RUIZ, A. u. DIEZ, J. (1995): Glutamine synthetase from the green alga *Monoraphidium braunii* is regulated by oxidative modification. *Plant Science* **110**, 269-277

ISOBE, M., HAYASHI, Y., IMAI, K., NAKAGAWA, D., UYAKUL, D., MUTOH, N. u. GOTO, T. (1992): in Stillman, M.J., Shaw, C.F., Suzuki, K.T.: Metallothioneins, synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatin and metal-thiolate complexes. VCH Publishers, Inc., New York (1992)

JACOB, C., MARET, W. u. VALLEE, B. (1998): Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3489-3494

JAHNS, H.M. (1987): Farne, Moose, Flechten Mittel- Nord und Westeuropas. BLV Verlagsgesellschaft mbH München

JIANG, L.-J., MARET, W. u. VALLEE, B. (1998a): The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 3483-3488

JIANG, L.-J., MARET, W. u. VALLEE, B. (1998b): The ATP-metallothionein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 9146-9149

JOUINI, M., LAPLUYE, G., HUET, J., JULIEN, R. u. FERRADINI, C. (1986): Catalytic activity of a copper(II)-oxidized glutathione complex on aqueous superoxide ion dismutation. J. Inorg. Biochem. **26**, 269-280

KAIM, W. u. SCHWEDERSKI B. (1995): Bioanorganische Chemie. B.G. Teubner Verlag Stuttgart

KAISER, W. (1976): The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta **440**, 476-482

KALT-TORRES, W., BURKE, J.J. u. ANDERSON, J.M. (1984): Chloroplast glutathione reductase: Purification and properties. Physiol. Plant **61**, 271-278

KANE, H.J., WILKIN, J.-M., PORTIS JR, A.R. u. ANDREWS, T.J. (1998): Potent inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase by an oxidized impurity in ribulose-1,5-bisphosphate. Plant Physiol. **117**, 1059-1069

KARLSTRÖM, A.R. u. LEVINE, R.L. (1991): Copper inhibits the protease from human immunodeficiency virus 1 by both cysteine-dependent and cysteine-independent mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 5552-5556

KEHRER, J.P. (1993): Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical Reviews in Toxicology **23** (1), 21-48

KELTJENS, W.G. u. VAN BEUSICHEM, M.L. (1998): Phytochelatins as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: single metal effects of copper and cadmium. *J. Plant Nutr.* **21** (4), 635-648

KISU, Y., ONO, T., SHIMOFURUTANI, N., SUZUKI, M. u. ESAKA, M. (1998): Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant Cell Physiol.* **39** (10), 1054-1064

KOSKE, D. (1997): Vergleich von Ubichinon und „Pangansäure“ als Antioxidantien in biochemischen Modellreaktionen. Dissertation, Technische Universität München

KRÄMER, E. u. SCHMIDT, A. (1984): Oxidation of cysteine to cystine by membrane fractions of *Chlorella fusca*. *Planta* **160**, 235- 241

KREBS N.F., MILLER, L.V., NAAKE, V.L., LEI, S., WESTCOTT, J.E., FENNESSEY, P.V. u. HAMBRIDGE, K.M. (1995): The use of stable isotope techniques to assess zinc metabolism. *Nutritional Biochemistry* **6**, 292-301

v. KRUEDENER, S., SCHEMPP, H. und ELSTNER, E.F. (1995): Gas chromatic differentiation between myeloperoxidase activity and Fenton-type oxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **19**, 141-146

KUKREJA, R.C., OKABE, E., SCHRIER, G.M. und HESS, M.L. (1988): Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, 447-457

LARSON, R.A. (1988): The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27** (4), 969-978

LAW, M.Y., CHARLES, S.A. u. HALLIWELL, B. (1983): Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* **210**, 899-903

LEE, Y.S., PARK, S.C., GOLDBERG, A.L. u. CHUNG, C.H. (1988): Protease So from *Escherichia coli* preferentially degrades oxidatively damaged glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **263** (14), 6643-6646

LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R. u. LAMB, C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593

LEVINE, R.L., OLIVER, C.N., FULKS, R.M. u. STADTMAN, E.R. (1981): Turnover of bacterial glutamine synthetase: Oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2120-2124

LEVINE, R.L. (1983a): Oxidative modification of glutamine synthetase; I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J. Biol. Chem.* **258** (19), 11823-11827

LEVINE, R.L. (1983b): Oxidative modification of glutamine synthetase; II. Characterization of the ascorbate model system. *J. Biol. Chem.* **258** (19), 11828-11833

LI, Z.-S., LU, Y.-P., ZHEN, R.-G., SZCZYPKA, M., THIELE, D.J. u. REA, P.A. (1997): A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 42-47

LIDON, F.C., RAMALHO, J.C. u. HENRIQUES, F.S. (1993): Copper inhibition of rice photosynthesis. *J. Plant Physiol.* **142**, 12-17

LINDER, M.C. (1991): *Biochemistry of copper*. Plenum Press New York

LOLKEMA P.C. u. VOOIJS, R. (1986): Copper tolerance in *Silene cucubalus*. *Planta*, **167**, 30-36

LOUIE, A.Y. u. MEADE, T.J. (1998): A cobalt complex that selectively disrupts the structure and function of zinc fingers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6663-6668

LUPI, F.M., FERNANDES, H.M.L. u. SA-CORREIA, I. (1998): Increase of copper toxicity to growth of *Chlorella vulgaris* with increase of light intensity. *Microb. Ecol.* **35**, 193-198

LYNCH, S.M. u. FREI, B. (1993): Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **34**, 1745-1753

- MAKSYMIEC, W., RUSSA, R., URBANIK-SYPNIEWSKA, T. u. BASZYNSKI, T. (1994): Effect of excess Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages. *Physiol. Plant.* **91**, 715-721
- MARET, W., LARSEN, K.S. u. VALLEE, B.L. (1997): Coordination dynamics of biological zinc „clusters“ in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2233- 2237
- MARET, W. u. VALLEE, B.L. (1998): Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3478- 3482
- MARTIN, G., HAEHNEL, W. u. BÖGER, P. (1997): Oxidative inactivation of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Journal of Bacteriology* **179** (3), 730-734
- MAZHOUDI, S., CHAOUI, A., GHORBAL, H. u. EL FERJANI, E. (1997): Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science* **127**, 129-137
- McCORD, J.M. u. FRIDOVICH, I. (1969): Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, No. 22, 6049- 6055
- McKERSIE, B.D., CHEN, Y., DE BEUS, M., BOWLEY, S.R., BOWLER, C., INZÉ, D., D'HALLUIN, K. u. BOTTERMAN, J. (1993): Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **103**, 1155-1163
- MEHRA, R.K. u. MULCHANDANI, P. (1995): Glutathione mediated transfer of Cu(I) into phytochelatin. *Biochem. J.* **307**, 697-705
- MENGEL, K. (1991). Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. Gustav Fischer Verlag Jena
- Merck- Handbuch (1970): Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papier-Chromatographie
- Merck- Handbuch (1975): Organische Reagenzien für die Spurenanalyse

- MEUWLY, P., THIBAUT, P., SCHWAN, A.L. u. RAUSER, W.E. (1995): Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J.* **7** (3), 391-400
- MERILUOTO, J.A.O., SANDSTRÖM, A., ERIKSSON, J.E., REMAUD, G., GREY CRAIG, A. und CHATTOPADHYAYA, J. (1989): Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon* **27**, 1021-1034
- MERSCHMEYER, C. (1992): Identifizierung von Rinder-Serumalbumin als Schutzfaktor der Glutathion-Reduktase. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- MULTHAUP, G., SCHLICKSUPP, A., HESSE, L., BEHER, D., RUPPERT, T., MASTERS, C.L. u. BAYREUTHER, K. (1996): The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (II) to copper (I). *Science* **271**, 1406-1409
- MURPHY, A., ZHOU, J., GOLDSBROUGH, P.B. u. TAIZ, L. (1997): Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **113**, 1293-1301
- NAKAMURA, K. u. STADTMAN, E.R. (1984): Oxidative inactivation of glutamine synthetase subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2011-2015
- NAKAZAWA, R. u. TAGENAKA, H. (1998): Interactions between cadmium and several heavy metals in the activation of the catalytic activity of phytochelatin synthase. *Soil Sci. Plant. Nutr.* **44** (2), 265-268
- NOCTOR, G., ARISI, A.-C. M., JOUANIN, L., KUNERT, K.J., RENNENBERG, H. u. FOYER, C.H. (1998): Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* **49** (321), 623-647
- O'HALLORAN, T. (1993): Transitional metals in control of gene expression. *Science* **261**, 715-725
- OIKAWA, S., KURASAKI, M., KOJIMA, Y. u. KAWANISHI, S. (1995): Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNS cleavage induced by copper-containing metallothioneins. *Biochemistry* **34**, 8763-8770

- OUARITI, O., BOUSSAMA, N., ZARROUK, M., CHERIF, A. u. GHORBAL, M.H. (1997): Cadmium and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry* **45** (7), 1343-1350
- OUZOUNIDOU, G., ILIAS, I., TRANOPOULOU, H. u. KARATAGLIS, S. (1998): Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology. *J. Plant Nutr.* **21** (10), 2089-2101
- PATRA, J. u. PANDA, B.B. (1998): A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L.. *Environmental Pollution* **101**, 99-105
- PINTO, M.C., MATA, A.M. u. LÓPEZ-BAREA, J. (1985): The redox interconversion mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase. *Eur. J. Biochem.* **151**, 275-281
- PRESTA, A., GREEN, A.R., ZELAZOWSKI A. u. STILLMAN, M.J. (1995): Copper binding to rabbit liver metallothionein; Formation of a continuum of Copper(I)-thiolate stoichiometric species. *Eur. J. Biochem* **227**, 226- 240
- PRINCE, R.C. u. GUNSON, D.E. (1998): Prions are copper-binding proteins. *TIBS* **23**- June 1998, 197-198
- PUFAHL, R.A., SINGER, C.P. PEARISO, K.L., LIN, S-J., SCHMIDT, P.J., FAHRNI, C.J., CIZEWSKI CULOTTA V., PENNER-HAHN, J.E. u. O'HALLORAN, T.V. (1997): Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**, 853-856
- RAFTER, G.W. (1982): Copper inhibition of glutathione reductase and its reversal with gold thiolates, thiol, and disulfide compounds. *Biochemical Medicine* **27**, 381-391
- RAO, M.V., HALE, B.A. u. OMROD, D.P. (1995): Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. *Plant. Physiol.* **109**, 421-432
- RAUSER, W.E. (1995): Phytochelatins and related peptides; Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.* **109**, 1141-1149
- REED, C.J. u. DOUGLAS, K.T. (1991): Chemical cleavage of plasmid DNA by glutathione in the presence of Cu(II) ions. *Biochem. J.* **275**, 601-608

RENNENBERG, H. (1982): Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* **21** (12), 2771-2781

RHODES, D. u. STEWART, G.R. (1974): A procedure for the in vitro determination of enzyme activity in higher plant tissue. *Planta* **118**, 133-144

RIVETT, A.J. u. LEVINE, R.L. (1990): Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes. *Arch. Biochem. Biophys.* **278** (1), 26-34

ROBINSON, N.J., TOMMEY, A.M., KUSKE, C. u. JACKSON, P.J. (1993): Plant metallothioneins. *Biochem. J.* **295**, 1-10

ROHNERT, U., KOSKE, D., SCHNEIDER, W. und ELSTNER, E.F. (1998): Inhibition by Salix- extracts and phytodolor^R of copper-catalyzed oxidative destructions. *Z. Naturforsch.* **53c**, 233-240

SABEH, F., WRIGHT, T. u. NORTON, S.J. (1993): Purification and characterization of a glutathione peroxidase from *Aloe vera* plant. *Enzyme Protein* **47**, 92-98

SAMUNI, A., ARONOVITCH, J., GODINGER, D., CHEVION, M. u. CZAPSKI, G. (1983): On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. *Eur. J. Biochem.* **137**, 119-124

SANDMANN, G. u. BÖGER, P., (1980): Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiol.* **66**, 797-800

SCHMEIL, FITSCHEN: (1982) Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten. 87. überarbeitete und erweiterte Auflage von W. Rauh und K. Senghas. Quelle und Meyer, Heidelberg.

SHARMA, Y.K., LEON, J., RASKIN, I. u. DAVIS, K.R. (1996): Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5099-5104

- SHAW, C.F., STILLMAN, M.J. u. SUZUKI, K.T. (1992): in Stillman, M.J., Shaw, C.F., Suzuki, K.T.: Metallothioneins, synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate complexes. VCH Publishers, Inc., New York (1992)
- SIGFRIDSSON, K. (1998): Plastocyanin, an electron-transfer protein. *Photosynthesis Research* **57**, 1-28
- SILVER, S. (1996): Bacterial resistances to toxic metal ions – a review. *Gene* **179**, 9-19
- SMITH, I.K., KENDALL, A.C., KEYS, A.J., TURNER, J.C. u. LEA, P.J. (1985): The regulation of the biosynthesis of glutathione in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* **41**, 11-17
- SMITH, I.K., VIERHELLER, T.L. u. THORNE, C.A. (1989): Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol. Plant.* **77**, 449-456
- SMITH, M.A., HARRIS, P.L.R., SAYRE, L.M. u. PERRY, G. (1997): Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9866-9868
- SOMASHEKARAI AH, B.V., PADMAJA, K. u. PRASAD, A.R.K. (1992): Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* **85**, 85-89
- STADTMAN, E.R. (1990a): Discovery of glutamine synthetase cascade. *Meth. Enzymol.* **182**, 793-809
- STADTMAN, E.R. (1990b): Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* **9**, 315-325
- STEFFENS, J.C. (1990): The heavy metal binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 553-575
- STREB, P., FEIERABEND, J. u. BLIGNY, R. (1997): Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant, Cell and Environment* **20**, 1030-1040

SUGIMOTO, M., FURUI, S. u. SUZUKI, Y. (1997): Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (8), 1379-1381

TKESHELASHVILI, L.K., McBRIDE, T., SPENCE, K. u. LOEB, L.A. (1991): Mutation spectrum of copper-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* **266** (10), 6401-6406

UCHIDA, K. u. KAWAKISHI, S. (1990): Site-specific oxidation of angiotensin I by copper(II) and L-ascorbate: conversion of histidine residues to 2-imidazolones. *Arch. Biochem. Biophys.* **283** (1), 20-26

UEDA, J., TAKAI, M., SHIMAZU, Y. u. OZAWA, T. (1998): Reactive oxygen species generated from the reaction of copper(II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. *Arch. Biochem. Biophys.* **357** (2), 231-239

WECKX, J.E.J. u. CLIJSTERS, H.M.M. (1996): Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol. Plant.* **96**, 506-512

WOLOSIUK, R.A. u. BUCHANAN, B.B. (1977): Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* **266**, 565-567

YE, B., MÜLLER, H.H., ZHANG, J. u. GRESSEL, J. (1997): Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and wheat. *Plant Physiol.* **115**, 1443-1451

YUAN, D.S., STEARMAN, R., DANCIS, A., DUNN, T., BEELER, T. u. KLAUSNER, R. (1995): The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2632-2636

ZENK, M.H. (1996): Heavy metal detoxification in higher plants- a review. *Gene* **179**, 21-30

Herrn Prof. Dr. A. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas und die stets gern gewährten Ratschläge und Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. B. Huchzermeyer und Herrn Prof. Dr. G. Bicker vom Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich für ihre Unterstützung und für die Möglichkeit der Nutzung ihres Labors.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Elstner vom Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München für die freundliche Gewährung der Möglichkeit, experimentelle Arbeiten in seinem Labor in Weihenstephan durchführen zu können.

Bei Frau Dr. S. Hippeli, Frau Dr. I. Heiser, Frau A. Muhr vom Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München und in besonderem Maße bei Frau Dr. D. Schneider vom Lehrstuhl für Forstbotanik der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanke ich mich für die Unterstützung während der Ausführung der Experimente.

Frau J. Bunnenberg und Herrn T. Heins danke ich für ihre Hilfe bei der Faktorpräparation.

Frank Wiechmann

Lebenslauf

geboren: 21.06.1964 in Gehrden

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulbildung: 1970-1974 Grundschule
1974-1976 Orientierungsstufe
1976-1983 Ganztagsgymnasium
Abschluß Allgemeine Hochschulreife

25.07.1983 - 23.09.1983 Berufstätigkeit bei der Hannoverschen landwirtschaftlichen Berufsgenossenschaft (HIBG)

01.10.1983 - 31.12.1984 Wehrdienst

07.01.1985 - 31.08.1985 Berufstätigkeit bei der HIBG

07.10.1985 - 24.10.1985 Berufstätigkeit bei der HIBG

13.II.1985 - 30.08.1986 Berufstätigkeit bei der HIBG / Alterskasse

ab Wintersemester 1986 Studium der Biologie an der Universität Hannover

13.10.1993 Erlangung des Hochschulgrades Diplom-Biologe
Thema der Diplomarbeit: „Die Cysteinsynthese aus *Anabaena* PCC 7120“, angefertigt bei Prof. Dr. A. Schmidt im Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
Geprüfte Fächerkombination: Botanik, Mikrobiologie, Biochemie und Virologie

16.07.1999 Promotion zum Dr. rer. nat. am Botanischen Institut der Universität Hannover