

Übersichten

Die Glutathionperoxidase: Enzymologie und biologische Aspekte

L. FLOHÉ

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel)

Glutathione Peroxidase: Enzymology and Biological Aspects.

Summary. The literature on glutathione peroxidase (glutathione: H_2O_2 oxidoreductase, EC 1.11.1.9) is reviewed.

The essential properties of the enzyme will be briefly summarized: Glutathione peroxidase contains no non-protein prosthetic group. Its molecular weight is 84000; the molecule consists of four subunits of identical molecular weight. A helix content of approximately 25% was estimated from circular dichroism measurements. The enzyme is highly specific for GSH, whereas all kinds of peroxides are metabolized. The α -carboxylic function of the glutamic acid residue of GSH is mainly responsible for the pronounced donor substrate specificity. The pH dependency of the enzymatic turnover and the velocities of the reaction with foreign donor substrates reveal that GSH reacts as a mercaptide ion. A saturation by the donor substrate could not be observed for GSH peroxidase from both cow and rat. A definite K_m (GSH)-value of 3 mM, however, has been reported for the pig blood enzyme. The $K_m(H_2O_2)$ -values, which must not be considered as dissociation constants of an enzyme peroxide complex, are low in value and depend on the concentration of the donor substrate. The role of protein SH-groups in the reaction mechanism is discussed. It is assumed that these SH-groups, activated in an unknown manner, change their redox state during the catalytic process. Mixed disulfide intermediates of enzyme and donor substrate are suggested.

The following biological aspects are to be noted: The studies on the kinetic properties and substrate specificity of GSH peroxidase yield essential information on the possible biological function of the enzyme. The proportionality of the reaction rate of GSH peroxidase to the GSH concentration (within a physiological range) explains the similarity of the clinical symptoms resulting from either a shortage of GSH or from a genetic deficiency of GSH peroxidase. It becomes evident that the decrease of the peroxidatic reaction rate at low GSH conditions plays an important role in the pathogenesis.

Since peroxides of any structure are metabolized by GSH peroxidase at comparable rates, the discussion of the pathogenesis of oxidative cell damage in GSH deficiencies must also consider toxic metabolites besides H_2O_2 , especially hydroperoxides of unsaturated fatty acids. The importance of GSH peroxidase for the protection of membrane lipids from oxidative disintegration has been established. It seems obvious to discuss this function of GSH peroxidase also for other tissues. However, this remains to be proved experimentally.

The question as to what extent H_2O_2 is eliminated via GSH peroxidase or via catalase is rather complex since GSH peroxidase is localized in other compartments than catalase (at least in parenchymatous organs). Therefore, an unambiguous answer can only be given in special cases (lens, liver mitochondria, and peroxisomes).

GSH peroxidase contributes to the regulation of the pentose-monophosphate shunt by influencing the NADP/NADPH quotient via the glutathione reductase system; the level of GSH peroxidase itself is subject to either direct or indirect hormonal control.

Zusammenfassung. Die Literatur zur Glutathionperoxidase (Glutathion: H_2O_2 -Oxidoreduktase, EC 1.11.1.9) wird diskutiert.

Die wesentlichen Eigenschaften des Enzyms seien kurz zusammengefaßt: Glutathionperoxidase enthält keine proteinfremde prosthetische Gruppe. Das Molekulargewicht beträgt 84000, sie besteht aus 4 Untereinheiten mit identischem Molekulargewicht. Messung des Circulardichroismus lassen einen ungefähren Helixgehalt von 25% erwarten. Es wird eine hohe Selektivität für GSH beobachtet, während Peroxide beliebiger Struktur umgesetzt werden. Für die ausgeprägte Donor-Substrat-Spezifität ist u. a. die α -Carboxylgruppe des Glutamylrestes von GSH verantwortlich. Aus der pH-Abhängigkeit der Reaktion und den Reaktionsraten mit Donor-Fremd-Substraten kann geschlossen werden, daß GSH als Mercaptidion in die Reaktion eingeht. Eine Sättigung mit Donorsubstrat wird bei der GSH-Peroxidase des Rindes und der Ratte nicht beobachtet, für das Schweineblutenzym wird ein K_m (GSH)-Wert von 3 mM angegeben. Die $K_m(H_2O_2)$ -Werte, die nicht als Dissoziationskonstanten eines Enzym-Peroxid-Komplexes betrachtet werden dürfen, liegen niedrig und sind eine Funktion der Donor-Substrat-Konzentration. Zum Verständnis des Reaktionsmechanismus müssen in noch ungeklärter Weise aktivierte Protein-SH-Gruppen diskutiert werden, die einem Valenzwechsel während der Katalyse unterliegen. Intermediär werden wahrscheinlich gemischte Disulfide zwischen Enzym und Donorsubstrat gebildet.

Folgende biologische Aspekte werden hervorgehoben: Insbesondere die Ergebnisse zur Kinetik und Substratspezifität der GSH-Peroxidase gewähren wichtige Einblicke in mögliche biologische Funktionen des Enzyms: Da bei physiologischen GSH-Konzentrationen die Reaktionsrate des Enzyms dem GSH-Gehalt proportional ist, wird die Ähnlichkeit der klinischen Bilder bei GSH-Mangelzuständen und genetisch bedingtem GSH-Peroxidase-Mangel verständlich. Es wird deutlich, daß der Verminderung der peroxidatischen Reaktionsrate entscheidende pathogenetische Bedeutung bei GSH-Mangelzuständen beizumessen ist.

Da Peroxide beliebiger Struktur annähernd gleich schnell von der GSH-Peroxidase gestoffwechselt werden, müssen in pathogenetische Betrachtungen bei GSH-mangelbedingten oxidativen Zellschädigungen nicht nur Wasserstoffperoxid, sondern andere Peroxide, besonders peroxidierte Lipide als toxische Metaboliten einbezogen werden.

Die Bedeutung der GSH-Peroxidase beim Schutz der Membranlipide vor oxidativer Zerstörung kann in Mitochondrien als erwiesen angesehen werden. Eine Erweiterung dieses Konzeptes auf andere Gewebe liegt nahe, bedarf aber noch der experimentellen Überprüfung.

Die Frage, in welchem Ausmaß Wasserstoffperoxid über GSH-Peroxidase bzw. Katalase eliminiert wird, kann pauschal nicht beantwortet werden, da GSH-Peroxidase (in parenchymatösen Organen zumindest) anders als Katalase kompartimentiert ist. Eindeutige Aussagen sind daher zur Zeit nur in speziellen Fällen (z. B. Augenlinse, Lebermitochondrien und Peroxisomen) möglich.

Die Glutathionperoxidase-Reaktion reguliert via Glutathionreduktase und NADP/NADPH-Quotient den Pentosephosphatcyclus, unterliegt aber selber direkt oder indirekt hormonaler Kontrolle.

1. Einleitung

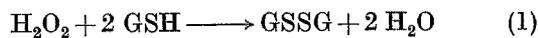
Seit nunmehr 13 Jahren wird die Glutathionperoxidase mit wachsendem Interesse untersucht.

Das Enzym verdient nicht nur insofern Beachtung, als es unter den Peroxidasen in reaktionsmechanistischer Hinsicht eine Sonderstellung einnimmt; vielmehr

zeichnet sich nach eingehender Beschäftigung mit diesem Enzym die Möglichkeit ab, einige pathophysiologische Phänomene aus dem Bereich der Hämatologie und Ophthalmologie exakter zu deuten. Darüber hinaus wird die generelle Bedeutung der Glutathionperoxidase beim Schutz von Membranen vor oxidativen Schädigungen zunehmend evident. Eine Zusammenstellung der bisherigen Befunde zur Glutathionperoxidase und eine zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf ihre mögliche biologische bzw. pathophysiologische Signifikanz scheint daher geeignet, älteren Untersuchungen auf dem Gebiet der Membranstabilität, des Peroxid- und des Glutathionstoffwechsels einen neuen Stellenwert zu geben und die noch offenen Fragen prägnanter zu artikulieren.

2. Entdeckung und bisherige Anreicherungen der Glutathionperoxidase

1957 entdeckte Mills [148], daß in Rindererythrocyten neben der Katalase ein weiteres Enzym existiert, das in Anwesenheit von Glutathion die oxidative Zerstörung von Hämoglobin durch H_2O_2 verhindern kann. Das Enzym, das die Reaktion



katalysiert, erhielt den systematischen Namen GSH: H_2O_2 -Oxidoreduktase (E.C. 1.11.1.9) [82]. Mills [149] reicherte das Enzym 1959 aus Rindererythrocyten an; eine Isolierung gelang jedoch wegen der ausgesprochenen Instabilität der GSH-Peroxidase nicht. 1967 beschrieben Schneider und Flohé [180] ein Schema zur Präparation der GSH-Peroxidase aus Rindererythrocyten, das zu einem relativ stabilen Produkt mit hoher spezifischer Aktivität ($> 100 \text{ U/mg}$) führte. Die erhaltenen Proteinmengen waren jedoch so gering, daß eine Überprüfung der Einheitlichkeit des Materials unterbleiben mußte. Nach unseren heutigen Erfahrungen dürften jedoch nur unwesentliche Verunreinigungen in diesem Produkt vorhanden gewesen sein. Die Glutathionperoxidase konnte inzwischen auch aus anderen Quellen angereichert werden, so von Little und O'Brien [134] aus Rattenleber, von Holmberg [96] aus Rinderaugenlinsen, von Flohé, Schlegel und Schaich [79] aus Erythrocyten und Leber der Ratte und von Little et al. [135] aus Schweineerythrocyten. Erst 1970 gelang Flohé et al. [81] erstmals die Reindarstellung des Enzyms in wägbaren Mengen.

Das Interesse der genannten Arbeitsgruppen galt vornehmlich dem Peroxidstoffwechsel der Zelle. Unabhängig fanden Lehninger und Gotterer [126] ein mitochondriales Protein, das die GSH-induzierte Schwellung von Mitochondrien [128] verhindern kann. Darüber hinaus kontrahieren sich die geschwollenen Mitochondrien bei Zugabe von ATP, Mg^{++} und Rinderalbumin, sofern dieser „C-Faktor“ in ausreichender Konzentration zugegeben wird. 1962 konnten Neubert, Wojtczak und Lehninger [160] zeigen, daß diese „C-Faktor-Aktivität“ im wesentlichen der Leber-GSH-Peroxidase zuzuordnen ist. Vergleichende Untersuchungen der Glutathionperoxidase aus Erythrocyten und Leber ergaben, daß das Erythrocytenenzym mit dem Leberenzym und somit mit dem C-Faktor I zumindest funktionell, wahrscheinlich auch chemisch identisch ist [79, 160].

Bisher konnte die Glutathionperoxidase nur im Säugetier mit Sicherheit nachgewiesen werden. Zwar fanden Flohé und Menzel [75] eine GSH-Peroxidase-Aktivität im Spinathomogenat, doch unterscheidet sich das pflanzliche Enzymsystem in wesentlichen Kriterien, insbesondere in der pH-Abhängigkeit der Reaktionsrate, von der Glutathionperoxidase tierischer Gewebe. Zudem konnte die in der Pflanze nachgewiesene Glutathionperoxidaseaktivität bisher nicht einer definierten Proteinfraction zugeordnet werden. Obwohl also auch in pflanzlichem Gewebe ein Glutathion-abhängiger Stoffwechselweg zur Peroxidelimination wirksam ist [75, 141, 142, 203], scheinen die Unterschiede zum tierischen Organismus in reaktionsmechanistischer Hinsicht so ausgeprägt, daß es sinnvoll erscheint, die Bezeichnung „Glutathionperoxidase“ bzw. GSH: H_2O_2 -Oxidoreduktase zunächst auf das Enzym aus tierischen Quellen zu beschränken.

3. Testsysteme

Die Aktivitätsbestimmung der GSH-Peroxidase hat aus verschiedenen Gründen große Schwierigkeiten bereitet: 1. Die Substrate des Enzyms reagieren auch nichtenzymatisch miteinander, in schwach alkalischer Lösung sogar mit erheblicher Geschwindigkeit. 2. Beide Substrate reagieren weiterhin mit einer Vielzahl von Substanzen aus biologischem Material, so daß der Spezifität der Analysenverfahren besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden muß. 3. Die Aktivität des Enzyms wird stark durch die Zusammensetzung des Inkubationsmediums, insbesondere durch Art und Konzentration der Anionen beeinflusst [74]. 4. Da ein definiertes pH-Optimum nicht gegeben ist [96, 149, 180], muß im Bereich steiler pH-Abhängigkeit der Reaktionsrate gemessen werden, so daß geringfügige pH-Schwankungen des Mediums zu erheblichen Störungen der Aktivitätsbestimmung führen. Die bisher verwandten Testsysteme seien daher kurz diskutiert:

Der erste von Mills [148] beschriebene Test beruhte auf der biologischen Funktion der GSH-Peroxidase in Erythrocyten. Es wurde als Maß für die Aktivität die Hemmung der Choleglobinbildung in Hämolysaten bei Peroxidbelastung verfolgt. Dieser Methode kann heute nur noch historisches Interesse beigemessen werden.

In der folgenden Zeit wurden einige Aktivitätsbestimmungen beschrieben, bei denen das Verschwinden von GSH gemessen wurde: 1. durch Umsatz des verbliebenen GSH mit pCMB [149] nach Boyer [23], 2. durch Verwendung der Nitroprussidreaktion [44, 87] nach Beseitigung von nichtumgesetztem H_2O_2 , 3. durch amperometrische Titration von GSH [40] nach Børresen [14] und 4. durch polarographische Bestimmung von Glutathion [74, 180]. Von den genannten Methoden ist nach unserer Erfahrung die polarographische GSH-Bestimmung vorzuziehen, da sie die Analyse des Testgemisches bei niedrigem pH und somit bei höchstmöglicher Stabilität der Substrate gestattet.

Weitere Testverfahren beruhen auf der enzymatischen Bestimmung des durch die GSH-Peroxidase-Reaktion gebildeten GSSG. Dies kann einmal erfolgen nach Stoppen der Peroxidasereaktion [171] oder nach Paglia und Valentine durch gekoppelte Reaktion mit NADPH und Glutathionreductase [166]. Die

kinetischen Eigenschaften der Glutathionreductase — Produkthemmung durch GSH [74, 182] und Substrathemmung bei hoher NADPH- und niedriger GSSG-Konzentration [190—192] — schränken den Anwendungsbereich des gekoppelten Testes jedoch ein. Obwohl dieses Verfahren als eine der elegantesten Routinemethoden betrachtet werden muß, kann es bei extremen Substratkonzentrationen, z. B. bei kinetischen Untersuchungen, zu falschen Ergebnissen führen [73, 74, 79]. Der gekoppelte Test kann zur Identifizierung der Glutathionperoxidase auf Elektrophoresestreifen herangezogen werden [71]. Unlängst wurde er für klinische Routineuntersuchungen als Tüpfeltest ausgearbeitet [15].

Wegen der zahlreichen Reaktionsmöglichkeiten der Substrate der GSH-Peroxidase ist es unmöglich, die Aktivität des Enzyms in biologischem Material ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen zu bestimmen. Die katalytische H_2O_2 -Zersetzung wird zweckmäßig durch Acid gehemmt [15, 44, 74, 148, 166, 180]. Die Nebenreaktionen von GSH quantitativ zu verhindern, bereitet ernstere Schwierigkeiten. Da aber die Reaktionsrate der GSH-Peroxidase in allen Konzentrationsbereichen der GSH-Konzentration proportional ist (vgl. 4.4) verfälschen unspezifische Reaktionen des Glutathions in jedem Fall das Analyseergebnis [74]. Von Paglia und Valentine [166] wurde für die GSH-Peroxidase-Bestimmung in Erythrocyten vorgeschlagen, das Hämoglobin nach Drabkin und Austin [63—65] in Cyanmethämoglobin zu überführen, um die durch HbO_2 bedingte GSH-Oxidation unter den Testbedingungen auszuschließen. Von Flohé und Brand [74] konnte gezeigt werden, daß durch dieses Verfahren die Analyseergebnisse zwar wesentlich verbessert wurden, die Nebenreaktionen von GSH jedoch nicht quantitativ verhindert werden können. Die verlässlichsten Aktivitätsbestimmungen dürften durch vorherige partielle Reinigung des Enzyms auf Sephadex G 150 erreicht werden — ein Verfahren, das unter den in l. c. 74 angegebenen Bedingungen ohne Aktivitätsverlust und mit zufriedenstellender Reproduzierbarkeit verläuft, für Routineanalysen jedoch zu aufwendig ist. Als Screening-Test müssen daher die Methoden von Paglia und Valentine [166] und Boguslawska-Jaworska und Kaplan [15] empfohlen werden. Wegen der geschilderten Schwierigkeiten sind Absolutangaben der Glutathionperoxidaseaktivität in biologischem Material durchweg mit Vorsicht zu beurteilen.

4. Eigenschaften der GSH-Peroxidase

4.1. Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der Glutathionperoxidase aus Rindererythrocyten wurde von Schneider und Flohé [180] durch Chromatographie auf Sephadex G 150 nach Andrews [5] auf 85000 geschätzt. Paglia und Valentine [166] erhielten mit der gleichen Methode (Sephadex G 200) für das Enzym aus menschlichen Erythrocyten einen groben Schätzwert von 100000. Ebenfalls durch Gelchromatographie bestimmte Holmberg [96] das Molekulargewicht des Enzyms aus Rinderaugenlinsen auf 95000. Die Untersuchungen der GSH-Peroxidase aus Blut und Leber der Ratte ergaben Schätzwerte in der gleichen Größenordnung. In befriedigender Übereinstimmung mit dem in l. c.

180 gefundenen Wert wurde unlängst [81] mit Hilfe der Sedimentationsgleichgewichtsmethode ein Molekulargewicht für das Rinderblutenzym von 83800 ± 1200 ermittelt. Außerdem konnte durch elektrophoretische Untersuchungen nach Dunker [66] gezeigt werden, daß die Glutathionperoxidase in Natriumdodecylsulfat in 4 Untereinheiten von einem Molekulargewicht von 21000 dissoziiert [81]. Eine Molekülgröße des nativen Enzyms um 84000 ist somit durch 3 unabhängige Methoden gesichert.

4.2. Substratspezifität

4.2.1. Donorsubstratspezifität. Im Gegensatz zu anderen Peroxidasen ist die Glutathionperoxidase hochspezifisch in Hinsicht auf das Donorsubstrat. So werden die üblichen Peroxidsubstrate wie o-Toluidin, Guajacol, Pyrogallol u. a. [178] überhaupt nicht umgesetzt [149]. Mills [149] fand darüber hinaus auch mit anderen SH-Verbindungen als Glutathion keinen signifikanten Umsatz durch partiell gereinigte GSH-Peroxidase aus Rindererythrocyten. Demgegenüber beschrieben Little und O'Brien [134] relativ hohe Reaktionsraten der Leberglutathionperoxidase der Ratte mit Cystein, Cysteamin und Thioglykolsäure. Von Flohé et al. [79] konnte gezeigt werden, daß unter Verwendung hoher Enzymaktivitäten mit einer Vielzahl von SH-Verbindungen signifikante Umsatzraten erzielt werden können, die jedoch relativ zum GSH-Umsatz beträchtlich niedriger als die von Little und O'Brien [134] beschrieben sind. Da sich die unter l. c. 79 zitierten Untersuchungen auch auf das Rattenleberenzym erstrecken, können die differierenden Ergebnisse nur durch unterschiedliche Reinheit der verwendeten Enzympräparate erklärt werden. Obwohl Glutathion mit Sicherheit als das einzige Substrat der GSH-Peroxidase mit physiologischer Bedeutung betrachtet werden kann, wurde von Flohé et al. [81] eine systematische Spezifitätsstudie durchgeführt, die folgende Einblicke in den Substratbindungsmechanismus gestattet: 1. Aminothiole, deren Aminofunktion sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur SH-Gruppe befindet, werden extrem schlecht umgesetzt. Möglicherweise verhindert eine hohe positive Ladungsdichte im aktiven Zentrum des Enzyms die Annäherung der Ammoniumgruppe. 2. Die Carboxylgruppe des Glutamylrestes von GSH ist offenbar an der Orientierung des Substratmoleküls beteiligt, da Veresterung dieser Carboxylgruppe oder Austausch des γ -Glutamyl- gegen den β -Aspartyl- oder Acetylrest in GSH-analogen Peptiden die Reaktionsrate drastisch senkt. 3. Abgesehen von diesen spezifischen Beziehungen von Donor-Substrat und Enzym wird die Reaktionsrate mit Fremdsubstraten weitgehend durch den Dissoziationsgrad ihrer Mercaptogruppe determiniert (vgl. 4.4 und 4.5).

4.2.2. Acceptorsubstratspezifität. Während von den bisher bekannten Peroxiden außer H_2O_2 im wesentlichen nur Methyl- und Äthylhydroperoxid reduziert werden [178], scheint sich die Glutathionperoxidase im Hinblick auf das Peroxidsubstrat völlig unspezifisch zu verhalten [40—43, 96, 133—135]. Zum Beispiel werden nach Little und O'Brien [134] Linolsäurehydroperoxid, Cumolhydroperoxid, t-Butylhydroperoxid und Linolensäurehydroperoxidäthylester nahezu gleich schnell wie H_2O_2 durch GSH-Peroxidase abgebaut. Diese Ergebnisse wurden unlängst durch Holm-

berg [96] weitgehend bestätigt. Christophersen [42] konnte ferner zeigen, daß auch Thyminhydroperoxid und peroxidierte DNA von Rattenleber-GSH-Peroxidase reduziert werden.

Die Reaktionsprodukte bei der enzymatischen Reduktion von Fettsäureperoxiden wurden von Christopherseon [40, 41, 43] als Hydroxysäuren identifiziert. Mit Linolsäurehydroperoxid [40] als Substrat konnten die Produkte 9-Hydroxy-10,12-octodecadiensäure und 13-Hydroxy-9,11-octodecadiensäure nachgewiesen werden, während mit Linolensäurehydroperoxid [43] 4—5 Produkte (9-Hydroxy-10,12,15-octodecatriensäure, 12-Hydroxy-9,13,15-octodecatriensäure, 13-Hydroxy-9,11,15-octodecatriensäure, 16-Hydroxy-9,12,14-octodecatriensäure und 8-Hydroxy-9,12,15-octodecatriensäure) erhalten wurden.

Die von der GSH-Peroxidase katalysierte Reaktion kann also allgemeiner wie folgt formuliert werden:



4.3. Hemmbarkeit der GSH-Peroxidase

Im Unterschied zu hämhaltigen Peroxidasen wird GSH-Peroxidase nicht durch Pseudohalogenide gehemmt [134, 148, 180]. Schwermetallionen und SH-Reagentien in niedrigen Konzentrationen ($< 10^{-4}$ M) haben ebenfalls keinen Einfluß auf die Enzymaktivität [180]. Demgegenüber fanden Little et al. eine signifikante Hemmung der GSH-Peroxidase bei hohen Konzentrationen von pCMB (3×10^{-3} M [134] bzw. $0,5 \times 10^{-3}$ M [135]) und NEM (3×10^{-3} M [134]), während Jodacetat, Jodacetamid, Arsenit und Cd^{++} unwirksam bleiben [134]. Schneider und Flohé [180] fanden weiterhin eine reversible Hemmung durch SO_3^- . Hg^{++} hemmt ebenfalls reversibel, jedoch nur wenn das Enzym zuvor mit GSH vorinkubiert wird [180]. Die zuletzt erwähnten Ergebnisse wurden als Hinweis auf eine reversible Oxidation vicinaler SH-Gruppen des Enzymproteins zu —S—S—Brücken während der Katalyse interpretiert [180, 181].

Die substratanalyse Ophthalmalmsäure hemmt die Reaktion erstaunlicherweise nicht [81, 96]. Demgegenüber wird mit verschiedenen SH-Verbindungen, die kaum strukturelle Verwandtschaft mit GSH zeigen, eine signifikante Hemmung beobachtet [81].

Von Interesse dürfte weiterhin sein, daß der Flavinantagonist Chinacrin selbst bei hohen Konzentrationen (1×10^{-2} M) keinen Einfluß auf die Katalyse ausübt und FMN und FAD die Enzymaktivität nicht zu steigern vermögen [69, 134].

Eine unspezifische und reversible Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch hohe Konzentrationen mehrwertiger Anionen wurde von Flohé und Brand [74] beschrieben. Unlängst wurde eine Hemmung der GSH-Peroxidase durch verschiedene Nucleotide beobachtet. Nach kinetischen Untersuchungen erweist sich die Hemmung durch ATP als kompetitiv im Hinblick auf GSH, während der Hemmeffekt durch Peroxid eher gesteigert wird. Da die Ansprechbarkeit des Enzyms auf Nucleotide durch SH-Reagentien und denaturierende Behandlungen nicht gleichermaßen beeinflusst wird wie die katalytische Funktion, wird jedoch die Hemmung als allosterisch interpretiert [135].

Es fällt nicht leicht, die hinsichtlich ihres informativen Charakters teils widersprüchlichen Ergebnisse zu interpretieren. Jedenfalls konnten bislang keine

für Häm- und Flavoproteide charakteristischen Reaktionen festgestellt werden, während die Beteiligung von SH- bzw. —S—S-Gruppen an der enzymatischen Reaktion zumindest durch einige der angeführten Befunde gestützt wird (vgl. 4.6).

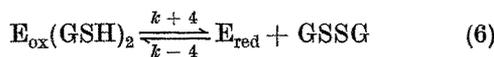
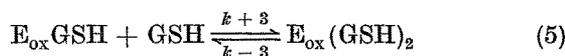
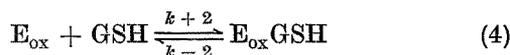
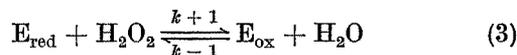
4.4. Kinetik der GSH-Peroxidase

In ihren kinetischen Eigenschaften weist sich die Glutathionperoxidase insofern als echte Peroxidase aus, als eine Sättigung des Enzyms mit Donorsubstrat nicht erreicht wird und die Affinität zum Peroxid extrem hoch ist [178]. Eine Reaktionskinetik erster Ordnung im Hinblick auf das Donorsubstrat wurde bereits von Cohen und Hochstein [44], Schneider und Flohé [180], Little und O'Brien [134] und Christophersen [40] beobachtet. Widersprechende Ergebnisse von Paglia und Valentine [166], Hochstein und Utley [95] und Demus-Oole et al. [53, 55], die eine GSH-Sättigung des Enzyms fanden, konnten unlängst auf methodische Unzulänglichkeiten (Verwendung des gekoppelten Tests für kinetische Untersuchungen; vgl. 3.) zurückgeführt werden [74]. Eine lineare Proportionalität von Umsatzrate und Donorsubstratkonzentration auch bei hohen Substratkonzentrationen konnte schließlich von Flohé und Brand [73, 74] für das Rindererythrocytenenzym, von Flohé, Schlegel und Schaich [79] für GSH-Peroxidase aus Rattenblut und Rattenleber und von Holmberg [96] für das Enzym aus Rinderaugenlinsen festgestellt werden.

Als weniger gesichert müssen die Ergebnisse über die Michaeliskonstante für H_2O_2 angesehen werden. Lange Zeit gelang es nicht, überhaupt eine Abhängigkeit der Reaktionsrate von der Peroxidkonzentration festzustellen [40, 44, 87, 95, 96, 148, 180]. Paglia und Valentine [166] erhielten unter Verwendung des gekoppelten Testes einen $K_m(\text{H}_2\text{O}_2)$ -Wert von $2,5 \times 10^{-5}$ M für GSH-Peroxidase aus menschlichen Erythrocyten. Das Ergebnis konnte von Boivin et al. [18] bestätigt werden, während es von Hochstein und Utley [95] und Holmberg [96] mit Hilfe des gleichen Analysenverfahrens nicht reproduziert werden konnte. Durch direkte Substratbestimmungen fanden hingegen Flohé und Brand [73] und Flohé, Schlegel und Schaich [79] wesentlich niedrigere $K_m(\text{H}_2\text{O}_2)$ -Werte sowohl für das Rinder- als auch Rattenenzym (1×10^{-6} bzw. $2—3 \times 10^{-6}$ M bei 37°C und 1×10^{-4} M GSH). Die mit beiden Analysenverfahren gewonnenen Ergebnisse sind allerdings mit erheblichen Ungenauigkeiten belastet, die bedingt sind durch sehr kurze Inkubationszeiten [73], interferierende Spontanreaktion der Substrate [74] und im Falle des gekoppelten Testes zusätzlich durch die unter 3. angeführten Eigenheiten der Indicatorreaktion.

Obwohl demnach die kinetischen Analysen in quantitativer Hinsicht wenig befriedigen, kann der Reaktionsablauf der enzymatischen Katalyse wie folgt interpretiert werden [73]: Das Enzym wird in einer in weiten Konzentrationsbereichen nicht limitierenden, also sehr schnellen Reaktion durch Peroxid oxidiert und das reduzierte Enzym wird anschließend durch GSH regeneriert. Diese Regeneration muß in mindestens 2 sukzessiven Schritten erfolgen, da eine limitierende Reaktion mit einer Kinetik 1. Ordnung, also vom bimolekularen Typ, beobachtet wird. Diese

Überlegungen lassen sich an Hand des folgenden Formelschemas präzisieren:



Wir können mit einiger Sicherheit annehmen, daß k_{+2} bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen zumindest die limitierende Größe des gesamten Reaktionsablaufes darstellt. Wären k_{+3} bzw. k_{+4} kleiner als k_{+2} , so würde das Zwischenprodukt $E_{\text{ox}}(GSH)$ oder $E_{\text{ox}}(GSH)_2$ während der Reaktion akkumulieren. Dies aber würde sich zwangsläufig in einer GSH-Sättigungs-Kinetik ausdrücken, die wie eingangs erwähnt nicht beobachtet wird.

Weiterhin kann mit einiger Wahrscheinlichkeit eine Reversibilität von Reaktion (3) ausgeschlossen werden. Das bedeutet, daß abweichend von der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik [58, 93, 147] $K_m(H_2O_2)$ keine Gleichgewichtskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes darstellt, sondern vielmehr sich nach Briggs und Haldane [27, 59] zu k_{+2}/k_{+1} vereinfacht. Die Annahme, daß

$$K_m(H_2O_2) = \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \quad (7)$$

ist, beinhaltet jedoch, daß der unter definierten Bedingungen gemessene K_m -Wert für H_2O_2 eine Funktion der GSH-Konzentration ist. In diesem Licht erscheinen nunmehr die zitierten Ergebnisse nicht völlig unvereinbar, da sie bei sehr unterschiedlicher Donorkonzentration erhalten wurden (Ref. 166: $K_m(H_2O_2) = 2,5 \times 10^{-5}$ bei 5×10^{-3} M GSH; Ref. 73: $K_m(H_2O_2) = 1 \times 10^{-6}$ M bei 1×10^{-4} M GSH; Ref. 79: $2-3 \times 10^{-6}$ M bei 1×10^{-4} M GSH; Ref. 53: $K_m(H_2O_2) = 6,6 \times 10^{-5}$ bei 5×10^{-3} M GSH). Von Flohé [72] wurde daher die GSH-Abhängigkeit von $K_m(H_2O_2)$ geprüft. Auf Grund der experimentellen Schwierigkeit waren jedoch die Ergebnisse zu ungenau, um den oben postulierten Reaktionsablauf [Gl. (3)–(7)] definitiv beweisen zu können. Immerhin zeigte sich eine qualitativ eindeutige Abhängigkeit der $K_m(H_2O_2)$ -Werte von der Donorkonzentration. Eine abschließende Klärung der hier aufgeworfenen Fragen kann nur von der Anwendung spezieller Techniken zur Verfolgung schneller Reaktionen erhofft werden.

In einer kürzlich erschienenen Untersuchung [135] über die kinetischen Eigenschaften der GSH-Peroxidase aus Schweineerythrocyten wurden qualitativ abweichende Ergebnisse erhalten: Die Messung der Reaktionsrate in Abhängigkeit von der Peroxidkonzentration (Cumolhydroperoxid) ergab in Übereinstimmung mit Ref. 72 steigende K_m -Werte bei steigenden GSH-Konzentrationen, jedoch keine quantitativ auswertbaren Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm. Es wurde auf eine negative Kooperation oder mehrere Peroxidbindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität geschlossen. Letztere Interpretation ist als wahrscheinlicher zu betrachten. Für GSH wurde wiederum ein definierter K_m -Wert von 3 mM extra-

poliert. In der Formelfolge (3)–(6) würde dieser Kinetik eine Limitierung durch k_{+3} [Gl. (5)] und somit eine Akkumulation des Intermediärprodukts $E_{\text{ox}}GSH$ entsprechen. Einige Indizien [81, 180] sprechen dafür, daß die Reaktionen (4) und (5) jeweils Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen darstellen (vgl. auch 4.3 und 4.6). In Anbetracht der Ähnlichkeit der zugrundeliegenden chemischen Reaktionen ist durchaus denkbar, daß je nach Species einmal k_{+2} , ein anderes Mal k_{+3} den Gesamtverlauf limitiert. Für Ratte und Rind kann der erste Fall als gesichert betrachtet werden [73, 79].

Auf Grund der pH-Abhängigkeit der Reaktionsrate [96, 149, 180] muß vermutet werden, daß nicht GSH, sondern das Anion GS^- als eigentliches Substrat der GSH-Peroxidase anzusehen ist. In diesem Sinne läßt sich auch die Abhängigkeit der Reaktionsrate mit Donor-Fremd-Substraten vom pK-Wert ihrer SH-Gruppe interpretieren [81]. Doch konnte die enzymatische Reaktionsrate im pK-Bereich der Glutathionmercaptogruppe bislang wegen der hohen spontanen Reaktionsrate bei alkalischem pH nicht eindeutig gemessen werden. Eine Komplizierung der Verhältnisse durch dissoziablen reaktive Gruppen des Proteins kann demnach noch nicht ausgeschlossen werden. Weitergehende Folgerungen aus der pH-Abhängigkeit der Reaktionsrate, z. B. Beteiligung von Flavin an der Katalyse [169], haben sich als unbegründet erwiesen [69, 81, 96, 134, 180].

4.5. Spektrale Charakteristika

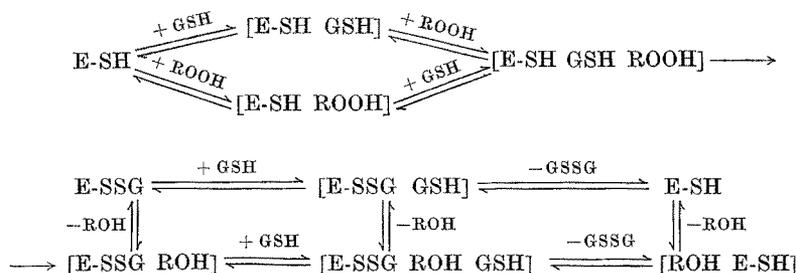
Das Absorptionsspektrum der reinen Glutathionperoxidase verdient insofern Beachtung, als es eine Beteiligung von Häm- oder Flavingruppen an der enzymatischen Katalyse definitiv ausschließt. Entsprechendes läßt sich aus Circular dichroismusspektren schließen, die keine Cotton-Effekte im sichtbaren Spektralbereich aufweisen [81]. Auffällig sind Verschiebungen der Maxima und Veränderungen der Intensität sowohl der Absorptionsspektren als auch der CD-Spektren im nahen UV-Bereich bei Anwesenheit von Donor-Substrat [81].

Da durch Gleichgewichtschromatographie von GSH-Peroxidase mit ^{14}C GSH die Bildung eines stabilen Enzym-Donorsubstrat-Komplexes ausgeschlossen wurde, sind die spektralen Verschiebungen wahrscheinlich auf Tertiärstrukturänderungen des Enzyms durch Reaktion mit dem Substrat zu deuten [60, 81]. Aus den CD-Spektren der GSH-Peroxidase im fernen UV, bzw. aus dem Vergleich der Spektren im Puffer, Natriumdodecylsulfat und 9 M Harnstoff, läßt sich für das native Enzym ein geringer α -Helix-Gehalt (um 25%) abschätzen [81].

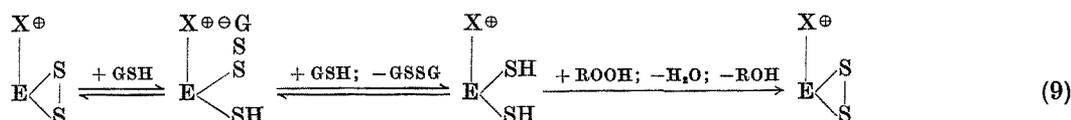
4.6. Möglicher Reaktionsmechanismus

Zum Reaktionsmechanismus der GSH-Peroxidase wurden einige Vorschläge publiziert, von denen nunmehr einer mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann: die von Paul [169] vermutete Flavinkatalyse. Am besten fundiert dürften die Hypothesen von Schneider und Flohé [180] in der von Flohé et al. [81] beschriebenen Modifikation und das Reaktionsschema von Little u. Mitarb. [135] sein. Beide Vorschläge verzichten auf proteinfremde Gruppen während der Katalyse, berücksichtigen SH-Funktionen im aktiven

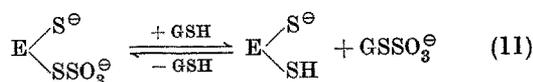
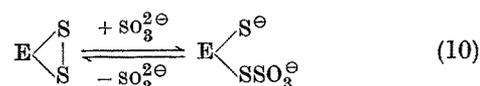
Zentrum des Enzyms und formulieren als Zwischenprodukt der enzymatischen Reaktion ein gemischtes Disulfid aus Protein und Glutathion; sie divergieren jedoch in entscheidenden Fragen und sollen daher zur Diskussion gestellt werden. Der Reaktionsweg nach Little, Olinescu, Reid und O'Brien [135] kann wie folgt schematisiert werden:



Der Vorschlag von Flohé et al. [81] beschränkt sich auf folgende Sequenz von Reaktionen:



Ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen Formulierungen besteht darin, daß Little et al. [135] nur eine SH-Gruppe pro Reaktionszentrum in die Betrachtung einbeziehen, während Flohé et al. [81] die Beteiligung zweier SH-Gruppen für wahrscheinlicher halten. Diese Frage ist experimentell nicht eindeutig entschieden. Zugunsten der Dithiol-Disulfid-Formulierung (9) lassen sich immerhin folgende Befunde anführen: 1. Nach Vorinkubation des Enzyms mit Glutathion werden Protein-SH-Gruppen freigesetzt [81, 180]. 2. Sulfid-Ionen hemmen die GSH-Peroxidase reversibel, ein Befund, der sich nach (10) und (11) als (reversible) Sulfityolyse [38] deuten läßt [180].



3. Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion mit GSH bzw. die Abhängigkeit der Reaktionsrate vom Dissoziationsgrad von Fremdsubstraten entspricht den Gesetzmäßigkeiten nichtenzymatischer Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen [81, 170, 214].

Gegen die Annahme vicinaler SH-Gruppen [180] wurde geltend gemacht, daß die Reaktion nicht durch Cd^{++} oder Arsenit gehemmt wird [134]. Doch besteht keine Notwendigkeit, eine strenge räumliche Nachbarschaft der SH-Gruppen zu fordern. Die beobachteten Differenzspektren (vgl. 4.5) der Glutathionperoxidase sprechen vielmehr für tiefgreifende Konformationsänderungen während der Reaktion [81]. Der wohl entscheidendste Unterschied zwischen (8) und (9) ist darin zu sehen, daß in (9) bewußt auf die in der Enzymologie übliche Formulierung von Enzym-Substrat-Komplexen verzichtet wird. Hierfür lieferte die Arbeitsgruppe von Little selbst ein gravierendes Argument,

nämlich die Unspezifität des Enzyms im Hinblick auf das Peroxidsubstrat [134, 135]. Die extrem hohen Reaktionsraten des Enzyms mit Peroxiden beliebiger Struktur (vgl. 4.2.2) sind eher als Ausdruck einer bimolekularen Redoxreaktion zu verstehen, bei der spezifischen Substratbindungsmechanismen keine Bedeutung zukommt. Für die Bildung von Enzym-

Peroxid- und Enzym-Produkt-Komplexen konnte bislang keine experimentelle Evidenz erbracht werden.

Differenzierter verlaufen die Reaktionen des oxidierten Enzyms mit Glutathion. Die hohe Spezifität der Peroxidase für Glutathion (vgl. 4.2.1) legt nahe, die Bildung eines Enzym-Glutathion-Komplexes [vgl. (8)] anzunehmen. Eine Beziehung von Enzym und Glutathion ausschließlich über die SH-Funktion ist nicht denkbar. Wie erwähnt, wird GSH offenbar über die α -Carboxylgruppe seines Glutamylrestes gebunden [81]. Auf die Formulierung eines Enzym-Substrat-Komplexes wird in (9) trotzdem wegen folgender experimenteller Befunde verzichtet:

1. Die für die überwiegende Zahl der Enzyme charakteristische Substrat-Sättigung, Ausdruck der Bildung von Enzym-Substrat-Komplexen, wird bei der GSH-Peroxidase des Rindes und der Ratte auch bei extremen GSH-Konzentrationen nicht beobachtet [73, 79].

2. Die bis auf die Mercaptofunktion völlig substrat-analoge Ophthalmalssäure hemmt die Reaktion nicht [81, 96].

3. Durch Gleichgewichtschromatographie mit ^{14}C GSH konnte keine meßbare Bildung von Enzym-GSH-Komplex festgestellt werden [81].

Die Reaktion des Enzyms mit GSH ist danach so zu interpretieren, daß nach reaktionslimitierender Bindung von GSH in nicht geschwindigkeitsbestimmenden Folgereaktionen das reduzierte Enzym regeneriert wird. Die primäre „Bindung“ von Glutathion an das Enzym wird wahrscheinlich adäquater als eine elektrostatisch bedingte optimale Orientierung des Substratmoleküls im Reaktionszentrum betrachtet, die die Reaktion der Substrat-Mercaptogruppe mit der Protein-Disulfidbrücke erleichtert. Nur durch diese Deutung wird verständlich, daß trotz hoher Spezifität weder meßbare Mengen an Enzym-GSH-Komplex gefunden werden noch dessen Konzentration als limitierende Größe der Gesamtreaktion fungiert.

Trotz der Vielfalt der in (8) aufgezeigten Reaktionsmöglichkeiten ist unseres Erachtens der wahr-

scheinlichste Reaktionsweg unberücksichtigt geblieben: die Oxidation des Proteins durch Peroxid in Abwesenheit von Donorsubstrat. Aus den kinetischen Untersuchungen (vgl. 4.4) kann geschlossen werden, daß die (unspezifische) Reaktion des Enzyms mit Peroxid ungleich schneller verläuft als die spezifische mit GSH. Die Bindung von GSH als Voraussetzung für die Reaktion mit Peroxid zu betrachten [vgl. (8)], ist unbegründet. Zudem dürfte es Schwierigkeiten bereiten, die extrem hohen Umsatzraten der GSH-Peroxidase unter Annahme eines statistisch unwahrscheinlichen ternären Komplexes aus Enzym, Peroxid und GSH zu erklären. Die Formulierung der Enzymkatalyse als Folge bimolekularer Redoxreaktionen scheint somit die Verhältnisse richtiger wiederzugeben.

5. Verteilung der Glutathionperoxidase im Organismus

5.1. Die Organverteilung der Glutathionperoxidase bei der Ratte wurde von Mills bereits 1960 untersucht [150]. Die höchste spezifische Aktivität konnte in der Leber nachgewiesen werden, mittlere Aktivitäten wurden in Erythrocyten, Herz, Lunge und Niere gefunden, während der Intestinaltrakt und die Skelettmuskulatur nur geringe Aktivitäten zeigten, die als nicht signifikant betrachtet wurden. Weiterhin gelang Pirie [174] der Nachweis von GSH-Peroxidase in Augenlinsen von Rind, Kaninchen und Meerschweinchen. Holmberg [96] konnte darüber hinaus zeigen, daß die spezifische Aktivität in Kern, Rinde und Epithel der Rinderaugenlinse sich annähernd gleich verhält. Unlängst [24] wurde GSH-Peroxidase auch in polymorphkernigen Leukocyten nachgewiesen. Die überwiegend aus Lymphocyten bestehenden Leukocyten von Pertussis-Patienten zeigten eine geringere spezifische Aktivität.

5.2. Intracelluläre Verteilung

In der Leberzelle zumindest liegt die Glutathionperoxidase nicht ausschließlich in gelöster Form vor. Schon Neubert, Rose und Lehninger [159] beobachteten eine offenbar vom Redoxzustand der Zelle abhängige Bindung der GSH-Peroxidase an die Mitochondrien. Der gebundene Anteil betrug bis zu 30% des Gesamtgehaltes. Es wurde eine reversible Bindung des Enzyms über Disulfidbrücken an die Mitochondrienmembran diskutiert [160]. Demus-Oole und Swierczewski [53] fanden bei einer groben Zellfraktionierung von Rattenlebern auch in der Kern- und Mikrosomenfraktion signifikante spezifische Aktivitäten.

Neuere Untersuchungen [80, 85] haben jedoch ergeben, daß der strukturgebundene Anteil der GSH-Peroxidase nahezu quantitativ den Mitochondrien zugeordnet werden muß. Auch in den Peroxisomen konnten nur geringe Aktivitäten festgestellt werden, die auf mitochondriale Verunreinigungen zurückgeführt werden müssen [80].

Die Zuordnung der Glutathionperoxidase zu den einzelnen mitochondrialen Kompartimenten blieb lange Zeit umstritten. Da die GSH-Peroxidase von Mitochondrien durch GSH-Behandlung solubilisiert werden konnte, vermuteten Neubert et al. [160] eine Bindung des Enzyms an die Mitochondrienoberfläche. Aus Versuchen von Schlegel [179] und Zimmermann [78, 219] ging bereits hervor, daß diese Hypothese den Verhältnissen nicht gerecht wurde: Einmal

konnte nach Solubilisieren der mitochondrialen GSH-Peroxidase nach Neubert et al. [160] aus den scheinbar Peroxidase-inaktiven Mitochondrien durch osmotische Lyse oder erneute GSH-Behandlung nochmals GSH-Peroxidase freigesetzt werden, außerdem zeigte sich, daß exogenes Glutathion in Mitochondriensuspensionen nur partiell der mitochondrialen GSH-Peroxidase zugänglich war. Eine ausschließliche Lokalisation des Enzyms an der Mitochondrienoberfläche konnte somit ausgeschlossen werden. Green und O'Brien [85] beobachteten schließlich eine parallele Solubilisierung von GSH-Peroxidase und Matrixenzymen bei unspezifischen Schädigungen der Mitochondrien wie auch bei der Behandlung isolierter Mitochondrien durch unphysiologische GSH-Konzentrationen. Nach einer sorgfältigen Fraktionierung von Rattenlebermitochondrien (Schlegel und Flohé, unveröff.) kann das Problem wie folgt beantwortet werden: Weder an der äußeren noch an der inneren Mitochondrienmembran können Spuren von GSH-Peroxidase nachgewiesen werden. Eventuelle Aktivitäten des Intermembranraumes können auf Verunreinigungen zurückgeführt werden. Die „mitochondriengebundene“ Fraktion des Enzyms ist ausschließlich im Matrixraum lokalisiert. Daß die GSH-Peroxidase von Mitochondrien überhaupt mit exogen angebotenen GSH reagiert, muß demnach durch eine begrenzte GSH-Permeabilität der inneren Membran isolierter und möglicherweise vorgeschädigter Mitochondrien bedingt sein.

6. Biologische Funktion der Glutathionperoxidase

Entsprechend der unterschiedlichen Zielsetzung der Arbeitsgruppen, die sich mit der GSH-Peroxidase des Blutes bzw. der Leber befaßten, wird die biologische Funktion des Enzyms in den genannten Geweben recht verschieden beurteilt. Erst in jüngster Zeit zeichnen sich Aspekte ab, die eine einheitliche Interpretation der biologischen Effekte ermöglichen. Die Frage nach der physiologischen Bedeutung der GSH-Peroxidase soll daher für die bisher untersuchten Gewebe getrennt behandelt werden.

6.1. Biologische Funktion der GSH-Peroxidase in der Leberzelle

1959 beobachteten Lehninger und Schneider [128], daß durch Zugabe von GSH und GSSG eine Schwellung isolierter Lebermitochondrien induziert werden kann. Dieser Typ von Mitochondrienschwellung („high amplitude swelling“) unterscheidet sich insofern wesentlich von anderen Arten der Volumenänderung bei Mitochondrien [13, 37, 86, 109, 122—125, 127, 204], als er durch ATP, Mg^{++} -Ionen und Rinderserumalbumin nicht rückgängig gemacht werden kann [124, 125] und schließlich eine vollständige Zerstörung des Membrangefüges (Lysis) [101] zur Folge hat. Eine Kontraktion der durch GSH geschwellenen Mitochondrien kann jedoch erreicht werden, wenn vor Zugabe von ATP, Mg^{++} und Rinderserumalbumin dem Inkubationsmedium ein mitochondriales Protein zugefügt wird [126, 160]. Dieser Kontraktionsfaktor („C-Faktor“) konnte aus Mitochondrien durch Behandlung mit hohen Konzentrationen von GSH oder anderen Mercaptanen und durch Ultraschall freigesetzt werden [158, 160] und erwies sich als eine

Mischung aus Katalase (C-Faktor II) und GSH-Peroxidase (C-Faktor I) [160]. Über 80% der gesamten C-Faktor-Aktivität der Mitochondrien konnte der GSH-Peroxidase zugeordnet werden [160]. Da nach neueren Befunden Katalase vorwiegend mit den Peroxisomen und kaum, wenn überhaupt, mit den Mitochondrien in der Zelle vergesellschaftet ist [28, 52, 80, 129], der strukturgebundene Anteil der GSH-Peroxidase aber tatsächlich größtenteils auf die Mitochondrien entfällt [80, 85], muß der GSH-Peroxidase hinsichtlich der C-Faktor-Aktivität die überragende biologische Signifikanz zugesprochen werden.

Die Wirkungsweise von GSH bei dem beschriebenen Schwellungsvorgang wurde ursprünglich als reduktive Abspaltung des C-Faktors von der Mitochondrienmembran gedeutet, an die er über Disulfidbrücken gebunden sein sollte [158, 160]. Der so erfolgte Ausfall der GSH-Peroxidase am Wirkungsort sollte die Einbuße der contractilen Eigenschaften der Mitochondrienmembran bewirken. Nachdem nun evident ist, daß die GSH-Peroxidase kein membranständiges Enzym ist, muß die glutathionbedingte Mitochondrienschwellung anders verstanden werden: Sofern isolierte Mitochondrien in GSH-haltigem Medium inkubiert werden, dient GSH nicht oder nur unzureichend als Donor für die im Matrixraum lokalisierte Peroxidase, vielmehr bildet es durch eine radikalisch verlaufende Autoxidation Peroxide, die ihrerseits die Mitochondrienmembran schädigen.

Die enzymatische Funktion der GSH-Peroxidase konnte zunächst nicht erklären, auf welche Weise das Enzym die irreversible Membranschädigung verhindert, da sein toxisches Substrat H_2O_2 die pathologischen Effekte nicht simulieren konnte [160].

Erst als durch Untersuchungen von Little und O'Brien [133, 134, 164] und Christophersen [40, 41, 43] bekannt wurde, daß Glutathionperoxidase neben H_2O_2 auch Peroxide ungesättigter Fettsäuren reduziert (vgl. 4.2.2) wurde eine Hypothese vorstellbar, die es erlaubte, die C-Faktor-Aktivität der GSH-Peroxidase aus ihrer peroxidatischen Funktion zu erklären. Aus zahlreichen Untersuchungen von Hunter u. Mitarb. [99—102] ist nämlich bekannt, daß „high amplitude swelling“ von einer Peroxidierung ungesättigter Lipide in der Mitochondrienmembran eingeleitet oder zumindest begleitet wird. Die Autoxidation der ungesättigten Phospholipide, die u. a. durch GSH/GSSG-Mischungen [99, 125], Schwermetallionen [101, 125], Ascorbinsäure [102], Cytochrome [162] und nicht Haem-Eisen-Proteide [89] katalysiert wird, könnte demnach eine Permeabilitätsstörung der Mitochondrienmembran zur Folge haben. Durch Reduktion der Lipidhydroperoxide jedoch kann die GSH-Peroxidase eine weitere Schädigung von Enzymen oder Membranproteinen durch die peroxidierten Lipide [39, 56, 132, 163, 217] verhindern und somit die Membran in einem funktionstüchtigen, contractilen Zustand erhalten.

Um diese Hypothese zu prüfen, untersuchten Flohé und Zimmermann [78] GSH-induzierte Schwellung und Lipidperoxidbildung von Rattenlebermitochondrien in Abhängigkeit von ihrer GSH-Peroxidaseaktivität. Dabei kamen ihnen die Beobachtungen von Pinto und Bartley [171] und Demus-Oole und Swierczewski [53—55] zugute, daß die GSH-Peroxidase der Rattenleber eine extreme Alters- und Geschlechtsabhängigkeit zeigt. Die am Rattenleberhomo-

genatüberstand gefundenen Ergebnisse [171] ließen sich auch für den strukturgebundenen Anteil der GSH-Peroxidase sichern [53, 78, 80, 219]. Somit standen Mitochondrien zur Verfügung, die sich wesentlich in ihrem GSH-Peroxidasegehalt unterschieden. Es wurde in allen Fällen eine Parallelität von Schwellungsneigung und Lipidperoxidbildung festgestellt, während Schwellung und Peroxidakkumulation der Mitochondrien ihrem GSH-Peroxidasegehalt umgekehrt proportional war [78, 80]. Analoge Ergebnisse wurden erhalten, wenn durch Variation vom pH des Inkubationsmediums die Aktivität der mitochondrialen GSH-Peroxidase artifiziell verändert wurde [78, 80].

Auf Grund dieser Beobachtungen scheint kein Zweifel möglich, daß der GSH-Peroxidase zumindest *in vitro* eine entscheidende Funktion beim Schutz oxidationsempfindlicher Membranlipide zukommt. Die physiologische Bedeutung der Versuche bleibt jedoch insofern zweifelhaft, als sich alle zitierten Versuche durch unphysiologische Bedingungen auszeichnen und Lipidperoxide in Mitochondrien auch durch „chaotrope“ Agentien, wie SCN^- , Guanidin-HCl, ClO_4^- , Br^- , J^- und Harnstoff, d. h. durch Vorschädigung des Membrangefüges, in Gegenwart von Luftsauerstoff induzieren lassen [91]. Doch fand Corwin [48] auch in nativen Lebermitochondrien von Vitamin E-Mangelratten Lipidperoxide. Demnach könnte der Lipidperoxidation unter gewissen Stoffwechselbedingungen eine pathophysiologische Bedeutung und der GSH-Peroxidase die entsprechende Schutzfunktion zukommen. In diesem Sinne deuten auch Pinto und Bartley [172, 173] ihre Beobachtungen, daß unter Oestrogeneinfluß, der in weiblichen Ratten eine Veränderung des Lipidmusters mit erhöhter Autoxidationsneigung bewirkt, der GSH-Peroxidasespiegel kompensatorisch erhöht ist.

Von Hochstein und Utley [95] wird der Leber-GSH-Peroxidase auch eine gewisse Funktion bei der H_2O_2 -Eliminierung sowie eine regulatorische Wirkung auf den Pentosephosphatcyclus zugesprochen (vgl. 6.2).

6.2. Biologische Funktion der GSH-Peroxidase in Erythrocyten

Die Bedeutung des Glutathions für die Stabilität des Hämoglobins und der Erythrocyten wird seit geraumer Zeit intensiv diskutiert [3, 10—12, 16—18, 25, 26, 32—36, 44—46, 68, 73, 87, 92, 94, 103—108, 110, 113, 115, 119, 148, 152, 154—157, 165, 166, 175, 177, 180, 207—213]. Die Wichtigkeit von Glutathion für den Erythrocytenstoffwechsel ergibt sich schon daraus, daß eine relativ hohe intracelluläre Konzentration durch Neusynthese aufrechterhalten wird [103, 110, 121, 177], die offenbar weitgehend analog der besser untersuchten GSH-Biosynthese in der Leber und der Hefe verläuft [61, 183—185]. Glutathion kann nämlich weder in oxidiertem noch in reduziertem Zustand in den Erythrocyten eindringen [186, 188, 189, 215]. Der Redoxzustand des Thiol-Disulfidsystems wird zumindest langfristig durch energieabhängigen Transport von GSSG aus dem Erythrocyten in der Weise aufrechterhalten, daß Glutathion intraerythrocytär nahezu völlig reduziert vorliegt [189].

Neuere Untersuchungen mit Modellschubstanzen [115], (z. B. Phenylldiazoameisensäuremethylester [117, 120], Diazodiameisensäure-bis-(N,N-Dimethylamid)

[116]), die eine intraerythrocytäre Oxidation von GSH gestatten, haben jedoch ergeben, daß eine vollständige GSH-Oxidation zumindest kurzfristig keine signifikanten irreversiblen Schädigungen der Erythrocyten bewirken, solange zusätzliche oxidative Noxen ausgeschaltet bleiben [115—120]. Laufen jedoch bei GSH-Abwesenheit radikalische Prozesse ab, so tritt eine Membranschädigung bis zur Hämolyse ein [119]. Diese Befunde stützen die Hypothese, daß eine wesentliche Funktion des erythrocytären Glutathions darin besteht, als Substrat der GSH-Peroxidase Produkte radikalisch verlaufender Autoxidationsprozesse zu eliminieren. Als toxische Metaboliten müssen dabei H_2O_2 [1—4, 44—46, 106, 107, 131] und Hydroperoxide von Lipiden [98, 106, 146, 200, 201] in Betracht gezogen werden.

Zur Beurteilung der in vivo möglichen Umsatzraten der GSH-Peroxidase müssen die kinetischen Eigenschaften des Enzyms berücksichtigt werden (vgl. 4.4). Da in bezug auf das Donorsubstrat eine Kinetik 1. Ordnung vorliegt, vermindert ein erniedrigter GSH-Spiegel in ähnlicher Weise die Reaktionsrate wie eine Senkung der GSH-Peroxidaseaktivität. Dieser Zusammenhang erklärt die Ähnlichkeit klinischer Symptome, die bei GSH-Mangelzuständen einerseits und verminderter GSH-Peroxidaseaktivität andererseits beobachtet werden [18, 154—157]¹. Das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch eine Neigung zu hämolytischen Krisen mit Heinzschen Innenkörpern und Reticulocytose und wird in der Regel erst bei zusätzlicher Belastung des Erythrocytenstoffwechsels durch oxidierende Agentien, die als Arzneimittelmetaboliten erst im Organismus gebildet [202] oder mit der Nahrung aufgenommen werden [32], oder ionisierende Strahlen [209] manifest. Derartige Symptome konnten bisher bei allen Enzymdefekten, die eine Verminderung des GSH-Spiegels zur Folge haben könnten, nachgewiesen werden, so z. B. bei Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Mangel [34, 35, 138, 210], Übersichten in [9, 12, 32, 152], 6-Phosphogluconatdehydrogenase-Mangel [26, 137], Glutathionreductase-Mangel [9, 32, 33, 36, 139, 207, 208, 211—213] und bei Störungen der Glutathionsynthese [9, 16, 17, 140, 165, 175, 208, 209]. Das Ausmaß der pathologischen Phänomene variiert allerdings stark [9, 32]. Bei Störungen der Glutathionreduktion z. B., die auch alimentär durch Flavin-arme Diät bedingt sein können [10], treten nach Beutler [11] erst pathologische Symptome auf, wenn die Aktivität der Glutathionreductase auf weniger als 40% der Norm vermindert ist.

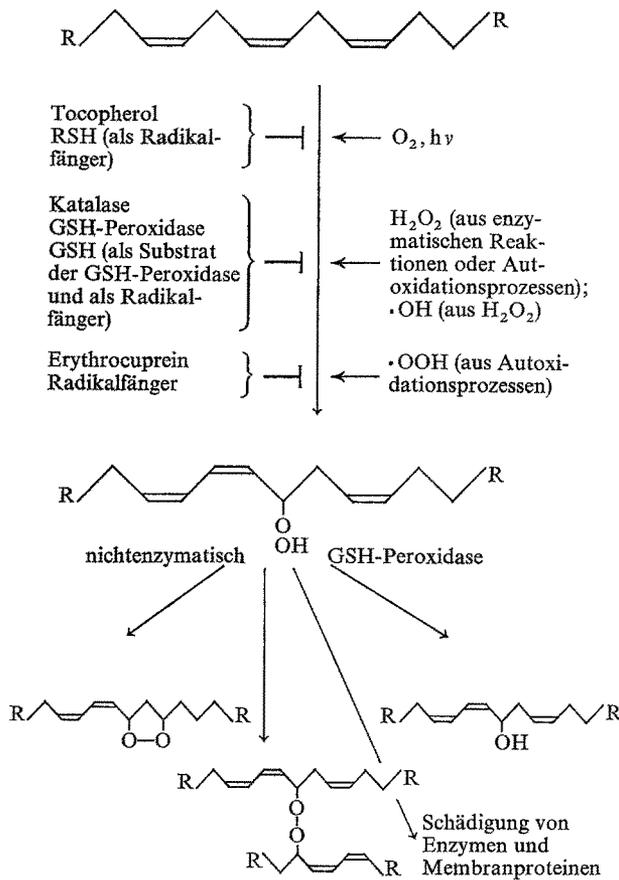
Aus der Ähnlichkeit der Ausfallserscheinungen bei den erwähnten Enzymdefekten und bei einem isolierten Mangel an GSH-Peroxidase kann vermutet werden, daß die pathologischen Erscheinungen letzten Endes auf die verminderte Umsatzrate der GSH-Peroxidase unter jenen Stoffwechselbedingungen zurückzuführen sind. Jedoch wurde nichtsphärocytäre hämolytische Anämien auch bei weiteren Stoffwechselstörungen beobachtet, deren Beziehung zu dem hier angenommenen pathogenetischen Mechanismus nicht evident ist [152].

¹ Kürzlich erschien ein Übersichtsartikel, der den klinischen und genetischen Aspekten des Glutathionperoxidase-Mangels gewidmet ist: T. F. Necheles, M. H. Steinberg und D. Cameron: Erythrocyte Glutathione-Peroxidase Deficiency. Brit. J. Haematol. 19, 605—612 (1970).

Unklar ist bislang, welche toxischen Metaboliten bei verminderter GSH-Peroxidase-Aktivität in dem Erythrocyten die charakteristischen pathophysiologischen Phänomene auslösen. In l. c. [3, 15, 18, 44, 45, 54, 72, 87, 94, 131, 148, 150, 151, 154—157, 166—168, 180, 181] wird in erster Linie eine Akkumulation von H_2O_2 als pathogenetisches Prinzip diskutiert. In diesem Zusammenhang entstand eine lebhafte Diskussion, ob intraerythrocytär anfallendes H_2O_2 vorzugsweise über GSH-Peroxidase oder Katalase eliminiert wird. Cohen und Hochstein [44] vertraten die These, daß bei niedrigen Konzentrationen ($< 3 \times 10^{-6}$ M) H_2O_2 hauptsächlich von der GSH-Peroxidase metabolisiert wird. Von Liebowitz und Cohen [131] wurde tatsächlich ein erhöhter „steady-state-level“ von H_2O_2 in Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Mangel-Erythrocyten unter Belastung mit Acetylphenylhydrazin auch bei ungehemmter Katalase nachgewiesen. Demgegenüber wurde von anderen Autoren [3, 107, 167, 168] der Katalase auch bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen eine gewisse Oxidationsschutzfunktion in vivo zugesprochen. Nicholls [161] zeigte sogar an Hand theoretischer Überlegungen, daß Katalase, und zwar in ihrer katalatischen Funktion durchaus in der Lage ist, unter physiologischen Bedingungen H_2O_2 in ausreichender Geschwindigkeit zu eliminieren. Auf Grund der kinetischen Befunde bei der GSH-Peroxidase (vgl. 4.4) kann heute als gesichert gelten, daß H_2O_2 in niedriger Konzentration über beide Enzymsysteme mit vergleichbarer Umsatzrate abgebaut werden kann. Die von Flohé und Brand [73] geschätzten Umsatzraten der GSH-Peroxidase sind jedoch zu hoch veranschlagt, da die GSH-Abhängigkeit des zugrunde gelegten $K_m(H_2O_2)$ -Wertes unberücksichtigt blieb, was nach neueren Untersuchungen [72, 135] unzulässig ist.

Da die H_2O_2 -Umsatzraten über Katalase und GSH-Peroxidase sich in ähnlichen Größenordnungen bewegen, wird verständlich, daß bei hinreichendem GSH-Angebot die Glutathionperoxidase die Katalase funktionell weitgehend ersetzen kann [3, 44, 168]. Dies bedingt die relative Stabilität von Akatalasie-Erythrocyten [1, 3, 44, 107]. Da jedoch die Katalase trotz ihrer hohen H_2O_2 -Umsatzraten [161] offenbar nicht in der Lage ist, Störungen des Glutathionstoffwechsels und Ausfall der Glutathionperoxidasefunktion funktionell voll zu kompensieren, drängt sich der Verdacht auf, daß bei den erwähnten Stoffwechselanomalien nicht H_2O_2 als entscheidender toxischer Metabolit betrachtet werden darf. Es erscheint daher nicht unwahrscheinlich, daß Autoxidationsprozesse, die zu anderen Peroxiden als H_2O_2 führen, als pathogenetische Mechanismen erwogen werden müssen. Analog den für Rattenlebermitochondrien gesicherten Verhältnissen (vgl. 6.1), könnte eine Permeabilitätsstörung der Erythrocytenmembran auch durch Peroxidation ungesättigter Membranlipide bedingt sein. Eine Parallelität von Lipidperoxidbildung in der Erythrocytenmembran und Hämolyse konnte in der Tat bei Nagern [29, 106, 146, 200, 201] und beim Menschen [98] nachgewiesen werden. Jedoch wurden bisher keine eindeutigen Beziehungen zwischen der Neigung zu Lipidperoxidation und GSH-Stoffwechsel der Erythrocyten deutlich [201]. Vielmehr scheint der Membranschutz durch eine Vielzahl sich ergänzender Mechanismen bewerkstelligt zu werden, so daß die

biologische Signifikanz jedes einzelnen Schutzmechanismus schwer abzuschätzen ist. In dem folgenden Schema soll die Komplexität der Verhältnisse skizziert werden.



Die radikalisch verlaufende Autoxidation ungesättigter Lipide [51] kann z. B. durch Lichteinwirkung, Sauerstoff, H₂O₂, OH- und Superoxidradikal eingeleitet bzw. unterhalten werden. Als Antagonisten können einmal physiologische Antioxidantien bzw. Radikalfänger wie Tocopherol [29, 50, 98, 106, 146, 200, 201] und GSH [47, 49, 83, 84, 97] den Autoxidationsprozeß unterbinden. Ferner kann Katalase und Glutathionperoxidase durch Elimination von H₂O₂ einer Lipidperoxidation entgegenwirken. Schließlich erscheint eine Schutzfunktion des Erythrocyteins in seiner Eigenschaft als Superoxid-Radikal-Dismutase [143–145] diskutabel, zumal ein Erythrocytenstabilisierender Effekt alimentär zugeführten Kupfers beschrieben wurde [30]. Nach Erschöpfung der erwähnten prophylaktischen Mechanismen könnte die GSH-Peroxidase nochmals einen Reparationsvorgang einleiten, indem sie entstandene Hydroperoxide ungesättigter Lipide zu Hydroxylipiden reduziert (vgl. 4.2.2). Hierdurch kann eine weitergehende Störung des Membranlipidgefüges durch Bildung von Dialkylperoxyden sowie eine oxidative Zerstörung von Enzymen [39, 56, 132, 146, 163, 217] und Membranproteinen [106, 146] verhindert werden. Als empfindlichster Angriffspunkt der Lipidhydroperoxide werden die Membran-SH-Gruppen des Erythrocyten [106] diskutiert, die offenbar für seine funktionelle Integrität von entscheidender Bedeutung sind [6, 67, 104, 114, 153, 176, 197, 201].

Weiterhin konnte von Jacob und Jandl [105] gezeigt werden, daß der Erythrocyt bei Peroxidbelastung kompensatorisch seine Reduktionskapazitäten durch Steigerung des Pentosephosphatcyclus erhöht. Der Mechanismus dieses Regulationsvorganges ist nach neueren Erkenntnissen wie folgt zu verstehen: Das durch die GSH-Peroxidase-Reaktion gebildete GSSG wird durch Glutathionreductase unmittelbar reduziert, wodurch der NADPH/NADP⁺-Quotient zugunsten von NADP⁺ verschoben wird. Wie von Bonsignore et al. gefunden wurde, inaktiviert NADPH in Anwesenheit eines isolierbaren Proteinfaktors die Glucose-6-phosphatdehydrogenase [19, 21], das Schlüsselenzym des Pentosephosphatcyclus. Darüber hinaus wird eine Reaktivierung von NADPH-inaktivierter Glucose-6-phosphatdehydrogenase durch NADP⁺ diskutiert [20, 22]. Auf diese Weise bewirkt erhöhter GSH-Umsatz seine beschleunigte Regeneration. Ein entsprechender Regulationsmechanismus wird auch für die Leber [95], die Schilddrüse [7], die Augenlinse [96, 112] und für polymorphkernige Leukocyten [24] diskutiert.

Die erhöhte Anfälligkeit fetaler Erythrocyten gegen oxidative Noxen [8, 113, 195] soll abschließend noch erwähnt werden.

Von Betke [8] und Kleihauer [113] wurde die Instabilität fetaler Erythrocyten hauptsächlich auf die gegenüber Hämoglobin A gesteigerte Oxidabilität und Denaturierungsneigung von Hämoglobin F zurückgeführt. Flohé et al. [70, 76, 77] erhielten jedoch für hochgereinigtes Hämoglobin A [62] und Hämoglobin F [193, 194] bei physiologischem pH ein identisches Redoxpotential. Obwohl diese Ergebnisse der von Kleihauer [113] gefundenen kinetischen Instabilität von Hämoglobin F gegen Oxidantien nicht widersprechen, scheinen die Eigenschaften des fetalen Blutfarbstoffes nicht die alleinige Ursache für die Vulnerabilität fetaler Erythrocyten darzustellen. Vielmehr ist nach neueren Befunden der verminderten GSH-Peroxidase-Aktivität fetaler Erythrocyten eine entscheidende Bedeutung bei der Pathogenese mancher Fälle von Neugeborenenhämolyse beizumessen [25, 31, 87, 154–157, 216].

Keine Altersabhängigkeit des Glutathionperoxidasespiegels in menschlichen Erythrocyten wurde unlängst von Vetrella et al. [205] gefunden. Die Publikation steht jedoch im Widerspruch mit den Ergebnissen zahlreicher Arbeitsgruppen, die eine signifikante Abhängigkeit der GSH-Peroxidase-Aktivität vom Alter der Individuen bei verschiedenen Species sowohl in den Erythrocyten [15, 25, 31, 87, 199, 216] als auch in der Leberzelle [53–55, 78, 80, 171, 172, 219] erhielten. Im Blut von Neugeborenen wird allerdings der niedrige GSH-Peroxidasegehalt durch erhöhte Enzymaktivität der Reticuloocyten teilweise ausgeglichen [31, 155, 166, 216]. Die Ergebnisse von Vetrella et al. [205] bedürfen daher der Überprüfung, zumal bei der Bestimmung der GSH-Peroxidase nur unzureichende Vorkehrungen zur Verbesserung der Testspezifität getroffen wurden (vgl. 2).

6.3. Biologische Funktion der GSH-Peroxidase in der Augenlinse

Da Katalase in der Augenlinse kaum nachweisbar ist [218], obliegt allein der Glutathionperoxidase in

diesem Gewebe die Elimination von H_2O_2 , das durch Autoxidation von Ascorbat im Kammerwasser entsteht [174]. Der extrem hohe Glutathiongehalt in der sonst stoffwechselträgen Linse (10^{-2} M) [111, 112] erscheint daher verständlich [96, 174]. Die Bedeutung des GSH-Spiegels für die Transparenz der Linse ist seit langem bekannt [57, 111, 187, 206]. Da in der Linse GSH offenbar in erster Linie als Substrat der GSH-Peroxidase betrachtet werden muß, liegt es nahe, bei der Pathogenese des Katarakts an eine oxidative Schädigung von Linsenprotein oder Membranen durch verminderte Reaktionsrate der GSH-Peroxidase zu denken.

Die von Kinoshita [111] diskutierte Analogie zwischen hämolytischen Phänomenen und Linsentrübung wird durch die Beobachtung gestützt, daß bei genetisch [90, 92, 220] oder experimentell [130] bedingtem Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Mangel mit verminderter GSH-Reduktions-Kapazität der Linse tatsächlich Kataraktbildung beobachtet wird. Der Zusammenhang von GSH-Stoffwechsel und pathologischen Phänomenen der Augenlinse des Menschen ist aus naheliegenden Gründen nicht so eingehend untersucht wie die entsprechenden Verhältnisse in Erythrocyten.

Literatur

- Aebi, H., Suter, H.: Über die Peroxydempfindlichkeit von Akatalasie-Erythrocyten. *Humangenetik* **2**, 328—343 (1966).
- Dewald, B., Suter, H.: Peroxidbildung bei der Autoxydation N^2 -substituierter Methylhydrazine. *Helv. chim. Acta* **48**, 1380—1394 (1965).
- Heiniger, J. P., Lauber, E.: Methämoglobinbildung in Erythrocyten durch Peroxideinwirkung. Versuche zur Beurteilung der Schutzfunktion von Katalase und Glutathionperoxidase. *Helv. chim. Acta* **47**, 1428—1440 (1964).
- Baggiolini, M., Dewald, B., Lauber, E., Suter, H., Micheli, A., Frei, J.: Observations in two Swiss families with acatalasia II. *Enzymol. biol. Clin.* **4**, 121—151 (1964).
- Andrews, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* **91**, 222—233 (1964).
- Angelone, L.: Hemolysis of rat erythrocytes by p-hydroxymercuribenzoate and N-ethylmaleimide. *Arch. Biochem.* **112**, 288—293 (1965).
- Bénard, B., Groot, L. J., de: The role of hydrogen peroxide and glutathione in glucose oxydation by the thyroid. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **184**, 48—53 (1969).
- Betke, K.: *Der menschliche rote Blutfarbstoff bei Fetus und reifem Organismus*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.
- Beutler, E.: Drug-induced hemolytic anemia. *Pharmacol. Rev.* **21**, 73—103 (1969).
- Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: In vivo and in vitro studies. *J. clin. Invest.* **48**, 1957—1966 (1969).
- Srivastava, S. K.: Relationship between glutathione reductase activity and drug-induced haemolytic anaemia. *Nature (Lond.)* **226**, 759—760 (1970).
- Mathai, C. K., Smith, J. E.: Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of the pentose-phosphate pathway. *Amer. J. Med.* **41**, 744—761 (1966).
- Blondin, G. A., Vail, W. J., Green, D. E.: The mechanism of mitochondrial swelling. II. Pseudoenergized swelling in the presence of alkali metal salts. *Arch. Biochem.* **129**, 158—172 (1969).
- Börresen, H. Ch.: An improvement of the amperometric titration of thiols at the rotating platinum electrode. *Analyt. Chem.* **35**, 1096—1097 (1963).
- Boguslawska-Jaworska, J., Kaplan, J. C.: A simple screening test for glutathione peroxidase activity in red cells. *Clin. chim. Acta* **26**, 459—463 (1969).
- Boivin, P., Galand, C.: La synthèse du glutathion au cours de l'anémie hémolytique congénitale avec déficit en glutathion réduit. *Nouv. Rev. franç. Hémat.* **5**, 707—720 (1965).
- — André, R., Debray, J.: Anémies hémolytiques congénitales avec déficit isolé en glutathion réduit par déficit en glutathion synthétase. *Nouv. Rev. franç. Hémat.* **6**, 859—866 (1966).
- — Hakim, J., Rogé, J., Guéroult, N.: Anémie hémolytique avec déficit en glutathionperoxydase chez un adulte. *Enzymol. biol. Clin.* **10**, 68—80 (1969).
- Bonsignore, A., Flora, A. de, Lorenzoni, I., Mangiarotti, M. A., Cancedda, R., Dina, D.: Metabolism of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. III. Isolation of a protein involved in the 6-phosphogluconate-induced inactivation. *Febs Letters* **1**, 176—178 (1968).
- — Mangiarotti, M. A., Lorenzoni, I., Cancedda, R., Dina, D.: Metabolism of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. II. Changes of quaternary structure of the enzyme during the metabolite induced inactivation and reactivation. *Ital. J. Biochem.* **17**, 90—100 (1968).
- — — Lorenzoni, I., Dina, D., Cancedda, R.: Metabolism of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. I. Metabolite induced inactivation. *Ital. J. Biochem.* **17**, 1—16 (1968).
- Lorenzoni, I., Cancedda, R., Silenco, L., Dina, D., Flora, A. de: Metabolism of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. IV. Reductive inactivation and autoinactivation of the enzyme. *Ital. J. Biochem.* **17**, 346—362 (1968).
- Boyer, P. D.: Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 4331—4337 (1954).
- Bracci, R., Calabri, G., Bettini, F., Princi, P.: Glutathione peroxidase in human leucocytes. *Clin. chim. Acta* **29**, (2), 345—348 (1970).
- Seeler, R., Rudolph, N., Kochen, J. A., Gross, R. T.: Erythrocyte glutathione peroxidase activity and hydrogen peroxide sensitivity: A mechanism for drug-induced hemolysis in the newborn. *J. Pediat.* **67**, 938—939 (1965).
- Brewer, G. J., Dern, R. J.: A new inherited enzymatic deficiency of human erythrocytes: 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency. *Amer. J. hum. Genet.* **16**, 472—476 (1964).
- Briggs, G. E., Haldane, J. B. S.: A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.* **19**, 338—339 (1925).
- Brown, D. H.: Separation of mitochondria, peroxisomes, and lysosomes by zonal centrifugation in a ficoll gradient. *Biochem. biophys. Acta (Amst.)* **162**, 152—153 (1968).
- Bunyan, J., Green, J., Edwin, E. E., Diplock, A. T.: Studies on vitamin E. 5. Lipid peroxidation in dialuric acid-induced haemolysis of vitamin E-deficient erythrocytes. *Biochem. J.* **77**, 47—51 (1960).
- Bush, J. A., Jensen, W. N., Athens, J. W., Ashenbrucker, H., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M.: Studies on copper metabolism. XIX. Kinetics of iron metabolism and erythrocyte life-span in copper-deficient swine. *J. exp. Med.* **103**, 701—712 (1956).
- Butenandt, O.: Persönliche Mitteilung.
- Carson, P. E., Frischer, H.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of the pentose phosphate pathway. *Amer. J. Med.* **41**, 744—761 (1966).
- Brewer, G. J., Ickes, C.: Decreased glutathione reductase with susceptibility to hemolysis. *J. Lab. clin. Med.* **58**, 804 (1961).
- Schrier, S. L., Alving, A. S.: Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. *J. Lab. clin. Med.* **48**, 794—795 (1956).
- Flanagan, C. L., Ickes, C. E., Alving, A. S.: Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* **124**, 484—485 (1956).
- Okita, G. T., Frischer, H., Hirasa, J., Long, W. K., Brewer, G. J.: Patterns of hemolytic susceptibility and metabolism. In: *Proceedings of the 9th Congr. of the European Society of Haematologists*, Lisbon, p. 655. Basel-New York: S. Karger 1963.
- Cash, W. D., Gardy, M., Carlson, H. E., Ekong, E. A.: Mitochondrial swelling and lipid peroxidation studies with mixtures of thyroxine and micromolar concentrations of certain metal ions. *J. biol. Chem.* **241**, 1745—1750 (1966).

38. Cecil, R., McPhee, J. R.: A kinetic study of the reactions on some disulphides with sodium sulphite. *Biochem. J.* **60**, 496—506 (1955).
39. Chio, K. S., Tappel, A. L.: Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry* **8**, 2821—2827 (1969).
40. Christophersen, B. O.: Formation of monohydroxy-polyenic fatty acids from lipid peroxides by a glutathione peroxidase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **164**, 35—46 (1968).
41. — Enzymic removal of fatty acid hydroperoxides in rat liver. 5th Meeting of the Fed. of Europ. Biochem. Soc., Abstracts Nr. 603. Prag 1968.
42. — Reduction of X-ray-induced DNA and thymine hydroperoxides by rat liver glutathione peroxidase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **186**, 387—389 (1969).
43. — Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathione peroxidase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **176**, 463—470 (1969).
44. Cohen, G., Hochstein, P.: Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* **2**, 1420—1423 (1963).
45. — Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochemistry* **3**, 895—900 (1964).
46. — Martinez, M., Hochstein, P.: Generation of hydrogen peroxide during the reaction of nitrite with oxyhemoglobin. *Biochemistry* **3**, 901—903 (1964).
47. Colowick, S., Lazarow, A., Racker, E., Schwarz, D. R., Stadtman, E., Waelsch, H.: *Glutathione*. New York: Academic Press 1954.
48. Corwin, L. M.: Studies on peroxidation in vitamin E-deficient rat liver homogenates. *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 51—58 (1962).
49. Cronkite, E. P., Brecher, G., Conrad, R. A., Chapman, W. H., in: Colowick, S., Lazarow, A., Racker, E., Schwarz, D. R., Stadtman, E., Waelsch, H., *Glutathione in radiation injury*. Glutathione, p. 271—287. New York: Academic Press 1954.
50. Csallany, A. S., Chiu, M., Draper, H. H.: Oxidation products of α -tocopherol formed in autoxidation methyl linoleate. *Lipids* **5**, 63—70 (1970).
51. Dahle, L. K., Hill, E. G., Holman, R. T.: The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem.* **98**, 253—261 (1962).
52. Duve, C. de: The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lect.* **59**, 49—87 (1965).
53. Demus-Oole, A., Swierczewski, E.: Glutathione peroxidase in rat liver during development. I. Localization and characterization of the Enzyme in the subcellular liver fractions of newborn and adult rat. *Biol. Neonat. (Basel)* **14**, 211—218 (1969).
54. — — Glutathione peroxidase in rat liver during development. II. Changes in glutathione peroxidase during post-natal development of normal and hypotrophic rats. *Biol. Neonat. (Basel)* **14**, 219—225 (1969).
55. — — Minkowski, A.: Glutathione peroxidase of rat liver during development. *Z. klin. Chem.* **7**, 209 (1969).
56. Desai, I. D., Tappel, A. L.: Damage to proteins by peroxidized lipids. *J. Lipid Res.* **4**, 204—207 (1963).
57. Dische, Z., in: Colowick, S., Lazarow, A., Racker, E., Schwarz, D. R., Stadtman, E., Waelsch, H.: *Glutathione and protein oxidation and precipitation in the process of aging and cataract formation in the lens*. Glutathione, p. 296—297. New York: Academic Press 1954.
58. Dixon, M., Webb, E. C.: *Enzymes*, p. 63ff. London: Longmans Green & Co 1967.
59. — — *Enzymes*, p. 92ff. London: Longmans Green & Co 1967.
60. Donovan, J. W.: Changes in ultraviolet absorption produced by alteration of protein conformation. *J. biol. Chem.* **244**, 1961—1967 (1969).
61. Dooz Mooz, E., Meister, A.: Tripeptide (glutathione) synthetase. Purification, properties, and mechanism of action. *Biochemistry* **6**, 1722—1734 (1967).
62. Drabkin, D. L.: A simplified technique for a large scale crystallization of human oxyhemoglobin. Isomorphous transformations of hemoglobin and myoglobin in the crystalline state. *Arch. Biochem.* **21**, 224—232 (1949).
63. — Austin, J. H.: Spectrophotometric studies. I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. *J. biol. Chem.* **98**, 719—733 (1932).
64. Drabkin, D. L., Austin, J. H.: Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; Nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J. biol. Chem.* **112**, 51—65 (1935).
65. — — Spectrophotometric studies. IV. Hemochromogenes. *J. biol. Chem.* **112**, 89—104 (1935).
66. Dunker, A. K., Rueckert, R. R.: Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel. *J. biol. Chem.* **244**, 5074—5080 (1969).
67. Erich, C., Waller, H. D.: Zum Verhalten von SH-Verbindungen in Erythrocyten nach in vivo-Vergiftung mit Schwermetallen und Arsen. *Klin. Wschr.* **45**, 983—986 (1967).
68. Fegler, G.: Relationship between reduced glutathione content and spontaneous haemolysis in shed blood. *Nature (Lond.)* **170**, 624—625 (1952).
69. Flohé, L.: Untersuchungen zur Glutathion-Peroxidase. Biochemische Diplomarbeit. Tübingen 1966.
70. — Potentiometrische Untersuchung des menschlichen Hämoglobin-F-Methämoglobin-F-Systems. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **348**, 953—962 (1967).
71. — Spezifischer Nachweis der Glutathion-Peroxydase auf Cellogel-Elektrophoresestreifen und Bestimmung des isoelektrischen Punktes. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **350**, 856—858 (1969).
72. — Kinetik und biologische Funktion der Glutathion-Peroxydase. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **350**, 1181 (1969).
73. — Brand, I.: Kinetics of glutathione peroxidase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **191**, 541—549 (1969).
74. — — Some hints to avoid pitfalls in quantitative determination of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9). *Z. klin. Chem.* **8**, 156—161 (1970).
75. — Menzel, H.: The influence of GSH upon light-induced high-amplitude swelling and lipidperoxide formation of spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiol.* (im Druck).
76. — Uehleke, H.: The oxidation-reduction potential of human haemoglobin. *F. Life Sci.* **5**, 1041—1045 (1966).
77. — — Oxidationsgleichgewicht von menschlichem fetalen Hämoglobin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **255**, 15 (1966).
78. — Zimmermann, R.: The role of GSH peroxidase in protecting the membrane of rat liver mitochondria. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **223**, 210—213 (1970).
79. — Schlegel, W., Schaich, E.: Zur Frage der Identität von Glutathionperoxidase aus Erythrocyten und Leber („Contraction Factor I“) der Ratte. *Z. klin. Chem.* **8**, 149—155 (1970).
80. — — Wendel, A., Zimmermann, R.: The Function of GSH peroxidase (C Factor I) in rat liver mitochondria. *International Colloquium on Bioenergetics Bari 1970* (im Druck).
81. — u. Mitarb. (s. u.): *Glutathionperoxidase. I—III.*
(a) — Eisele, B., Wendel, A.: Glutathion-Peroxidase. I. Reindarstellung und Molekulargewichtsbestimmungen. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **352**, 151—158 (1971).
(b) — Günzler, W., Jung, G., Schaich, E., Schneider, F.: Glutathion-Peroxidase. II. Substratspezifität und Hemmbarkeit durch Substratanaloge. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **352**, 159—169 (1971).
(c) — Schaich, E., Voelter, W., Wendel, A.: Glutathion-Peroxidase. III. Spektrale Charakteristika und Versuche zum Reaktionsmechanismus. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **352**, 170—180 (1971).
82. Florin, M., Stotz, E. H.: *Comprehensive biochemistry, enzyme nomenclature*, vol. 13. Amsterdam-London-New York: Elsevier Publishing Company 1965.
83. Foye, W. O.: Radiation-protective agents in mammals. *J. Pharm. Sci.* **58**, 283—300 (1969).
84. Gerschman, R., in: Colowick, S., Lazarow, A., Racker, E., Schwarz, D. R., Stadtman, E., Waelsch, H.: *Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common*. Glutathione, p. 288—291. New York: Academic Press 1954.
85. Green, R. C., O'Brien, P. J.: The cellular localisation of glutathione peroxidase and its release from mitochondria during swelling. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **197**, 31—39 (1970).
86. Greenbaum, A. L., Dicker, S. E.: The effects of mammalian posterior lobe hormones on the swelling of liver and

- kidney mitochondria, in the rat and the dog. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **74**, 519—524 (1963).
87. Gross, R. T., Bracci, R., Rudolph, N., Schroeder, E., Kochen, J. A.: Hydrogen peroxide toxicity and detoxification in the erythrocytes of newborn infants. *Blood* **29**, 481—493 (1967).
 88. Günzler, A. W.: „Weitere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der GSH-Peroxidase.“ Biochemische Diplomarbeit, Tübingen (in Vorbereitung).
 89. Hanstein, W. G., Hatefi, Y.: Lipid oxidation in biological membranes. II. Kinetics and mechanism of lipid oxidation in submitochondrial particles. *Arch. Biochem.* **138**, 87—95 (1970).
 90. Harley, J. D., Robin, H., Menser, M. A., Hertzberg, R.: Cataracts in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Brit. med. J.* **1966 I**, 421.
 91. Hatefi, Y., Hanstein, W. G.: Lipid oxidation in biological membranes. I. Lipid oxidation in submitochondrial particles and microsomes induced by chaotropic agents. *Arch. Biochem.* **138**, 73—86 (1970).
 92. Helge, H., Borner, K.: Kongenitale nichtsphärozytöse hämolytische Anämie, Katarakt und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel. *Dtsch. med. Wschr.* **91**, 1584—1590 (1966).
 93. Henri, V.: Allgemeine Theorie der Wirkung einiger Fermente. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **135**, 916—919 (1902).
 94. Hill, A. S., Haut, A., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M.: The role of nonhemoglobin proteins and reduced glutathione in the protection of hemoglobin from oxidation in vitro. *J. clin. Invest.* **43**, 17—26 (1964).
 95. Hochstein, P., Utley, H.: Hydrogen peroxide detoxication by glutathione peroxidase and catalase in rat liver homogenates. *Molec. Pharmacol.* **4**, 574—579 (1968).
 96. Holmberg, N. J.: Purification and properties of glutathione peroxidase from bovine lens. *Exp. Eye Res.* **7**, 570—580 (1968).
 97. Hope, D. B., in: Crook, E. M.: Thiols and radiation damage. *Biochemical Society Symposia*, vol. 17, p. 93—114. Cambridge: Cambridge University Press 1959.
 98. Horwitt, M. K., Harvey, C. C., Duncan, G. D., Wilson, W. C.: Effects of limited tocopherol intake in man with relationships to erythrocyte hemolysis and lipid oxidations. *Amer. J. clin. Nutr.* **4**, 408—419 (1956).
 99. Hunter, F. E., Jr., Scott, A., Weinstein, J., Schneider, A.: Effects of phosphate, arsenate, and other substances on swelling and lipid peroxide formation when mitochondria are treated with oxidized and reduced glutathione. *J. biol. Chem.* **239**, 622—630 (1964).
 100. — Levy, J. F., Fink, J., Schutz, B., Guerra, F., Hurwitz, A.: Studies on the mechanism by which anaerobiosis prevents swelling of mitochondria in vitro: Effect of electron transport chain inhibitors. *J. biol. Chem.* **234**, 2176—2186 (1959).
 101. — Scott, A., Hoffsten, P. E., Gebicki, J. M., Weinstein, J., Schneider, A.: Studies on the mechanism of swelling, lysis, and disintegration of isolated liver mitochondria exposed to mixtures of oxidized and reduced glutathione. *J. biol. Chem.* **239**, 614—621 (1964).
 102. — — — Guerra, F., Weinstein, J., Schneider, A., Schutz, B., Fink, J., Ford, L., Smith, E.: Studies on the mechanism of ascorbate-induced swelling and lysis of isolated liver mitochondria. *J. biol. Chem.* **239**, 604—613 (1964).
 103. Jackson, R. C.: Studies in the enzymology of glutathione metabolism in human erythrocytes. *Biochem. J.* **111**, 309—315 (1969).
 104. Jacob, H. S., Jandl, J. H.: Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of hemolysis. *J. clin. Invest.* **41**, 779—792 (1962).
 105. — — Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. III. Glutathione in the regulation of the hexose monophosphate pathway. *J. biol. Chem.* **241**, 4243—4250 (1966).
 106. — Lux, S. E.: Degradation of membrane phospholipids and thiols in peroxide hemolysis: Studies in vitamin E deficiency. *Blood* **32**, 549—568 (1968).
 107. — Ingbar, S. H., Jandl, J. H.: Oxidative hemolysis and erythrocyte metabolism in hereditary acatalasia. *J. clin. Invest.* **44**, 1187—1199 (1965).
 108. Jocelyn, P. C., in Crook, E. M.: Glutathione metabolism in animals. *Biochemical Society Symposia*, vol. 17, p. 43—65. Cambridge: Cambridge University Press 1959.
 109. Johnson, C. L., Oró, J., Schwartz, A.: Basic protein induction of low amplitude energy-linked mitochondrial swelling. *Arch. Biochem.* **131**, 310—315 (1969).
 110. Kasbekar, D. K., Sreenivasan, A.: Biosynthesis of glutathione by rat erythrocytes. *Biochem. J.* **72**, 389—395 (1959).
 111. Kinoshita, J. H.: Selected topics in ophthalmic biochemistry. *Arch. Ophthalm.* **72**, 554—572 (1964).
 112. — Masurat, T.: Studies on glutathione in bovine lens. *Arch. Ophthalm.* **57**, 266—274 (1957).
 113. Kleihauer, E.: Fetale Hämoglobin und fetale Erythrocyten. Vergleichende Untersuchungen über strukturelle und funktionelle Besonderheiten der roten Blutzelle Neugeborener und junger Säuglinge. *Arch. Kinderheilk.* **53**, Beih. S. 1—130 (1966).
 114. Kollman, G., Shapiro, B., Martin, D.: Mechanism of radiation hemolysis in human erythrocytes. *Radiat. Res.* **37**, 551—566 (1969).
 115. Kosower, E. M., Kosower, N. S.: Lest I forget thee, glutathione . . . *Nature (Lond.)* **224**, 117—120 (1969).
 116. Kosower, N. S., Kosower, E. M., Wertheim, B.: Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **37**, 593—596 (1969).
 117. — Song, K.-R., Kosower, E. M.: Glutathione. I. The methyl phenyldiazencarboxylate (azoester) procedure for intracellular oxidation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **192**, 1—7 (1969).
 118. — — — Glutathione. III. Biological aspects of the azoester procedure for oxidation within the normal human erythrocyte. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **192**, 15—22 (1969).
 119. — — — Glutathione. IV. Intracellular oxidation and membrane injury. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **192**, 23—28 (1969).
 120. — — — Correa, W.: Glutathione. II. Chemical aspects of azoester procedure for oxidation to disulfide. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **192**, 8—14 (1969).
 121. Koj, A.: Biosynthesis of glutathione in human blood cells. *Acta biochim. pol.* **9**, 11—25 (1962).
 122. Lehniger, A. L.: A heat-labile factor required in extrusion of water from mitochondria. *J. biol. Chem.* **237**, 946—951 (1962).
 123. — The mitochondrion. New York-Amsterdam: W. A. Benjamin 1965.
 124. — Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. *J. biol. Chem.* **234**, 2465—2471 (1959).
 125. — Beck, D. P.: The catalase requirement in the reversal of mitochondrial swelling caused by reduced glutathione and by trace metals. *J. biol. Chem.* **242**, 2098—2101 (1967).
 126. — Gotterer, G. S.: A soluble protein required in mitochondrial contraction; “Leakage” of active factors from mitochondria. *J. biol. Chem.* **235**, PC 8—9 (1960).
 127. — Neubert, D.: Effect of oxytocin, vasopressin, and other disulfide hormones on uptake and extrusion of water by mitochondria. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **47**, 1929—1936 (1961).
 128. — Schneider, M.: Mitochondrial swelling induced by glutathione. *J. biophys. biochem. Cytol.* **5**, 109—116 (1959).
 129. Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, St., Duve, Ch. de: The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. *J. Cell Biol.* **37**, 482—513 (1968).
 130. Lerman, S.: Enzymatic factors in experimental galactose cataract. *Science* **130**, 1473—1474 (1959).
 131. Liebowitz, J., Cohen, G.: Increased hydrogen peroxide levels in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes exposed to acetylphenylhydrazine. *Biochem. Pharmacol.* **17**, 983—988 (1968).
 132. Little, C., O'Brien, P. J.: Inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by linoleic acid hydroperoxide. *Biochem. J.* **101**, 13 p (1966).
 133. — — Thiol oxidation in subcellular fractions and inhibition of glycolysis by a lipid peroxide. *Biochem. J.* **103**, 29 p—30 p (1967).
 134. — — An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **31**, 145—150 (1968).

135. Little, C. Olinescu, R., Reid, K. G., O'Brien, P. J.: Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J. biol. Chem.* **245**, 3632—3636 (1970).
136. Löhr, G. W.: Die enzymatischen Erythropathien. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **70** (1964).
137. — Lauseker, Ch.: Zit. nach G. W. Löhr: Die enzymatischen Erythropathien. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **70**, 495 (1964).
138. — Waller, H. D.: Biochemie und Pathogenese der enzymopenischen hämolytischen Anämien. *Dtsch. med. Wschr.* **86**, I, 87—93 (1961).
139. — — Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit Glutathionreduktase-Mangel. *Med. Klin.* **57**, II, 1521—1525 (1962).
140. — Baum, P., Kamm, G.: Toxische hämolytische Anämien. *Med. Klin.* **52**, 2111—2120 (1963).
141. Mapson, L. W., in: Crook, E. M.: Enzyme systems associated with the oxidation and reduction of glutathione in plant tissues. *Biochemical Society Symposia*, vol. 17, p. 28—42. Cambridge: Cambridge University Press 1959.
142. — Moustata, E. M.: The oxidation of glutathione by a lipoxidase enzyme from pea seeds. *Biochem. J.* **60**, 71—80 (1955).
143. McCord, J. M., Fridovich, I.: The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. biol. Chem.* **243**, 5753—5760 (1968).
144. — — Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. biol. Chem.* **244**, 6049—6055 (1969).
145. — — The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J. biol. Chem.* **244**, 6056—6063 (1969).
146. Mengel, Ch. E., Kann, H. E., Jr.: Effects of in vivo hyperoxia on erythrocytes. III. In vivo peroxidation of erythrocyte lipid. *J. clin. Invest.* **45**, 1150—1158 (1966).
147. Michaelis, L., Menten, M. L.: Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**, 333—369 (1913).
148. Mills, G. C.: Hemoglobin catabolism: I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. biol. Chem.* **229**, 189—197 (1957).
149. — The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J. biol. Chem.* **234**, 502—506 (1959).
150. — Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem.* **86**, 1—5 (1960).
151. — Randall, H. P.: Hemoglobin catabolism. II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. *J. biol. Chem.* **232**, 589—598 (1958).
152. Moser, K.: Die kongenitalen enzymopenischen hämolytischen Anämien. *Wien. klin. Wschr.* **81**, 249—258 (1969).
153. Myers, D. K., Bide, R. W.: Biochemical effects of X-irradiation on erythrocytes. *Radiat. Res.* **27**, 250—263 (1966).
154. Necheles, T. F., Boles, T. A., Allen, D. M.: Erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn. *Blood* **28**, 988—989 (1965).
155. — — Erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. *J. Pediat.* **72**, 319—324 (1968).
156. — Maldonado, N., Barquet-Chediak, A., Allen, D. M.: Homozygous erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency. *Blood* **30**, 880—881 (1967).
157. — — — Homozygous erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency: Clinical and biochemical studies. *Blood* **33**, 164—169 (1969).
158. Neubert, D., Lehninger, A. L.: The effect of thiols and disulfides on water uptake and extrusion by rat liver mitochondria. *J. biol. Chem.* **237**, 952—958 (1962).
159. — Rose, T. H., Lehninger, A. L.: Assay and cellular distribution of mitochondrial "contraction factor". *J. biol. Chem.* **237**, 2025—2031 (1962).
160. — Wojtczak, A. B., Lehninger, A. L.: Purification and enzymatic identity of mitochondrial contraction-factors I and II. *Proc. natl. Acad. Sci. (Wash.)* **48**, 1651—1658 (1962).
161. Nicholls, P.: Activity of catalase in the red cell. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **99**, 286—297 (1965).
162. O'Brien, P. J.: Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles. *Canad. J. Biochem.* **47**, 485—492 (1969).
163. — Frazer, A. C.: The effect of lipid peroxides on the biochemical constituents of the cell. *Proc. Nutr. Soc.* **25**, 9—18 (1966).
164. — Little, C.: Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. II. Decomposition of a lipid peroxide by subcellular fractions. *Canad. J. Biochem.* **47**, 493—499 (1969).
165. Oort, M., Loos, J. A., Prins, H. K.: Hereditary absence of reduced glutathione in the erythrocytes. — A new clinical and biochemical entity? *Vox. Sang. (Basel)* **6**, 370—373 (1961).
166. Paglia, D. E., Valentine, W. N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. clin. Med.* **70**, 158—169 (1967).
167. Paniker, N. V., Iyer, G. Y. N.: Erythrocyte catalase and detoxication of hydrogen peroxide. *Canad. J. Biochem.* **43**, 1029—1039 (1965).
168. — — Protective factors in the detoxication of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Canad. J. Biochem.* **47**, 405—410 (1969).
169. Paul, K. G., in: Boyer, P. D., Lardy, H., Myrbäck, K.: Peroxidases. The enzymes, vol. 8, p. 227—274. New York-London: Academic Press 1963.
170. Pihl, A., Eldjarn, L., Bremer, J.: On the mode of action of X-ray protective agents. III. The enzymatic reduction of disulfides. *J. biol. Chem.* **227**, 339—345 (1957).
171. Pinto, R. E., Bartley, W.: The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem. J.* **112**, 109—115 (1969).
172. — — A negative correlation between oxygen uptake and glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem. J.* **114**, 5—9 (1969).
173. — — The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male, and female rat liver. *Biochem. J.* **115**, 449—446 (1969).
174. Pirie, A.: Glutathione peroxidase in lens and a source of hydrogen peroxide in aqueous humour. *Biochem. J.* **96**, 244—253 (1965).
175. Prins, H. K., Oort, M., Loos, J. A., Zürcher, C., Beckers, T.: Congenital nonsperocytic hemolytic anemia, associated with glutathione deficiency of the erythrocytes. *Hematologie, biochemical, and genetic studies. Blood* **27**, 145—166 (1966).
176. Sandberg, H. E., Bryant, R. G., Piette, L. H.: Studies on the location of sulfhydryl groups in erythrocyte membranes with magnetic resonance spin probes. *Arch. Biochem.* **133**, 144—152 (1969).
177. Sass, M. D.: Glutathione synthesis in cell-free preparations from erythrocytes of different ages. *Clin. chim. Acta* **22**, 207—210 (1968).
178. Saunders, B. C., Holmes-Siedle, A. G., Stark, B. P.: Peroxidases. London: Butterworths 1964.
179. Schlegel, W.: Glutathionperoxidase aus Rattenblut, Rattenleberhomogenat und Rattenlebermitochondrien. — Vergleichende Untersuchungen. *Biochemische Diplomarbeit, Tübingen* 1969.
180. Schneider, F., Flohé, L.: Untersuchungen über die Glutathion: H₂O₂-Oxydoreduktase (Glutathion-Peroxydase). *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **348**, 540—552 (1967).
181. — — Untersuchungen über Eigenschaften und Mechanismus der Glutathion: H₂O₂-Oxydoreduktase (EC 1.11.1.9). *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **348**, 1245 (1967).
182. Scott, E. M., Duncan, I. W., Ekstrand, V.: Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *J. biol. Chem.* **238**, 3928—3933 (1963).
183. Snoke, J. E.: Isolation and properties of yeast glutathione synthetase. *J. biol. Chem.* **213**, 813—824 (1955).
184. — Bloch, K., in: Colowick, S., Lazarow, A., Racker, E., Schwartz, D. R., Stadtman, E., Waelsch, H.: The biosynthesis of glutathione. *Glutathione*, p. 129—137. New York: Academic Press 1954.
185. — Yanari, S., Bloch, K.: Synthesis of glutathione from γ -glutamylcysteine. *J. biol. Chem.* **201**, 573—586 (1953).

186. Srivastava, S. K., Beutler, E.: Permeability of normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes to glutathione. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **28**, 659—664 (1967).
187. — — Cataract produced by tyrosinase and tyrosine systems in rabbit lens in vitro. *Biochem. J.* **112**, 421—425 (1969).
188. — — The transport of oxidized glutathione from the erythrocytes of various species in the presence of chromate. *Biochem. J.* **114**, 833—837 (1969).
189. — — The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes. *J. biol. Chem.* **244**, 9—16 (1969).
190. Staal, G. E. J., Veeger, C.: The reaction mechanism of glutathione reductase from human erythrocytes. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **185**, 49—62 (1969).
191. — Visser, J., Veeger, C.: Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **185**, 39—48 (1969).
192. — Hellemann, P. W., Wael, J. de, Veeger, C.: Purification and properties of an abnormal glutathione reductase from human erythrocytes. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **185**, 63—69 (1969).
193. Stöffler, G., Flohé, L., Tischendorf, F. W.: Large-scale crystallization of purified human foetal oxyhaemoglobin from cord blood. *Nature (Lond.)* **211**, 768—769 (1966).
194. — — — Kristallisation von reinem fetalen Hämoglobin aus menschlichem Nabelblut. *Blut* **15**, 193—197 (1967).
195. — Thauer, R. K., Uehleke, H.: Methämoglobinbildung durch p-Hydroxylamino- und p-Nitrosobenzolsulfonamid in Nabelschnur- und Erwachsenen-Erythrocyten. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **252**, 359—367 (1966).
196. Straus, J. H., Gordon, A. S., Wallach, D. F. H.: The influence of tertiary structure upon the optical activity of three globular proteins. Myoglobin, hemoglobin, and lysozyme. *Europ. J. Biochem.* **11**, 201—212 (1969).
197. Sutherland, R. M., Rothstein, A., Weed, R. I.: Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and cation permeability. *J. Cell Physiol.* **69**, 185—198 (1967).
198. — Stannard, J. N., Weed, R. I.: Involvement of sulfhydryl groups in radiation damage to the human erythrocyte membrane. *Int. J. Radiat. Biol.* **12**, 551—564 (1967).
199. Świerczewski, E., Demus-Oole, A., Minkowski, M.: Glutathione peroxidase and catalase in the erythrocytes of premature, full-term and hypotrophic infants. *Z. klin. Chem.* **7**, 208—209 (1969).
200. Tsen, C. C., Collier, H. B.: The protective action of tocopherol against hemolysis of rat erythrocytes by dialuric acid. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **38**, 957—964 (1960).
201. — — The relationship between the glutathione content of rat erythrocytes and their hemolysis by various agents in vitro. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **38**, 981—987 (1960).
202. Uehleke, H., in: Jucker, E.: *Biologische Oxydation und Reduktion am Stickstoff aromatischer Amino- und Nitroderivate und ihre Folgen für den Organismus.* Fortschr. Arzneimittelforsch. **8**, 195—260 (1965).
203. Vennesland, B., Conn, E. E., in: Colowick, S., Lazarow A., Racker, E., Schwarz, D. R., Stadtman, E., Waelsch, H.: *The enzymatic oxidation and reduction of glutathione.* Glutathione, p. 105—127. New York: Academic Press 1954.
204. Verity, M. A., Gambell, J. K.: Studies of copper ion-induced mitochondrial swelling in vitro. *Biochem. J.* **108**, 289—295 (1968).
205. Vetrella, M., Barthelmai, W., Rietkötter, J.: Aktivität der Glutathion-Peroxidase in Erythrocyten vom Fetalbis zum Erwachsenenalter. *Klin. Wschr.* **48**, 85—88 (1970).
206. Waley, S. G., in: Crook, E. M.: *Glutathione and its analogues in the lens.* Biochemical Society Symposia, vol. 17, p. 79—92. Cambridge: Cambridge University Press 1959.
207. Waller, H. D., in: Beutler, E.: *Hereditary disorders of erythrocyte metabolism. Glutathione reductase deficiency.* New York-London: Grune & Statton 1968.
208. — Gerok, W.: Schwere strahleninduzierte Hämolyse bei hereditärem Mangel an reduziertem Glutathion in Blutzellen. *Klin. Wschr.* **42**, 948—954 (1964).
209. — Schoen, H. D.: Heinzkörperbildung und GSH-Gehalt in Erythrocyten mit Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Mangel und Glutathionsynthesestörung nach Röntgenbestrahlung in vitro. *Klin. Wschr.* **44**, 189—194 (1966).
210. — Löhr, G. W., Tabatabai, M.: Hämolyse und Fehlen von Glucose-6-phosphatdehydrogenase in roten Blutzellen. *Klin. Wschr.* **35**, 1022—1027 (1957).
211. — Benöhr, H. Ch., Waumans, P.: Zur Entstehung der medikamenteninduzierten Anämie bei Glutathionreductase-Mangelträgern. *Klin. Wschr.* **47**, 25—30 (1969).
212. — Kaufmann, W., Gerok, W., Eggstein, M.: Biochemische Befunde bei heterozygoten Glutathionreductasemangelträgerinnen mit Pilzvergiftung. *Klin. Wschr.* **42**, 613—618 (1964).
213. — Löhr, G. W., Zysno, E., Gerok, W., Voss, D., Straus, G.: Glutathionreductasemangel mit hämatologischen und neurologischen Störungen. *Klin. Wschr.* **43**, 413—426 (1965).
214. Weber, U., Hartter, P., Flohé, L.: S-Alkylmercaptogruppen zum Schutz der SH-Funktion des Cysteins. II. Thiol-Disulfid-Austausch unsymmetrischer Disulfide des Cysteins. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **351**, 1389—1394 (1970).
215. Wendel, A., Flohé, L.: Zur Permeabilität der Erythrocytenmembran für Glutathion. *Z. klin. Chem.* **8**, 441 (1970).
216. Whaun, J. M., Oski, F. A.: Relation of red blood cell glutathione peroxidase to neonatal jaundice. *J. Pediatr.* **76**, 555—560 (1970).
217. Wills, E. D.: Effect of unsaturated fatty acids and their peroxides on enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 7—16 (1961).
218. Zeller, E. A.: Contribution to the enzymology of the normal and cataractous lens. III. On the catalase of the crystalline lens. *Proceedings of the Association for Research in Ophthalmology. Inc. 21th Meeting, Chicago, Illinois 1952.* *Amer. J. Ophthal.* **36**, 51—53 (1953).
219. Zimmermann, R.: Einfluß der Glutathionperoxidase auf Schwellung und Peroxidbildung in Lebermitochondrien. *Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1970.*
220. Zinkham, W. H.: A deficient of glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity in lens from individuals with primaquine-sensitive erythrocytes. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **109**, 206—216 (1961).

Doz. Dr. L. Flohé
 Physiologisch-Chemisches Institut
 der Universität
 BRD-7400 Tübingen
 Auf dem Schnarrenberg
 Deutschland