

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Sies

**Evaluation von Methoden zur Bestimmung des Glutathiongehaltes  
menschlicher Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Noxen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Marco Döll  
2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Sies

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1.	Bedeutung von Glutathion	6
1.2.	Bestimmung von Glutathion – Prinzipien	6
1.2.1.	Bestimmung mit 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	7
1.2.2.	Bestimmung mit Monobromobiman (mBBr)	7
1.2.3.	Bestimmung mit 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB)	8
1.3.	Ziele der Arbeit	8
<b>2.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1.	Zellkultur	9
2.2.	Behandlung der Zellen	9
2.2.1.	UVA	9
2.2.2.	5-Aminolävulinsäure-Photodynamische Therapie (ALA-PDT)	9
2.2.3.	Peroxyinitrit	10
2.2.4.	Kupfer	10
2.2.5.	Wasserstoffperoxid und Menadion	11
2.2.6.	Diethylmaleat und Diamid	11
2.3.	Glutathionbestimmung	11
2.3.1.	Probenaufbereitung	11
2.3.2.	Messung des Glutathiongehaltes	12
2.3.2.1.	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)-Methode	12
2.3.2.1.1.	DTNB enzymatisch	12
2.3.2.1.2.	DTNB nicht-enzymatisch	13
2.3.2.2.	Monobromobiman (mBBr)-Methode	13
2.3.2.2.1.	Derivatisierung des proteinfreien Zellextraktes	13
2.3.2.2.2.	Ganzzellderivatisierung	14
2.3.2.3.	1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB)-Methode	15
2.4.	Proteinbestimmung	15

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>16</b>
3.1.	Vergleich unterschiedlicher Bestimmungsmethoden für Glutathion	16
3.1.1.	Bestimmung standardisierter Glutathionproben	16
3.1.2.	Bestimmung von Glutathion in enteiweißten Zellextrakten	17
3.1.3.	Bestimmung von Glutathion durch Derivatisierung ganzer Zellen	18
3.2.	Einfluß verschiedener Noxen auf den zellulären Glutathiongehalt	19
3.2.1.	Ultraviolett-A-Aminolävulinat-Photodynamische Therapie	20
3.2.2.	Peroxyinitrit	21
3.2.3.	Kupfersulfat	22
3.2.4.	Wasserstoffperoxid	23
3.2.5.	Menadion	23
3.2.6.	Diethylmaleat	24
3.2.7.	Diamid	24
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>25</b>
4.1.	Vergleichbarkeit der verschiedenen Testsysteme zur Glutathionbestimmung	25
4.2.	Unterschiedlicher Einfluß von Streßfaktoren auf den zellulären Glutathiongehalt	26
<b>5.</b>	<b>Literatur</b>	<b>29</b>
<b>6.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>33</b>

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Helmut Sies herzlich für die Überlassung des Themas. Unter seiner Leitung entstand diese Arbeit.

Herrn PD Dr. Klaus-Dietrich Kröncke danke ich für die Übernahme des Korreferates.

PD Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich herzlich für die Betreuung. Aufgrund seines freundschaftlichen Wesens war es eine Freude, unter seinem Rat tätig zu sein.

Ich danke Dr. Franz Stüb und Dr. Rainer Wolber vom Hautforschungszentrum der Firma Beiersdorf, Hamburg, für die freundliche Zusammenarbeit.

Dr. Gavin Arteel danke ich für die Einführung in Labortechniken sowie für die Chance, mein Englisch zu verbessern.

Mein Dank gilt auch den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klotz, Kotb Aly, Dr. Darius Buchczyk, Dr. Elena Ostrakhovitch, Pauline Patak, Peet Schröder, Heinz Venghaus, für eine stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

**Abkürzungen**

ALA	5-Aminolävulinat
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
FCS	Fötales Kälberserum
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion ( $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin)
GSSG	Glutathiondisulfid
mBBr	Monobromobiman
MTT	3-[4,5 Dimethyl-thiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDT	Photodynamische Therapie
PSG	Phosphat-Natriumchlorid-Glucose
SD	Standardabweichung
UVA	Ultraviolett A (320-400 nm)

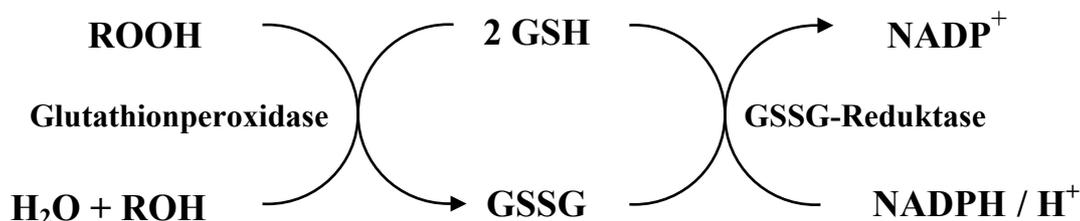
## 1. Einleitung

### 1.1. Bedeutung von Glutathion

Dem Glutathion kommt in der lebenden Zelle eine wesentliche Bedeutung als wasserlösliches Antioxidans zu. Glutathion dient im Phase II-Metabolismus der hepatischen Entgiftung mittels der Glutathion-S-Transferasen (GST).

Glutathion (GSH) ist das Tripeptid  $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin mit einer Sulfhydryl-Gruppe als maßgeblicher funktioneller Gruppe. Es stellt das intrazellulär in den höchsten Konzentrationen vorkommende niedermolekulare Thiol dar und kann mit reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies reagieren – entweder direkt oder unter enzymatischer Katalyse der Glutathionperoxidase (Sies, 1989, 1999; Brigelius-Flohé, 1999; Dringen, 2000; Dringen et al., 2000; Siems et al., 1996; Schulz et al., 2000). Weiterhin hat GSH durch Reduktion von Disulfidgruppen Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität von Proteinen.

Glutathiondisulfid (GSSG), das bei den genannten Reaktionen, bei der Regeneration von anderen Antioxidantien sowie den GPx-abhängigen enzymatischen Reaktionen anfällt, wird durch die Glutathionreduktase (GSSG-Reduktase, siehe Abb. 1.1.) mit NADPH als Kosubstrat regeneriert.



**Abb. 1.1.:** Entgiftung von Hydroperoxiden (ROOH) durch GSH

### 1.2. Bestimmung von Glutathion - Prinzipien

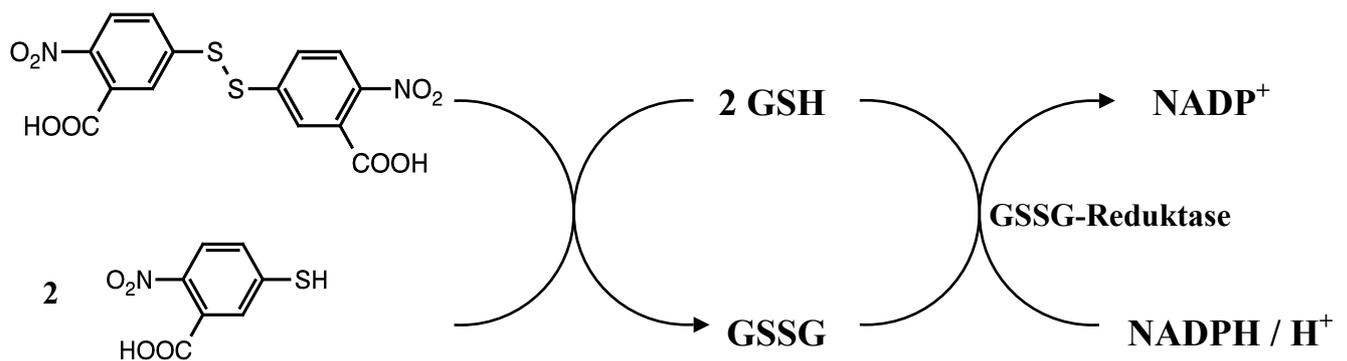
Der Glutathiongehalt in den Zellextrakten wurde in der vorliegenden Arbeit nach verschiedenen Methoden bestimmt, die entweder auf Derivatisierung des Glutathions und anschließender fluorimetrischer Bestimmung (Monobromobiman = mBBr) oder auf enzymkatalysierter Reaktion des Glutathions mit den Substraten CDNB bzw. DTNB zu photometrisch quantifizierbaren Produkten basiert.

### 1.2.1. Bestimmung mit 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)

Die Methode der Glutathionbestimmung mit DTNB nutzt die Bildung eines photometrisch meßbaren Produkts aus DTNB nach Reduktion durch Thiole. Durch mit GSSG-Reduktase unter Anwesenheit von NADPH enzymatisch getriebenes Recycling wird im Reaktionsansatz Gesamtglutathion gemessen (Anderson et al., 1985).

Durch Vorbehandlung eines Aliquots der unbekannt Probe mit 2-Vinylpyridin kann außerdem spezifisch das Glutathiondisulfid gemessen werden; das 2-Vinylpyridin reagiert mit Glutathion, so daß beim nachfolgenden Einsatz dieser Probe in das DTNB-Testsystem lediglich das Glutathiondisulfid (GSSG) gemessen wird. Die Differenz zum gemessenen Gesamtglutathion entspricht dem Gehalt an GSH.

5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), ein generelles Thiol-Reagenz, kann auch ohne Enzymkatalyse zur Quantifizierung von Glutathion eingesetzt werden. In diesem Falle mißt die Testmethode aber nicht spezifisch Glutathion, sondern auch andere Thiole (Ellman et al., 1979).



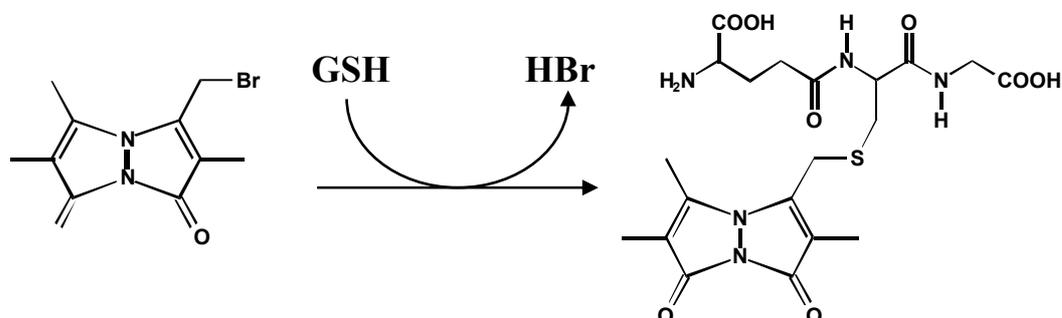
**Abb. 1.2.:** Glutathionbestimmung mit der DTNB-Methode

### 1.2.2. Bestimmung mit Monobromobiman (mBBr)

Die Monobromobiman-Methode beruht auf der spontanen Reaktion des nicht fluoreszierenden Monobromobiman mit Thiolen zu fluoreszierenden Produkten, die nach Anregung mit 390 nm eine Emission bei 460 nm zeigen.

Diese Produkte können entweder in einer Totalmessung der Fluoreszenz im Reaktionsansatz oder direkt von der Kulturplatte bestimmt oder per HPLC aufgetrennt und analysiert werden (Briviba et al., 1993; Jösch et al., 1998). Monobromobiman kann außerdem zur Thiolummessung in lebenden kultivierten Zellen verwandt werden.

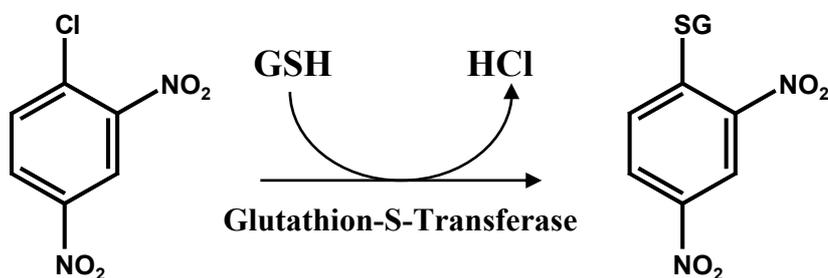
Mit Glutathion reagiert das mBBr unter Abgabe von HBr zum Biman-S-Glutathion, das in Zellextrakten den überwiegenden Anteil der detektierbaren Thiol-Biman-Konjugate stellt (Abb. 1.3.).



**Abb. 1.3.:** Glutathionbestimmung mit der mBBr-Methode

### 1.2.3. Bestimmung mit 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB)

1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) reagiert in einer durch Glutathion-S-Transferase (GST) katalysierten Reaktion spezifisch mit GSH zum 2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion, das photometrisch bei 340 nm gemessen werden kann (Abb. 1.4.; Brigelius et al., 1983).



**Abb. 1.4.:** Glutathionbestimmung mit der CDNB-Methode

## 1.3. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit galt es, die verschiedenen Meßmethoden für Glutathion bezüglich ihrer Eigenschaften bei der Anwendung in Zellen zu vergleichen. Die Methoden unterschieden sich in dem vermessenen Probenmaterial (enteiweißter Zellextrakt, Zellsuspension) sowie der technischen Durchführung (photometrisch, fluorimetrisch, mit oder ohne HPLC-Auftrennung).

Es war zu evaluieren, inwieweit die Verfahren reproduzierbare Ergebnisse lieferten und ob sie gleichgut zur Messung von Glutathionkonzentrationen in Zellen geeignet sind. Auf Basis dieser Erkenntnisse sollte der Einfluß von Stressoren auf den zellulären Glutathiongehalt untersucht werden.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Zellkultur**

Die Zellen (primäre menschliche Hautfibroblasten von der Firma BioWhittaker (Walkersville, MD, USA), HaCaT Keratinocyten und SkMel 23 Melanomzellen (freundlicherweise überlassen von Dr. Clemens Fritsch, Hautklinik der Universität Düsseldorf) wurden in 90mm-Schalen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C, einem Kohlendioxidgehalt von 5 % und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Viabilität von Zellen wurde über Reduktion von MTT (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zum entsprechenden blauen, schwerlöslichen Formazan mittels mitochondrialer und mikrosomaler Dehydrogenaseaktivität bestimmt.

### **2.2. Behandlung der Zellen**

#### **2.2.1. UVA**

Die zu behandelnden Zellen wurden mit 7 ml vorgewärmtem PBS gewaschen, das durch 7 ml vorgewärmte Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) ersetzt wurde, und die Zellen dann bei Zimmertemperatur mit einem UVA-Bestrahlungsgerät (UVA700 von Waldmann, Villingen-Schwenningen) behandelt. Die Gesamtdosis betrug dabei 30 J/cm<sup>2</sup>, welche nach 10 Minuten Bestrahlung mit einer Intensität von 50 mW/cm<sup>2</sup> erreicht war.

Die sofortige Ernte der Zellen erfolgte bei allen Behandlungsmethoden auf die gleiche Weise: Nach Waschen mit 7 ml eiskaltem PBS wurde der restliche Waschpuffer aus der schräggestellten Kulturschale sorgfältig abgesaugt. Sofort danach wurden die behandelten Zellen nach Zugabe von 300 µl eiskalter HCl (0,01 N) mit einem Schaber von der Unterlage gelöst und die so gewonnene Suspension von der Schale vollständig in ein eisgekühltes Probengefäß überführt.

Die Proben wurden bei -80°C eingefroren bis zur weiteren Aufbereitung gelagert (siehe 2.3.).

#### **2.2.2. 5-Aminolävulinsäure-Photodynamische Therapie (ALA-PDT)**

Zellen wurden in Gegenwart von 5-Aminolävulinsäure (1 mM Endkonzentration) für 24 h im Brutschrank vorinkubiert und nach Austausch des Mediums durch 7 ml warmen HBSS-Puffer wie unter 2.2.1. mit unterschiedlichen Dosen UVA bestrahlt. Die Kontrollen wurden nicht mit ALA präinkubiert bzw. nicht bestrahlt.

Die nachfolgenden Schritte waren identisch mit den unter 2.2.1. beschriebenen.

### 2.2.3. Peroxynitrit

Die Synthese von Peroxynitrit erfolgte nach Koppenol et al., 1996. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die aufgetaute Stammlösung in 0,1 % KOH verdünnt und die Extinktion bei 302 nm gegen 0,1 % KOH gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte über den Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{302}=1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Aus der Stammlösung wurde eine Arbeitsverdünnung von 50 mM in 0,1 % KOH hergestellt.

Nach Waschen der Zellen mit PBS und Austausch des Mediums gegen 7 ml warmen PSG-Puffer (100 mM Kaliumphosphat, 10 mM NaCl, 5 mM Glucose, pH 7,4) wurden der Schale 70  $\mu\text{l}$  der 50 mM-Arbeitsverdünnung zugefügt (Endkonzentration 500  $\mu\text{M}$ ) und die Kulturschalen zur Verteilung geschwenkt. Die Schalen wurden dann für 5 min inkubiert, mit warmem PBS gewaschen, wieder mit 7 ml DMEM bedeckt, für weitere 60 min inkubiert und wie oben geerntet.

Für die Kontrolle wurden 70  $\mu\text{l}$  50 mM Peroxynitrit in einem Reaktionsgefäß mit 7 ml warmem PSG gemischt und für drei Minuten bei Zimmertemperatur aufbewahrt, um vorzerfallenes Peroxynitrit herzustellen. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit dem Gemisch bedeckt und für fünf Minuten im Brutschrank gelagert. Nach Absaugen und Waschen mit PBS erfolgte vor der Ernte eine 60minütige Inkubation mit 7 ml DMEM (Briviba et al., 1999).

### 2.2.4. Kupfer

Zur Behandlung mit Kupferionen wurden Leberepithelzellen (WB-F344) ausgesucht, weil im lebenden Organismus insbesondere die Leber Puffer- und Eliminierungsaufgaben für Schwermetalle übernimmt.

$\text{CuSO}_4$ -Arbeitslösungen mit 1 und 10 mM in Wasser wurden vorbereitet. Die Kulturschalen wurden mit warmem PBS gewaschen und mit 7 ml HBSS bedeckt. Durch Zugabe von 70  $\mu\text{l}$  der  $\text{CuSO}_4$ -Arbeitslösungen wurden die Endkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  hergestellt. Zusammen mit Kontrollen ohne Kupferzusatz wurde 15, 30 oder 60 min im Kulturschrank inkubiert und geerntet.

Ernte und weitere Aufbereitung des Lysates folgten dem Vorgehen unter 2.2.1.

### 2.2.5. Wasserstoffperoxid und Menadion

Nach Waschen der Zellen mit PBS und Austausch des Mediums gegen 7 ml warmen HBSS-Puffer erfolgte die Behandlung der Zellen mit 0,2-1 mM Wasserstoffperoxid durch Boluszugabe von 70 µl verschieden konzentrierter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösungen (in aqua bidest.). Den Kontrollen wurden 70 µl aqua bidest. zugefügt. Nach Inkubation bei 37°C für 60 min wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet.

Zur Behandlung mit Menadion wurden die Endkonzentrationen (100-500 µM) durch Boluszugabe zum Medium von 7-35 µl einer frisch hergestellten und dunkel gehaltenen 100 mM Stammlösung Menadion in Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Medium eingestellt. Die Kontrollen erhielten 0,5 % (v/v) DMSO.

Dann wurde für 60 min im Brutschrank inkubiert und die Zellen wie oben beschrieben geerntet.

### 2.2.6. Diethylmaleat und Diamid

Diethylmaleat ist ein Substrat der Glutathion-S-Transferase. Es dient in dieser Arbeit der Kontrolle der Testsysteme hinsichtlich selektiver Abnahme von GSH ohne einen gleichzeitigen Anstieg des Oxidationsproduktes GSSG.

Für die Behandlung mit Diethylmaleat wurde in den 7 ml Wachstumsmedium über den Zellen durch Boluszugabe von 70 µl einer 200 mM DEM-Arbeitslösung in DMSO die Endkonzentration vom 2 mM hergestellt. Nach 60minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgesaugt, mit kaltem PBS gewaschen und geerntet wie oben beschrieben.

Diamid ist ein Thiol-Oxidans, das zur Steigerung der GSSG-Spiegel führt. Die Behandlung mit Diamid wurde im Hautforschungszentrum der Fa. Beiersdorf (Hamburg) unter der Leitung von Herrn Dr. rer. nat. Rainer Wolber durchgeführt.

Abweichend von dem Vorgehen bei den anderen Behandlungen wurden hier 600cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit primären Dermisfibroblasten trypsiniert, die Zellen in Medium aufgenommen, zentrifugiert und das Zellsediment in PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert und in 10cm-Glas-Petrischalen für 30 min bei 37°C mit 1 mM Diamid behandelt. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS.

## **2.3. Glutathionbestimmung**

### **2.3.1. Probenaufbereitung**

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in 0,01 N HCl gelagerten Zellproben wurden auf Eis aufgetaut. Es folgte zweimaliges Sonifizieren für 10 Sekunden auf Eis. Die Gefäße wurden schließlich für 2 min bei ca. 20,000 x g und  $2^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, um Zelltrümmer aus dem Lysat zu entfernen.

Dem Überstand wurden nun 250  $\mu\text{l}$  für die weitere Aufarbeitung zur Glutathionbestimmung sowie zwei 10  $\mu\text{l}$ -Aliquots zur Proteinbestimmung entnommen. Diese Aliquots wurden mit 20  $\mu\text{l}$  aqua bidest. verdünnt und bis zur Messung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die 250  $\mu\text{l}$  des Lysates, die zur Glutathionbestimmung bestimmt waren, mußten für den Einsatz in die Testsysteme enteweißt werden.

Für die mit der DTNB- und mBBr-Methode zu messenden Proben wurde die Eiweißfällung durch Versetzen mit 5 % (w/v; Endkonzentration) eiskalter 5-Sulfosalicylsäure, zweiminütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation für 2 min bei ca. 20,000 x g und  $2^{\circ}\text{C}$  durchgeführt.

Zur Bereitung der Proben für den Einsatz in die CDNB-Methode wurde die Proteinfällung mit 2,5 % (w/v; Endkonzentration) Trichloressigsäure vorgenommen, da es hier bei Verwendung von Sulfosalicylsäure zu Interaktionen mit dem Testsystem kam.

Die klaren Überstände wurden in ein neues Probengefäß überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Konnte die Glutathionbestimmung nicht noch am selben Tag geschehen, wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.3.2. Messung des Glutathiongehaltes**

#### **2.3.2.1. 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)-Methode**

##### **2.3.2.1.1. DTNB enzymatisch**

Gesamtglutathion (GSH und GSSG; in GSH-Äquivalenten) sowie Glutathiondisulfid (GSSG) wurden über 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) mit Hilfe durch Glutathionreduktase getriebenen GSSG-Recyclings gemessen. Das geschah nach Anderson (1985) mit Modifikationen. Hierzu wurden 75  $\mu\text{l}$  des sauren Zellextraktes zu 900  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung (0,9 mM NADPH, 0,48 mM DTNB, 0,1 mM EDTA in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4) pipettiert und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  Glutathionreduktase (aus Bäckerhefe; Sigma-Aldrich #G-3664; 67 U/ml Stammlösung) gestartet, gefolgt durch Messung der Extinktionszunahme bei 412 nm. Die gemessenen Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit wurden mit denen identisch behandelter GSH-Standards (0-25  $\mu\text{M}$ ) verglichen und in GSH-Konzentrationen umgewandelt. Normierung erfolgte über Proteingehalt der Zellysate.

Zusätzlich wurde der Gehalt an Glutathiondisulfid im Lysat gemessen. Dazu wurde ein 100 µl-Aliquot des sauren Überstandes mit 58 µl 10 % (v/v) Triethanolamin neutralisiert und für 60 min bei Zimmertemperatur mit 2 µl 2-Vinylpyridin inkubiert. Das 2-Vinylpyridin reagiert mit Glutathion, so daß beim nachfolgenden Einsatz dieser Probe in das DTNB-Testsystem lediglich das Glutathiondisulfid (GSSG) gemessen wird. Die Differenz zum gemessenen Gesamtglutathion entspricht dem Gehalt an GSH.

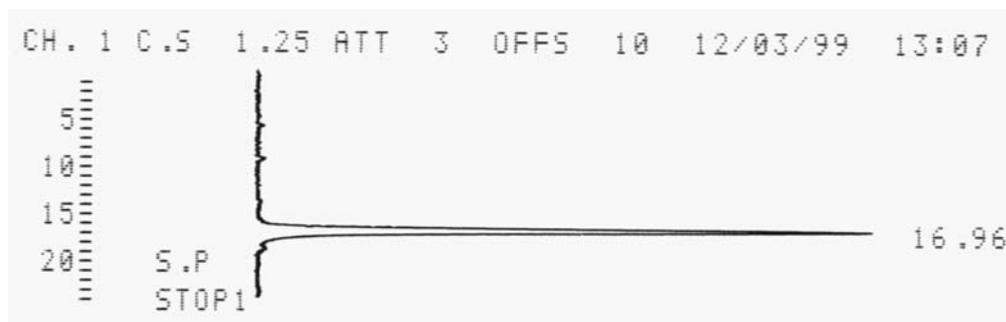
#### 2.3.2.1.2. DTNB nicht-enzymatisch

Die DTNB-Reaktion kann auch ohne Enzymkatalyse zur Quantifizierung von Thiolen genutzt werden. Dazu wurden 75 µl des Zellextraktes zu 925 µl Reaktionslösung (0,3 mM DTNB, 0,1 mM EDTA in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4) pipettiert und nach 2 min die Extinktionsdifferenz gegen die reine Reaktionslösung gemessen. Durch Vergleich der gemessenen Extinktionsdifferenz mit der einer wie die Zellextrakte behandelten Standardreihe wurden daraus GSH-Konzentrationen errechnet. Zu beachten ist die in diesem Fall fehlende Spezifität für Glutathion, da das enzymkatalysierte Recycling wegfällt.

#### 2.3.2.2. Monobromobiman

##### 2.3.2.2.1. Derivatisierung des proteinfreien Zellextraktes

Die Messung von GSH erfolgte durch Derivatisierung mit mBBr (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) und anschließender Auftrennung der Derivatisierungsprodukte über HPLC. Hierzu wurden 133 µl der sauren Extrakte durch Zugabe von 1 M Tris (pH 8,0; 25 µl) und 2,8 M NaOH (17,5 µl) auf einen pH von 7,8-8 gebracht und mit 25 µl mBBr (1,6 mM in Wasser) versetzt. Nach Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für mindestens 1 h wurden sie über HPLC aufgetrennt (Detektion über Fluoreszenz bei 460 nm nach Anregung bei 390 nm); Laufpuffer war hierbei 15 % (v/v) Methanol/ 85 % (v/v) 20 mM Natriumacetat (pH 3,5), die Auftrennung erfolgte über eine LiChrospher 100 RP18-Säule von Merck (Darmstadt). Auch hier erfolgte die Auswertung anhand identisch behandelter GSH-Standards.



**Abb. 2.1.:** Glutathionbestimmung mit der mBBr-Methode; Auftrennung der mBBr-Konjugate mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion, Peak entspricht Biman-GSH-Addukt; siehe Abb. 1.3.

#### 2.3.2.2.2. Ganzzellderivatisierung

Die Glutathionbestimmung mit dieser Methode wurde im Hautforschungszentrum der Firma Beiersdorf (Hamburg) nach Stáb et al. (2000) durchgeführt.

Die Zellen wurden nicht direkt in der Kulturschale Stressoren ausgesetzt, sondern vorher wie unter 2.2.6. für das Diamid beschrieben trypsiniert, gewaschen und dann in PBS mit der Noxe behandelt. Nach erneutem Waschen wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einer Verdünnungsreihe austitriert (in 96-well-Mikrotiterplatte), mit Monobromobiman (60  $\mu\text{M}$  in PBS, 30 min, 37°C) inkubiert und fluorimetrisch (SpectraFluor, SLT-Tecan) vermessen. Auf Basis der sich ergebenden (Hintergrund-korrigierten) Geradengleichung (Fluoreszenz 390/460 vs. Zellzahl; Zellzahl wurde per Neubauerzählkammer bestimmt) wurde für die jeweilige Probe der Fluoreszenz-Wert von 10.000 Zellen/well berechnet und die Daten auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

Es wurden Zellbehandlungen mit Diamid und UVA durchgeführt (UVA-Behandlung analog zu 2.2.1. mit 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  Gesamtdosis, Dermalight).

Es erfolgten zwei Messungen des Glutathiongehaltes der Zellen. Die erste Messung wurde direkt nach Behandlung in Hamburg gemäß 2.3.2.2.2. mit der Ganzzellderivatisierung mit Monobromobiman vorgenommen. Die übriggebliebene gewaschene Zellsuspension wurde in kalter 0,01 N HCl aufgenommen und auf Trockeneis nach Düsseldorf verschickt. Dort wurden die Proben bei  $-80^\circ\text{C}$  untergebracht und am nächsten Tag gemäß 2.3.1. aufbereitet und nach 2.3.2.1.1. mit der enzymatischen DTNB-Methode auf ihren Glutathiongehalt untersucht. (Ergebnisse Tabelle 3.1.)

#### 2.3.2.3. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB)-Methode

Es wurden 100 µl des mit Trichloressigsäure enteweißten Überstandes zu 890 µl Reaktionslösung (1,14 mM CDNB in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4) pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Glutathion-S-Transferase (aus Pferdeleber; Sigma-Aldrich #G-6511; 12 U/ml) unter Messung der Extinktion bei 340 nm gestartet. Die Auswertung erfolgte anhand identisch behandelte GSH-Standards.

#### 2.4. Proteinbestimmung

Aus den nach Gefrier-Tau-Behandlung und Sonifizierung durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreiten Zellysaten wurden zwei 10 µl-Aliquots genommen und mit 20 µl aqua bidest. verdünnt, um mit dieser Probe die Proteinbestimmung nach Bradford durchzuführen.

Dazu wurden 15 µl des verdünnten Lysates mit 885 µl Bradford-Reagenz (BioRad Protein Assay, Fa. BioRad, München) in einer Einmalküvette gemischt und nach 5 min die Extinktion bei 595 nm gemessen.

Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vergleich unterschiedlicher Bestimmungsmethoden für Glutathion

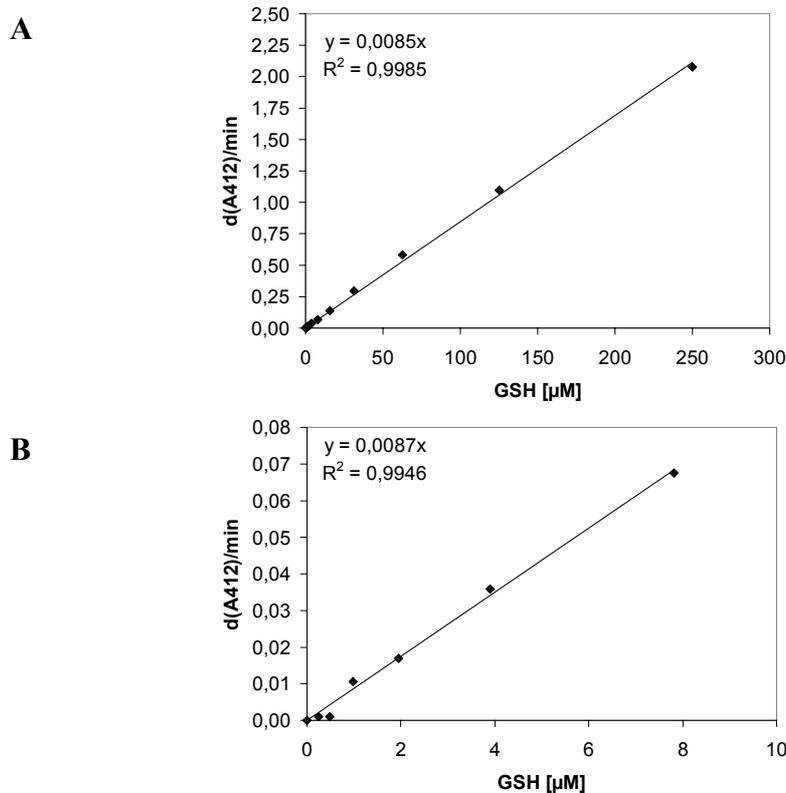
##### 3.1.1. Bestimmung standardisierter Glutathionproben

Um die unter 2.3. vorgestellten Meßmethoden für Glutathion hinsichtlich ihrer Sensitivität und Verlässlichkeit zu vergleichen, wurden identische GSH-Standards nach den unterschiedlichen Methoden bestimmt und so Standardkurven angelegt.

Zur Herstellung der GSH-Standardreihe wurde eine 10 mM Stammlösung in 0,01 N HCl angefertigt. Hiermit wurden serielle Verdünnungen mit Konzentrationen von 0,24–1000  $\mu\text{M}$  GSH erstellt. Die Null-Probe bestand aus 0,01 N HCl.

Um die Bedingungen der Bestimmung von GSH aus Zellysaten zu simulieren, wurden diese GSH-Standards nun mit 5-Sulfosalicylsäure bzw. Trichloressigsäure (CDNB-Methode) versetzt.

Die so behandelten Standards wurden nun in die entsprechenden Testsysteme eingesetzt (siehe 2.3.2.).



**Abb. 3.1.:** Standardkurve, erstellt mit enzymatischer DTNB-Methode  
 A: Standardkurve mit bekannten GSH-Proben  
 B: Ausschnittsvergrößerung von A an der Sensitivitätsgrenze

Mit allen Methoden ließen sich sehr gut lineare Standardkurven herstellen (z.B. Abb. 3.1.). Jedoch stellte sich heraus, daß die Methoden unterschiedliche Sensitivitäten besitzen. Die CDNB- und die enzymatisch getriebene DTNB-Methode messen GSH-Konzentrationen bis 1  $\mu\text{M}$  zuverlässig, d.h. die Standardkurven sind durchgehend linear (vgl. Abb. 3.1. B). Die Sensitivität der nicht-enzymatischen DTNB-Methode liegt unter den angegebenen Bedingungen bei maximal 2  $\mu\text{M}$ , die der mBBr-Methode mit HPLC-Auftrennung bei mindestens 4  $\mu\text{M}$ . Für die praktische Anwendung an Zellextrakten bieten jedoch alle untersuchten Methoden eine ausreichende Empfindlichkeit.

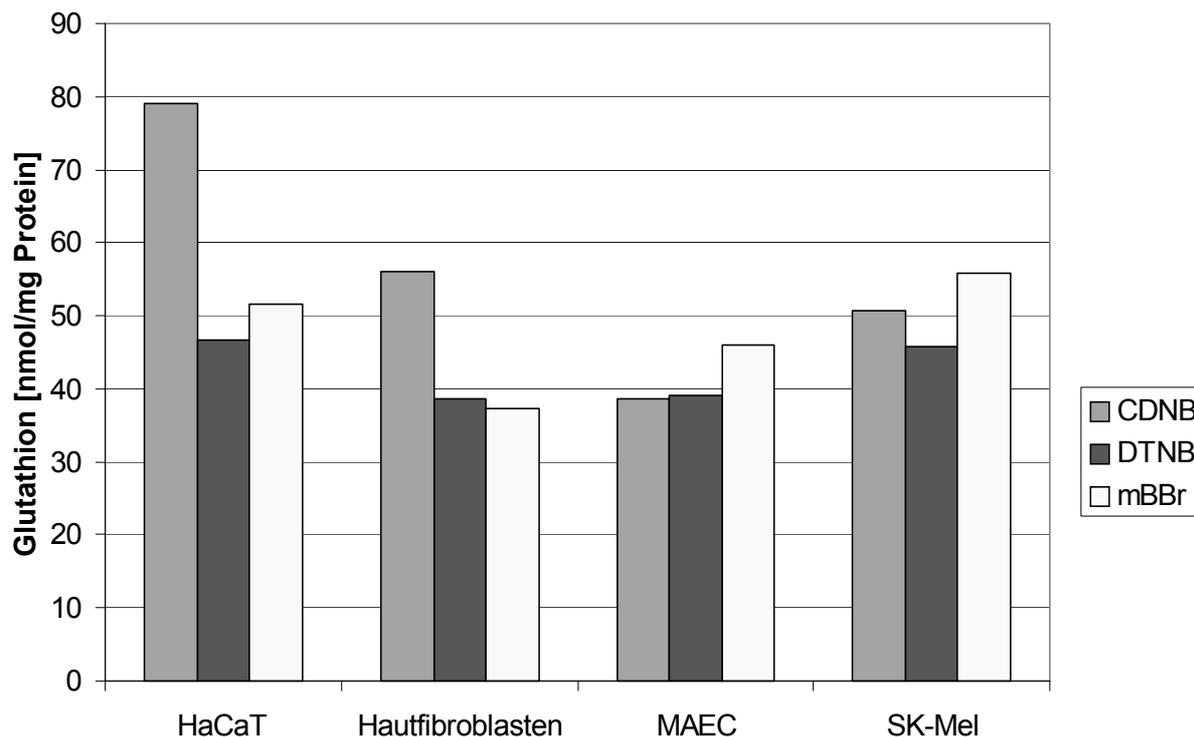
### 3.1.2. Bestimmung von Glutathion in entweißten Extrakten von Zellen in Kultur

Um zu prüfen, ob die oben bestimmte Zuverlässigkeit der verschiedenen Testmethoden bei der Bestimmung von Standards auch auf Zellsysteme zutrifft, wurden die Methoden durch Messung des Glutathiongehaltes verschiedener Zellen untereinander verglichen. Dazu dienten HaCaT Keratinocyten, primäre menschliche Hautfibroblasten, Mausendothelzellen (MAEC) sowie SkMel 23 Melanomzellen.

Konfluent bewachsene Kulturflaschen mit einer Fläche von 165  $\text{cm}^2$  wurden mit 30 ml kaltem PBS gewaschen und sofort in 1200  $\mu\text{l}$  0,01 N HCl-Lösung gesammelt. Nach Aufbereitung des Extraktes erfolgte die Messung von Glutathion in drei unterschiedlichen Testsystemen:

1. enzymkatalysierte 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)-Methode
2. Monobromobiman (mBBr)-Methode
3. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB)-Methode

Dabei zeigte sich, daß die DTNB- und die mBBr-Methode in allen Zellsystemen zu sehr gut vergleichbaren Ergebnissen führt. Die Resultate der CDNB-Methode korrelieren bei Messung von Mausendothelzellen und Melanomzellen ebenfalls gut mit den anderen beiden Methoden, in Keratinocyten und Hautfibroblasten allerdings weichen die ermittelten Glutathiongehalte um ca. 50 % nach oben ab. Das bedeutet, daß hier in der Tendenz Glutathionkonzentrationen überschätzt werden, wenn sie per CDNB-Methode bestimmt werden.



**Abb. 3.2.:** Darstellung der Ergebnisse aus vergleichenden GSH-Messungen an vier Zellsystemen; die Zellen wurden aus konfluenten Kulturflaschen in 0,01 N HCl lysiert und dann wie unter 2.3. beschrieben aufbereitet und mit drei verschiedenen Methoden Glutathion gemessen: 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB), 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) enzymatisch, Monobromobiman (mBBr); Mittelwerte aus  $n=2$ , Abweichung vom Mittelwert < 12 %

### 3.1.3. Bestimmung von Glutathion durch Derivatisierung ganzer Zellen

Die Behandlung der Zellen mit Diamid und UVA erfolgte gemäß 2.2.6.

Tabelle 3.1. zeigt die Ergebnisse der vergleichenden Messungen.

Die Methode der Derivatisierung einer Suspension aus trypsinisierten Zellen und Totalfluoreszenzmessung des Gemisches ergibt im Vergleich zur DTNB-Methode mit photometrischer Bestimmung aus enteiweißtem Lysat einen tendenziell etwas höheren Gehalt an Glutathion in den behandelten primären Hautfibroblasten, da Monobromobiman in der Lage, ist, auch mit anderen, z.B. proteingebundenen Thiolen zu reagieren, so daß eher der Gesamt-Thiolstatus bestimmt wird. Der GSH-senkende Einfluß der Noxen UVA und Diamid schlägt sich daher in den Meßergebnissen der Ganzzellmethode weniger nieder. Der t-Test für verbundene Stichproben ergibt jedoch keine Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte im Vergleich zur DTNB-Methode. Beide Testsysteme eignen sich zur Quantifizierung des Einflusses von Noxen auf den zellulären GSH-Gehalt.

Behandlung	mBBr-HPLC	DTNB	mBBr-Ganzzellmessung
Kontrolle	100	100	100
UVA	37	57 ± 20	77 ± 8
Diamid	12	29 ± 4	45 ± 19
	n=2	n=3-4	n=4

**Tabelle 3.1.:** Glutathion-Gehalt UVA- und Diamid-behandelter humaner Hautfibroblasten, Messung mit verschiedenen Methoden (A) mBBr-Derivatisierung von enteiweißtem Lysat und nachfolgende HPLC, n=2 [Abweichung: 20 % (UVA) bzw. 4 % (Diamid)] (B) DTNB-Methode in enteiweißtem Lysat n=3-4 (C) Ganzzell-mBBr-Derivatisierung, n=4; Mittelwerte ± SD; relative GSH-Gehalte

### 3.2. Einfluß verschiedener Noxen auf den zellulären Glutathiongehalt

Im folgenden galt es, die Effekte unterschiedlicher Streßfaktoren auf die intrazellulären Glutathionkonzentrationen zu untersuchen.

Dazu kamen in unseren Untersuchungen verschiedene oxidative und nicht-oxidative Noxen zum Einsatz.

Da es galt, präzise Messungen der Glutathionkonzentration in Zellextrakten durchführen zu können, und sich die enzymatische DTNB-Methode für diesen Zweck bewährte (vgl. 3.1.), wurden hiermit die Daten für streßbehandelte Zellen gewonnen.

Die Behandlung mit Noxen erfolgte wie unter 2.2. beschrieben.

### 3.2.1. Ultraviolett-A-Aminolävulinat-Photodynamische Therapie

In den vorliegenden Experimenten zeigte sich ein Effekt von UVA-Bestrahlungen auf den zellulären Glutathiongehalt, der abhängig war von der applizierten UVA-Dosis, dem Vorhandensein von ALA sowie von der auf die Bestrahlung folgenden Postinkubationszeit bis zur Ernte und dem damit verbundenen "Einfrieren" des Oxidationsstatus des GSH-Pools.

Zur Ermittlung geeigneter Bestrahlungsbedingungen wurden mittels des MTT-Assays die 20 %- bzw. 80 %-Letaldosen ( $LD_{20}$  bzw.  $LD_{80}$ ) sowohl für reine UVA-Behandlungen (Ergebnis: 40 bzw. 80  $J/cm^2$ ) als auch für die mit ALA präinkubierten Zellen (0,1 bzw. 0,8  $J/cm^2$ ) 24 h nach Bestrahlung bestimmt (Buchczyk et al., 2001).

Tabelle 3.2. zeigt die Ergebnisse der Glutathionmessung für die jeweilige Bestrahlungsstärke mit bzw. ohne ALA-Präinkubation. Es wurde direkt nach der Bestrahlung gemessen (0 h), sowie nach 3 h und 6 h Postinkubation nach der Behandlung.

Die Kontrollen ohne Bestrahlung wurden für 6 h mit bzw. ohne ALA im Medium im Brutschrank gehalten.

Die Bestrahlungen mit  $LD_{20}$  führten sowohl bei der reinen UVA-Behandlung als auch bei der Bestrahlung mit vorausgegangener ALA-Präinkubation direkt nach der Exposition zu einem Abfall des Gesamtglutathiongehaltes auf ca. 65 % der Kontrollwerte. Nach sechsstündiger Postinkubation in HBSS-Puffer erhöhten sich die Glutathiongehalte wieder auf Werte, die im Bereich der Kontrollen lagen.

Im Falle der UVA-Bestrahlung mit der 80 %-Letaldosis sank der Glutathiongehalt dauerhaft auf ca. 55 % des Kontrollwertes. Die analoge Behandlung mit vorheriger ALA-Präinkubation führte zu einem sofortigen Abfall der GSH-Konzentration auf ca. 40 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 3 h und 6 h nach der Behandlung sinkt der GSH-Gehalt auf ca. 5 % ab.

Beim Glutathiondisulfid zeigte sich nach allen Behandlungen ein Anstieg der gemessenen Konzentrationen. Diese GSSG-Zunahme beträgt ca. 10-20 %, bis auf die mit ALA vorinkubierten und dann mit  $LD_{20}$  bestrahlten Zellen. Hier zeigt sich ein von der Postinkubationsdauer abhängiger Anstieg auf ca. 200 % nach 6 h.

**Tabelle 3.2.:** Glutathiongehalt in UVA-bestrahlten Fibroblasten mit/ohne ALA-Präinkubation

<b>Behandlung</b>	<b>GSH + 0.5 GSSG</b>	<b>GSSG</b>
	<b>Relativer Gehalt</b>	
UVA		
Kontrolle <sup>a)</sup>	100 <sup>b)</sup>	100 <sup>c)</sup>
LD <sub>20</sub> (40 J/cm <sup>2</sup> )		
0 h <sup>d)</sup>	67	114
3 h	73	100
6 h	100	122
LD <sub>80</sub> (80 J/cm <sup>2</sup> )		
0 h	55	111
3 h	65	125
6 h	53	121
UVA/ALA		
Kontrolle <sup>a)</sup>	100 <sup>b)</sup>	100 <sup>c)</sup>
LD <sub>20</sub> (0,1 J/cm <sup>2</sup> )		
0 h	58	120
3 h	79	137
6 h	97	179
LD <sub>80</sub> (0,8 J/cm <sup>2</sup> )		
0 h	41	115
3 h	5	108
6 h	5	102

<sup>a)</sup> Kontrollen waren für 6 h in Medium (UVA) bzw. in Medium mit ALA (UVA/ALA)

<sup>b)</sup> absolute Werte: UVA: 100=117 nmol GSH/mg Protein  
UVA/ALA: 100 = 111 nmol GSH/mg Protein

<sup>c)</sup> absolute Werte: UVA: 100 = 5,7 nmol GSSG/mg Protein  
UVA/ALA: 100 = 5,0 nmol GSSG/mg Protein

<sup>d)</sup> Zeitpunkt nach Bestrahlung

Mittelwerte aus n=2; Abweichung vom Mittelwert: GSH < 65 %; GSSG < 50 %

### 3.2.2. Peroxynitrit

Die Behandlung von Fibroblasten mit Peroxynitrit in einer Konzentration von 0,5 mM führte zu einem Abfall des zellulären Gesamtglutathions um ca. 25 %. Auch hier stieg der Gehalt an GSSG nicht gegenüber der Kontrolle an (siehe Tabelle 3.3.).

**Tabelle 3.3.:** Glutathiongehalt in Peroxynitrit-behandelten Zellen

<b>Behandlung</b>	<b>GSH + 0.5 GSSG</b>	<b>GSSG</b>
	<b>Relativer Gehalt</b>	
Kontrolle <sup>a)</sup>	100 <sup>b)</sup> ± 23	100 <sup>c)</sup> ± 79
Peroxynitrit 0,5 mM	75 ± 19	102 ± 79

<sup>a)</sup> Kontrolle war Zerfallskontrolle

<sup>b)</sup> absolute Werte: 100 = 149 nmol GSH/mg Protein

<sup>c)</sup> absolute Werte: 100 = 4,2 nmol GSSG/mg Protein

Mittelwerte ± SD aus n=4

### 3.2.3. Kupfersulfat

Bei der Behandlung von WB-F344 Leberepithelzellen mit Kupfersulfat zeigte sich ein Einfluß auf den Glutathiongehalt, der von der Konzentration sowie der Inkubationszeit mit der Noxe abhängt.

Wie Tabelle 3.4. zeigt, führt eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  auch nach 60 min Inkubation zu keiner signifikanten Abnahme des Gesamtglutathions. Hingegen hat die Exposition mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  nach 60 min einen Abfall des Gesamtglutathions um ca. 30 % zur Folge.

Stärker als der Rückgang des GSH ist der zu beobachtende Anstieg von GSSG, der bei der 10  $\mu\text{M}$ -Behandlung ca. 400 %, bei der 100  $\mu\text{M}$ -Behandlung zeitabhängig bis zu 1700 % relativ zur HBSS-Kontrolle beträgt.

**Tabelle 3.4.:** Glutathiongehalt in mit Kupferionen behandelten Zellen

Behandlung	GSH + 0.5 GSSG (nmol GSH/mg Protein)	GSSG (nmol GSSG/mg Protein)
CuSO <sub>4</sub>		
Kontrolle*		
15 min	447 ± 123	3,6 ± 3,2
30 min	431 ± 127	3,2 ± 3,8
60 min	441 ± 77	3,3 ± 3,0
10 $\mu\text{M}$		
60 min	438 ± 190	12 ± 9,1
100 $\mu\text{M}$		
15 min	461 ± 182	23 ± 18
30 min	425 ± 153	55 ± 67
60 min	310 ± 81	41 ± 32

\* Kontrollen waren für die jeweilige Inkubationsdauer mit HBSS-Puffer bedeckt  
 Erläuterung: die Zeitangabe bezieht sich auf die Inkubationsdauer  
 Mittelwerte ± SD aus n=3

### 3.2.4. Wasserstoffperoxid

Wie Tabelle 3.5. zeigt, war nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Konzentrationen von 0,2 und 1 mM nur ein moderater Effekt auf den zellulären Gesamtglutathiongehalt zu beobachten. Auch die Konzentration an Glutathiondisulfid stieg nur leicht um ca. 30 % an.

**Tabelle 3.5.:** Glutathiongehalt in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen

<b>Behandlung</b>	<b>GSH + 0.5 GSSG</b>	<b>GSSG</b>
	<b>Relativer Gehalt</b>	
Kontrolle*	100** ± 19	100*** ± 68
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
0,2 mM	80 ± 33	131 ± 77
1 mM	95 ± 19	131 ± 69

\* Kontrolle war: Inkubation in HBSS-Puffer

\*\* absolute Werte: 100 = 117 nmol GSH/mg Protein

\*\*\* absolute Werte: 100 = 6,0 nmol GSSG/mg Protein

Mittelwerte ± SD aus n=3

### 3.2.5. Menadion

Menadion führte zu einer dosisabhängigen starken Verminderung des meßbaren Gesamtglutathions (siehe Tabelle 3.6.). Während eine Konzentration von 100 µM zu einem Abfall auf ca. 30 % führte, verminderte sich durch eine Exposition mit 500 µM Menadion das Gesamtglutathion auf weniger als 10 %.

Verglichen damit stieg die Konzentration von GSSG hingegen wenig an (30-40 %).

**Tabelle 3.6.:** Glutathiongehalt in Menadion-behandelten Zellen

<b>Behandlung</b>	<b>GSH + 0.5 GSSG</b>	<b>GSSG</b>
	<b>Relativer Gehalt</b>	
Kontrolle*	100** ± 34	100*** ± 37
Menadion		
100 µM	31 ± 47	143 ± 14
500 µM	8 ± 32	129 ± 4

\* Kontrolle war: Zugabe von 50 µl DMSO zum Medium

\*\* absolute Werte: 100 = 112 nmol GSH/mg Protein

\*\*\* absolute Werte: 100 = 3,9 nmol GSSG/mg Protein

Mittelwerte ± SD aus n=3

### 3.2.6. Diethylmaleat

Einen ähnlichen Einfluß wie Menadion auf den Gesamtglutathiongehalt sowie den Gehalt an GSSG besitzt Diethylmaleat bei einer Konzentration von 2 mM. Hierbei wurde eine Verminderung des Gesamtglutathions um fast 90 % beobachtet.

Die Konzentration von Glutathiondisulfid hingegen stieg nur um ca. 10 % an.

**Tabelle 3.7.:** Glutathiongehalt in Diethylmaleat-behandelten Zellen

<b>Behandlung</b>	<b>GSH + 0.5 GSSG</b>	<b>GSSG</b>
	<b>Relativer Gehalt</b>	
Kontrolle*	100**	100***
Diethylmaleat 2 mM	11	113

\* Kontrolle war: Zugabe von 50 µl DMSO zum Medium

\*\* absolute Werte: 100 = 82 nmol GSH/mg Protein

\*\*\* absolute Werte: 100 = 4,2 nmol GSSG/mg Protein

Mittelwerte aus n=2; Abweichung vom Mittelwert < 40 %

### 3.2.7. Diamid

Entsprechend Tabelle 3.8. führte Diamid in einer Konzentration von 1 mM zu einem Abfall des zellulären Gesamtglutathions um ca. 70 %. Der Gehalt des Glutathiondisulfids stieg nur um ca. 10 % an.

**Tabelle 3.8.:** Glutathiongehalt in Diamid-behandelten Zellen

<b>Behandlung</b>	<b>GSH + 0.5 GSSG</b>	<b>GSSG</b>
	<b>Relativer Gehalt</b>	
Kontrolle*	100**	100***
Diamid 1 mM	27	108

\* Kontrolle war: PBS

\*\* absolute Werte: 100 = 10 nmol GSH/mg Protein

\*\*\* absolute Werte: 100 = 2,0 nmol GSSG/mg Protein

Mittelwerte aus n=2– Abweichung vom Mittelwert < 45 %

## 4. Diskussion

### 4.1. Vergleichbarkeit der verschiedenen Testsysteme zur Glutathionbestimmung

Zur zuverlässigen Messung von standardisierten Glutathion-Proben eignen sich sowohl die DTBN-, mBBr- als auch die CDNB-Methode. Bei unterschiedlicher Sensitivität weisen alle Testmethoden Linearität der Abhängigkeit des jeweiligen Signals von den Glutathionkonzentrationen bis 250  $\mu\text{M}$  auf.

Nachfolgend sollen Vor- und Nachteile der Methoden beschrieben werden:

Die Monobromobiman-Methode mit Derivatisierung und nachfolgender HPLC-Analyse besitzt nach unseren Erfahrungen eine geringere Sensitivität als die anderen Methoden. Dies liegt vermutlich an der Störanfälligkeit der Konjugationsbedingungen; beispielsweise verändern geringe Schwankungen des pH-Werts zum Sauren oder Alkalischen deutlich die Effektivität der Konjugation.

Bei der Anwendung an behandelten Zellen ist diese Einschränkung jedoch ohne praktische Bedeutung, da die hier gemessenen Signale in der Regel im linearen Bereich liegen.

Ein Nachteil ist der im Vergleich zu den anderen beschriebenen Techniken große Zeitaufwand. Dieser ergibt sich zum einen aus der Notwendigkeit einer Präinkubation (Derivatisierung) der Proben mit Monobromobiman, zum anderen durch die nachfolgende Auftrennung der Addukte per HPLC, will man spezifisch Aussagen über den Glutathiongehalt machen.

Die Methode der Derivatisierung einer Suspension aus trypsinierten Zellen und Totalfluoreszenzmessung des Gemisches hat gegenüber der Derivatisierung des proteinfreien Zellextraktes und der Auftrennung der Addukte den Vorteil der Praktikabilität, da keine aufwendige und potentiell fehlerträchtige Aufarbeitung der Proben nötig ist. Monobromobiman reagiert sowohl mit kleinen Thiolen wie Glutathion als auch mit proteingebundenen Thiolen, so daß bei der Derivatisierung ganzer Zellen eine Aussage über den Gesamtstatus an Thiolen gemacht werden kann. Jedoch ist nur die Angabe der relativen Veränderung gegenüber einer Kontrolle möglich und keine Konzentrationsangabe.

In vergleichenden Messungen derselben Proben von „streßbehandelten“ Zellen mit beiden Methoden zeigte sich, daß bei der Ganzzellerivatisierung und Totalfluoreszenzmessung die Veränderung der Gesamtfluoreszenz der Thioladdukte geringer ist als die aus dem Zellextrakt mit HPLC beobachtete spezifische Veränderung des Glutathion-Peaks (Tabelle 3.1.). Der Gesamt-Thiolgehalt der Zelle sinkt also weniger stark als der Glutathiongehalt, so daß die Effekte auf die zelluläre Glutathionkonzentration tendenziell unterschätzt werden, wenn man die Gesamtfluoreszenz als Index verwendet.

Die CDNB-Methode hat ähnliche Vorteile wie die DTNB-Methode. Sie ist durch Enzymkatalyse spezifisch für GSH, sensitiv ( $1 \mu\text{M}$  GSH), zuverlässig und rasch durchzuführen. Allerdings kann mit der CDNB-Methode nur GSH und nicht Gesamtglutathion oder GSSG gemessen werden.

Die DTNB-Methode stellte sich in unseren Experimenten als besonders günstige Methode für spezifische GSH/GSSG-Messungen dar. Sie ist in der Lage, sowohl Gesamtglutathion als auch Glutathiondisulfid zu messen. Zusätzlich besitzt das Testsystem eine im Vergleich zu den anderen Techniken hohe Sensitivität von  $1 \mu\text{M}$  und ist rasch und einfach photometrisch durchzuführen.

Die Monobromobiman-Methode mit Derivatisierung lebender Zellen ist ebenfalls ausreichend sensitiv, noch einfacher, und sehr gut für eine Beurteilung des Gesamt-Thiolgehalts der Zelle geeignet.

#### **4.2. Unterschiedlicher Einfluß von Stressfaktoren auf den zellulären Glutathiongehalt**

In dieser Arbeit behandelten wir Zellen mit verschiedenen „Stressoren“, die durch unterschiedliche Mechanismen Einfluß auf die Glutathionkonzentration nehmen können.

- (a) Ultraviolett A (UVA)-Bestrahlungen, insbesondere bei vorangegangener Präinkubation mit 5-Aminolävulinsäure, zeigten einen deutlichen Effekt auf den zellulären Glutathiongehalt. Dieser Einfluß auf die GSH-Konzentration kann durch die UVA-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Klotz et al., 1998; Fuchs et al., 2000; Buchczyk et al., 2001) erklärt werden, welche dann mit zellulären Thiolen reagieren können. Diese oxidativen Schäden müssen zum Teil unter Verbrauch von GSH repariert werden, was die dosisabhängige Erniedrigung des Gehalts an Glutathion erklärt. Beim Verbrauch von GSH wird dies nur zu einem geringen Teil in seine Disulfidform GSSG überführt.
- (b) Peroxynitritbehandlung von Fibroblasten in einer Konzentration von  $0,5 \text{ mM}$  führte zu einem Abfall des zellulären Gesamtglutathions um ca. 30 %. Auch hier stieg der Gehalt an GSSG nicht gegenüber der Kontrolle an. Dies ist erklärbar aufgrund der direkten Reaktion von Peroxynitrit mit Thiolen, ohne daß diese zu Disulfiden oxidiert werden (Scarlett et al., 1996; Arteel et al., 1999; Quijano et al., 1997; Radi et al., 1991).

- (c) Kupferionen ( $\text{CuSO}_4$ ) hatten einen zeit- und konzentrationsabhängigen Effekt auf den Gehalt an GSH und GSSG in WB-F344 Leberepithelzellen. Diese Beobachtung erklärt sich aus der intrazellulären Reduktion von  $2 \text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $2 \text{Cu}^+$  wobei 2 GSH zu GSSG oxidiert werden.

Daneben kann in der Fenton-Reaktion  $\text{Cu}^+$  von  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Anfall von  $\text{OH}^\bullet$  und  $\text{OH}^-$  zu  $\text{Cu}^{2+}$  oxidiert werden. Die entstehenden Hydroxylradikale können ebenfalls zu einem Verbrauch von GSH führen, entweder durch direkte Reaktion oder durch Induktion von Prozessen, die GSH-abhängiger Reparatur bedürfen (Kachur et al., 1998).

- (d) Durch die Behandlung von Fibroblasten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Konzentrationen von 0,2 und 1 mM war in den durchgeführten Experimenten kein eindeutiger Effekt auf den zellulären Glutathiongehalt auszumachen.

Im Zytoplasma kann Wasserstoffperoxid durch die Glutathionperoxidase (GPx) unter Verbrauch von GSH-Reduktionsäquivalenten reduziert werden ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ ; siehe Sies et al., 1972, und Brigelius-Flohé, 1999).

Dies bestätigte sich in den vorliegenden Experimenten durch einen Abfall der GSH- und Anstieg der GSSG-Gehalte. Daß diese beobachteten Effekte nur moderat sind, kann am  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abbau durch die Katalasereaktion liegen, die ohne Verbrauch von GSH arbeitet.

- (e) Eine einstündige Inkubation mit Menadion hat eine dosisabhängige drastische Verringerung des Gesamtglutathiongehaltes der Zellen zur Folge.

Menadion induziert über Redox-Cycling die Bildung von  $\text{O}_2^-$  und daraus die Generierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das wie oben beschrieben zu einer Oxidation von GSH in seine Disulfidform führen kann (Brunmark et Cadenas, 1989).

Darüber hinaus kann Menadion auch direkt mit GSH reagieren, ohne daß GSSG entsteht (Wefers & Sies, 1983). Da in den vorliegenden Versuchen der Gehalt an GSSG trotz einer starken Abnahme von GSH nur wenig anstieg, kann man schließen, daß hier die direkte GSH-bindende Reaktion von Menadion stärker auf den GSH-Gehalt gewirkt hat als die Umsetzung von GSH in GSSG durch die Glutathionperoxidase-Reaktion in Folge der menadionbedingten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung.

- (f) Diethylmaleat (2 mM) führte zu einem starken Rückgang des Gesamtglutathiongehaltes ohne einen gleichzeitigen Anstieg des Glutathiondisulfids. Dies kann darauf zurückgeführt

werden, daß DEM unter Enzymkatalyse durch Glutathion-S-Transferase mit Glutathion reagiert (Plummer et al., 1981). Vergleichbare Resultate sind in der Literatur beschrieben (Klotz et al., 1996, Zorov et al., 2000).

- (g) Es ist bekannt, daß Diamid Glutathion zu oxidieren vermag (Plummer et al., 1981). Die Behandlung mit 1 mM Diamid senkte den Gesamtglutathiongehalt drastisch, wenn auch ohne einen deutlichen Anstieg des Glutathiondisulfids.

## 5. Literatur

Anderson, M.E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology 113*, 548-555

Arteel, G.E., Briviba, K., Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite. *FEBS Letters 445*, 226-230

Brigelius, R., Muckel, C., Akerboom, T.P.M., Sies, H. (1983). Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochemical Pharmacology 32*, 2529-2534

Brigelius-Flohé, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine 27*, 951-965

Briviba, K., Fraser, G., Sies, H., Ketterer, B. (1993). Distribution of the monochlorobimane-glutathione conjugate between nucleus and cytosol in isolated hepatocytes. *Biochemical Journal 294*, 631-633

Briviba, K., Klotz, L.-O., Sies, H. (1999). Defenses against peroxynitrite. *Methods in Enzymology 301*, 301-311

Brunmark, A., Cadenas, E. (1989). Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine 7*, 435-477

Buchczyk, D.P., Klotz, L.O., Lang, K., Fritsch, C., Sies, H. (2001). High efficiency of 5-aminolevulinate-photodynamic treatment using UVA irradiation. *Carcinogenesis 22*, 879-883

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology 62*, 649-671

Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry 267*, 4912-4916

Ellman, G., Lysko, H. (1979). A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Analytical Biochemistry 93*, 98-102

- Fuchs, J., Weber, S., Kaufmann, R. (2000). Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: Implications for clinical photodynamic therapy. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 537-548
- Jösch, C., Sies, H., Akerboom, T.P.M. (1998). Hepatic mercapturic acid formation: Involvement of cytosolic cysteinylglycine S-conjugate dipeptidase activity. *Biochemical Pharmacology* 56, 763-771
- Kachur, A.V., Koch, C.J., Biaglow, J.E. (1998). Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radical Research* 28, 259-269
- Klotz, L.-O., Fritsch, C., Briviba, K., Tsacmacidis, N., Schliess, F., Sies, H. (1998). Activation of JNK and p38 but not ERK MAP kinases in human skin cells by 5-Aminolevulinate-Photodynamic Therapy. *Cancer Research* 58, 4297-4300
- Klotz, L.-O., Müller, J., Fausel, M., Gebhardt, R., Weser, U. (1996). Reactivity of lipophilic diSchiff-Base coordinated copper in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 51, 919-929
- Koppenol, W.H., Kissner, R., Beckman, J.S. (1996). Syntheses of peroxynitrite: To go with the flow or on solid grounds? *Methods in Enzymology* 269, 296-203
- Plummer, J.L., Smith, B.R., Sies, H., Bend, J.R. (1981). Chemical depletion of glutathione in vivo. *Methods in Enzymology* 77, 50-59
- Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R.M., Augusto, O., Radi, R. (1997). Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochemical Journal* 322, 167-173
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 266, 4244-4250
- Scarlett, J.L., Packer, M.A., Porteous, C.M., Murphy, M.P. (1996). Alterations to glutathione and nicotinamide nucleotides during the mitochondrial permeability transition induced by peroxynitrite. *Biochemical Pharmacology* 52, 1047-1055
- Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry* 267, 4904-4911
- Siems, W.G., Krämer, K., Grune, T. (1996). Zur Chemie und Biologie des Glutathionsystems: ein Überblick. *Pharmazeutische Zeitung* 45, 4239-4248

Siems, W.G., Krämer, K., Grune, T. (1996). Störungen im Glutathionsystem und klinische Konsequenzen. *Pharmazeutische Zeitung* 46, 4343-4352

Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H., Flohé, L. (1972). Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides. *FEBS Letters* 27, 171-175

Sies, H. (1989). Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions. *Naturwissenschaften* 76, 57-64

Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 916-921

Stäb, F., Wolber, R., Blatt, T., Keyhani, R., Sauermann, G. (2000). Topically applied antioxidants in skin protection. *Methods in Enzymology* 319, 465-478

Wefers, H., Sies, H. (1983). Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and the menadione-glutathione conjugate: Relation to glutathione and NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase) activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 224, 568-578

Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.-O., Zweier, J.L., Sollott, S.J. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: A new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1001-1014

## 6. Lebenslauf

### Marco Döll

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

22.03.1977	Geburt in Bad Schwalbach am Taunus (Hessen)
1983-1986	Grundschule
1986-1996	Gymnasium
06/1996	Abitur (Wigbert-Schule Hünfeld, Kreis Fulda/ Hessen)
07/1996	Beginn des Dienstverhältnisses eines Soldaten auf Zeit in der Laufbahn der Sanitätsoffiziere bei der Bundeswehr, Teilstreitkraft Marine
04/1997	Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
03/1999	Ärztliche Vorprüfung
03/2000	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
03/2002	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
04/2002	Wechsel zur Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
04/2002	Beginn des Praktischen Jahres am Städtischen Klinikum Kemperhof, Koblenz
04/2003	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
04/2003	AiP im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz, Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie unter Oberstarzt Prof. Dr. med. H.-P. Becker

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ging es um die Evaluation von Methoden zur Bestimmung des Glutathiongehaltes in menschlichen Zellen.

Im Vergleich der drei zur Verfügung stehenden Testsysteme [5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)-Methode, Monobromobiman (mBBR)-Methode, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB)-Methode] zeigte sich, daß die enzymkatalysierte DTNB-Methode optimal geeignet ist, um rasch und zuverlässig den Gehalt an GSH und GSSG in Zellen zu ermitteln, weshalb hiermit die Messungen an mit Noxen behandelten Zellen vorgenommen wurden. Die mBBR-Methode hat den Vorteil, daß der Thiolgehalt an lebenden Zellen beurteilt werden kann.

Bei der Behandlung und nachfolgenden Aufarbeitung der Zellen galt es, Methoden zu finden, die im Probenmaterial einen größtmöglichen Erhalt des oxidationsempfindlichen Glutathions bis zur Bestimmung erlaubten, was insbesondere durch sofortige Ansäuerung und unterbrechungsfreie Kühlung erreicht wurde.

Die Wahl der experimentellen Noxen umfasste die Noxen UVA, Peroxynitrit, Kupferionen,  $H_2O_2$ , Menadion, Diethylmaleat und Diamid. Diese „Stressoren“ hatten einen unterschiedlich starken Effekt auf die Konzentration von GSH und GSSG. UVA führte in Hautfibroblasten zu einem dosisabhängigen Abfall von Glutathion bis auf ca. 5 % des Ausgangswertes. Nur ein kleiner Anteil des verbrauchten GSH tauchte aber als GSSG auf. Peroxynitrit (0,5 mM) senkte den GSH-Gehalt um ca. 30 %. Auch hier blieb der GSSG-Gehalt nahezu unbeeinflusst. Die Behandlung von Leberepithelzellen mit Kupferionen war bei Konzentrationen von 100  $\mu M$  in der Lage, mit steigender Inkubationszeit den GSH-Gehalt auf ca. 70 % abzusenken. Auffallend war hier der extreme Anstieg von GSSG bis auf das zwanzigfache der Kontrolle. Einen weniger deutlichen Effekt hatte die Behandlung mit  $H_2O_2$ , das selbst bei hohen Konzentrationen (1 mM) den zellulären Glutathiongehalt nur moderat senkte. Menadion (100 bzw. 500  $\mu M$ ) senkte den Glutathiongehalt drastisch auf 30 bzw. unter 10 %. Hier stieg die GSSG-Konzentration nur um 30-40 % an, so daß wohl der Mechanismus der direkten Reaktion mit GSH überwiegt gegenüber der Auslösung GSH-verbrauchender Prozesse. Die Behandlung mit Diethylmaleat und Diamid führte erwartungsgemäß zu einem starken Abfall des meßbaren GSH, das nicht bzw. in geringem Maße oxidativ in GSSG umgesetzt wurde.

Zusammenfassend wurden verschiedene Glutathion-Testsysteme verglichen und am Beispiel der Behandlung von Hautfibroblasten mit unterschiedlichen Streßfaktoren (oxidativer Streß, Metallstreß, UVA) in die Laborpraxis umgesetzt.