

Umsatz von extrazellulärem Glutathion und
Glutathiondisulfid durch Gehirnzellen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von
Cornelia Rüdig

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2005
Dekan Prof. Dr. S. Laufer
1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Dringen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hamprecht

MEINER FAMILIE

Danke!

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von August 2001 bis November 2004 im Labor von Herrn Prof. Dr. Ralf Dringen am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. Bernd Hamprecht im Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dringen für die Themenstellung der Arbeit und die fundierte wissenschaftliche Ausbildung in seinem Labor.

Herr Prof. Hamprecht hat mich während der Doktorarbeit durch seine konstruktiven Fragen und Vorschläge sehr unterstützt.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dringen für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den Spaß, den wir bei der Arbeit hatten. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Dr. Johannes Hirrlinger, von dem ich sehr viel gelernt habe und der mir immer mit gutem Rat und Tips zur Seite stand. Nicht unerwähnt bleiben sollen meine Doktorandenkollegen Hans-Hermann Höpken und Tobias Minich sowie die ehemaligen Diplomanden Julia Hullmann, Petra Pawlowski, Till Korten und Thomas Knorpp. Es war eine sehr, sehr schöne Zeit mit Euch!

Die Mitarbeiter des Arbeitskreises Hamprecht haben mich sehr freundlich aufgenommen und waren jederzeit hilfsbereit und für konstruktive Diskussionen zugänglich. Ich hatte das Vergnügen mit Daniela Scheible, Wolfgang Hirschner, Bhavani Kowtharapu Shankar, Barbara Birk, Dr. John Wellard, Dr. Radovan Murin und Dr. Stephan Verleysdonk hochinteressante Gespräche führen zu können, die sehr aufmunternd waren. Daniela Scheible und Wolfgang Hirschner haben mit guten Tips zum Gelingen von Klonierungen beigetragen. Die Gespräche mit Herrn Prof. Dr. Heiner Wiesinger haben mich ermutigt und ich habe seine Meinung immer sehr geschätzt.

Herr Dr. Alexander Beck (Medizinische Klinik Abt. VI, Tübingen) hat mich durch die massenspektrometrischen Analysen sehr unterstützt.

Herr Prof. Dr. Jörg B. Schulz (ehemals Neurologische Klinik in Tübingen) stellte die Körnerneuronen zur Verfügung und ich hatte die Möglichkeit in seinem Labor Geräte zu nutzen. Seine Mitarbeiterin Dr. Ellen Gerhardt hat mich durch die Herstellung der adenoviralen Konstrukte unterstützt.

Frau Prof. Dr. G. Dodt und ihre Arbeitsgruppe haben es mir ermöglicht ihr schönes Fluoreszenzmikroskop zu nutzen.

Sehr großer Dank gebührt meinen Eltern, die mich immer bedingungslos und in jeder Hinsicht unterstützt und ermutigt haben, meinen Weg zu gehen.

Einen nicht unwesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat Sebastian Kraft durch sein Verständnis und seine große Geduld. Durch diesen Rückhalt wurde einiges sehr viel erträglicher. Es war sicher nicht immer leicht mit mir. Ich danke Dir für alles!

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen und Nomenklatur	9
1.1	Abkürzungen	9
1.2	Nomenklatur	12
2	Einleitung	13
2.1	Glutathion: Funktionen und Stoffwechsel	13
2.1.1	Funktionen	13
2.1.2	Biosynthese	13
2.1.3	Intrazellulärer Metabolismus	14
2.1.4	Export von Glutathion	14
2.1.5	Extrazellulärer Metabolismus	15
2.2	γ Glutamyltranspeptidase	16
2.3	Glutathionstoffwechsel im Gehirn	18
2.3.1	Zelltypen des Gehirns	18
2.3.2	Glutathionstoffwechsel	20
2.3.3	Glutathion, oxidativer Streß und neurologische Erkrankungen	24
2.4	Tumor-Nekrose-Faktor α und seine Rezeptoren	26
2.5	Gentherapie und adenoviraler Gentransfer	29
2.6	Aufgabenstellung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Charakterisierung der verwendeten neuronalen Zellkulturen	33
3.2	Vorkommen von γ Glutamyltranspeptidase in neuronalen Zellen	37
3.2.1	Modulation der Aktivität der γ Glutamyltranspeptidase in neuronalen Zellen	38
3.2.1.1	Tumor-Nekrose-Faktor α	41
3.2.1.2	Eisenionen	45

3.2.1.3	Stickstoffmonoxid	49
3.2.1.4	Überexpression der γ Glutamyltranspeptidase durch adenoviralen Gentransfer	49
3.3	Extrazellulärer Stoffwechsel von Glutathiondisulfid	54
3.3.1	Umsatz von extrazellulärem Glutathiondisulfid durch neurale Zellen	54
3.3.1.1	Suche nach Cosubstraten	56
3.3.1.2	Identifizierung des Redoxzustandes des nachgewiesenen Gesamtglutathions	59
3.3.1.3	Bedingungen des Glutathionumsatzes	61
3.3.1.4	Inhibierung des Umsatzes von Glutathiondisulfid	64
3.3.1.5	Vergleich verschiedener neuraler Zellkulturtypen	65
3.3.2	Umsatz von Glutathiondisulfid durch Zellysate	65
3.3.2.1	Etablierung eines Testsystems im Mikrotiterformat	66
3.3.2.2	Substratabhängigkeit des Glutathionumsatzes	70
3.3.2.3	Inhibierung des Glutathionumsatzes	73
3.3.3	Massenspektrometrische Analyse von Reaktionsansätzen	74
4	Diskussion	81
4.1	Charakterisierung der verwendeten neuralen Zellkulturen	81
4.2	γ Glutamyltranspeptidase in Gehirnzellen	82
4.3	Modulation der Aktivität der γ Glutamyltranspeptidase	83
4.3.1	Tumor-Nekrose-Faktor α und NO	83
4.3.2	Eisenionen	86
4.3.3	Überexpression durch adenoviralen Gentransfer	87
4.4	Extrazellulärer Glutathiondisulfidmetabolismus	88
4.5	Ausblick	96
5	Experimenteller Teil	99
5.1	Material und Geräte	99
5.2	Reagenzien und Chemikalien	101
5.3	Methoden	102
5.3.1	Zellkulturen	102
5.3.1.1	Allgemeine Techniken	102
5.3.1.2	Astrogliareiche Primärkulturen	103

5.3.1.3	Oligodendrogliareiche Sekundärkulturen	103
5.3.1.4	Microgliareiche Sekundärkulturen	104
5.3.1.5	Neuronenkulturen	105
5.3.2	Anfärbungen	105
5.3.2.1	Immuncytochemische Anfärbungen	105
5.3.2.2	Chromatinanfärbung	106
5.3.3	Experimentelle Inkubation von Zellkulturen	106
5.3.3.1	Experimente zur Bestimmung von γ Glutamyltranspeptidase- aktivität, Zellvitalität und Eisengehalt	106
5.3.3.2	Experimente zur Freisetzung von Glutathion und Glutathion- disulfid	107
5.3.3.3	Experimente zum Umsatz von extrazellulärem Glutathion- disulfid	107
5.3.3.4	Experimente mit adenoviralen Vektoren	108
5.3.4	Bestimmungsmethoden	109
5.3.4.1	γ Glutamyltranspeptidase	109
5.3.4.2	Glutathion und Glutathiondisulfid	110
5.3.4.3	Eisen	110
5.3.4.4	Zellvitalität	111
5.3.4.5	Protein	112
5.3.5	Molekularbiologische Methoden	112
5.3.5.1	Sequenzanalyse und <i>Primerdesign</i>	112
5.3.5.2	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der γ Glutamyltranspeptidase-mRNA	112
5.3.5.3	Klonierung der cDNA des xCT-Gens in einen <i>shuttle</i> -Vektor .	113
5.3.6	Massenspektrometrische Analysen	117
6	Zusammenfassung	119
	Literaturverzeichnis	121

1 Abkürzungen und Nomenklatur

1.1 Abkürzungen

ABC	ATP-Bindungskassette (engl.: <i>ATP binding cassette</i>)
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom (engl.: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: <i>analysis of variance</i>)
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	engl.: <i>activator protein 1</i>
APK	Astrogliareiche Primärkultur(en)
APN	Aminopeptidase N
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
BSO	L-Buthioninsulfoximin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	3',5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure (engl.: <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHX	Cycloheximid
CID	engl.: <i>collision induced dissociation</i>
CKZ	Cerebellare Körnerzellen
DA	Dopamin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	engl.: <i>death domain</i>
DFX	Desferoxamin
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)

1 Abkürzungen und Nomenklatur

dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTNB	5,5´-Dithio-bis(nitrobenzoesäure)
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verstärkt grünfluoreszierendes Protein (engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Reticulum
ESI	Electrospray-Ionisation
FAC	Ammoniumeisen(III)citrat (engl.: <i>ferric ammonium citrate</i>)
FCS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FIA	engl.: <i>flow injection analysis</i>
GalC	Galactocerebrosid
GAP-43	engl.: <i>growth-associated protein-43</i>
GCNA	γ Glutamyl-(3-Carboxy-4-Nitroanilid)
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein (engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
γ GT	γ Glutamyltranspeptidase
GPx	Glutathionperoxidase(n)
GR	Glutathionreductase
GSH	Glutathion (reduziertes Glutathion)
GS-SC	Glutathionylcystein
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion)
GSx	Gesamtglutathion (Menge an GSH + 2 x Menge an GSSG)
GS-X	Glutathionkonjugat
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen (engl.: <i>human embryonal kidney</i>)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-(2-ethansulfonsäure)
HIV	humanes Immundefizienzvirus
Hrsg.	Herausgeber
HS	Pferdeserum (engl.: <i>horse serum</i>)
HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
IAA	Iodacetamid
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase (engl.: <i>inducible nitric oxide synthase</i>)

IP	Inkubationspuffer
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
kb	kilo-Base(n) (1000 x bp)
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MM	Minimalmedium
MOI	Viruspartikelkonzentration im Verhältnis zur Zellkonzentration (engl.: <i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Botenribonucleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
Mrp	<i>multidrug-resistance</i> -Protein
MS	Multiple Sklerose
MSK	microgliareiche Sekundärkultur(en)
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NADH	reduziertes Nicotinsäureamidadenindinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat
$NF\kappa B$	Nucleärer Faktor κB
NPK	neuronenreiche Primärkultur(en)
n.s.	nicht signifikant
n.u.	nicht untersucht
OATP	<i>organic anion transporter</i> Protein
ORF	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
OSK	oligodendrogliareiche Sekundärkultur(en)
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDI	Proteindisulfidisomerase
PS	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonucleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RSS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkription
SD	Standardabweichung(en) (engl.: <i>standard deviation</i>)
SNP	Nitroprussid Natrium (engl.: <i>sodium nitroprusside</i>)
SOD	Superoxiddismutase(n)
SSS	Sulfosalicylsäure

1 Abkürzungen und Nomenklatur

TACE	TNF α <i>converting enzyme</i>
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAF	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (engl.: <i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
2VP	2-Vinylpyridin
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
v/v/v	Volumen/Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
z.B.	zum Beispiel

1.2 Nomenklatur

Zur Unterscheidung von neuronalen Zellen in Kultur und im Gehirn werden Zellen in Kultur als Astrogliazellen, Microgliazellen und Oligodendrogliazellen bezeichnet. Sind die entsprechenden Zellen *in vivo* gemeint, werden sie als Astrocyten, Microglia bzw. Oligodendrocyten bezeichnet.

Soweit sinnvoll und vorhanden sind in dieser Arbeit deutsche Fachbegriffe verwendet worden. Sofern keine geeigneten deutschen Fachbegriffe genutzt werden konnten oder deutsche Begriffe keine eindeutige Bezeichnung darstellten, wurden englische Fachbegriffe verwendet. Diese sind, ebenso wie alle anderen Begriffe aus Fremdsprachen, kursiv geschrieben.

2 Einleitung

2.1 Glutathion: Funktionen und Stoffwechsel

2.1.1 Funktionen

Das Tripeptid Glutathion (GSH; γ -Glutamylcysteinylglycin) ist ein zelluläres Thiol, das in Säugerzellen in Konzentrationen bis zu 12 mM vorkommt (Dringen, 2000). Seine Funktionen sind vielfältig. Es fungiert als Antioxidationsmittel, als Reaktionspartner für die Entgiftung endogener Substanzen und Xenobiotika, als Cofaktor in Isomerisierungsreaktionen und es ist eine Speicher- und Transportform für Cystein (Meister und Anderson, 1983; Cooper, 1997; Wu *et al.*, 2004). GSH ist außerdem essentiell für die Proliferation von Zellen (Poot *et al.*, 1995) und erhält das Thiol-Redox-Potential in Zellen, indem es Sulfhydrylgruppen von Proteinen im reduzierten Zustand hält (Cotgreave und Gerdes, 1998). Weiterhin wird vermutet, daß GSH auch eine Rolle bei der Regulation der Apoptose spielt (Ghibelli *et al.*, 1998; Hall, 1999; Sen, 2000). Im endoplasmatischen Reticulum (ER) ist Glutathion/Glutathiondisulfid als Redoxpuffer an der Faltung von Proteinen beteiligt (Wilkinson und Gilbert, 2004). Das Glutathionsystem ist sehr wichtig für die zelluläre Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (RSS). GSH reagiert dabei einerseits direkt in nichtenzymatischen Reaktionen mit Radikalen, andererseits ist GSH Elektronendonator in der durch Glutathionperoxidasen (GPx) katalysierten Reduktion von Peroxiden (Chance *et al.*, 1979; Saez *et al.*, 1990; Winterbourn und Metodiewa, 1994; Wu *et al.*, 2004; Dringen *et al.*, 2005).

2.1.2 Biosynthese

GSH wird *in vivo* durch zwei aufeinanderfolgende enzymkatalysierte Reaktionen synthetisiert. γ Glutamylcystein synthetase katalysiert die Kondensation von Cystein und Glutamat zum Dipeptid γ Glutamylcystein. In der durch Glutathion synthetase katalysierten Reaktion reagiert dieses Dipeptid mit Glycin zum Tripeptid GSH. Cosubstrat dieser beiden Enzyme ist ATP (Meister, 1974). γ Glutamylcystein synthetase ist das

geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Synthese von GSH und wird in negativer Rückkopplung durch GSH gehemmt (Richman und Meister, 1975; Misra und Griffith, 1998). Dadurch wird der intrazelluläre Spiegel an GSH reguliert und die Synthese dem Verbrauch von GSH angepaßt.

2.1.3 Intrazellulärer Metabolismus

GSH ist an der Entgiftung von RSS durch zwei verschiedenen Reaktionstypen beteiligt. Einmal reagiert GSH nichtenzymatisch mit Radikalen wie Superoxidradikalanionen, Stickstoffmonoxid oder Hydroxylradikalen (Clancy *et al.*, 1994; Winterbourn und Metodiewa, 1994; Singh *et al.*, 1996; Dickinson und Forman, 2002), zum anderen ist GSH Elektronendonator bei der Reduktion von Peroxiden durch GPx (Chance *et al.*, 1979; Dringen *et al.*, 2005). Das Endprodukt der Oxidation von GSH ist Glutathiondisulfid (GSSG). Bisher sind mehrere Selenocystein enthaltende Isozyme der GPx beschrieben worden (Ursini *et al.*, 1995; Arthur, 2000). Intrazellulär wird GSH durch die Reduktion von GSSG regeneriert. Diese Reaktion wird durch Glutathionreduktase (GR) katalysiert, ein Flavoenzym, das den Transfer von Elektronen von NADPH auf GSSG vermittelt (Lopez-Barea *et al.*, 1990; Dringen und Gutterer, 2002).

Während der Reaktionen, die durch GPx und GR katalysiert werden, wird GSH nicht verbraucht, sondern regeneriert. Im Gegensatz dazu wird die Konzentration von GSH bei der Bildung von Glutathion-S-Konjugaten durch Glutathion-S-Transferasen (Salinas und Wong, 1999) oder durch Freisetzung von GSH aus Zellen (Kaplowitz *et al.*, 1996; Dringen und Hirrlinger, 2003) verringert. Das bei diesen Reaktionen verbrauchte GSH muß durch *de novo*-Synthese ersetzt werden.

2.1.4 Export von Glutathion

GSH wird von verschiedenen Zellen und Geweben freigesetzt. Beispielsweise geben Hepatocyten große Mengen GSH an die Galle und an das Blut ab (Akerboom und Sies, 1989; Ballatori und Rebbeor, 1998; Paulusma *et al.*, 1999). Verantwortlich für den Export von GSH sind zum einen Transporter der Familie der *multidrug resistance*-Proteine (Mrp) (Ballatori und Rebbeor, 1998; Paulusma *et al.*, 1999; Lai und Tan, 2002; Rius *et al.*, 2003). Mrp gehören zur Untergruppe C der ATP-Bindungskassetten-Transporter (ABC-Transporter; Borst *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 1999; Borst und Elferink, 2002). Zu dieser Untergruppe gehört auch das CFTR-Protein (CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Borst *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 1999),

das ebenfalls GSH aus Zellen exportiert (Kogan *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2004). Weitere Transporter für GSH gehören zur Familie der ATP-unabhängigen Transporter von organischen Anionen (OATP: *organic anion transporter* Protein) wie die Transporter OATP1 und OATP2 (Ballatori und Rebbecq, 1998; Li *et al.*, 2000).

Auch GSSG wird von Zellen exportiert. Während oxidativem Stress wurde die Freisetzung von GSSG für Erythrocyten (Srivastava und Beutler, 1969), für Hepatocyten (Eklöv *et al.*, 1981), für Astrocyten (Hirrlinger *et al.*, 2001, 2002d) und für verschiedene Gewebe beschrieben (Sies und Akerboom, 1984). Exportiert wird GSSG durch die Transporter Mrp1 und Mrp2 (Leier *et al.*, 1996; Paulusma *et al.*, 1999; Hirrlinger *et al.*, 2001, 2002d). Neben GSH und GSSG sind auch Glutathion-S-Konjugate Substrate verschiedener Mrp (Keppler *et al.*, 1998).

2.1.5 Extrazellulärer Metabolismus

Extrazelluläres GSH und Glutathionkonjugate sind Substrate der γ -Glutamyltranspeptidase (γ GT; siehe 2.2). Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von GSH und den Transfer der γ -Glutamyl-Einheit von GSH oder Glutathion-S-Konjugaten auf einen Aminosäureakzeptor und setzt dadurch das Dipeptid Cysteinylglycin bzw. Cysteinylglycinkonjugate frei (Tate und Meister, 1981; Meister und Tate, 1976; Commandeur *et al.*, 1995). Das Dipeptid Cysteinylglycin kann durch Ectopeptidasen zu Cystein und Glycin hydrolysiert werden (Tate, 1985), die dann nach Aufnahme in Zellen wieder der Synthese von GSH zur Verfügung stehen. In Astrogliazellen kann Cysteinylglycin aber auch über einen Peptidtransporter aufgenommen werden (Dringen *et al.*, 1997b, 1998a).

γ GT spielt eine wichtige Rolle beim Stoffwechsel (Entgiftung) von Xenobiotika und endogenen Substanzen, die durch eine Glutathion-S-Transferase an die Sulfhydrylgruppe des GSH konjugiert werden. Die dabei entstehenden Glutathion-S-Konjugate sind Substrate der γ GT (Wang und Ballatori, 1998), die den γ -Glutamylanteil abspaltet. Nach weiteren Modifizierungen, der Abspaltung des Cysteinrests und N-Acetylierung, können die Substanzen mit dem Urin ausgeschieden werden (Taniguchi und Ikeda, 1998). Dieser Stoffwechsel der Glutathion-S-Konjugate ist nicht nur für die Entgiftung von Xenobiotika relevant, sondern auch für den Stoffwechsel endogener Substanzen, wie z. B. die Umwandlung von Leukotrien C4 in Leukotrien D4 (Anderson *et al.*, 1982) und den Prostaglandinstoffwechsel (Cagen *et al.*, 1976).

In Gegenwart von RSS reagiert GSH mit Catecholaminen zu Cysteinylkonjugaten dieser Catecholamine (Spencer *et al.*, 1998), die dann durch extrazelluläre γ GT abge-

baut werden (Wang und Ballatori, 1998). Durch die Katalyse einer membranständigen Oxidase wird extrazelluläres GSH im Gehirn und anderen Geweben zu GSSG oxidiert (Tate und Orlando, 1979). Der Stoffwechsel von extrazellulärem GSSG ist bisher an Leber, renalen Tubuluszellen und Dünndarmmucosazellen der Ratte untersucht worden. In den untersuchten Zelltypen und Geweben wurde GSSG wie GSH durch γ GT gespalten und abgebaut (Hahn *et al.*, 1978; Grafström *et al.*, 1980).

2.2 γ Glutamyltranspeptidase

γ Glutamyltranspeptidase (γ GT) (EC 2.3.2.2) ist ein Schlüsselenzym im Glutathionmetabolismus und spielt eine zentrale Rolle beim Abbau von extrazellulärem GSH und bei der Bereitstellung von Substraten für die Synthese von GSH (Meister und Tate, 1976; Meister und Anderson, 1983). γ GT ist ein membrangebundenes Ectoenzym, das sowohl den Transfer der γ -Glutamyl-Einheit von GSH oder Glutathion-S-Konjugaten auf einen Aminosäureakzeptor als auch die Hydrolyse von GSH katalysiert (Tate und Meister, 1981; Meister und Tate, 1976). In Säugetieren findet man die höchste Aktivität der γ GT in der Niere. Weitere Gewebe, die γ GT-Aktivität aufweisen, sind u.a. Pankreas, Epididymis, Jejunum, Leber und Milz (Tate und Meister, 1981).

γ GT ist ein glycosyliertes Heterodimer, das über eine kurze, hydrophobe N-terminale Region in der Zellmembran verankert ist (Tate und Meister, 1976, 1985). Die Untereinheiten haben eine molekulare Masse von ungefähr 22 kDa (leichte Untereinheit) und, je nach Spezies, von 46 oder 65 kDa (schwere Untereinheit) (Tate und Meister, 1976). Die Bindungsstelle für den γ -Glutamylrest ist auf der leichten Untereinheit lokalisiert (Tate und Meister, 1981). Das Enzym wird als monomere nichtglycosylierte Polypeptidkette synthetisiert. Das Polypeptid wird noch während der Translation glycosyliert, in die Membran des endoplasmatischen Reticulums integriert (Nash und Tate, 1982, 1984) und autokatalytisch in die beiden Untereinheiten gespalten (Suzuki und Kumagai, 2002). Die ungespaltene Form der γ GT weist nur etwa 2 % der Aktivität des reifen heterodimeren Enzyms auf (Tate, 1986). Es wird angenommen, daß die Polypeptidkette schon während der Glycosylierung gespalten wird bevor das Enzym die Membranaußenseite erreicht (Tate und Meister, 1985).

Struktur und Organisation des Gens der γ GT sind vielfach untersucht worden. In Maus und Ratte wurde jeweils ein Gen nachgewiesen, dessen Transkription bei der Maus durch bis zu sechs Promoter reguliert wird, so daß bis zu sechs verschiedene mRNAs erzielt werden können (Rajagopalan *et al.*, 1993). In der Ratte sind bislang

vier Promoter identifiziert worden, die zu fünf verschiedenen mRNAs führen können (Okamoto *et al.*, 1994). Beim Menschen sind die Gene der γ GT auf dem Chromosom 22q11 lokalisiert (Figlewicz *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1997). Es gibt bis zu sieben humane Gene, aber nur eins codiert ein komplettes funktionelles Protein (Lieberman *et al.*, 1995; Chikhi *et al.*, 1999). Bei der Transkription des Gens durch mehrere Promoter entstehen verschiedene RNAs, die zu dem gleichen Protein führen. Es wird vermutet, daß dies eine Rolle in der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression der γ GT spielt (Lieberman *et al.*, 1995; Chikhi *et al.*, 1999; Visvikis *et al.*, 2001).

Die Aktivität der γ GT wird durch eine Vielzahl von Substanzen reguliert. Beeinflusst wird die Aktivität durch Effektoren wie Wachstumshormon (Brown-Borg *et al.*, 2004), Glucocorticoide (Stastný und Lisý, 1981), 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Garcion *et al.*, 1996, 1999), Thyroidhormon (Hemmings und Storey, 1999) und Retinsäure (Tsao und Batist, 1988). Ebenfalls erhöhend auf die Aktivität der γ GT wirken Lipopolysaccharide (LPS; Garcion *et al.*, 1999), Stickstoffmonoxid (NO; Gegg *et al.*, 2003) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α ; Ruedig und Dringen, 2004).

Die Bedeutung der γ GT für den GSH-Stoffwechsel wird in γ GT-defizienten Mäusen besonders deutlich. Das Ausschalten des Gens der γ GT führt bei Mäusen zu einem retardierten Wachstum und fehlender Geschlechtsreife. Die Tiere sterben im Alter von ca. 10 Wochen und entwickeln häufig Katarakte. Die GSH-Konzentrationen in Plasma und Urin sowie in verschiedenen Geweben sind erhöht (Lieberman *et al.*, 1996; Harding *et al.*, 1997), die Konzentration von Cyst(e)in im Plasma hingegen erniedrigt (Lieberman *et al.*, 1996). Glutathionurie und Glutathionämie treten auch bei Patienten mit einem Mangel an γ GT auf. Diese Patienten haben ebenfalls ein verlangsamtes Wachstum und sind geistig retardiert (Schulman *et al.*, 1975; Wright *et al.*, 1980; Hammond *et al.*, 1999; Iida *et al.*, 2005).

Inhibiert werden kann γ GT durch die γ -Glutamyl-Antagonisten 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucin und L-Azaserin (Inoue *et al.*, 1977; Tate und Meister, 1977). Weitaus effektiver und spezifischer wird die γ GT aber durch Acivicin inhibiert (Stole *et al.*, 1994). Dieser Inhibitor derivatisiert spezifisch den Threoninrest 523 und den Serinrest 405 der γ GT (Stole *et al.*, 1990, 1994) und inaktiviert damit das Enzym.

2.3 Glutathionstoffwechsel im Gehirn

2.3.1 Zelltypen des Gehirns

Das Gehirn des Menschen und der höheren Säugetiere ist ein sehr kompliziert aufgebautes Organ. Kleinere zelluläre Einheiten setzen sich zu größeren funktionellen Arealen zusammen, die ihrerseits übergeordnete Gehirnbereiche bilden. Damit verbunden ist eine Spezialisierung der Struktur, die bis in die geweblichen Feinstrukturen reicht. Die Anzahl von Verschaltungen zwischen Neuronen und die morphologischen und funktionellen Verknüpfungen der verschiedenen Zelltypen des Gehirns sind kaum zu überblicken. Neben den Neuronen, die für die Erregungsfortleitung, die Signalverarbeitung und die Informationsintegration verantwortlich sind, bilden die Gliazellen die zweite Säule der Funktionen des Gehirns (Somjen, 1988; Kettenmann und Ransom, 1995). Gliazellen lassen sich einteilen in Macroglia (Astrocyten, Oligodendrocyten und Ependymzellen) und Microglia. Die Eigenschaften von Zellen eines Zelltyps im Gehirn können sich dabei je nach Lokalisation und Aufgaben stark unterscheiden (Denis-Donini *et al.*, 1984; Prochiantz und Mallat, 1988; Raine, 1999).

Mit steigender Gehirnkomplexität und Phylogenie steigt auch die Anzahl der Astrocyten im Gehirn relativ zur Gesamtzellzahl und zur Anzahl der Neuronen. In weniger entwickelten Organismen überwiegt die Anzahl der Neuronen, im humanen Gehirn sind Astrocyten der am häufigsten vorkommende Zelltyp (Nedergaard *et al.*, 2003). Astrocyten formen ein dichtes Netzwerk aus Zellfortsätzen, die sich um andere Zellen herum legen, und bilden nicht nur einen morphologischen, sondern auch einen funktionellen Verband (Nedergaard *et al.*, 2003). Astrocyten spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Funktionen des Gehirns (Kirchhoff *et al.*, 2001). Sie unterstützen die neuronale Erregungsfortleitung, indem sie Neurotransmitter wie Glutamat und Ionen wie K^+ aufnehmen und so zur Beendigung der Neurotransmission und zur Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase beitragen (Swanson, 2005; Newman, 2005; Coles und Deitmer, 2005). Astrocyten sind aber auch bidirektionale Kommunikationspartner von Neuronen. Sie erhalten Signale von benachbarten Neuronen und können darauf durch Freisetzung neuroaktiver Substanzen reagieren. Als Folge einer erhöhten intrazellulären Calciumionenkonzentration können Astrocyten mit der Freisetzung von Glutamat und/oder Adenosintriphosphat (ATP) reagieren, die als Gliatransmitter präsynaptische oder postsynaptische Neuronen beeinflussen (Parpura *et al.*, 1994; Pasti *et al.*, 1997; Newman, 2005).

Neuronen sind die am meisten polymorphen Zellen des menschlichen Organismus.

Sie haben eine Vielzahl von Fortsätzen (Dendriten und Axone), die in der Regel den Großteil der Zelloberfläche ausmachen. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Bildung von Aktionspotentialen aus. Axone sind im Gegensatz zu Soma und Dendriten häufig myelinisiert, wodurch ihre Effizienz zur Reizweiterleitung erhöht ist (Raine, 1999; Thompson, 2000). Neuronen führen die Erregungsleitung, Verschaltung und Prozessierung von Information und die Steuerung willkürlicher und unwillkürlicher Bewegungen und Vorgänge aus. Die Zellen können durch mehrere Kriterien charakterisiert werden, z.B. durch den auf Zielzellen ausgeübten Effekt (inhibitorisch, exzitatorisch, sekretorisch), durch ihre Funktion (sensorisch, motorisch oder verschaltend), oder durch die verwendeten Neurotransmitter (Glutamat, Glycin, Dopamin usw.). Diese Einteilung berücksichtigt nicht, daß viele Neuronen auch mehrere Neurotransmitter verwenden können (Changeux, 1986; Hoekfelt *et al.*, 1986; Raine, 1999; Thompson, 2000). Die neuronale Zellpopulation ist bereits kurz nach der Geburt festgelegt. Reife Neuronen können sich nicht mehr teilen. Obwohl im menschlichen Gehirn pro Tag bis zu 20.000 Neuronen zugrunde gehen, die in den meisten Gehirnarealen nicht ersetzt werden können (Raine, 1999), werden die Funktionen des Gehirns dennoch in der Regel bis ins hohe Alter erfüllt. Nur in bestimmten Bereichen des adulten Gehirns werden aus neuralen Stammzellen Neuronen generiert (Lie *et al.*, 2004).

Microgliazellen repräsentieren im Gehirn bis zu 20 % der gesamten Zellpopulation (Streit, 2005). Sie wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben, genauer untersucht wurde dieser Zelltyp aber erst in den letzten 20 Jahren. Microgliazellen üben im Gehirn ähnliche Funktionen aus wie Macrophagen in der Peripherie. Sie teilen mit Macrophagen einige wesentliche biochemische, entwicklungsgeschichtliche und physiologische Merkmale. Microgliazellen sind aber im Gegensatz zu Macrophagen echte parenchymale Zellen, da sie außerhalb der Basalmembran der Blutkapillaren vorkommen (Streit, 2005). Sie zeigen ein ausgeprägtes Territorialverhalten, d.h. *in vivo* besteht zwischen zwei Microgliazellen immer ein gewisser Abstand. Microgliazellen können im adulten Gehirn in verschiedenen Zuständen vorliegen: als ruhende ramifizierte Zellen, als aktivierte reaktive Zellen und als runde phagozytierende Zellen (Streit, 2005). Microgliazellen sind an völlig unterschiedlichen Vorgängen im Gehirn beteiligt, z.B. an der Regulation der Proliferation von Astrocyten (Giulian und Baker, 1985) und an immunologischen Prozessen. Dabei wirken sie wie Macrophagen, als antigenpräsentierende Zellen und als Immuneffektorzellen bei lokalen entzündlichen Reaktionen des Gehirns (Giulian, 1987; Nelson *et al.*, 2002). Nach akuten Verletzungen des Gehirns haben Microglia eine zentrale Rolle bei der Regulation posttraumatischer Mechanismen, indem sie Cytokine und deren Rezeptoren exprimieren (Streit, 2005).

Oligodendrocyten bilden die Myelinschicht um Axone von Neuronen im Gehirn (Baumann und Pham-Dinh, 2001; Butt, 2005). Die Zusammensetzung des Myelins ist dabei einzigartig. Es ist sehr reich an Lipiden und zugleich arm an Wasser, so daß eine elektrische Isolierung der Axone gewährleistet wird (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Myelinhüllen sind die Verlängerungen der Plasmamembran von Oligodendrocyten, die um die Axone gewickelt sind. Die Zellen bilden dabei Myelinsegmente, zwischen denen die Ranvierschen Schnürringe liegen. Diese Anordnung ermöglicht eine saltatorische Erregungsleitung entlang der Axone, wodurch auch dünne, feine Nervenfasern Impulse sehr schnell weiterleiten können (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Eine Schädigung des Myelins spielt eine entscheidende Rolle bei pathologischen Prozessen wie der Multiplen Sklerose (MS). MS ist eine chronisch-entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Die Ursachen der Erkrankung sind bislang ungeklärt (Keegan und Noseworthy, 2002).

2.3.2 Glutathionstoffwechsel

Der Gehalt des Gehirns an GSH wird vermutlich größtenteils durch die Wiederverwendung der Bestandteile des GSH aufrecht erhalten (Dringen, 2000). Vorstufen von GSH können aber auch durch die Blut-Hirn-Schranke aus der Peripherie ins Gehirn transportiert werden. So gelangen Cystein und Glutamin über verschiedene Transportsysteme in das Gehirn (Wade und Brady, 1981; Xiang *et al.*, 2003). Es gibt aber auch Hinweise auf einen Transport von GSH aus der Peripherie in das Gehirn (Kannan *et al.*, 1992; Zlokovic *et al.*, 1994). Unklar aber ist, ob GSH intakt importiert wird (Dringen, 2000), oder ob die Aufnahme von GSH in das Gehirn vom Abbau des Moleküls durch γ GT an der luminalen Seite der Endothelzellen abhängt (Jain *et al.*, 1991). In welchem Umfang der Transport von GSH aus der Peripherie zur Aufrechterhaltung der GSH-Homöostase im Gehirn beiträgt ist noch unklar (Dringen, 2000).

Synthetisiert wird GSH im Gehirn auf gleichem Wege wie in anderen Geweben (Dringen, 2000). Die beiden beteiligten Enzyme GSH-Synthetase und γ Glutamylcysteinsynthetase wurden im Gehirn mit der höchsten spezifischen Aktivität im *choroidealen Plexus* nachgewiesen (Tate *et al.*, 1973; Okonkwo *et al.*, 1974). GSH liegt im Gehirn in Konzentrationen von 1 bis 3 mM vor (Cooper, 1997). Die Konzentration an GSH im Gehirn wird durch direkte Applikation von Synthesevorstufen (Pileblad und Magnusson, 1992) oder leichte γ -Strahlung (Kojima *et al.*, 1998) erhöht. Die Gabe von BSO verringert die GSH-Konzentration (Jain *et al.*, 1991; Wüllner *et al.*, 1999).

Astrogliazellen und Neuronen bevorzugen für die Synthese von GSH jeweils unter-

schiedliche extrazelluläre Substrate. Astrogliazellen synthetisieren GSH in Gegenwart von extrazellulärem Cystin und Glutamat bzw. Glutamin (Kranich *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2005), Neuronen dagegen bevorzugen extrazelluläres Cystein und Glutamin (Kranich *et al.*, 1996). Neuronen sind für ihre GSH-Synthese auf Cystein angewiesen und können extrazelluläres Cystin nicht als GSH-Vorstufe nutzen (Sagara *et al.*, 1993a,b; Kranich *et al.*, 1996). Cystein kann durch verschiedene unabhängige Transportsysteme in Neuronen aufgenommen werden (Sagara *et al.*, 1993b; Himi *et al.*, 2003). Im Extrazellulärraum des Gehirns wird jedoch Cystein schnell durch Sauerstoff zu Cystin oxidiert. Im Gegensatz zu Neuronen können Astrogliazellen extrazelluläres Cystin für die GSH-Synthese effizient nutzen (Kranich *et al.*, 1996, 1998). Astrogliazellen versorgen Neuronen mit Cystein für deren GSH-Synthese. Sie setzen GSH frei, aus dem durch die astrogliale γ GT (Dringen *et al.*, 1997a) das Dipeptid Cysteinylglycin entsteht, das von Neuronen zur GSH-Synthese verwendet werden kann (Abb. 1; Dringen *et al.*, 1999b). Cysteinylglycin wird dabei durch das neuronale Ecto-enzym Aminopeptidase N hydrolysiert (Dringen *et al.*, 2001) und die entstehenden Aminosäuren Cystein und Glycin können von Neuronen aufgenommen und für ihre GSH-Synthese verwendet werden (Abb. 1). Zusätzlich stellen Astrogliazellen durch Freisetzung von Glutamin (Hertz *et al.*, 1999) Neuronen auch die Vorstufe des dritten Bausteins (Glutamat) für die GSH-Synthese zur Verfügung (Dringen *et al.*, 2001).

Der Transport von Cystin durch die Plasmamembran ist von Bedeutung für die Synthese von GSH in neuronalen Zellen (Sagara *et al.*, 1993a,b; Kranich *et al.*, 1996, 1998). An der Translokation von Cystin durch die Membran können sowohl Na^+ -abhängige als auch Na^+ -unabhängige Prozesse beteiligt sein. In Anwesenheit von Na^+ wird Cystin mit Hilfe des hochaffinen Glutamattransporters X_{AG}^- in Zellen aufgenommen. Der Na^+ -unabhängige Transport wird durch einen elektroneutralen Cystin-Glutamat Austausch vermittelt (Bannai, 1984; McBean, 2002). Dieses Na^+ -unabhängige Transportsystem X_c^- (Makowske und Christensen, 1982) gehört einer Familie von disulfidverbundenen, heteromeren Aminosäuretransportern an, die aus einer schweren und einer leichten Untereinheit zusammengesetzt sind (Sato *et al.*, 1999, 2000). Die leichte Untereinheit, xCT genannt, besteht aus 502 Aminosäuren (Sato *et al.*, 1999). Die schwere Untereinheit des Systems X_c^- wurde als das Zelloberflächenantigen 4F2 identifiziert. Zwei mögliche Spleißvarianten der humanen xCT-Untereinheit, hxCTa und hxCTb, sind für humane U87-Gliomzellen beschrieben worden und unterscheiden sich in der C-terminalen Region. Beide Varianten kommen im Rückenmark, Gehirn und Pankreas vor (Kim *et al.*, 2001). Die Na^+ -unabhängige Cystin-Aufnahme wurde für fetale Gehirnzellen (Sagara *et al.*, 1993a), hippocampale Neuronen (Allen *et al.*, 2001),

sowie zu einem geringen Anteil für Synaptosomen (Flynn und McBean, 2000) und Astrogliazellen in Kultur (Bender *et al.*, 2000) beschrieben. Die xCT-Untereinheit wurde immunocytochemisch auf Astrocyten im Hippocampus, auf Müller-Zellen in der Retina und auf Bergmann-Gliazellen im Cerebellum nachgewiesen (Pow, 2001).

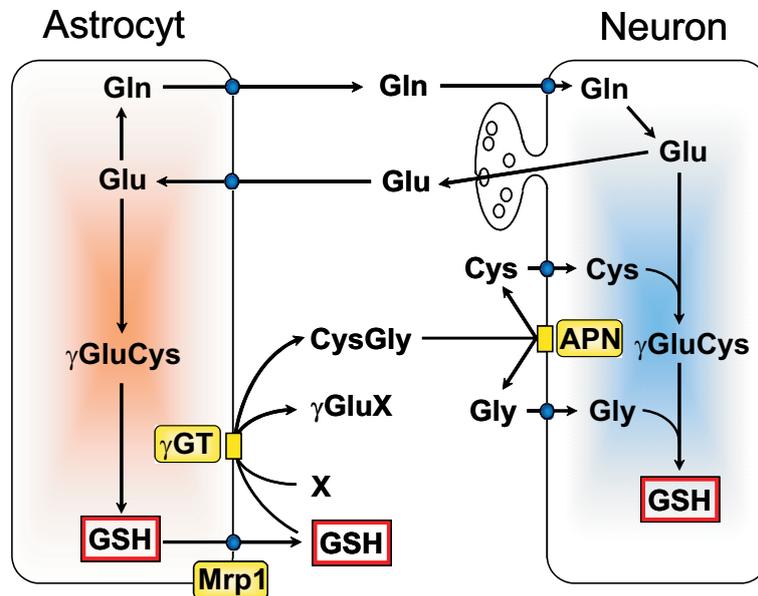


Abb. 1 Metabolische Kooperation zwischen Astrocyten und Neuronen im Glutathionstoffwechsel. Im oberen Teil der Abbildung ist der Glutamat-Glutamin-Zyklus dargestellt, der Neuronen mit Glutamat versorgt. Der untere Teil zeigt den Stoffwechselweg, über den Astrocyten Neuronen mit Cystein und Glycin versorgen. Dabei wird nach Abspaltung der γ -Glutamyl-Einheit des GSH durch die γ GT das entstehende Cysteinylglycin (CysGly) durch Aminopeptidase N (APN) weiter gespalten. Die Aminosäuren Cystein (Cys) und Glycin (Gly) können von Neuronen aufgenommen werden und zur Synthese von GSH genutzt werden. (Gln: Glutamin, Glu: Glutamat, γ GluCys: γ Glutamylcystein, Mrp1: *multidrug resistance protein 1*, X: Akzeptor der γ -Glutamyl-Einheit) (Abbildung modifiziert nach Dringen *et al.* (2001))

GSH erfüllt im Gehirn ebenso wie in der Peripherie antioxidative Aufgaben. Die spezifischen Aktivitäten der am GSH-Redoxzyklus beteiligten Enzyme GPx und GR sind allerdings im Gehirn niedriger als in anderen Geweben (Dringen, 2000). Die Lokalisation der Enzyme in den verschiedenen Zelltypen variiert zwischen Spezies (Damier *et al.*, 1993; Takizawa *et al.*, 1994; Knollema *et al.*, 1996; Trépanier *et al.*, 1996; Lindenau *et al.*, 1998). Verbraucht wird GSH in Gehirnzellen durch Konjugation an Substanzen, die so entgiftet werden. Von dem dafür verantwortlichen Enzym Glutathion-S-Transferase kommen verschiedene Isoformen in den verschiedenen Zelltypen des Gehirns vor (Tansey und Cammer, 1991; Johnson *et al.*, 1993; Philbert *et al.*, 1995).

Die Freisetzung von unkonjugiertem GSH aus Zellen wurde auch für neurale Zellen beschrieben. So konnte die Freisetzung von GSH an Hirnschnitten (Zängerle *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1999) und in Microdialysestudien (Yang *et al.*, 1994; Lada und Kennedy, 1997; Han *et al.*, 1999) gezeigt werden und GSH in der cerebrospinalen Flüssigkeit nachgewiesen werden (Anderson *et al.*, 1989; Do *et al.*, 2000). Auch Astrogliazellen in Kultur setzen GSH (Yudkoff *et al.*, 1990; Sagara *et al.*, 1996; Dringen *et al.*, 1997a; Hirrlinger *et al.*, 2002c) und GSSG frei (Hirrlinger *et al.*, 2001, 2002d). Obwohl in Astrogliakulturen verschiedene Mrp exprimiert werden (Declèves *et al.*, 2000; Hirrlinger *et al.*, 2001, 2002a), wird GSH aus Astrogliazellen überwiegend durch Mrp1 exportiert (Hirrlinger *et al.*, 2002c). In anderen Gehirnzelltypen wurde zwar das Vorkommen der Mrp1-mRNA gezeigt, jedoch kein Export von GSH (Hirrlinger *et al.*, 2002a). Im humanen Gehirn konnten durch Immunfluoreszenz die GSH-transportierenden MRP1 und MRP4 nachgewiesen werden (Nies *et al.*, 2004). Für den Export von GSSG aus Zellen können Mrp1 und Mrp2 verantwortlich sein (Leier *et al.*, 1996; Paulusma *et al.*, 1999). Von diesen Transportern wird in kultivierten Astrogliazellen lediglich Mrp1 exprimiert (Hirrlinger *et al.*, 2001, 2002a). Da der Export von GSSG durch den Mrp1-Inhibitor MK571 gehemmt wird (Hirrlinger *et al.*, 2001), ist Mrp1 auch für den Export von GSSG aus Astrogliazellen verantwortlich.

Extrazelluläres GSH hat im Gehirn wahrscheinlich mehrere Funktionen. Diskutiert wird die Funktion als Neurohormon, die Detoxifikation von Glutamat, die Modulation von Glutamatrezeptoren und, durch die Rolle im Leukotrienmetabolismus, eine Beteiligung an lokalen hormonalen Signalprozessen (Dringen, 2000; Dringen und Hirrlinger, 2003). Als Funktionen von extrazellulärem GSSG werden die Modulation von Glutamatrezeptoren oder eine Rolle im Schlafrhythmus vorgeschlagen (Dringen, 2000; Dringen und Hirrlinger, 2003).

Metabolisiert wird extrazelluläres GSH auch im Gehirn durch γ GT. Im Gehirn findet man eine hohe Aktivität der γ GT in Kapillaren (Orlowski *et al.*, 1974). Dabei werden sowohl Endothelzellen als auch Pericyten mit Antikörpern gegen γ GT angefärbt (Ghandour *et al.*, 1980; Frey *et al.*, 1991). Ebenfalls γ GT-positiv sind Gliazellen und Ependymzellen, Neuronen dagegen zeigen kaum γ GT-Immunreaktivität (Shine und Haber, 1981; Philbert *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997). *In vitro* ist die Aktivität der γ GT für APK nachgewiesen worden (Dringen *et al.*, 1997a; Garcion *et al.*, 1999; Gegg *et al.*, 2003; Ruedig und Dringen, 2004). Im Gegensatz dazu wurde in Kulturen anderer Zelltypen allenfalls eine geringe Aktivität der γ GT gemessen (Ruedig und Dringen, 2004).

2.3.3 Glutathion, oxidativer Streß und neurologische Erkrankungen

Während des normalen Stoffwechsels entstehen RSS. Dazu gehören unter anderem Superoxid, H_2O_2 , Alkylhydroperoxide, Singulett-Sauerstoff, Hydroxylradikale, NO und Peroxynitrit (Halliwell, 1992). Es gibt eine Reihe von Mechanismen zur Entgiftung dieser Verbindungen. Durch eine Verschiebung des Fließgleichgewichts von Bildung und Entgiftung von RSS in Richtung einer erhöhten Konzentration von RSS entsteht oxidativer Streß. Dessen Ursache ist vermehrte Bildung und/oder verminderte Entgiftung von RSS. Die Folge von oxidativem Streß ist die Schädigung der Zellen, z.B. durch DNA-Strangbrüche, Proteinmodifikationen und Lipidperoxidation (Halliwell und Gutteridge, 1999; Halliwell, 2001). Antioxidative Mechanismen basieren zum einen auf der Beseitigung der RSS. So wird z.B. H_2O_2 durch Catalase und GPx oder Superoxid durch Superoxiddismutasen (SOD) beseitigt. Zum anderen basieren antioxidative Mechanismen darauf die Entstehung von RSS zu verhindern. So wird das Hydroxylradikal unschädlich gemacht, indem die Edukte für die Fenton-Reaktion und die Haber-Weiss-Reaktion (H_2O_2 , Superoxid und Eisenionen als Katalysator) beseitigt werden (Halliwell, 1992).

Die meisten RSS werden im oxidativen Stoffwechsel durch die mitochondrialen Atmungskette freigesetzt (Halliwell, 1992, 2001). Dort entsteht Superoxid als Nebenprodukt einer Einelektronen-Reduktion des Sauerstoffs. Superoxid wird durch SOD zu H_2O_2 und O_2 disproportioniert. Das entstehende H_2O_2 kann durch Catalase zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert oder durch GPx zu Wasser reduziert werden (Halliwell, 1992; Dringen *et al.*, 2005).

Von allen Organen scheint das Gehirn im Hinblick auf oxidativen Streß in mehrfacher Hinsicht besonders gefährdet zu sein. Die Zellen des Gehirns verbrauchen 20 % des vom Körper aufgenommenen Sauerstoffs (Clarke und Sokoloff, 1999) und der Eisengehalt ist in einigen Gehirnbereichen recht hoch (Gerlach *et al.*, 1994; Lan und Jiang, 1997). Das Gehirn ist zudem reich an Lipiden mit mehrfach ungesättigten Fettsäureketten, die leicht zu Lipidperoxiden oxidiert werden (Porter, 1984; Halliwell, 1992). Die spezifischen Aktivitäten von SOD, Catalase und GPx sind niedriger als in anderen Geweben (Cooper, 1997; Ho *et al.*, 1997). Weil geschädigte und abgestorbene Neuronen bis auf wenige Ausnahmen nicht durch neue Neuronen ersetzt werden können, ist die Entgiftung von RSS und das Verhindern oxidativer Schädigung für das Gehirn von großer Bedeutung.

Oxidativer Streß spielt eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen wie dem

Altern (Halliwell, 2001; Barja, 2004; Junqueira *et al.*, 2004; Poon *et al.*, 2004) oder bei der Pathogenese einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Idiopathischen Parkinsonsyndrom (IPS), der Alzheimerschen Krankheit oder der Amyotrophen Lateralsklerose (Jenner, 2003; Andersen, 2004; Emerit *et al.*, 2004). Dabei werden unterschiedliche Mechanismen als Ursache angesehen. Neben der Mutation wichtiger Enzyme (Morrison und Morrison, 1999) werden in diesem Zusammenhang proteasomale Dysfunktionen diskutiert. Die Fehlfunktion des Proteasoms kann durch oxidativen Streß ausgelöst werden und zur Aggregation oxidativ modifizierter Proteine führen (Halliwell, 2002; Grune *et al.*, 2004; Hyun *et al.*, 2004). Als Ursachen für oxidativen Streß bei neurodegenerativen Erkrankungen werden Störungen der Eisenhomöostase diskutiert (Todorich und Connor, 2004; Zecca *et al.*, 2004). Ebenso führen Inhibition oder Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette zu erhöhter Produktion von RSS (Yakes und van Houten, 1997). Bei der Alzheimerschen Erkrankung und bei HIV-Infektionen scheint auch eine irrtümliche Aktivierung von Microglia an der verstärkten Bildung von RSS beteiligt zu sein (Meda *et al.*, 1995; Bissel und Wiley, 2004; Verani *et al.*, 2005).

Beim IPS wird der Zusammenhang zwischen oxidativem Streß und Neurodegeneration besonders intensiv diskutiert. Charakteristisch für das IPS ist eine progressive Degeneration dopaminerger Neuronen in der *substantia nigra pars compacta*. Die Etiologie der Krankheit ist noch unbekannt. Es gibt aber durch Analysen von *post mortem*-Gewebe starke Hinweise auf oxidativen Streß in der *substantia nigra* während der Progression der Erkrankung (Jenner, 2003). Nachgewiesen wurden gesteigerte Lipidperoxidation (Jenner *et al.*, 1992; Dexter *et al.*, 1994) und erhöhter Eisengehalt in der *substantia nigra* (Youdim und Riederer, 1993; Gerlach *et al.*, 1994; Jenner, 2003). Gleichzeitig liegt bei der Pathogenese des IPS eine Störung des Glutathionstoffwechsels vor. In der *substantia nigra* von IPS-Patienten ist der Gehalt an GSH im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen um 40 bis 50 % verringert (Sofic *et al.*, 1992; Sian *et al.*, 1994a; Pearce *et al.*, 1997). Der verringerte Gehalt an GSH ist möglicherweise ein erster Hinweis darauf, daß oxidativer Streß an der Erkrankung beteiligt ist (Nakamura *et al.*, 1997), da bereits bei Patienten mit einer präsymptomatischen Form (*Incidental Lewy Body Disease*) des IPS in der *substantia nigra* ein verringerter GSH-Gehalt festgestellt wurde (Dexter *et al.*, 1994). Der Ursprung des oxidativen Streß liegt bei neurodegenerativen Erkrankungen wie IPS möglicherweise in Gliazellen und nicht in Neuronen, da Veränderungen in glialen Funktionen als Ursachen für die Pathogenese und Progression dieser Erkrankungen diskutiert werden (Jenner und Olanow, 1998; Vila *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Heales *et al.*, 2004). Gliazellen in der Nachbarschaft

dopaminergem Neuronen könnten durch die Freisetzung von Verbindungen wie NO oder Cytokinen an der Schädigung dieser Neuronen beteiligt sein (Hirsch *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2001). Da der Verlust von GSH in der *substantia nigra* von IPS-Patienten nicht nur auf den Verlust der dopaminergen Neuronen zurückgeführt werden kann, wurde vermutet, daß auch Gliazellen in der *substantia nigra* einen verringerten Gehalt an GSH beim IPS aufweisen (Jenner und Olanow, 1998). Die dadurch gegenüber RSS weniger geschützten Gliazellen würden oxidativen Stress erleiden. Unklar ist aber, ob die Abnahme des GSH-Gehaltes in der *substantia nigra* von IPS-Patienten auf unzureichende GSH-Synthese oder auf erhöhten, nicht kompensierten Verbrauch von GSH zurückzuführen ist (Jenner, 2003).

In diesem Zusammenhang ist der Verbrauch von GSH durch Reaktion mit Dopamin interessant. In einer superoxidabhängigen Reaktion von GSH mit Dopamin entsteht 5-S-Glutathionyl-Dopamin (Spencer *et al.*, 1995; Hirrlinger *et al.*, 2002d), das Substrat der γ GT ist (Wang und Ballatori, 1998). Das durch die Katalyse der γ GT entstehende 5-Cysteinyl-Dopamin wurde in der *substantia nigra* von IPS-Patienten in erhöhten Konzentrationen gefunden (Spencer *et al.*, 1998). Cysteinylkonjugate von Catecholaminen und ihre Derivate sind als neurotoxisch eingestuft worden (Zhang *et al.*, 2000; Spencer *et al.*, 2002). Somit könnte dieser Stoffwechsel am Untergang dopaminergem Neuronen beteiligt sein.

Die Bedeutung der γ GT im neuronalen Stoffwechsel von GSH im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen wird durch eine Reihe von Befunden deutlich. Beispielsweise wurden erhöhte Aktivitäten der γ GT in der *substantia nigra* von IPS-Patienten gefunden (Sian *et al.*, 1994b). Auch bei der Huntingtonschen Erkrankung ist im Gehirn von Ratten und Menschen die Aktivität des Enzyms erhöht (Butterworth *et al.*, 1985; Zhu *et al.*, 1990). Ebenso ist nach einem ischämischen Infarkt des Gehirns die γ GT-Aktivität im humanen Serum gesteigert (D’Erasmus *et al.*, 1993).

2.4 Tumor-Nekrose-Faktor α und seine Rezeptoren

Die Wirkung von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) bei der antitumoralen Immunantwort wurde bereits vor etwa 100 Jahren von William B. Coley entdeckt (Wajant *et al.*, 2003). Benannt als TNF α wurde das dafür verantwortliche lösliche Cytokin aber erst 1975 von Carswell *et al.* (1975). TNF α wird zunächst als transmembranes Protein vom Typ II (Kriegler *et al.*, 1988) als stabiles Homotrimer produziert (Tang *et al.*, 1996). Von dieser membranintegrierten Form wird der lösliche TNF α durch

eine Metalloprotease (TACE; TNF α *converting enzyme*) abgespalten (Gearing *et al.*, 1994; Black *et al.*, 1997). Das lösliche Cytokin ist ebenfalls ein Homotrimer (Wingfield *et al.*, 1987) und hat eine molekulare Masse von 52 kDa, das Monomer eine von 17 kDa (Pennica *et al.*, 1984, 1985; Aggarwal *et al.*, 1985; Shirai *et al.*, 1985; Arakawa und Yphantis, 1987).

TNF α wird von einer Reihe von Zellen synthetisiert, z.B. von Monocyten/Macrophagen, Lymphocyten und Kupfferschen Zellen (Tracey *et al.*, 1989). Im gesunden, unversehrten Gehirn wird TNF α in geringen Konzentrationen hauptsächlich von Neuronen synthetisiert (Gendron *et al.*, 1991; Breder *et al.*, 1993; Gahring *et al.*, 1996). Bei Schädigung des Gehirns sind aktivierte Astrocyten und Microglia die Hauptquelle von TNF α (Chung und Benveniste, 1990; Renno *et al.*, 1995; Schlomann *et al.*, 2000). Auch *in vitro* wird TNF α von stimulierten Astroglia- und Microgliazellen synthetisiert (Sawada *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1993; Benveniste *et al.*, 1995; Chao *et al.*, 1995).

TNF α ist an einer Vielzahl von biologischen Reaktionen beteiligt und hat unterschiedliche Effekte auf verschiedene Zelltypen. Durch die Stimulation von Lipolyse und Glycogenolyse kann TNF α Cachexie verursachen und spielt eine Rolle in der Pathogenese von endotoxischen und septischen Schocks, Entzündungsreaktionen und Infektionen (Camussi *et al.*, 1991; Wajant *et al.*, 2003). Aber TNF α kann auch als Wachstumsfaktor Zellwachstum stimulieren und ist über die Aktivierung von Macrophagen in die Immunabwehr eingebunden (Camussi *et al.*, 1991; Wajant *et al.*, 2003). Auch im Gehirn hat TNF α nicht nur cytotoxische Effekte, sondern ist an der Funktion und Entwicklung des Gehirns beteiligt. So induziert TNF α die Proliferation von Astrocyten (Barna *et al.*, 1990; Selmaj *et al.*, 1990). Außerdem fördert TNF α die Differenzierung unreifer Neuroblastomzellen zu einem neuronalen Phänotyp (Muñoz-Fernández *et al.*, 1991, 1994; Obregón *et al.*, 1997). Mäuse, die keine TNF α -Rezeptoren exprimieren, sind einerseits anfälliger für neuronale Schäden (Rothwell und Luheshi, 1996), andererseits aber auch geschützt gegen dopaminerge Neurotoxizität (Sriram *et al.*, 2002). Ebenso ist bei TNF α -defizienten Mäusen die neurotoxische Wirkung von MPTP abgeschwächt (Ferber *et al.*, 2004). In hohen Konzentrationen wirkt TNF α neurotoxisch (Araujo, 1992) und schädigend auf Oligodendrocyten (Robbins *et al.*, 1987; Selmaj und Raine, 1988). Ferner hat TNF α proinflammatorische Eigenschaften und induziert die Produktion anderer Cytokine, die eigene Synthese und die Freisetzung neuroaktiver Substanzen wie Glutamat, NO und Arachidonsäure (Muñoz-Fernández und Fresno, 1998).

Seine Wirkungen übt TNF α über die Regulation der Expression einer Vielzahl von Genen aus. Nach Applikation von TNF α werden beispielsweise Collagenase, Ferritin,

Mn-SOD, Hitzeschockproteine sowie c-fos und c-jun vermehrt exprimiert (Camussi *et al.*, 1991; Wajant *et al.*, 2003). In Astrogliazellen werden durch die Wirkung von TNF α u.a. Phospholipase A₂ (Oka und Arita, 1991), Transferrin (Oh *et al.*, 1993), induzierbare NO-Synthase (iNOS, Da Silva *et al.*, 1997) und der TNF-Rezeptor 2 (Lung *et al.*, 2001) vermehrt exprimiert.

Die Mitglieder der Familie der TNF-Liganden üben ihre biologischen Funktionen über Membranrezeptoren, die TNF-Rezeptoren (TNF-R), aus. Der membranintegrierte und lösliche TNF α wird von zwei Rezeptoren der Familie, TNF-R1 (TNF-Rezeptor Typ 1, CD120a, p55/60) und TNF-R2 (TNF-Rezeptor Typ 2, CD120b, p75/80) gebunden (Wajant *et al.*, 2003). Die humanen und murinen Rezeptoren wurden vor etwa 15 Jahren kloniert (Loetscher *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990; Goodwin *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1991) und sind auf einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert (Lewis *et al.*, 1991; Vandenabeele *et al.*, 2002; Wajant *et al.*, 2003). In den meisten Geweben, wie auch dem Gehirn, wird konstitutiv TNF-R1 synthetisiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von TNF-R2 stark reguliert und typischerweise auf Zellen des Immunsystems, z.B. Microglia, beschränkt (Bette *et al.*, 2003; Wajant *et al.*, 2003). In Kultur exprimieren auch Astrogliazellen konstitutiv TNF-R1 (Tada *et al.*, 1994; Aranguéz *et al.*, 1995; Dopp *et al.*, 1997; Lung *et al.*, 2001). TNF-R2 wird dagegen erst nach Induktion durch Cytokine gebildet (Lung *et al.*, 2001).

Die intrazellulären Domänen der beiden Rezeptortypen haben keine enzymatischen Aktivitäten. TNF-R1 enthält eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die sogenannte *death domain* (DD). Diese DD rekrutiert weitere DD-enthaltende Proteine und kann so die Rezeptoren an die Aktivierung von Caspasen und an die Apoptose koppeln. Der TNF-R1 aktiviert die Expression von Genen über indirekte Rekrutierung TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktoren (TRAF). TNF-R2 dagegen interagiert direkt mit TRAF2, induziert Genexpression oder interagiert mit TNF-R1 (Wajant *et al.*, 2003; Vandenabeele *et al.*, 2002; Hehlhans und Mannel, 2002). Auch die proinflammatorische Wirkung von TNF α wird durch TNF-R2 vermittelt (Akassoglou *et al.*, 2003). TNF-R aktivieren Transkriptionsfaktoren wie das *activator protein 1* (AP-1) oder NF κ B (Lee *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2003) über die Signalkaskaden von *mitogen activated protein* (MAP)-Kinasen (Chen und Goeddel, 2002; Wajant *et al.*, 2003). Der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert die Expression verschiedener Gene, z.B. der Collagenase (Brenner *et al.*, 1989). Auch im Promoter der γ GT ist eine Bindungsstelle für AP-1 nachgewiesen worden (Visvikis *et al.*, 2001).

TNF α ist mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden. In Gehirnen von IPS-Patienten wurden erhöhte TNF α -Konzentrationen und erhöhte

Immunreaktivität gegen $\text{TNF}\alpha$ festgestellt (Boka *et al.*, 1994; Mogi *et al.*, 1994). Auch im Gehirn und Plasma von Alzheimer-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen an $\text{TNF}\alpha$ gefunden (Fillit *et al.*, 1991; Bruunsgaard *et al.*, 1999; Tarkowski *et al.*, 1999). *In vitro* konnte $\text{TNF}\alpha$ in Microgliazellen und Macrophagen durch das $\text{A}\beta$ -Protein induziert werden (Klegeris *et al.*, 1997; Galimberti *et al.*, 1999; Combs *et al.*, 2001; Yates *et al.*, 2000). Die Studien zum Zusammenhang zwischen $\text{TNF}\alpha$ und Multipler Sklerose sind widersprüchlich. So wird $\text{TNF}\alpha$ zum einen ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben, zum anderen wird aber auch von einer demyelinisierenden Wirkung auf Oligodendrocyten berichtet (Muñoz-Fernández und Fresno, 1998). Erhöhte Immunreaktivität gegen beide $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren wurde im Gehirn von AIDS-Patienten, IPS-Patienten, MS-Patienten und Patienten mit chronischem Hirnödem oder Strahlungsnekrosen gefunden (Boka *et al.*, 1994; Sippy *et al.*, 1995; Mogi *et al.*, 2000).

Es wird vermutet, daß Cytokine glialer Herkunft wie $\text{TNF}\alpha$ an der Pathogenese des IPS direkt oder indirekt über NO-vermittelte Mechanismen beteiligt sind (Hirsch *et al.*, 2003). NO wird aus L-Arginin durch das NADPH-abhängige Enzym NO-Synthase (NOS) synthetisiert. Von NOS existieren drei Isoformen, zwei werden konstitutiv exprimiert, die dritte, iNOS, ist induzierbar. Induziert wird iNOS durch LPS und Cytokine über die Aktivierung des Gens der iNOS und *de novo*-Synthese des Proteins (Knowles und Moncada, 1994; Wiesinger, 2001; Kleinert *et al.*, 2003). NO ist eine sehr reaktive Substanz, die eine Rolle bei der Pathogenese einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen spielt (Muñoz-Fernández und Fresno, 1998; Wiesinger, 2001; Togo *et al.*, 2004). NO und NO-Derivate wie Peroxynitrit und S-Nitrosothiole hemmen den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Brown und Borutaite, 2004). Hemmung des Komplex I ist ein Symptom des IPS (Jenner, 2003), da in der *substantia nigra* von IPS-Patienten eine verringerte Aktivität dieses Komplexes nachgewiesen wurde (Mizuno *et al.*, 1989; Schapira *et al.*, 1990). iNOS wird im Gehirn und in kultivierten Gehirnzellen durch Cytokine wie Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$), $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β und durch LPS induziert (Da Silva *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 2000; Simmons und Murphy, 1992).

2.5 Genterapie und adenoviraler Gentransfer

Humane Genterapie ist eine Methode zur Behandlung neurologischer Erkrankungen, für die es keine klassische Pharmakotherapie gibt (Barkats *et al.*, 1998). Wegen der Blut-Hirn-Schranke ist das zentrale Nervensystem nur schwer für systemisch applizierte therapeutische Makromoleküle, wie Wachstumsfaktoren, Cytokine oder Enzy-

me, erreichbar (Barkats *et al.*, 1998). Diese Moleküle müssen direkt *in situ* injiziert werden, um das Gehirngewebe zu erreichen. Die kurze Halbwertszeit dieser Moleküle erfordert aber wiederholte Injektionen oder Infusionen und erhöht damit das Risiko von Infektionen. Daher ist die Gentherapie eine zukunftsweisende Therapiemethode (Barkats *et al.*, 1998). Vielversprechende Substanzen für die Gentherapie im Nervensystem sind neurotrophische Faktoren oder antioxidative Enzyme, wie SOD, Catalase und GPx (Olanow, 1993; Barkats *et al.*, 1998). Bei der Therapie von IPS durch Gentransfer werden eine Reihe von Strategien verfolgt, darunter die Behandlung mit neurotrophen Faktoren, die Verhinderung von Apoptose oder die Modulation der Expression von Neurotransmittern (Eberhardt und Schulz, 2004). Bei der Gentherapie sind prinzipiell zwei Strategien möglich: Gene können einerseits direkt durch Injektion eines Genvektorsystems (*in vivo*-Gentransfer) oder indirekt durch Implantation genetisch modifizierter Zellen in das Gehirn (*ex vivo*-Gentransfer) transferiert werden (Barkats *et al.*, 1998). Für beide Strategien (*in vivo* und *ex vivo*) sind modifizierte Viren als biologische Vektorsysteme sehr effiziente Werkzeuge, da Viren ihr eigenes Genom in die Zellen transferieren, die sie infiziert haben. Bevorzugt werden drei Typen von Viren genutzt: Retroviren, Adenoviren und adenoassoziierte Viren (Barkats *et al.*, 1998; Eberhardt und Schulz, 2004). Durch adenoviralen Gentransfer in Kultur können bei Körnerzellen des Kleinhirns und bei Neuroblastomzellen Transfektionsraten zwischen 70 und 100 % erreicht werden (Le Gal La Salle *et al.*, 1993; Simons *et al.*, 1999; von Coelln *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2001). Von primären Neuronenkulturen des Mesencephalons werden Transfektionsraten von 10 bis 20 % berichtet (von Coelln *et al.*, 2001). In APK konnten zwei Drittel der Zellen adenoviral transfiziert werden (Le Gal La Salle *et al.*, 1993)

In der Regel sind nichtvirale Gentransfermethoden bei primären neuronalen Zellen weniger effizient als bei proliferierenden Zellen. Durch liposomalen Gentransfer in Neuronen können Transfektionsraten zwischen 4 und 30 % erreicht werden (Kofler *et al.*, 1998; Ohki *et al.*, 2001; da Cruz *et al.*, 2004). Erst neuere Arbeiten beschreiben höhere Transfektionsraten für solche Methoden. So werden seit einiger Zeit auch durch Elektroporation hohe Transfektionsraten (bis zu 80 %) in kultivierten Neuronen erzielt (Dityateva *et al.*, 2003). Diese Techniken eignen sich für die *ex vivo*-Strategie.

Adenoviren sind DNA-Viren, die lineare doppelsträngige DNA von etwa 35 kb enthalten (Volpers und Kochanek, 2004). Adenoviren können in 49 Serotypen unterteilt werden, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Hämagglutination von Erythrocyten weiter in die Untergruppen A bis F eingeteilt werden (Walther und Stein, 2000; Volpers und Kochanek, 2004). Die am intensivsten untersuchten Typen sind Typ 2 (Ad2) und

Typ 5 (Ad5), die der Untergruppe C angehören. Diese Virustypen wurden zur Herstellung der ersten viralen Vektoren zum Gentransfer genutzt, weil diese Typen nicht mit schweren Krankheiten bei Menschen assoziiert sind (Walther und Stein, 2000; Volpers und Kochanek, 2004). Sie sind daher auch für *in vivo*-Applikationen geeignet. Erste Modifikation des adenoviralen Genoms war die Deletion des *early gene 1* (E1A), um replikationsinkompetente Vektoren und genügend Platz für Geninsertionen zu erhalten. Das E1A-Gen ist für die Replikation des Virus essentiell (Walther und Stein, 2000; Imperiale und Kochanek, 2004). Weitere partielle Deletionen wurden an den Genen E1B und E3 vorgenommen. Die DNA des Transgens wird in die E1- und E3-Regionen des Virusgenoms eingefügt. Die Aufnahmekapazität dieser Vektoren der ersten Generation ist ca. 7-8 kb (Walther und Stein, 2000; Imperiale und Kochanek, 2004; Volpers und Kochanek, 2004). Für die Erzeugung infektiöser Viruspartikel werden Helferzellen benötigt, die die Fähigkeit zur Verpackung der DNA haben. Dafür wird die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK) 293 genutzt, in deren Genom das E1A-Gen eingefügt wurde. Dadurch sind hohe Virustiter erreichbar (Imperiale und Kochanek, 2004; Volpers und Kochanek, 2004).

Adenovirale Vektoren infizieren ein breites Spektrum von Zellen, unter anderem auch postmitotische Zellen wie Neuronen (Le Gal La Salle *et al.*, 1993; Simons *et al.*, 1999; Walther und Stein, 2000). Der Nachteil adenoviraler Vektoren ist, daß das virale Genom nicht in das Wirtsgenom integriert wird und die Expression therapeutischer Gene daher nur transient ist (Walther und Stein, 2000). Da die Expression des viralen E2-Proteins Entzündungsreaktionen auslöst (Imperiale und Kochanek, 2004), wurde eine zweite Generation von Vektoren entwickelt, in denen die Funktion des E2A-Gens ausgeschaltet ist und deren E4-Gen modifiziert oder deletiert ist (Walther und Stein, 2000; Imperiale und Kochanek, 2004; Volpers und Kochanek, 2004). Diese Vektoren benötigen Helferzellen, die die Funktionen des E4-Gens (Regulation der Transkription, Übergang von früher zu später Genexpression, Transport der mRNA, Replikation der viralen DNA, Ausschalten der Expression der Gene des Wirtsorganismus und Zusammenbau des Virions) zur Verfügung stellen (Walther und Stein, 2000). Neuartige Vektoren, aus denen die meisten viralen codierenden Regionen entfernt wurden, sind noch weniger immunogen (Walther und Stein, 2000). Sie können bis zu 36 kb Fremd-DNA aufnehmen. Der Nachteil dieser Vektoren ist, daß sie nur schwer von Helferviren separiert werden können (Walther und Stein, 2000; Imperiale und Kochanek, 2004; Volpers und Kochanek, 2004).

Erste Versuche mit adenoviralen Vektoren *in vivo* und *in vitro* an Nervenzellen von Nagern zeigten eine bemerkenswerte Effizienz der Vektoren, fremdes genetisches

Material in Zellen zu transferieren (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). Die intrazelluläre Expression der Markierungsgene war über zwei Monate detektierbar. Diese Ergebnisse *in vivo* wurden von weiteren Gruppen bestätigt (Davidson *et al.*, 1993; Bajocchi *et al.*, 1993; Akli *et al.*, 1993).

In vivo ist eine Verteilung der Viruspartikel über die Injektion der Viren in Hirnventrikel, cerebrospinale Flüssigkeit oder die *Arteria Carotis* oder über nasale Instillation möglich (Bajocchi *et al.*, 1993; Doran *et al.*, 1995; Draghia *et al.*, 1995; Ooboshi *et al.*, 1995). Adenovirale Vektoren können auf eine retrograde Weise von der Injektionsstelle zu den Zellkörpern transportiert werden (Akli *et al.*, 1993; Ridoux *et al.*, 1994a). Dieser retrograde axonale Transport ist besonders interessant für die Gentherapie tödlicher neurodegenerativer Erkrankungen der Motoneuronen, wie der Amyotrophen Lateralsklerose (Barkats *et al.*, 1998).

Adenovirale Vektoren sind auch geeignete Vektoren für einen *ex vivo*-Gentransfer, wie Ridoux *et al.* (1994b) an Rattenastrocyten zeigten. Das Transgen wurde dabei über wenigstens fünf Monate exprimiert. Ähnliche Strategien sind für humane neurale Vorläuferzellen aus 5 bis 12 Wochen alten Feten entwickelt worden (Buc-Caron, 1995; Sabaté *et al.*, 1995). Die Amplifizierung dieser neuronalen Vorläuferzellen ist eine Möglichkeit die ethischen Konflikte zu minimieren, die bei klinischer Anwendung aufgrund des Bedarfs an humanem fetalem Gewebe entstehen.

2.6 Aufgabenstellung

Gegenstand der Untersuchungen in vorliegender Arbeit war der extrazelluläre GSH-Metabolismus. Dabei sollte zum einen in neuronalen Zellen das Vorkommen und die spezifische Aktivität des GSH-abbauenden Enzyms γ GT sowie die Modulation der spezifischen Aktivität der γ GT durch verschiedene Substanzen untersucht werden. Durch adenoviralen Gentransfer der γ GT in Neuronen sollte dieses Protein überexprimiert werden und die Auswirkungen auf den GSH-Metabolismus untersucht werden. Neben dem GSH-Stoffwechsel sollte auch der extrazelluläre GSSG-Stoffwechsel und eine Beteiligung der γ GT am Abbau von GSSG durch neurale Zellen untersucht werden.

3 Ergebnisse

Die Abbildungen und Tabellen der vorliegenden Arbeit zeigen entweder Daten repräsentativer Experimente, die in Dreifachbestimmungen an einer Kultur durchgeführt wurden, oder sie fassen Daten aus Experimenten an mehreren Kulturen zusammen. Wurden Daten aus mehreren Experimenten zusammengefaßt, ist die Anzahl der Experimente (n) angegeben. In den Diagrammen repräsentieren, wenn nicht anders angegeben, die Symbole den Mittelwert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (SD) an. Fehlerbalken wurden nicht eingezeichnet, wenn sie kleiner waren als die Symbole, die den Mittelwert angeben. Statistische Vergleiche zweier Datensätze wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit dem ungepaarten Student's t-Test, der Vergleich mehrerer Datensätze wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA gefolgt von dem Bonferroni post-Test) durchgeführt. War der Bonferroni post-Test zu konservativ, wurde der Tuckey-Kramer post-Test angewendet. Der Welch-korrigierte t-Test wurde verwendet, wenn die SD der Werte zu verschieden waren für den Student's t-Test (Sachs, 2002). $p > 0,05$ wurde als nicht signifikant gewertet. Signifikante Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mit Sternen gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit aufgeführten Experimente an wenigstens zwei, in der Regel an drei oder mehr unabhängigen Kulturen durchgeführt.

3.1 Charakterisierung der verwendeten neuronalen Zellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden neurale Zellkulturen aus Rattengehirn als Modellsysteme für verschiedene Gehirnzelltypen eingesetzt. Dazu wurden astrogliareiche Primärkulturen (APK), neuroneneiche Primärkulturen (NPK), oligodendroglareiche Sekundärkulturen (OSK) und microgliareiche Sekundärkulturen der Methode A (MSK-A) nach etablierten Methoden (Hamprecht und Löffler, 1985; Löffler *et al.*, 1986; Hirrlinger *et al.*, 2000, 2002b) hergestellt. Zusätzlich wurde zur Gewinnung von Micro-

gliakulturen eine weitere Methode etabliert und diese Kulturen immunocytochemisch charakterisiert. Phasenkontrastaufnahmen verschiedener neuraler Zellkulturen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind in Abb. 2 dargestellt.

APK bildeten einen konfluenten Zellrasen (Abb. 2 A). Im Gegensatz dazu waren Kulturen von Neuronen und Microgliazellen nicht konfluent (Abb. 2 C, E, G). Neuronen in Kultur zeigten ein weit verzweigtes Netzwerk von Fortsätzen (Abb. 2 C). Die Mehrzahl der Microgliazellen in Kulturen, die nach den Methoden A (MSK-A) oder B (MSK-B) präpariert worden waren, hatten amöboide oder stäbchenförmige Form (Abb. 2 E und G).

Die verwendeten Kulturen von Astrogliazellen, Microgliazellen, Oligodendrogliazellen und Neuronen enthalten in geringen Mengen andere Zelltypen (Reinhart *et al.*, 1990; Dringen *et al.*, 1999a; Hirrlinger *et al.*, 2000, 2002b). Deshalb wurden die gewonnenen Kulturen bezüglich der in ihnen enthaltenen Zelltypen charakterisiert. Dafür wurden Antikörper gegen CD 11b (Ox42) zur Identifizierung der Microgliazellen (Graeber *et al.*, 1988), gegen Galactocerebrosid (GalC) (Ranscht *et al.*, 1982) zur Identifizierung von Oligodendrogliazellen, gegen das *growth-associated protein-43* (GAP-43) zum Nachweis von Neuronen (Jacobson *et al.*, 1986) sowie Antikörper gegen das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) (Bock *et al.*, 1977) zum Nachweis von Astrogliazellen eingesetzt.

Die Anfärbung von APK mit einem polyklonalen Antikörper gegen GFAP führte zu einer intensiven Anfärbung der meisten Zellen der Kultur (Abb. 2 B). Die GFAP-positiven Zellen der APK wiesen die typische Morphologie von Astrogliazellen in Kultur auf (Reinhart *et al.*, 1990). Wurde der Primärantikörper bei der Anfärbung weggelassen, waren die Zellen nicht angefärbt (Daten nicht gezeigt). Die blaue Fluoreszenz ist die Färbung der Zellkerne mit DAPI. Die untersuchten APK waren also stark angereichert an GFAP-positiven Zellen und somit ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Eigenschaften von Astrogliazellen.

In NPK wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen GAP-43 Neuronen angefärbt (Abb. 2 D). Nur vereinzelte Zellen in NPK waren GFAP-positiv (Daten nicht gezeigt). Die Anfärbung von MSK-A mit dem monoklonalen Antikörper Ox42 gegen CD 11b führte zu einer intensiven Anfärbung von Zellen (Abb. 2 F). Vereinzelte Zellen in diesen Kulturen waren GFAP-positiv. Wurden die Primärantikörper während der Anfärbung von NPK und MSK-A weggelassen, waren die Zellen nicht angefärbt (Daten nicht gezeigt).

MSK-B wurden nach einer Modifikation der Methode von Saura *et al.* (2003) ge-

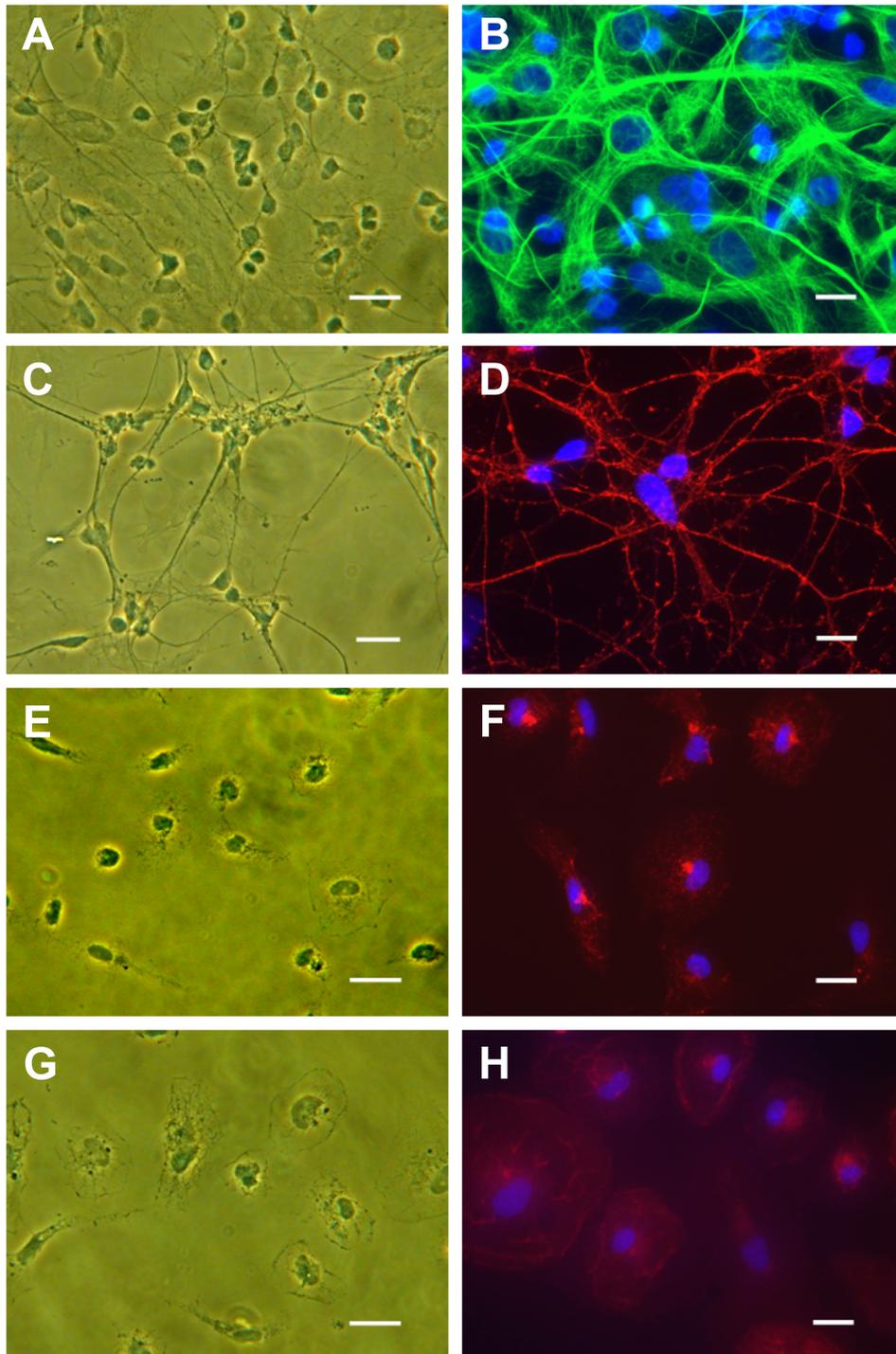


Abb. 2 Phasenkontrastaufnahmen (A, C, E, G) und immuncytochemische Anfärbungen (B, D, F, H) von APK (A, B), NPK (C, D), MSK-A (E, F) und MSK-B (G, H). Die immuncytochemischen Anfärbungen zeigen Ausschnitte von Kulturen, die jeweils mit Antikörpern gegen GFAP (B, grün), GAP43 (D, rot) oder CD11b (F und H, rot) angefärbt wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Die Balken in den Abb. entsprechen 20 μm . Die Kulturen waren zum Zeitpunkt der Experimente 3 d (MSK), 5 d (NPK) und 7 d (APK) alt.

wonnen (5.3.1.4). Im mikroskopischen Bild waren Zellen mit der für Microgliazellen typischen Morphologie (Streit, 2005) als runde, spiegeleierförmige Zellen zu sehen (Abb. 2 G). Durch immunocytochemische Anfärbungen mit Antikörpern gegen CD11b (Abb. 2 H) und zelltypspezifische Markerproteine und -lipide (Tabelle 1) wurden die in den MSK-B vorhandenen Zelltypen identifiziert und so die Zellzusammensetzung der Kulturen charakterisiert. Wurden die Primärantikörper während der Anfärbung weggelassen, waren keine Zellen angefärbt (Daten nicht gezeigt). Zwei angefärbte Präparate wurden freundlicherweise von Hans-Hermann Höpken zur Verfügung gestellt. Die Anfärbungen wurden photographiert und die Anzahl der gefärbten Zellen sowie die Gesamtzahl der Zellen durch eine Anfärbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) bestimmt (Tabelle 1). In MSK-B war der überwiegende Anteil der Zellen (96 %) positiv für Ox42 (Tabelle 1). Nur 1 % der Zellen war positiv für GFAP (Tabelle 1). GalC-positive Zellen wurden nicht gefunden. Somit zeigte die immunocytochemische Charakterisierung, daß in der durch Trypsinisierung von APK erhaltenen MSK-B Microgliazellen stark angereichert waren. Sie wurden daher als zweites Kulturmodell zur Untersuchung der Eigenschaften von Microgliazellen herangezogen.

Tabelle 1 Immunocytochemische Charakterisierung microgliareicher Sekundärkulturen (MSK-B)

Markierung	positive Zellen % der Zellen einer Kultur	n
CD11b	96,4 ± 2,8	3
GFAP	0,9 ± 0,9	3
GalC	0	2

Die Kulturen wurden durch Trypsinisieren gewonnen und mit Antikörpern gegen die angegebenen Moleküle angefärbt. Die Gesamtzahl der Zellen wurde durch eine Anfärbung der Zellkerne mit DAPI bestimmt. In n Kulturen wurde der Anteil der positiven Zellen durch Auszählen bestimmt. Pro Kultur und Anfärbung wurden zwischen 142 und 440 Zellen gezählt. Insgesamt wurden 2375 Zellen gezählt.

3.2 Vorkommen von γ Glutamyltranspeptidase in neuronalen Zellen

Um zu überprüfen, ob Zellen der in vorliegender Arbeit verwendeten neuronalen Zellkulturen γ GT exprimieren, wurde das Vorkommen von mRNA der γ GT untersucht und die spezifische Aktivität der γ GT in den Zellkulturen bestimmt.

Das Vorkommen der mRNA von γ GT in APK, NPK, OSK und MSK-A sowie in Gehirn und Leber adulter Ratten als Kontrollen wurde durch RT-PCR untersucht. Diese Methode liefert eine rein qualitative Aussage über die Präsenz einer bestimmten mRNA. Mit spezifischen *Primern* (Tabelle 20) konnte nach reverser Transkription der Gesamt-RNA, die aus den neuronalen Zellkulturtypen isoliert wurden, jeweils ein cDNA-Fragment der erwarteten Größe (Tabelle 20) für γ GT amplifiziert werden (Abb. 3). Außer dem prominenten und erwarteten 399 bp großen cDNA-Fragment der γ GT waren in den Gelen noch einige weitere weniger intensive Banden größerer und kleinerer Masse vorhanden. In den Proben der β -Actin-Kontrollen waren keine weiteren Banden zu sehen (Abb. 3).

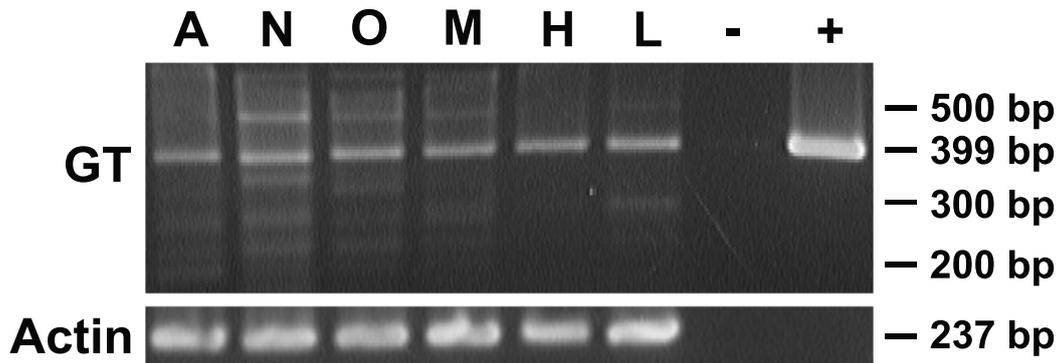


Abb. 3 RT-PCR-Analyse des Vorkommens von mRNA von γ GT in neuronalen Zellkulturen und in Gehirn und Leber adulter Ratten. Je 1 μ g Gesamt-RNA aus APK (A), NPK (N), OSK (O), MSK-A (M), Rattengehirn (H) und Rattenleber (L) wurde revers transkribiert und mit spezifischen *Primern* für die γ GT der Ratte amplifiziert (35 PCR-Zyklen). Die Positivkontrolle (+) war cDNA der γ GT in einem Plasmid (PGT-12). Für die Negativkontrolle (-) wurde die PCR ohne Zugabe von cDNA durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert. Die Integrität der cDNA wurde mit β -Actin-spezifischen *Primern* untersucht (Actin).

Um neben der Analyse des Vorkommens von mRNA der γ GT auch Daten zum Vorkommen des Proteins zu erhalten, wurde die spezifische Aktivität der γ GT in

den verschiedenen Zellkulturtypen bestimmt. Dazu wurden Zellen in Zellkulturschalen (50 mm Durchmesser) verwendet. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten der γ GT sowie die Proteingehalte der Kulturen sind in Tabelle 2 dargestellt. Von den untersuchten neuronalen Zellkulturen wiesen APK die höchste spezifische γ GT-Aktivität auf, gefolgt von OSK. Die hohe SD der Werte für OSK mag eine Folge von Verunreinigungen der Kulturen durch unterschiedliche Mengen an Astrogliazellen sein. Microgliazellen und Neuronen wiesen nur geringe spezifische γ GT-Aktivitäten auf (Tabelle 2).

Um die durch das verwendete Testsystem bestimmte Bildung von 3-Carboxy-4-nitroanilin aus γ Glutamyl-(3-carboxy-4-nitroanilid) (GCNA) eindeutig der γ GT zuzuordnen zu können, wurden neurale Zellkulturen 24 h lang mit Acivicin, einem spezifischen Inhibitor der γ GT (Stole *et al.*, 1994), inkubiert. Diese Inkubation mit Acivicin hemmte in allen vier Zellkulturtypen die Bildung von 3-Carboxy-4-nitroanilin nahezu vollständig (Tabelle 3). Somit war ausschließlich γ GT für den beobachteten Umsatz von GCNA verantwortlich.

3.2.1 Modulation der Aktivität der γ Glutamyltranspeptidase in neuronalen Zellen

Um mögliche Veränderungen der Aktivität der γ GT in APK zu bewirken, wurden APK in Zellkulturschalen (50 mm Durchmesser) mit verschiedenen Substanzen inkubiert (Tabelle 4). Diese Pilotexperimente zeigten, daß in Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml), Ammonium Eisen(III)citrat (FAC; 100 μM) oder $\text{IFN}\gamma$ + LPS (5 U/ml bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) die Aktivität der γ GT innerhalb von 24 h im Vergleich zu den Kontrollen anstieg. Alle anderen untersuchten Substanzen beeinflussten die Aktivität nicht (Tabelle 4).

Der Effekt von $\text{IFN}\gamma$ und LPS wurde in weiteren Experimenten bestätigt. Dabei führte die Anwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ (5 U/ml) und LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in einer 21 d alten APK (1,48 \pm 0,03 mg Protein pro Schale) innerhalb von 72 h zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität der γ GT von einem Ausgangswert von 1,6 \pm 0,0 nmol/(min x mg) auf 7,7 \pm 0,9 nmol/(min x mg). In den Kontrollen (Abwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ und LPS) stieg die Aktivität nur auf 2,6 \pm 0,3 nmol/(min x mg). Da der Anstieg der spezifischen γ GT-Aktivität durch $\text{IFN}\gamma$ und LPS in Astrogliazellen schon beschrieben worden war (Garcion *et al.*, 1999), wurde dieser Effekt in vorliegender Arbeit nicht weiter verfolgt. Im Gegensatz dazu waren die beobachteten Effekte von $\text{TNF}\alpha$ und FAC auf die Aktivität der γ GT in Astrogliazellen neu und wurden im weiteren näher analysiert.

Tabelle 2 γ GT-Aktivität in neuronalen Zellkulturen

Zellkultur	γ GT-Aktivität nmol/(min \times mg)	Proteingehalt μ g/Schale	n
APK	2,5 \pm 0,8	1274 \pm 282	57
OSK	1,6 \pm 1,1	111 \pm 32	7
MSK-A	0,6 \pm 0,4	207 \pm 74	5
MSK-B	0,1 \pm 0,1	155 \pm 71	3
NPK	0,4 \pm 0,1	405 \pm 8	3

Neurale Zellkulturen wurden in Zellkulturschalen (50 mm Durchmesser) kultiviert und die spezifische γ GT-Aktivität wurde bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD von Werten, die in n Experimenten gewonnen wurden.

Tabelle 3 Modulation der γ GT-Aktivität durch Acivicin

Zellkultur	[Acivicin] μ M	γ GT-Aktivität nmol/(min \times mg)	n	Proteingehalt μ g/Schale
APK	0	3,9 \pm 1,1	9	1050 \pm 124
	100	0,1 \pm 0,1 **	9	961 \pm 81
MSK-A	0	0,4 \pm 0,1	4	177 \pm 9
	100	0,1 \pm 0,1 **	4	n.b.
OSK	0	2,7 \pm 0,4	5	101 \pm 21
	100	0,3 \pm 0,1 ***	4	n.b.
NPK	0	0,4 \pm 0,2	6	400 \pm 104
	100	0,02 \pm 0,01 **	6	n.b.

Neurale Zellen wurden 24 h lang in Ab- oder Anwesenheit von 100 μ M Acivicin inkubiert. Die Tabelle faßt Daten aus 1 bis 3 Experimenten zusammen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD, die an n Kulturschalen aus je drei APK und NPK und je einer OSK und MSK-A gewonnen wurden. Zur Berechnung der spezifischen γ GT-Aktivität von acivicinbehandelten MSK-A, OSK und NPK wurden die angegebenen Proteinwerte von Kulturen genutzt, die ohne Acivicin inkubiert worden waren. Durch Sterne gekennzeichnet ist die Signifikanz der Unterschiede in der γ GT-Aktivität zwischen acivicinbehandelten Zellen und den entsprechenden Kontrollen (ohne Acivicin), die mittels Student's t-Test berechnet wurde. Für APK, NPK und OSK wurde zusätzlich eine Welch-Korrektur gerechnet. (n.b. = nicht bestimmt)

Tabelle 4 Modulation der spezifischen Aktivität der γ GT

Substanz	Konzentration	γ GT-Aktivität nmol/(min \times mg)
- (Kontrolle A)		3,3 \pm 0,4
PMA	100 nM	3,6 \pm 0,3
GABA	1 mM	3,9 \pm 0,3
Glutamat	1 mM	3,0 \pm 0,3
A23187 (in DMSO)	1 μ M	3,7 \pm 0,5
Isoproterenol	1 μ M	2,7 \pm 0,4
Insulin	1 μ M	3,2 \pm 0,3
db-cAMP	0,5 mM	3,7 \pm 1,3
TNF α	10 ng/ml	4,8 \pm 0,9 ***
- (Kontrolle B)		2,4 \pm 0,4
- (Kontrolle C)		1,9 \pm 0,0
HVA	1 mM	1,7 \pm 0,3
Dopac	1 mM	1,8 \pm 0,3
MPTP	1 mM	1,7 \pm 0,2
MPP $^+$	1 mM	2,1 \pm 0,1
TGF β 1	1 ng/ml	1,7 \pm 0,1
IFN γ + LPS	5 U/ml + 50 μ g/ml	2,9 \pm 0,3
FAS (in DMEM/FCS)	100 μ M	2,7 \pm 0,4
FAC	100 μ M	5,0 \pm 0,5 ***
Dexamethason (in EtOH)	1 μ M	1,9 \pm 0,1
- (Kontrolle D)		2,1 \pm 0,1

APK wurden 24 h lang in DMEM/PS mit den aufgeführten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von Dreifachbestimmungen. Die Kultur war zum Zeitpunkt des Experiments 16 d alt und enthielt $1,6 \pm 0,2$ mg Protein pro Schale. Um durch den Ablauf des Experiments bedingte Schwankungen der γ GT-Aktivität zu erfassen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Kontrollen (A, B, C, D) eingefügt. Die Unterschiede zwischen Kontrollen und TNF α -behandelten bzw. FAC-behandelten Zellen waren höchst signifikant. (PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; GABA: γ -Aminobuttersäure; db-cAMP: Di-buteryl-cAMP; HVA: Homovanillinsäure; Dopac: 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure; MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin; MPP $^+$: 1-Methyl-4-phenylpyridiniumion; TGF β 1: *transforming growth factor* β 1; FAS: Ammonium Eisen(II)sulfat; EtOH: Ethanol)

3.2.1.1 Tumor-Nekrose-Faktor α

Um den Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die spezifische Aktivität der γ GT in APK näher zu untersuchen, wurden APK mit 30 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ bis zu 72 h lang inkubiert. Während dieser Inkubation stieg in Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ die spezifische Aktivität der γ GT von einem Ausgangswert von $2,0 \pm 0,4$ nmol/(min x mg) innerhalb von 72 h um den Faktor 4,5 auf einen Plateauwert von $9,1 \pm 1,6$ nmol/(min x mg) (Abb. 4). Im Gegensatz dazu stieg in Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ die spezifische Aktivität der γ GT während der Inkubation nur geringfügig an. Die Vitalität der Zellen wurde durch die Inkubation nicht beeinträchtigt, da nur geringe LDH-Aktivitäten (<10 %) im Medium gefunden wurden (Daten nicht gezeigt).

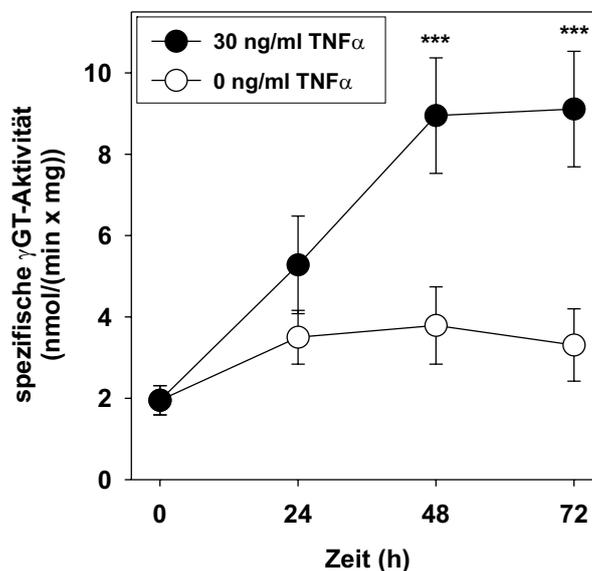


Abb. 4 Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die spezifische γ GT-Aktivität von APK. Die Zellen wurden in DMEM/PS in Ab- oder Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ (30 ng/ml) für die angegebene Zeit inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von Werten, die in sechs bis elf Experimenten an unabhängigen APK gewonnen wurden. Die Signifikanz der Unterschiede in der γ GT-Aktivität zwischen Kontrollen und $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Zellen wurde mittels Student's t-Test berechnet.

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von $\text{TNF}\alpha$ auf die Aktivität der γ GT wurden APK mit $\text{TNF}\alpha$ variiertter Konzentration in DMEM/PS inkubiert. Dabei zeigte sich nach 72 h ein deutlicher Zusammenhang zwischen der $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration und der spezifischen γ GT-Aktivität. Eine höhere Konzentration an $\text{TNF}\alpha$ resultierte in einer höheren γ GT-Aktivität in APK (Abb. 5). In vorliegender Arbeit wurden in weiteren Experimente 30 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ eingesetzt, da diese

3 Ergebnisse

Konzentration einen signifikant stimulierenden Effekt auf die Aktivität der γ GT in APK hatte (Abb. 5).

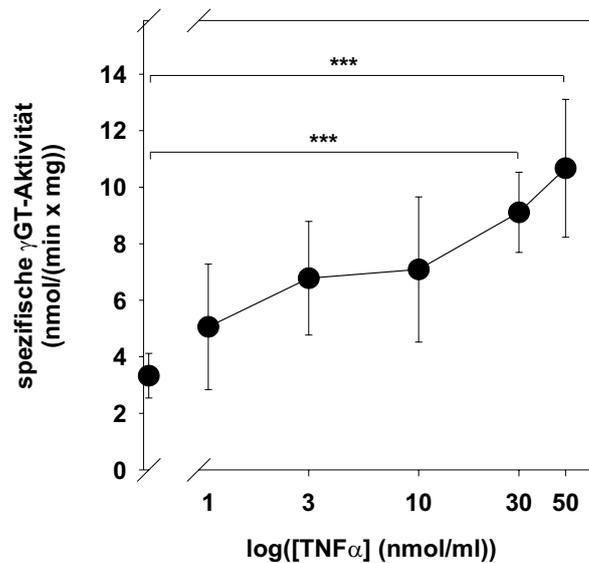


Abb. 5 Einfluß von TNF α auf die spezifische γ GT-Aktivität in APK. Die Zellen wurden 72 h lang in DMEM/PS mit TNF α der angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SD und wurden in Dreifachbestimmung an drei bis zehn unabhängigen APK gewonnen. Die Ausgangsaktivität der γ GT betrug $1,9 \pm 0,3$ nmol/(min x mg) ($n = 10$). Die Signifikanz der Unterschiede in der γ GT-Aktivität wurde mittels ANOVA und anschließendem Bonferroni posthoc-Test berechnet.

Um zu belegen, daß die nach Inkubation von APK mit TNF α nachgewiesene Steigerung der Bildung von 3-Carboxy-4-nitroanilin durch die gesteigerte Aktivität der γ GT verursacht wurde, wurde der γ GT-Inhibitor Acivicin eingesetzt. APK wurden zunächst für 48 h mit 30 ng/ml TNF α vorinkubiert und die spezifische Aktivität der γ GT wurde bestimmt (Tabelle 5). Die mit TNF α inkubierten Zellen wiesen dabei eine um den Faktor 3 erhöhte γ GT-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen auf (Tabelle 5). Bei der darauf folgenden Hauptinkubation wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von TNF α mit oder ohne Acivicin (100 μ M) 24 h lang inkubiert. Für acivicinbehandelte Zellen war nahezu keine Aktivität der γ GT nachweisbar, unabhängig von einer Inkubation mit oder ohne TNF α (Tabelle 5). Zellen, die nicht mit Acivicin inkubiert wurden, zeigten nach 24 h Hauptinkubation eine ähnliche spezifische γ GT-Aktivität wie Zellen nach der jeweiligen Vorinkubation.

Physiologisches Substrat der γ GT ist GSH (Meister und Tate, 1976; Meister und Anderson, 1983), das von Astrocyten freigesetzt wird (Yudkoff *et al.*, 1990; Sagara *et al.*, 1996; Dringen *et al.*, 1997a; Hirrlinger *et al.*, 2002c). Eine erhöhte Aktivität der

Tabelle 5 Einfluß von Acivicin auf die spezifische γ GT-Aktivität in APK

48 h Vorinkubation		24 h Hauptinkubation	
[TNF α] ng/ml	γ GT-Aktivität nmol/(min \times mg)	[Acivicin] μ M	γ GT-Aktivität nmol/(min \times mg)
0	3,6 \pm 1,2	0	3,2 \pm 0,8
		100	0,1 \pm 0,1
30	10,1 \pm 0,1	0	8,8 \pm 1,0
		100	0,2 \pm 0,1

Die Zellen wurden 48 h lang in DMEM/PS in An- oder Abwesenheit von TNF α (30 ng/ml) vorinkubiert. Die Hauptinkubation erfolgte über weitere 24 h mit oder ohne TNF α in Ab- oder Anwesenheit von Acivicin (100 μ M). Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm SD und wurden in Dreifachbestimmung in drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Die Ausgangsaktivität der γ GT vor Beginn der Vorinkubation betrug 2,0 \pm 0,3 nmol/(min \times mg) (n = 3). Die Unterschiede in der γ GT-Aktivität zwischen der Kontrolle (ohne Acivicin) und den acivicinbehandelten Zellen ist höchst signifikant (Student's t-Test; p < 0,001).

γ GT sollte daher zu einem verbesserten Abbau von extrazellulärem GSH in APK führen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden APK in *wells* von 24-*well*-Platten zunächst 72 h lang mit oder ohne TNF α (30 ng/ml) in DMEM/PS vorinkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit oder ohne 100 μ M Acivicin in MM 6 h lang inkubiert. Nach Inhibierung der γ GT durch Acivicin akkumulierte das von den Astrocyten freigesetzte GSx proportional zur Zeit im Medium (Abb. 6). Die spezifischen Freisetzungsgeschwindigkeiten für GSH betrugen 2,0 \pm 0,5 nmol/(h \times mg) (Kontrolle) und 1,9 \pm 0,6 nmol/(h \times mg) (TNF α). Es bestand somit kein Unterschied in der Geschwindigkeit der Freisetzung von GSH zwischen Kontrollen und TNF α -behandelten Zellen. In Abwesenheit von Acivicin kann aus APK freigesetztes GSH durch γ GT gespalten werden (Dringen *et al.*, 1997a). Unter solchen Bedingungen zeigte sich hinsichtlich der extrazellulären Akkumulation von GSH ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und TNF α -behandelten Zellen. Die Behandlung mit TNF α führte zu erhöhter Aktivität der γ GT. Ferner wurde extrazelluläres GSH in größerem Umfang von TNF α -behandelten Zellen abgebaut als von Kontrollzellen, in denen die Aktivität der γ GT nicht durch Vorinkubation mit TNF α erhöht worden war (Abb. 6).

Ursache gesteigerter Enzymaktivität kann erhöhte Expression des Gens, Stabilisierung der mRNA, Aktivierung des Enzyms oder Freisetzung gespeicherten Enzyms sein.

3 Ergebnisse

Um zu untersuchen, worauf die Steigerung der Aktivität der γ GT in APK nach der Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ beruhte, wurde Cycloheximid (CHX), ein Inhibitor der Proteinbiosynthese (Ennis und Lubin, 1964), eingesetzt. Dafür wurden Zellen mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ in An- und Abwesenheit von CHX ($10 \mu\text{M}$) inkubiert. Nach 24 und 48 h Inkubation wurde die Aktivität der γ GT gemessen. Dabei zeigte sich, daß die durch $\text{TNF}\alpha$ induzierte Steigerung der spezifischen Aktivität der γ GT in Anwesenheit von CHX vollständig unterdrückt wurde (Tabelle 6). Die spezifische γ GT-Aktivität $\text{TNF}\alpha$ -behandelter APK entsprach nach Inkubation mit CHX nahezu dem Ausgangswert. Die LDH-Freisetzung aus APK war nach 48 h Inkubation mit CHX im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle erhöht (Tabelle 6), was auf eine verminderte Zellvitalität schließen läßt.

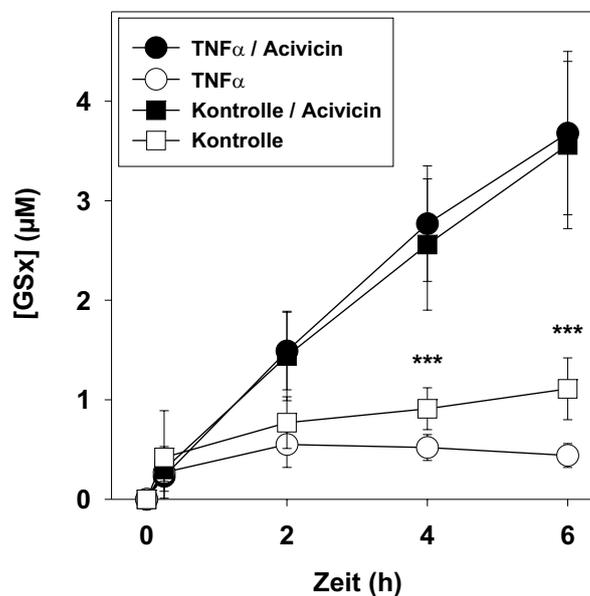


Abb. 6 Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die extrazelluläre GSx-Akkumulation in APK. Die Zellen wurden 72 h lang in DMEM/PS in der Abwesenheit (Quadrate) oder Anwesenheit (Kreise) von $\text{TNF}\alpha$ (30 ng/ml) vorinkubiert. Danach wurden die Zellen in MM inkubiert in Abwesenheit (offene Symbole) oder Anwesenheit (geschlossene Symbole) von Acivicin ($100 \mu\text{M}$). Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von Werten, die in Dreifachbestimmung in drei unabhängigen Experimenten gewonnen wurden. Die Signifikanzen der Unterschiede in der extrazellulären GSx-Konzentration von Kontrollen (ohne $\text{TNF}\alpha$) und $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Zellen wurden mittels Student's t-Test berechnet. Für die 6-h-Werte wurde zusätzlich eine Welch-Korrektur gerechnet.

Tabelle 6 Effekte von Cycloheximid auf die spezifische γ GT-Aktivität und die Zellvitalität von APK

[TNF α] ng/ml	[CHX] 10 μ M	24 h		48 h	
		γ GT-Aktivität nmol/(min \times mg)	LDH-Freisetzung %	γ GT-Aktivität nmol/(min \times mg)	LDH-Freisetzung %
0	-	3,0 \pm 0,3	3 \pm 2	3,4 \pm 0,7	5 \pm 3
0	+	2,1 \pm 0,4 *	12 \pm 11 *	2,2 \pm 0,3	24 \pm 13 *
30	-	5,1 \pm 1,5	8 \pm 8	8,2 \pm 1,7	5 \pm 3
30	+	2,2 \pm 0,4 *	25 \pm 10 *	2,5 \pm 0,5 **	37 \pm 5 ***

Die Zellen wurden bis zu 48 h lang ohne oder mit (30 ng/ml) TNF α in Ab- oder Anwesenheit von Cycloheximid (10 μ M) inkubiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von Daten, die in Dreifachbestimmung an je drei unabhängigen Kulturen (n = 9) gewonnen wurden. Die Ausgangsaktivität der γ GT betrug 1,9 \pm 0,3 nmol/(min \times mg) (n = 9). Durch Sterne gekennzeichnet ist die Signifikanz der Unterschiede in der γ GT-Aktivität zwischen CHX-behandelten Zellen und den entsprechenden Kontrollen (ohne CHX), die mittels Student's t-Test berechnet wurde.

3.2.1.2 Eisenionen

Wie in Tabelle 4 gezeigt, wurde die spezifische Aktivität der γ GT in APK auch durch Inkubation mit dem Eisensalz FAC gesteigert. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden APK in Zellkulturschalen (50 mm Durchmesser) mit oder ohne FAC (100 μ M) in DMEM/PS inkubiert. Die Messung der γ GT-Aktivität nach Inkubation von APK mit FAC ergab je nach Experiment recht heterogene Ergebnisse. Erhebliche gesteigerte Aktivitäten der γ GT zeigten sich nicht nur nach Inkubation mit FAC, sondern auch bei den Kontrollinkubationen ohne FAC. Tabelle 7 faßt Daten aus 12 bis 14 Experimenten zusammen, in denen APK 48 h lang mit oder ohne FAC inkubiert worden waren. Die hohen SD zeigen die Heterogenität der Ergebnisse. Nur durch die große Anzahl der durchgeführten Experimente wurde der Unterschied in der spezifischen Aktivität der γ GT zwischen FAC-inkubierten Zellen und Kontrollen signifikant (Tabelle 7).

Abb. 7 zeigt Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten und verdeutlicht die Variabilität des Effektes von FAC auf die Aktivität der γ GT in APK. In Abhängigkeit der applizierten Konzentration an FAC veränderte sich die spezifische Aktivität der γ GT (Abb. 7 A, B). Dabei war die Aktivität der γ GT nach Inkubation mit FAC in Konzentrationen von 100 bis 300 μ M am höchsten. Die Unterschiede in der Aktivität der γ GT zwischen FAC-inkubierten Zellen und Kontrollen, die 48 h ohne FAC inkubiert worden waren, waren jedoch nicht signifikant (Abb. 7 A, C). Im Gegensatz

Tabelle 7 Einfluß von Eisen auf die γ GT-Aktivität in APK

[FAC] μ M	γ GT-Aktivität nmol/(min \times mg)	Proteingehalt mg/Schale	n
0	5,3 \pm 1,6	1,1 \pm 0,2	12
100	6,4 \pm 1,1*	1,1 \pm 0,2	14

Die Zellen wurden 48 h lang in An- oder Abwesenheit von FAC inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD aus n Experimenten an neun unabhängigen APK. Der mittlere Ausgangswert der γ GT-Aktivität betrug $3,0 \pm 0,5$ nmol/(min \times mg) (n = 14). Der signifikante Unterschied der γ GT-Aktivität zwischen Kontrollen und FAC-inkubierten Zellen wurde mittels Student's t-Test berechnet.

dazu zeigten die Zeitabhängigkeiten des Effekts von 100 μ M FAC auf die Aktivität der γ GT zu verschiedenen Zeitpunkten signifikante Unterschiede zu Kontrollen (Abb. 7 C, D). Auch in den Zeitabhängigkeiten war immer ein tendenzieller Anstieg der γ GT-Aktivität nach Gabe von FAC meßbar (Abb. 7 C, D).

Um zu überprüfen, ob eine Inkubation von APK mit FAC den zellulären Eisengehalt verändert, wurde der spezifische Eisengehalt der Zellen bestimmt. Bei Inkubation von APK mit 100 μ M FAC stieg der Eisengehalt der Zellen innerhalb von 48 h auf einen Maximalwert von 197 ± 8 nmol/mg an, der 20fach höher war als der von Zellen, die ohne FAC inkubiert wurden (Abb. 8 A). Ein maximaler Gehalt an Eisen in Zellen von APK wurde nach 48 h Inkubation mit 300 μ M FAC erreicht. Inkubation bei geringeren oder höheren Konzentrationen führte zu einem geringeren spezifischen Eisengehalt (Abb. 8 B).

Um die Bedeutung von Eisen in dem Eisenkomplex FAC auf die Änderung der Aktivität der γ GT zu überprüfen, wurden APK mit den in Tabelle 8 angegebenen Substanzen inkubiert. FAC führte zu einem stärkeren Anstieg der γ GT-Aktivität als die anderen Substanzen und als Abwesenheit von Zusätzen. Citrat und Ammoniumionen, die neben Eisen in FAC enthalten sind, führten zu keiner Steigerung der spezifischen γ GT-Aktivität in APK (Tabelle 8). Der Eisenchelator Desferoxamin (DFX) verhinderte den FAC-abhängigen Anstieg der γ GT-Aktivität. Die beobachteten Unterschiede in der spezifischen γ GT-Aktivität von APK, die mit FAC bzw. den anderen in Tabelle 8 angegebenen Testsubstanzen erhalten wurden, waren nicht signifikant. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Substanzen wurde in Anwesenheit von Acivicin die Aktivität der γ GT nahezu vollständig gehemmt (Tabelle 8).

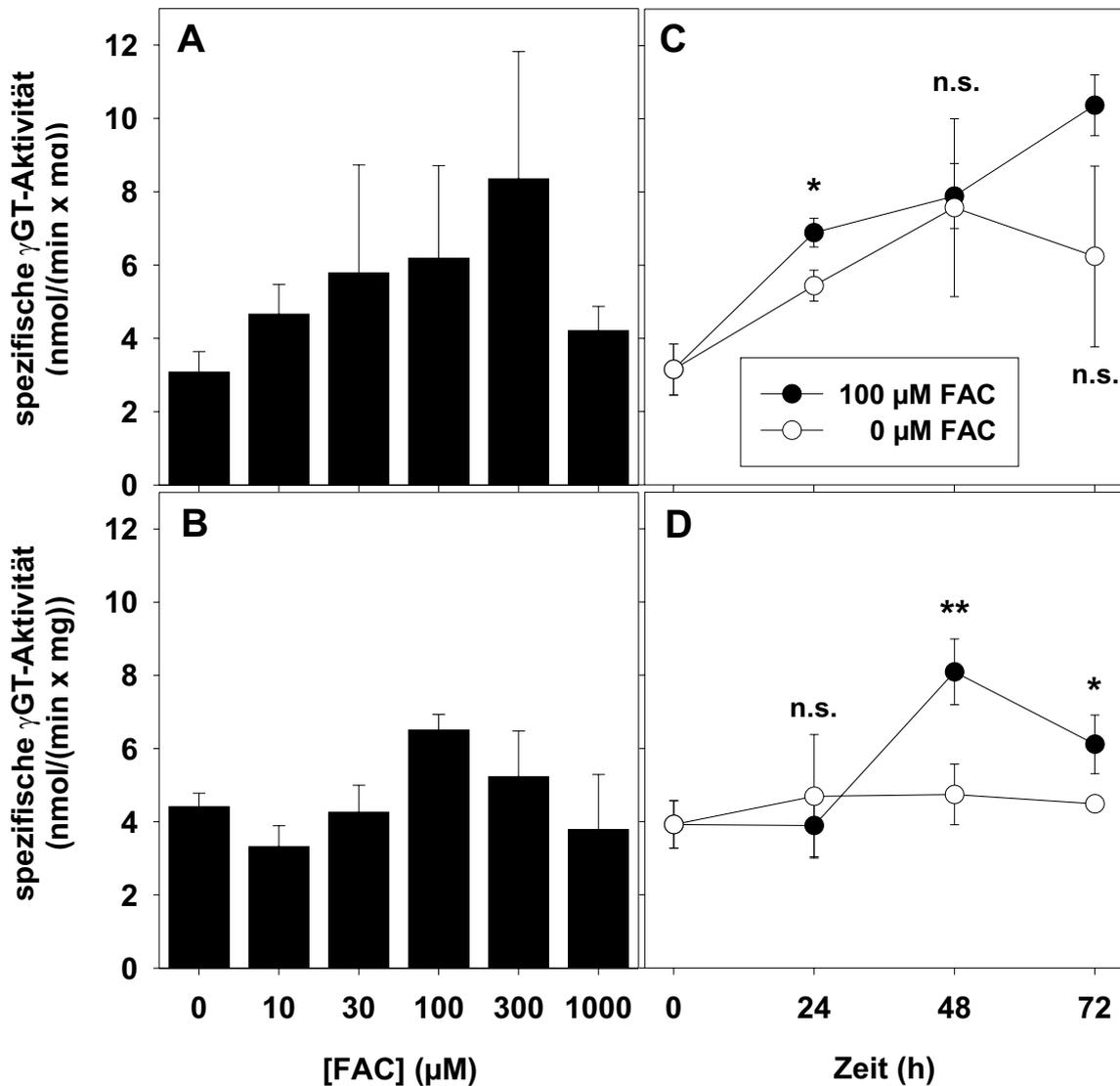


Abb. 7 Effekt einer Eisenapplikation auf die γ GT-Aktivität in APK. Dargestellt sind Daten aus vier unabhängigen Experimenten (A-D), die an unabhängigen Kulturen durchgeführt wurden. Die Zellen wurden 48 h lang in DMEM/PS mit FAC der angegebenen Konzentrationen (A, B) oder für die angegebene Zeit in Ab- oder Anwesenheit von 100 μ M FAC (C, D) inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachbestimmungen, die an 18 d (A, C, D) und 15 d (B) alten APK gewonnen wurden. Die Proteingehalte der Kulturen betragen $1,3 \pm 0,1$ (A), $1,3 \pm 0,0$ (B), $1,3 \pm 0,0$ (C) und $1,3 \pm 0,1$ (D) mg pro Schale. Die Unterschiede zwischen Kontrollen und FAC-inkubierten Zellen sind in den Experimenten A und B nicht signifikant (ANOVA mit Tuckey-Kramer post-Test). Die Signifikanzen der Unterschiede zwischen Kontrollen und FAC-inkubierten Zellen in den Experimenten C und D wurden per Student's t-Test ermittelt.

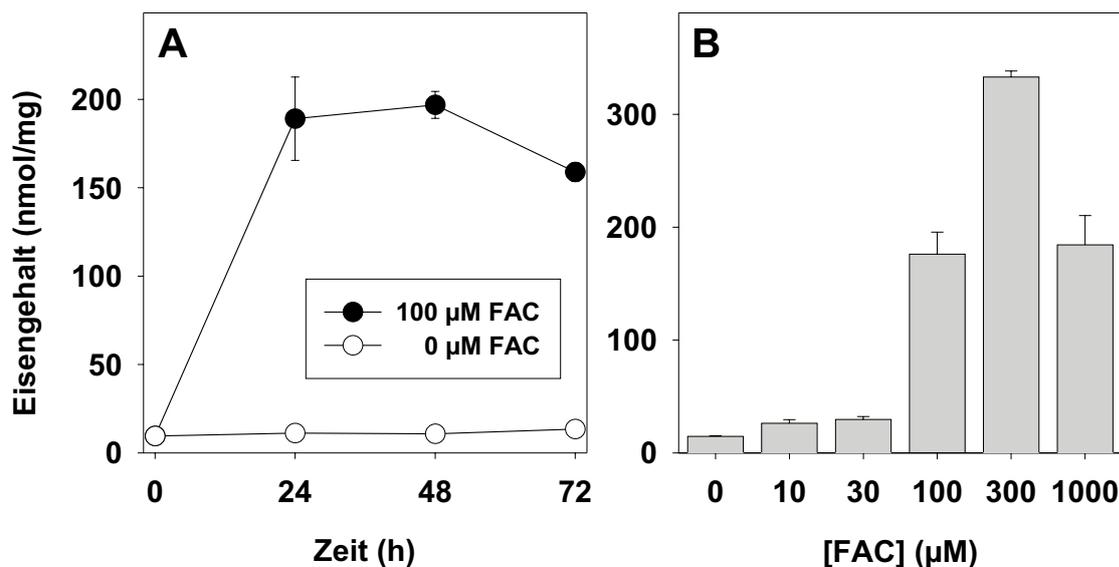


Abb. 8 Eisengehalt von APK in Abhängigkeit der Inkubationszeit in Ab- oder Anwesenheit von FAC (100 μM). Die Zellen wurden bis zu 72 h lang mit FAC (100 μM) (A) oder 48 h lang mit FAC variierten Konzentrationen (B) inkubiert. Die Werte wurden in Dreifachbestimmung an einer 18 d (A) und einer 15 d (B) alten APK gewonnen. Der Eisengehalt unbehandelter APK betrug $9,5 \pm 0,9$ (A) und $14,8 \pm 3,4$ nmol/mg. Der Proteingehalt der Kulturen betrug $1,27 \pm 0,01$ (A) und $1,34 \pm 0,03$ (B) mg pro Schale.

Tabelle 8 Effekte verschiedener Substanzen auf die spezifische γGT -Aktivität in APK

Substanz	Konzentration	γGT -Aktivität nmol/(min \times mg)	n
- (Kontrolle)		$5,5 \pm 1,9$	5
FAC	100 μM	$6,1 \pm 1,2$	7
AC	100 μM	$5,0 \pm 1,5$	3
Citrat	100 μM	$5,4 \pm 1,8$	3
NH_4^+	100 μM	$4,5 \pm 0,5$	3
FAC + DFX	100 μM / 1 mM	$4,6 \pm 1,4$	4
DFX	1 mM	$4,0 \pm 0,8$	3
FAC + Acivicin	100 μM / 100 μM	$0,1 \pm 0,03$	3
Acivicin	100 μM	$0,1 \pm 0,1$	4

Die Zellen wurden 48 h lang in DMEM/PS mit den aufgeführten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von Werten, die in n Experimenten an unabhängigen Kulturen gewonnen wurden. Die Ausgangsaktivität der γGT betrug $2,9 \pm 0,3$ nmol/(min \times mg). (AC: Ammoniumcitrat (dibasisch); DFX: Desferoxamin)

3.2.1.3 Stickstoffmonoxid

Da Inkubation von Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ die iNOS induziert und dadurch zu einer Produktion von NO führt (Da Silva *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 2000), wurde untersucht, ob NO die Aktivität der γ GT in APK beeinflusst. Dazu wurden APK mit dem NO-Donor Nitroprussidnatrium (SNP) in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ in DMEM/PS inkubiert. SNP führte zu deutlicher Steigerung der γ GT-Aktivität. Innerhalb von 24 h nach Gabe von SNP stieg die spezifische Aktivität der γ GT von $2,1 \pm 0,7 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ auf das 5fache ($10,7 \pm 4,9 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$), während die Aktivität in den Kontrollen nur auf das 1,6fache ($3,4 \pm 0,5 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$) anstieg (Tabelle 9).

Tabelle 9 Einfluß von SNP auf die spezifische γ GT-Aktivität in APK

[SNP] μM	γ GT-Aktivität $\text{nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$	Proteingehalt mg/Schale
0	$3,4 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,3$
100	$10,7 \pm 4,4$	$1,3 \pm 0,2$

Die Zellen wurden 24 h lang in DMEM/PS mit oder ohne SNP ($100 \mu\text{M}$) inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von Werten, die in Dreifachbestimmung in drei Experimenten an unabhängigen APK gewonnen wurden. Der gemittelte Ausgangswert der γ GT-Aktivität betrug $2,1 \pm 0,7 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$.

3.2.1.4 Überexpression der γ Glutamyltranspeptidase durch adenoviralen Gentransfer

NPK weisen eine niedrige spezifische Aktivität der γ GT auf (Tabelle 2). Um die Konsequenzen erhöhter Aktivität der γ GT in Neuronen untersuchen zu können, sollte γ GT in Neuronen überexprimiert werden. Da primäre Zellen in der Regel mit nicht-viralen Gentransfermethoden nur mit geringer Effizienz transfizierbar sind, wurde die cDNA der γ GT durch einen viralen Vektor in Neuronen eingebracht. Die adenoviralen Vektoren pAD- γ GT und pADEG (Kontrollvektor) wurden freundlicherweise von Dr. Ellen Gerhardt zur Verfügung gestellt. Zur Etablierung der Methoden und zur Bestimmung der Transfektionsrate wurden zunächst APK mit Adenoviren infiziert.

APK wurden mit dem viralen Vektor, der die cDNA der γ GT enthielt (pAD- γ GT) oder zum Vergleich mit einem Kontrollvirus (pADEG) infiziert. Die viralen Vektoren enthalten zusätzlich zu dem Transgen auch die genetische Information für das grün-

fluoreszierende Protein EGFP, dessen Fluoreszenz den Nachweis erfolgreicher Transfektion liefert. Die Zellen wurden zum Nachweis des Transgens γ GT zusätzlich mit einem Antikörper gegen das *flag-tag* (Brizzard *et al.*, 1994) inkubiert, das als Teil des Transgens im Virus enthalten war. Abb. 9 zeigt eine immunocytochemische Anfärbung transfizierter APK, die 2 d nach der Transfektion durchgeführt wurde. Zellen, die mit viralen Vektoren infiziert waren, zeigten durch die Expression von EGFP grüne Fluoreszenz (Abb. 9 A und B). Zellen, die außerdem das Transgen exprimierten, wurden durch den immunocytochemischen Nachweis des *flag-tag* identifiziert (Abb. 9 C). Die mit dem Kontrollvektor infizierten Zellen zeigten EGFP-Fluoreszenz (Abb. 9 B), wurden aber nicht durch den Antikörper gegen das *flag-tag* angefärbt (Abb. 9 D). Die Überlagerung von EGFP-Fluoreszenz und *flag-tag*-Anfärbung weist auf Kolo-kalisation der beiden Indikatoren in pAD- γ GT-transfizierten Zellen hin (Abb. 9 E)

Zur Bestimmung der Transfektionsrate der viralen Vektoren in APK wurden transfizierte Zellen immunocytochemisch gefärbt und ausgezählt (Tabelle 10). Dabei zeigte sich zwar eine positive Korrelation zwischen der Anzahl transfizierter Zellen und MOI, aber selbst bei einer MOI von 100 waren bestenfalls 22 % aller Zellen EGFP-positiv. Bei Zellen, die mit pAD- γ GT infiziert worden waren, war die Transfektionsrate geringfügig höher (25-40 %) als bei Zellen, die mit dem Kontrollvektor pADEC infiziert worden waren. Die Expression des *flag-tags* war bei pAD- γ GT-infizierten Zellen weniger stark ausgeprägt als die Expression des EGFP, die ca. 40 % größer war. Bei pADEC-infizierten Kontrollen wurden keine *flag-tag*-positiven Zellen gefunden (Tabelle 10).

Tabelle 10 Immunocytochemische Bestimmung der Transfektionsrate (% aller Zellen) von pAD- γ GT und pADEC in APK

MOI	pADEC			pAD- γ GT		
	EGFP-positiv	<i>flag</i> -positiv	n	EGFP-positiv	<i>flag</i> -positiv	n
10	1,7 \pm 0,9	0	2	4,1 \pm 1,3	4,0 \pm 1,1	2
50	9,8 \pm 1,8	0	2	13,2 \pm 4,0	8,2 \pm 0,4	2
100	14,2 \pm 8,1	0	3	22,2 \pm 5,2	16,5 \pm 3,8	3

In mit viralen Vektoren infizierten APK wurde nach 2 d EGFP und *flag-tag* nachgewiesen. Die Gesamtzahl der Zellen wurde durch eine Anfärbung der Zellkerne bestimmt. In n Kulturen wurde der Anteil der positiven Zellen durch Auszählen bestimmt. Pro Kultur wurden zwischen 1792 und 9549 Zellen ausgezählt. Insgesamt wurden 20.254 Zellen ausgezählt.

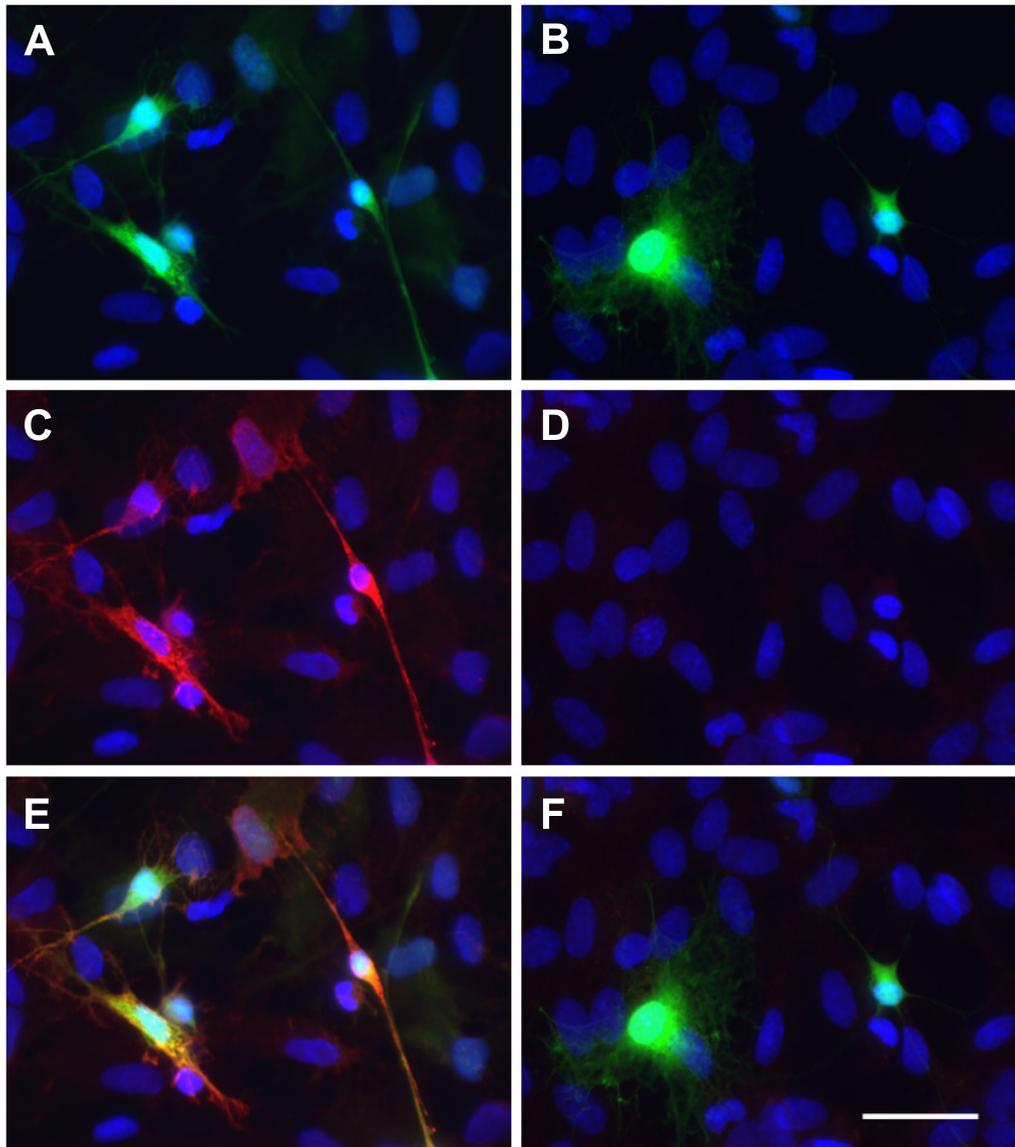


Abb. 9 APK wurden mit dem viralen Vektor pAD- γ GT (A, C und E) oder mit dem Kontrollvektor pADEG (B, D und F) in der Konzentration 100 MOI infiziert. Nach 2 d Inkubation wurde die Expression von EGFP (A, B) nachgewiesen bzw. wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen das *flag-tag* (C, D) angefärbt. E und F zeigen die Überlagerung von A und C bzw. B und D. Der Balken in F entspricht 20 μ m und gilt für alle Teilabbildungen.

Um die erfolgreiche Expression der γ GT nach Infektion von APK mit Adenoviren zu bestätigen, wurden die lösliche Fraktion und die Membranfraktion von APK, die mit den viralen Vektoren pAD- γ GT oder dem Kontrollvektor pADEG (kein Transgen) infiziert worden waren, in einem *Western blot* analysiert. In der Membranfraktion von APK, die mit pAD- γ GT infiziert worden waren, konnten im Vergleich zu den Kontrollen mit einem Antikörper gegen das *flag-tag* zusätzliche Proteinbanden nachgewiesen werden, von denen eine der Masse der C-terminalen Untereinheit der γ GT von ca. 22 kDa (Tate und Meister, 1976) entsprach (Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung der funktionellen Expression der γ GT in neuronalen Zellen, die mit pAD- γ GT infiziert worden waren, wurde die Aktivität der γ GT bestimmt. Trotz der geringen Transfektionsrate führte die Transfektion mit pAD- γ GT in allen Zellkulturtypen zu einer Steigerung der spezifischen Aktivität der γ GT um den Faktor 2500 (Tabelle 11). Die Infektion neuronaler Zellen mit dem Kontrollvirus führte allenfalls zu einer geringen Steigerung der γ GT-Aktivität (Tabelle 11). Mit den viralen Vektoren (pAD- γ GT und pADEG) wurden APK, NPK und CKZ bei verschiedenen MOI transfiziert (Tabelle 11). Bei pAD- γ GT-infizierten APK stieg die spezifische Aktivität der γ GT proportional zur applizierten MOI. Die spezifische Aktivität der γ GT stieg in pAD- γ GT-infizierten NPK nach Applikation von 10 MOI deutlich stärker an als in APK. Die γ GT-Aktivität erreichte bei 50 MOI einen Maximalwert, der bei weiterer Erhöhung der MOI nicht weiter gesteigert werden konnte. In pAD- γ GT-infizierten NPK war die maximale spezifische Aktivität der γ GT nur etwa halb so groß wie in transfizierten APK. In CKZ war die spezifische γ GT-Aktivität nach MOI von 100 für pAD- γ GT annähernd gleich wie in transfizierten APK. In pAD- γ GT-infizierten APK konnte in Pilotexperimenten (MOI 50: 17 d alte Kultur mit $448 \pm 7 \mu\text{g}$ Protein pro Schale, $n = 2$; MOI 10 und 100: 15 d alte Kultur mit 621 ± 15 und $561 \pm 30 \mu\text{g}$ Protein pro Schale, $n = 3$) die Bildung von 3-Carboxy-4-nitroanilin durch Inkubation des Zellysatüberstands (5.3.4.1) mit Acivicin (1 mM, 30 min) von $400 \pm 20 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ auf $60 \pm 10 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ (MOI: 10), von $2600 \pm 20 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ auf $48 \pm 0 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ (MOI: 50) und von $5300 \pm 650 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ auf $600 \pm 100 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ (MOI: 100) verringert werden. Die nachgewiesene Steigerung der Bildung von 3-Carboxy-4-nitroanilin in pAD- γ GT-transfizierten APK war somit auf Erhöhung der γ GT-Aktivität zurückzuführen.

In Pilotexperimenten ergaben Messungen der intrazellulären GSx-Konzentration in pAD- γ GT-infizierten CKZ und NPK wesentlich niedrigere Werte als in kontrollinfizierten Zellen. Die intrazelluläre Konzentration an GSx war bei pAD- γ GT-infizierten NPK (4 d alte Kultur mit $105 \pm 10 \mu\text{g}$ Protein pro 35 mm-Schale, $n = 3$) mit $4,8 \pm 0,6 \text{ nmol}$

3.2 Vorkommen von γ Glutamyltranspeptidase in neuronalen Zellen

GSx/mg Protein ca. 70 % niedriger als in kontrollinfizierten Zellen ($17,3 \pm 1,0$ nmol GSx/mg Protein) und ca. 80 % niedriger als in nichtinfizierten Zellen ($21,1 \pm 2,3$ nmol GSx/mg Protein). In pAD- γ GT-infizierten CKZ (2 d alte Kultur, 190 ± 120 μ g Protein pro Schale, n = 2) war der zelluläre GSx-Gehalt etwa 96 % niedriger ($1,1 \pm 0,6$ nmol GSx/mg Protein) als in kontrollinfizierten Zellen ($27,0 \pm 1,7$ nmol GSx/mg Protein, 183 ± 6 μ g Protein pro Schale, n = 3). Zusätzliche Inkubation mit GSH (100 μ M, 4 h) ließ den intrazellulären GSx-Gehalt in CKZ auf ca. 50 % des Kontrollwertes ansteigen ($9,4 \pm 2,1$ nmol GSx/mg Protein, 124 ± 10 μ g Protein pro Schale, n = 3). Im Gegensatz dazu war in pAD- γ GT-infizierten NPK nach Inkubation mit GSH der zelluläre GSx-Gehalt ($23,0 \pm 1,7$ nmol GSx/mg Protein) nahezu identisch mit dem GSx-Gehalt nichtinfizierter Zellen. Aufgrund dieser extrem starken Beeinflussung des intrazellulären GSH-Gehaltes von Neuronen durch die Transfektion von γ GT wurden mit diesen Viren keine weiteren Versuche (z.B. für Neuroprotektionsexperimente *in vivo* und *in vitro*) durchgeführt.

Tabelle 11 Aktivität der γ GT in neuronalen Primärkulturen nach Infektion mit Adenoviren

Zellkultur	MOI	γ GT-Aktivität nmol/(min x mg)		Proteingehalt μ g/Schale	n
		pADEG	pAD- γ GT		
APK	10	$2,8 \pm 0,1$	400 ± 20	621 ± 15	3
	50	$5,3 \pm 1,5$	2600 ± 20	448 ± 7	2
	100	$6,4 \pm 1,8$	5300 ± 650	560 ± 30	3
CKZ	100	$10,2 \pm 9,3$	4350 ± 1860	200 ± 20	6
NPK	10	$0,5 \pm 0,1$	1130 ± 160	179 ± 11	3
	50	$0,5 \pm 0,1$	2160 ± 290	143 ± 12	3
	100	$2,3 \pm 2,4$	2260 ± 200	154 ± 5	3

APK (15 und 17 d alt), NPK (4 d alt) und CKZ (2 d bis 3 d alt) wurden mit pADEG (Kontrollvektor) oder pAD- γ GT zwei Tage (APK, NPK) oder fünf Tage (CKZ) lang inkubiert. Die Ausgangsaktivitäten der γ GT betragen bei APK $1,8 \pm 0,6$ nmol/(min x mg) (n = 6), bei NPK $0,30 \pm 0,03$ nmol/(min x mg) (n = 4). Bei CKZ standen nicht genügend Zellen für die Bestimmung des Ausgangswertes zur Verfügung. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD aus n Messungen, die an einer oder zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt wurden. Entsprechend der Größe der SD wurden die Werte teilweise gerundet um die Übersichtlichkeit zu erhöhen.

3.3 Extrazellulärer Stoffwechsel von Glutathiondisulfid

Astrogliazellen exportieren GSSG während chronischem oxidativem Streß (Hirrlinger *et al.*, 2001, 2002c). Da der Verbleib des extrazellulären GSSG im Gehirn nicht geklärt ist, wurde an APK das Potential von Astrogliazellen zum Umsatz von GSSG untersucht.

3.3.1 Umsatz von extrazellulärem Glutathiondisulfid durch neurale Zellen

Um die Stabilität von extrazellulärem GSSG in APK zu untersuchen, wurde GSSG in DMEM/PS gelöst und 24 h lang in An- und Abwesenheit von APK inkubiert. In Anwesenheit von Zellen war innerhalb von 24 h nahezu die Hälfte des zugegebenen GSSG verschwunden oder jedenfalls mit dem verwendeten GSx-Testsystem nicht mehr nachweisbar (Abb. 10). Im Gegensatz dazu nahm in Abwesenheit von Zellen die GSSG-Konzentration innerhalb von 24 h nur geringfügig ab (Abb. 10).

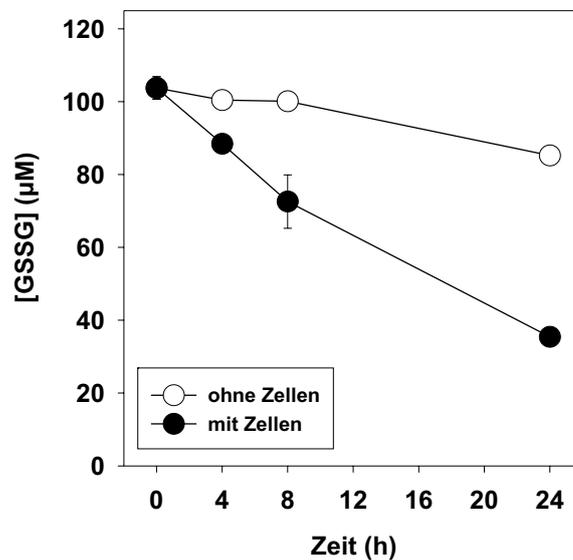


Abb. 10 Stabilität von GSSG in DMEM/PS. GSSG ($100 \mu\text{M}$) wurde in DMEM/PS in An- oder Abwesenheit von Zellen einer 15 d alten APK für die angegebenen Zeiten inkubiert.

Da substantielle Mengen an GSSG nur in Anwesenheit von Zellen verschwanden, wurde untersucht, ob dieser Effekt von vitalen, intakten Zellen abhängig war, auch in Gegenwart von Zellysaten auftrat oder von einem aus APK freigesetzten Faktor abhing. Dazu wurden intakte APK, Lysate von APK und gliakonditioniertes DMEM/PS auf ihr Potential zum Umsatz von GSSG getestet (Abb. 11). Die Lysate wurden mit Triton X-100 (0,1 bis 1 %) oder Digitonin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aus APK in *wells* von 24-*well*-Zellkulturplatten hergestellt. Das gliakonditionierte Medium wurde direkt vor dem Experiment durch 24stündige Inkubation von APK mit DMEM/PS hergestellt. Nach 24 h Inkubation von GSSG mit intakten Zellen oder den eingesetzten Lysaten von APK waren ca 50 % des eingesetzten GSSG nicht mehr nachweisbar (Abb. 11). Im Gegensatz dazu blieb in Abwesenheit von Zellen oder Lysaten die GSSG-Konzentration nahezu unverändert. Ebenso verringerte die Inkubation von GSSG in konditioniertem Medium in Abwesenheit von Zellen die GSSG-Konzentration nicht (Abb. 11). Die beobachtete Instabilität von GSSG ist somit vermutlich auf einen membranständigen und nicht auf einen sekretierten Faktor zurückzuführen.

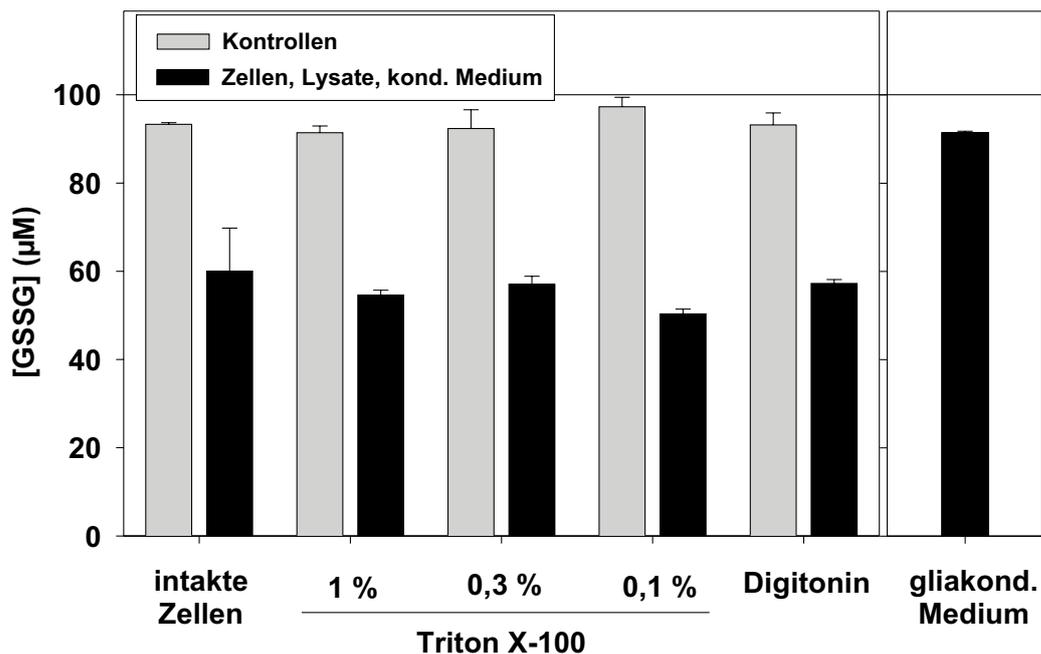


Abb. 11 Stabilität von GSSG in DMEM/PS in An- und Abwesenheit von Zellen oder Zellysaten. GSSG (0,1 mM) wurde 24 h lang mit oder ohne Zellen oder Zellysaten in DMEM/PS oder ohne Zellen in konditioniertem DMEM/PS inkubiert. Die Lysate wurden aus einer 20 d alten APK in *wells* von 24-*well*-Platten mit Triton X-100 (0,1 bis 1 %) oder Digitonin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hergestellt. Das gliakonditionierte Medium wurde durch 24 stündige Inkubation von APK mit DMEM/PS hergestellt.

3 Ergebnisse

Das Zellkulturmedium DMEM ist eine sehr komplexe Lösung vieler Substanzen (Dulbecco und Freeman, 1959). Um das Testsystem zur Messung des GSSG-Umsatzes zu vereinfachen und gleichzeitig eine Abhängigkeit dieses Prozesses von DMEM-Komponenten zu untersuchen, wurden APK mit GSSG 24 h lang in einer einfachen gepufferten Salzlösung (MM) vergleichend zu DMEM/PS inkubiert (Abb. 12). Dabei zeigte sich, daß in Gegensatz zu DMEM/PS (Abb. 12 B) GSSG in MM auch in Anwesenheit von APK nicht verschwand, sondern nach 24 h nahezu die gleiche Konzentration an extrazellulärem GSSG meßbar war wie vor der Inkubation (Abb. 12 A). Somit stimulieren eine oder mehrere Komponenten des DMEM/PS den beobachteten Umsatz von GSSG durch APK.

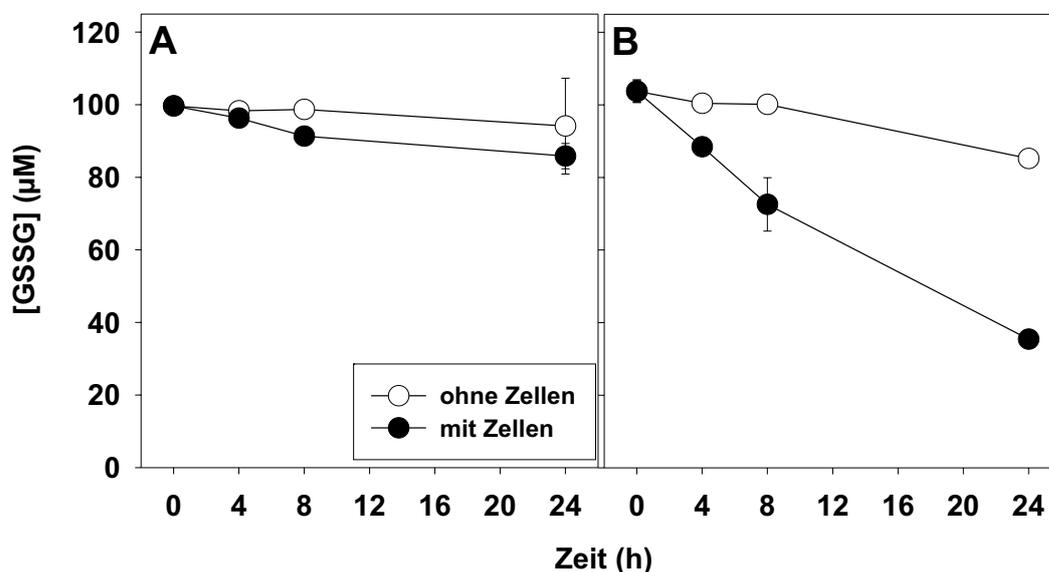


Abb. 12 Stabilität von GSSG in DMEM/PS oder MM in An- oder Abwesenheit von Zellen. 0,1 mM GSSG wurde in MM (A) oder DMEM/PS (B) in An- oder Abwesenheit von Zellen einer 15 d alten APK für die angegebenen Zeiten inkubiert.

3.3.1.1 Suche nach Cosubstraten

Um den beobachteten Umsatz von GSSG durch APK näher zu charakterisieren, wurden APK in DMEM/PS oder MM mit GSSG in Gegenwart verschiedener Substanzen inkubiert. Dabei wurde eine Beteiligung der γ GT durch Einsatz des Inhibitors Acivicin oder durch Gabe der bekannt guten γ GT-Substrate (Thompson und Meister, 1977; Taniguchi und Ikeda, 1998) Glutamin oder Methionin untersucht. Eine Beteiligung

von oxidativem Streß wurde durch Gabe antioxidativer Enzyme (Catalase und SOD), niedermolekularer Antioxidantien (GSH, Ascorbat) oder des Eisenchelators DFX untersucht. Keine dieser Substanzen führte zu einer Stimulation des Umsatzes von GSSG durch APK in MM oder zu einer Verringerung oder Steigerung des Umsatzes von GSSG durch APK in DMEM/PS (Tabelle 12).

Tabelle 12 Prüfung von Substanzen auf Beeinflussung der Stabilität von extrazellulärem GSSG im Medium von APK

Substanz	Konzentration	Effekt/Stimulierung	
		MM	DMEM/PS
Acivicin	100 μ M	nein	nein
Glutamin	1 mM	nein	n.u.
Methionin	1 mM	nein	n.u.
DFX	1 mM	n.u.	nein
SOD/Catalase	100 U / 100 U	n.u.	nein
GSH	1 μ M	nein	nein
	10 μ M	nein	nein
Ascorbinsäure	100 μ M	nein	nein

APK wurden mit 0,1 mM GSSG in MM oder DMEM/PS in Anwesenheit der angegebenen Substanzen 24 h lang inkubiert. Nach 24 h Inkubation von APK mit GSSG in MM wurden 81% der eingesetzten Menge an GSSG, nach Inkubation mit DMEM 35% nachgewiesen. Keine der angegebenen Substanzen verändert die Stabilität von GSSG im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (MM oder DMEM/PS). Mit Ausnahme des Acivicinexperiments, das dreimal durchgeführt wurde, wurden die gezeigten Experimente jeweils nur einmal durchgeführt. (n.u. = nicht untersucht)

Um zu untersuchen, welche Komponente(n) in DMEM/PS für den beobachteten GSSG-Umsatz durch APK benötigt wird, wurden die in DMEM – aber nicht in MM – enthaltenen Substanzen in fünf Gruppen zusammengefaßt und APK mit GSSG in MM inkubiert, das diese Testsubstanzen in der im DMEM enthaltenden Endkonzentration enthielt (Tabelle 13). Supplementierung von MM mit den Substanzen der Gruppe 1 (Isoleucin, Glycin, Arginin, Glutamin und Cystin (CSSC)) führte in APK zu der gleichen Abnahme der extrazellulären Konzentration an GSSG, wie sie bei APK beobachtet wurde, die mit GSSG in DMEM inkubiert wurden. Im Gegensatz dazu führten die anderen untersuchten Substanzgruppen zu keiner Beschleunigung des GSSG-Umsatzes (Tabelle 13).

Daraufhin wurden die Substanzen der Testgruppe 1 einzeln mit GSSG und APK in MM inkubiert. Nur die Gegenwart von Cystin wurde von APK in MM benötigt,

3 Ergebnisse

um dem Umsatz von GSSG auf Werte zu steigern, die durch DMEM ermöglicht wurden (Tabelle 14). Da von den vielen Komponenten des DMEM nur Cystin für den zellabhängigen Umsatz von GSSG benötigt wurde, sind die weiteren Experimente zur Untersuchung des an diesem Prozess beteiligten Mechanismus in MM (oder anderen Puffern) in Anwesenheit von Cystin durchgeführt worden.

Tabelle 13 Untersuchung von Komponenten des DMEM auf Beeinflussung des Umsatzes von extrazellulärem GSSG

	Substanz	Konzentration mM	Stimulation des GSSG-Umsatzes
Gruppe 1	Isoleucin	0,8	ja
	Glycin	0,4	
	Arginin	0,4	
	Glutamin	4,0	
	Cystin	0,4	
Gruppe 2	Histidin	0,14	nein
	Serin	0,4	
	Threonin	0,8	
	Phenylalanin	0,4	
	Methionin	0,2	
Gruppe 3	Lysin	0,8	nein
	Leucin	0,8	
	Valin	0,8	
	Tyrosin	0,4	
	Tryptophan	0,08	
Gruppe 4	Inositol	0,04	nein
	Cholin	0,03	
	Pyruvat	0,1	
	Fe (NO ₃) ₃	2,5 × 10 ⁻⁴	
Gruppe 5	Thiamin	0,12	nein
	Nicotinamid	0,03	
	Riboflavin	0,13	

APK wurden in MM mit 0,1 mM GSSG in Anwesenheit der angegebenen Substanzgruppen 24 h lang inkubiert. Das Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

Tabelle 14 Effekt der in Gruppe 1 (Tabelle 13) enthaltenen Substanzen auf den Umsatz von extrazellulärem GSSG

Substanz	Konzentration mM	Stimulation des GSSG-Umsatzes
Isoleucin	0,8	nein
Glycin	0,4	nein
Arginin	0,4	nein
Glutamin	4,0	nein
Cystin	0,4	ja

APK wurden in MM mit 0,1 mM GSSG in Anwesenheit der angegebenen Substanzen 24 h lang inkubiert.

3.3.1.2 Identifizierung des Redoxzustandes des nachgewiesenen Gesamtglutathions

Bei den bisher beschriebenen Experimenten wurde das eingesetzte GSSG als GSx bestimmt. Um zu untersuchen, ob das im Medium bestimmte GSx wirklich als GSSG vorlag, und ob intakte Zellen in APK GSSG aus dem Medium aufnehmen, wurden APK mit GSSG und/oder Cystin 6 h lang in MM inkubiert. Anschließend wurden Gesamtglutathion und GSSG in Zellen und Medium bestimmt. Aus der Differenz wurde die Menge an vorhandenem GSH berechnet. Nur in Gegenwart von GSSG und Cystin wurde eine Abnahme der extrazellulären Konzentration an GSSG durch APK beobachtet (Abb. 13 B). Unter allen untersuchten Bedingungen lag extrazelluläres GSx nahezu vollständig in oxidiertem Form als GSSG vor (Abb. 13 B). Somit wurde bei den weiteren im Rahmen vorliegender Arbeit durchgeführten Experimenten auf die Derivatisierung der Proben zur Bestimmung des GSSG-Anteils am GSx verzichtet und extrazelluläres GSx mit GSSG gleichgesetzt. Im Gegensatz zum extrazellulären GSx lag intrazelluläres GSx fast vollständig in reduzierter Form als GSH vor (Abb. 13 A). Der Gehalt an Glutathion blieb während der Inkubation mit GSSG und Cystin in den Zellen nahezu konstant. Wurden die Zellen in Abwesenheit von Cystin 6 h lang inkubiert, nahm der zelluläre GSx-Gehalt um ca. 40 % ab, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von GSSG (Abb. 13 A).

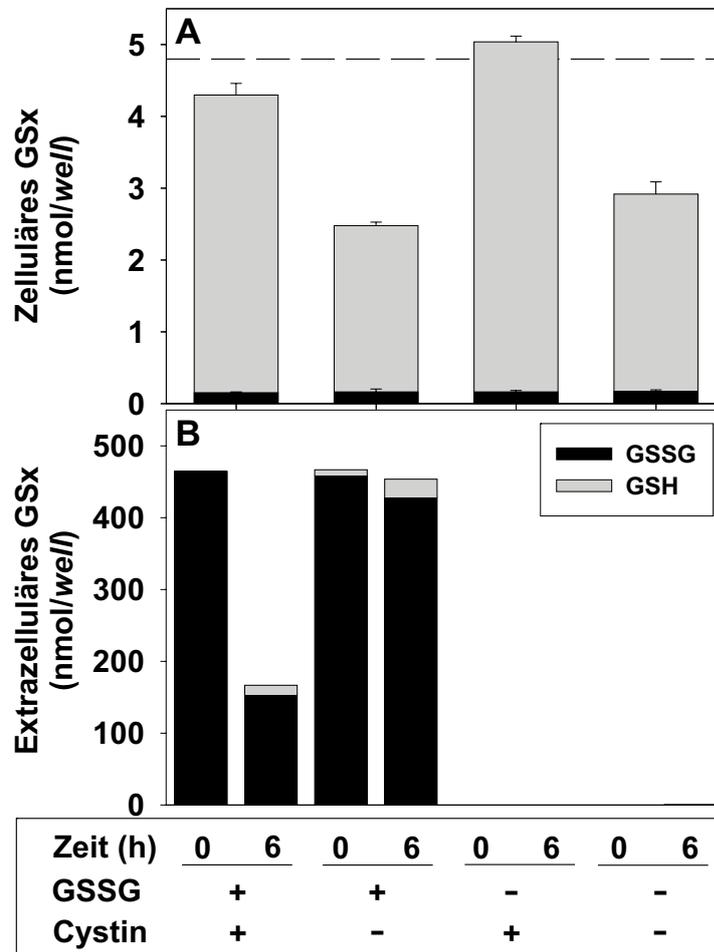


Abb. 13 Anteil des GSSG am zellulären (A) und extrazellulären (B) GSx-Gehalt von APK. Die Zellen wurden in MM mit 0,2 mM GSSG und/oder 0,5 mM Cystin für 6 h inkubiert. Dargestellt sind der GSx-Gehalt in Zellen (A) und Medium (B) sowie die jeweiligen Anteile von GSH (grau) und GSSG (schwarz) am Gesamt-Glutathion vor und nach der Inkubation. Die gestrichelte Linie in A stellt den Ausgangsgehalt an zellulärem GSx dar ($4,8 \pm 0,2$ nmol pro well). Die Kultur war zum Zeitpunkt der Inkubation 15 d alt und enthielt 118 ± 5 μ g Protein pro well.

3.3.1.3 Bedingungen des Glutathionumsatzes

Proteinabhängigkeit Der Umsatz von extrazellulärem GSSG in APK war abhängig von der Anwesenheit von Zellen oder von Zellysaten (Abb. 11). Um zu untersuchen, ob der Umsatz von GSSG von der Menge an Zellmaterial abhing, wurden GSSG und Cystin in MM mit verschiedenen Mengen an APK-Lysat inkubiert, das mit Digitonin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$, 1 ml pro Kulturschale mit 50 mm Durchmesser) hergestellt worden war. Triton X-100-Lysate wurden für solche Experimente nicht herangezogen, um Störungen des Proteinbestimmungstests nach Lowry *et al.* (1951) durch das Detergenz (Lottspeich und Zorbas, 1998) zu vermeiden. Mit zunehmender Menge an Lysat nahm der Umsatz von GSSG bis zu einer Menge von 80 % zu (Abb. 14). Somit war der GSSG-Umsatz von der Menge an zugesetztem Lysat abhängig.

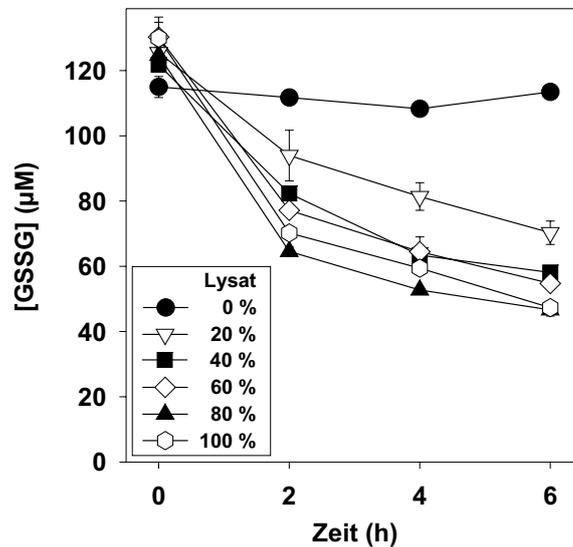


Abb. 14 Abhängigkeit der Abnahme der GSSG-Konzentration von der Lysatmenge. 0,1 mM GSSG wurden in MM mit 0,2 mM Cystin und verschiedenen Mengen an Zellysate für bis zu 6 h inkubiert. Das Lysate wurde durch Inkubation einer 22 d alten APK mit $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ Digitonin hergestellt. 100 % Lysate enthielten $1,00 \pm 0,02 \text{ mg}$ Protein.

Zeitabhängigkeit Um den Verlauf des Umsatzes von extrazellulärem GSSG in APK zu untersuchen, wurden intakte Zellen bis zu 48 h lang mit GSSG und Cystin in MM inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Konzentration an GSSG wurde bestimmt. Abb. 15 zeigt einen typischen Verlauf der Konzentrationsabnahme von extrazellulärem GSSG. Nach einer Verzögerungsphase von 1-2 h

folgte bis zu 8 h ein schneller, nahezu linear mit der Zeit verlaufender Umsatz von GSSG bis zu 8 h. Danach verlangsamte sich der Umsatz von GSSG (Abb. 15)

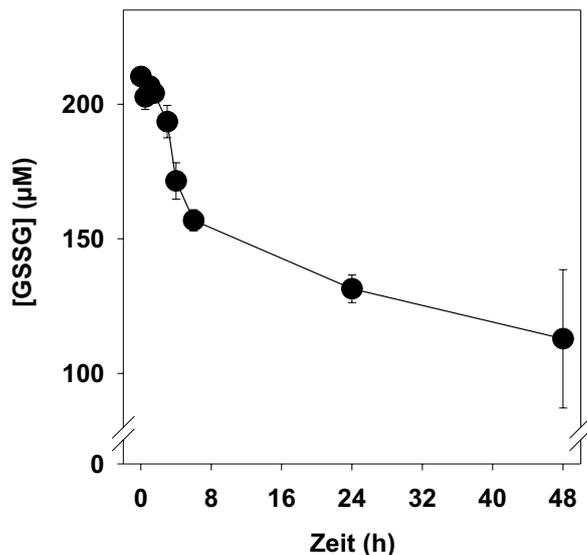


Abb. 15 Verlauf des Verschwindens von extrazellulärem GSSG in einer APK. Die 18 d alte APK wurde mit 0,2 mM GSSG und 0,2 mM Cystin in MM bis zu 48 h lang inkubiert.

Substratabhängigkeit Als weiterer Parameter zur Charakterisierung des Umsatzes von GSSG in APK wurde die Abhängigkeit von der Konzentration der Substrate GSSG und CSSC untersucht. Mit steigender Anfangskonzentration an GSSG steigerte sich innerhalb einer 6stündigen Inkubation von APK mit 0,5 mM Cystin der GSSG-Umsatz (Abb. 16 A). Die aus den linear abfallenden Bereichen der Zeitabhängigkeit berechneten Umsatzgeschwindigkeiten für GSSG zeigten eine nahezu proportionale Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der GSSG-Konzentration (Abb. 16 B). Abb. 16 C und D zeigen die Abhängigkeit des GSSG-Umsatzes von der eingesetzten Konzentration des zweiten Substrats Cystin bei konstanter Konzentration an GSSG (0,2 mM). Mit steigender Konzentration an Cystin beschleunigte sich das Verschwinden von GSSG (Abb. 16 C). Die berechneten Umsatzgeschwindigkeiten für GSSG waren nahezu proportional zur eingesetzten Cystin-Konzentration (Abb. 16 D).

GSSG wurde in APK nur in Anwesenheit von Cystin umgesetzt. Um zu klären, ob der Umsatz von GSSG spezifisch von der Anwesenheit des Disulfids Cystin abhängt, oder Cystin durch andere Disulfide ersetzt werden kann, wurden APK mit GSSG in Gegenwart verschiedener Disulfide in MM inkubiert. In intakten APK war ein

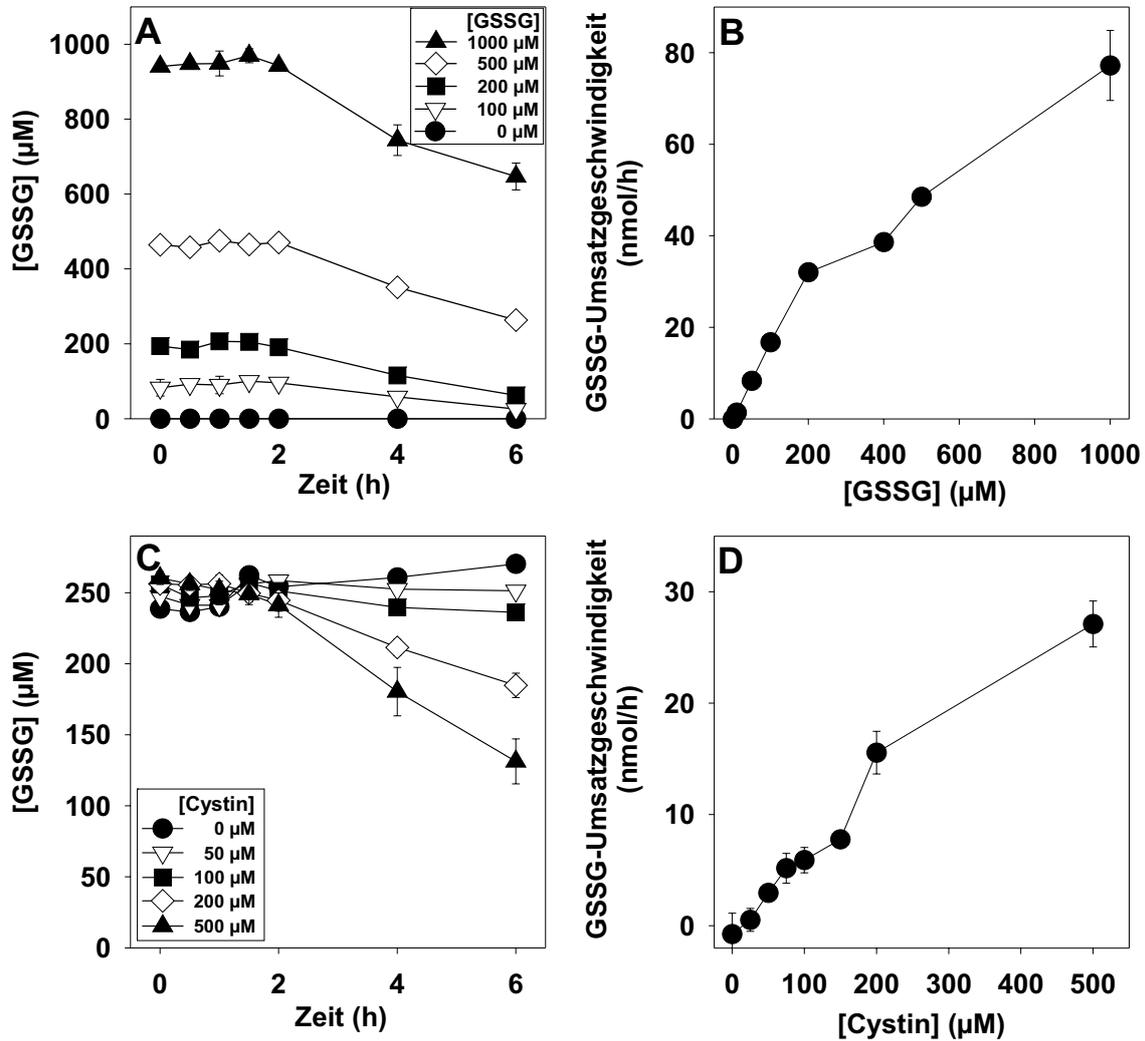


Abb. 16 Abhängigkeit des Verschwindens von GSSG im Medium von APK von den Konzentrationen an GSSG und Cystin. APK wurden bis zu 6 h lang in MM bei den angegebenen Konzentrationen an GSSG (A, B) bzw. Cystin (C, D) in Anwesenheit von 0,5 mM Cystin (A, B) bzw. 0,2 mM GSSG (C, D) inkubiert. A und C zeigen die Zeitabhängigkeit des Verschwindens von GSSG. Aus dem linearen Absinken der Konzentration an GSSG zwischen 2 und 6 h wurden die GSSG-Umsatzgeschwindigkeiten berechnet, die in B und D dargestellt sind. Die Kulturen waren zum Zeitpunkt der Experimente 20 d (A, B) bzw. 17 d (C, D) alt.

Verschwinden von extrazellulärem GSSG nur in Gegenwart von L-Cystin nachweisbar. Im Gegensatz dazu ermöglichten die Disulfide D-Cystin, DTNB, (CysGly)₂, (GlyCys)₂ und N-Acetylcystin (NAC_{ox}) keinen Umsatz von GSSG durch APK (Abb. 17).

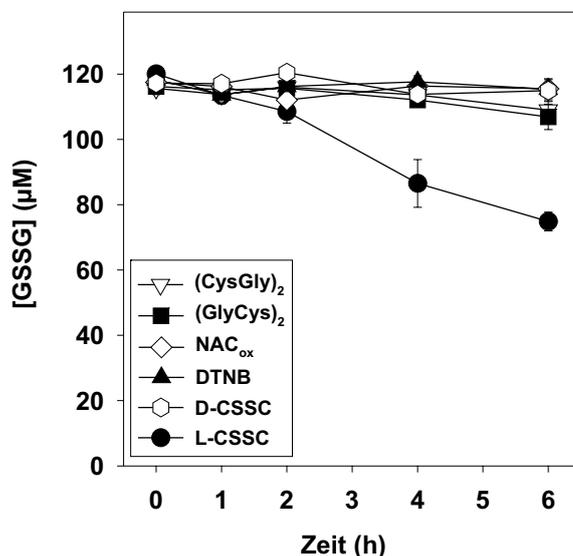


Abb. 17 Untersuchung der Disulfidabhängigkeit des Umsatzes von extrazellulärem GSSG im Medium von APK. Eine 19 d alte APK wurde mit 0,1 mM GSSG in MM in Anwesenheit der angegebenen Disulfide (0,1 mM) 6 h lang inkubiert.

3.3.1.4 Inhibierung des Umsatzes von Glutathiondisulfid

Extrazelluläre Protein-Disulfidisomerase (PDI) oder ähnliche Enzyme (Terada *et al.*, 1995; Yoshimori *et al.*, 1990; Mandel *et al.*, 1993; Rafter und Harmison, 1979) könnten an dem beobachteten Umsatz von GSSG durch APK beteiligt sein. Da PDI durch Bacitracin und 5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoesäure) (DTNB) inhibiert wird (Roth, 1981; Mizunaga *et al.*, 1990; Feener *et al.*, 1990; Ryser *et al.*, 1991) und ein nicht näher charakterisiertes Enzym, das GSSG und Cystin zu einem gemischten Disulfid reagieren läßt, durch Iodacetamid (IAA), Cu²⁺ und DTNB (Rafter und Harmison, 1979) gehemmt wird, wurden diese Substanzen auf ihr Potential zur Beeinflussung des Umsatzes von GSSG in APK untersucht. In Gegenwart von CuSO₄ (Abb. 18 A), IAA oder DTNB (Abb. 18 B) war der Umsatz von extrazellulärem GSSG durch APK vollständig gehemmt. Im Gegensatz dazu beeinflusste Bacitracin den Umsatz von GSSG nicht (Abb. 18 A).

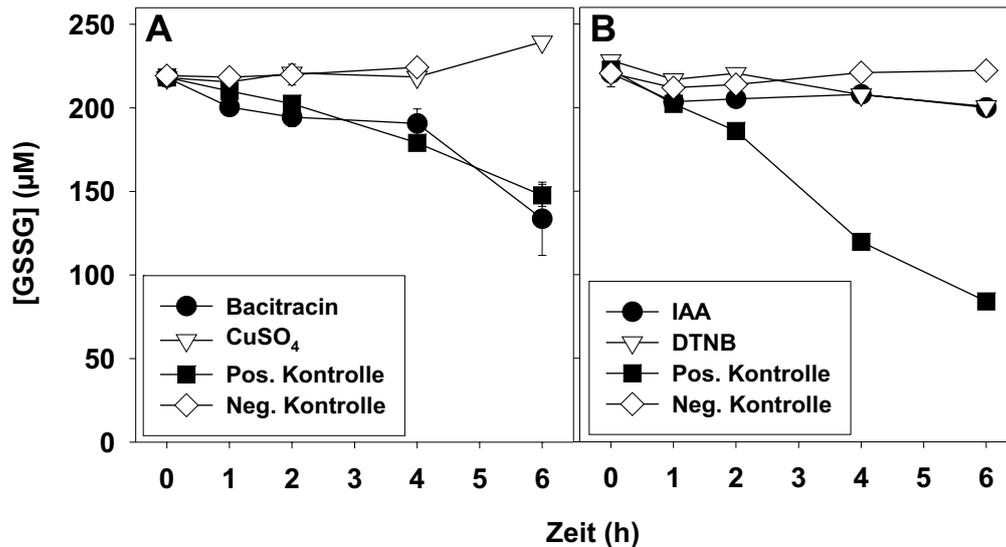


Abb. 18 Inhibition des Verschwindens von GSSG im Medium von APK. Die Zellen wurden 6 h lang mit GSSG (0,2 mM) und Cystin (0,5 mM) in MM in Abwesenheit (Positivkontrolle) oder Anwesenheit der angegebenen Substanzen (jeweils 1 mM; nur CuSO₄ 20 µM) inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt GSSG, aber kein Cystin. Die Kulturen war zum Zeitpunkt des Experiments 16 d (A) bzw. 19 d (B) alt und enthielten 110 ± 4 bzw. 151 ± 4 µg Protein pro well.

3.3.1.5 Vergleich verschiedener neuraler Zellkulturtypen

Um zu überprüfen, ob neben Astrogliazellen auch andere neurale Zellen extrazelluläres GSSG umsetzen können, wurde der Umsatz von GSSG auch an NPK und MSK-A untersucht. Wie bei APK verringerte sich auch in Kulturen von Neuronen und Microgliazellen die extrazelluläre Konzentration an GSSG in Gegenwart von Cystin. Allerdings wurde für APK die höchste spezifische Umsatzgeschwindigkeit für GSSG bestimmt. Im Vergleich dazu betrug die Umsatzgeschwindigkeit für GSSG in MSK etwa 75 %, in NPK etwa 40 % derjenigen in APK (Tabelle 15). Bedingt durch die hohen Standardabweichungen waren die beobachteten Unterschiede zwischen den verschiedenen neuronalen Zellkulturen jedoch nicht signifikant.

3.3.2 Umsatz von Glutathiondisulfid durch Zellysate

Die bisher beschriebenen Experimente zum Umsatz von GSSG waren an intakten Zellen oder an Zellysaten in Zellkulturmedien (DMEM, MM) durchgeführt worden. Dieser experimentelle Ansatz war problematisch, da die Resultate verschiedener Experimente zum Teil erheblich zwischen verschiedenen Kulturen schwankten. Zudem ist in carbonatgepufferten Lösungen ein konstanter pH-Wert schwierig einzuhalten,

Tabelle 15 Spezifische Umsatzgeschwindigkeit von extrazellulärem GSSG in neuronalen Zellkulturen

Zellkultur	Umsatzgeschwindigkeit nmol/(min × mg)	Proteingehalt µg/well	n
APK	168 ± 79	123 ± 18	7
MSK-A	94 ± 26	27 ± 12	3
NPK	51 ± 9	44 ± 21	3

Die Zellen wurden mit GSSG (0,2 mM) und Cystin (0,5 mM) in MM, je nach Zellkulturtyp, 6 bis 25 h lang inkubiert. Die Umsatzgeschwindigkeit wurde aus dem linearen Absinken der Konzentration an GSSG errechnet. Die Daten stammen aus n Experimenten, die an unabhängigen Kulturen durchgeführt wurden. Die Unterschiede der Umsatzgeschwindigkeiten von GSSG in den verschiedenen Kulturen sind nicht signifikant.

wenn Zellen zur Probenentnahme häufig aus dem Inkubator genommen werden. Daher sollte zur Untersuchung des Umsatzes von GSSG durch Zellysate ein Testsystem mit geschlossenem Puffersystem in Microtiterplatten etabliert werden, um umfangreichere Experimente zur Untersuchung der Kinetik und der Stöchiometrie des Umsatzes von GSSG mit geringerem Zellbedarf durchführen zu können.

3.3.2.1 Etablierung eines Testsystems im Mikrotiterformat

Umsatz von GSSG in APK und Lysaten von APK Um zu untersuchen, ob sich die für den Umsatz von GSSG verantwortliche Aktivität durch die Lyse von Zellen gegenüber der Aktivität intakter Zellen verändert, wurden APK oder APK-Lysate mit GSSG und Cystin in MM inkubiert. Die Aktivität zum Umsatz von GSSG in Lysaten aus Digitonin oder Triton X-100 war nahezu identisch mit der Aktivität von nicht lysierten APK (Abb. 19).

Umsatz von GSSG in Zellfraktionen Um zu untersuchen, ob sich die für den Umsatz von GSSG verantwortliche Aktivität in Lysaten von APK durch Zentrifugation (5 min, 14.000 x g) niederschlagen ließ, wurden GSSG und Cystin in MM mit Lysaten von APK sowie mit Überstand und Niederschlag (resuspendiert in MM) der Zentrifugation dieser Lysate inkubiert. Die Aktivität der Lysate mit Triton X-100 oder Digitonin aus APK wurde jeweils nahezu vollständig im Überstand der Lysate nachgewiesen (Abb. 20). Die Inkubation mit Zentrifugationsniederschlägen führte allenfalls

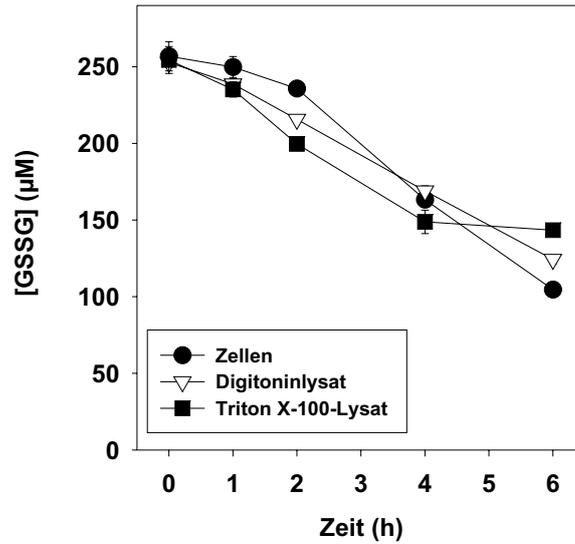


Abb. 19 Umsatz von GSSG in intakten APK und APK-Lysaten. GSSG (0,2 mM) wurde in MM mit Cystin (0,5 mM) in Anwesenheit von Zellen oder Zellysaten bis zu 6 h lang inkubiert. Die Lysate wurden mit Digitonin (100 µg/ml) oder Triton X-100 (0,1 %) aus einer 15 d alten APK in *wells* von 24-*well*-Platten hergestellt, die 142 ± 3 µg Protein pro *well* enthielt.

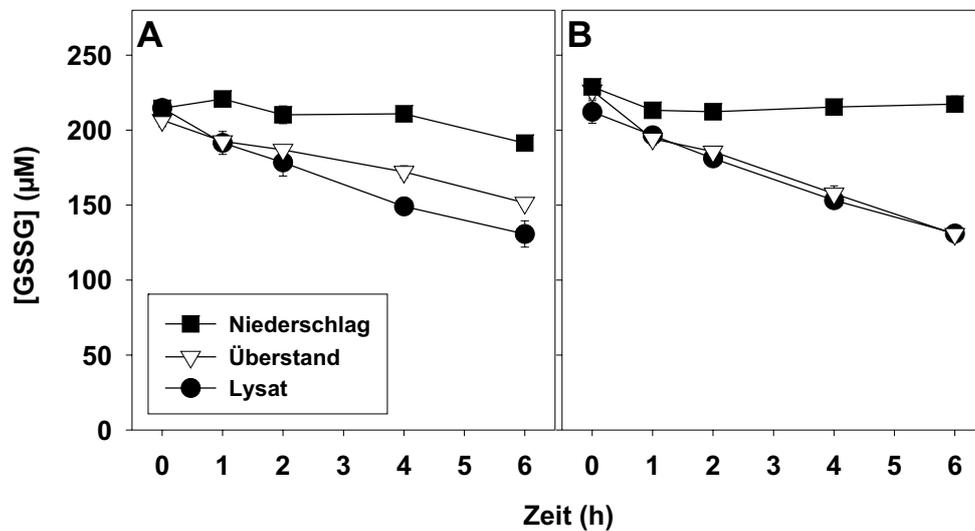


Abb. 20 Umsatz von GSSG in Zellysaten von APK, sowie im Überstand und Niederschlag zentrifugierter Lysate. GSSG (0,2 mM) wurde in MM mit Cystin (0,5 mM) in Anwesenheit von Zellysaten bzw. deren Zentrifugationsüberständen und -niederschlägen bis zu 6 h lang inkubiert. Die Lysate wurden mit Digitonin (100 µg/ml) (A) oder Triton X-100 (0,1 %) (B) aus einer 15 d alten APK in *wells* von 24-*well*-Platten hergestellt, die 142 ± 3 µg Protein pro *well* enthielt.

zu einer geringen Abnahme der Konzentration an GSSG. Die Umsatzgeschwindigkeiten von GSSG für Lysate aus APK, die mit Digitonin oder Triton X-100 hergestellt wurden, waren nahezu identisch. Deshalb wurden in den folgenden Experimenten Digitoninlysate eingesetzt, um Störungen durch Triton X-100 bei der Bestimmung der Proteinmenge (Lottspeich und Zorbas, 1998) zu vermeiden.

pH-Wert und Puffer Um die Abhängigkeit des GSSG-Umsatzes von pH-Wert und Puffersubstanzen zu untersuchen, wurden GSSG und Cystin in *wells* von Microtiterplatten mit Lysatüberständen in verschiedenen Puffern inkubiert. Dabei stellte sich heraus, daß die Umsatzgeschwindigkeit von GSSG in Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) identisch war mit der in HEPES-NaOH-Puffer (pH 7,4) und höher als die in HEPES-Inkubationspuffer (IP) (Abb. 21). Die Geschwindigkeit des Umsatzes von GSSG nahm mit steigendem pH-Wert in Tris-HCl- und HEPES-NaOH-Puffer zu. Als Puffer für die im folgenden beschriebenen Experimente wurde Tris-HCl pH 8,2 gewählt, da für diesen Puffer die höchste Umsatzgeschwindigkeit bestimmt worden war (Abb. 21).

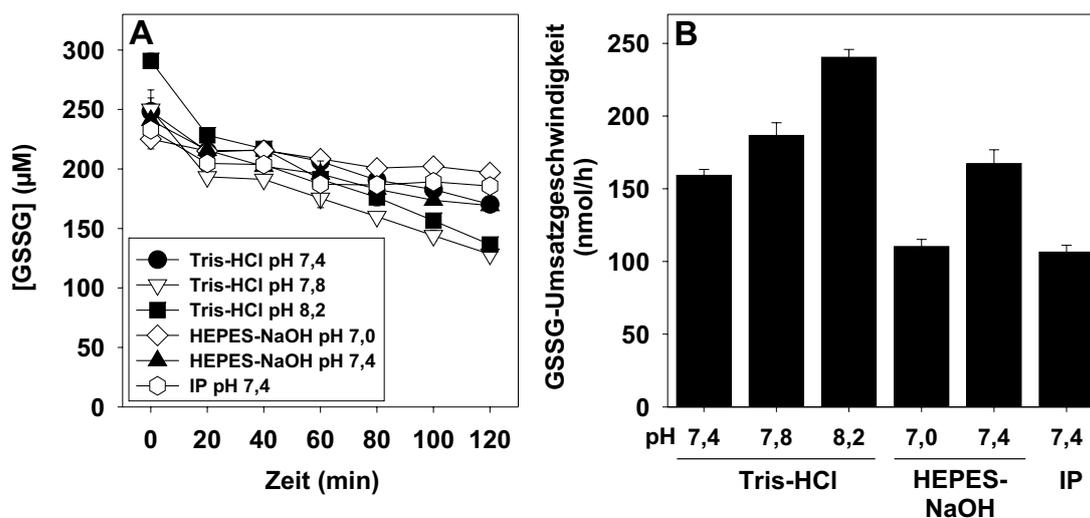


Abb. 21 pH-Wert- und Pufferabhängigkeit des Umsatzes von GSSG in Lysaten von APK. GSSG (0,2 mM) wurden in Anwesenheit von Cystin (0,5 mM) und 50 μ l Lysatüberstand 2 h lang mit den angegebenen Puffern (25 mM; IP 20 mM) inkubiert (A). Die Geschwindigkeiten des Umsatzes von GSSG (B) wurden aus der linearen Abnahme der Konzentration an GSSG zwischen 20 und 120 min errechnet. Das Lysat wurde mit Digitonin (100 μ g/ml; 1 ml pro Schale mit 50 mm Durchmesser) aus einer 14 d alten APK hergestellt und enthielt 1,7 mg Protein pro ml. (IP: 20 mM HEPES, 1,8 mM CaCl_2 , 145 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0,8 mM Na_2HPO_4 , mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt)

Lysatüberstand Wie bereits gezeigt (Abb. 14), war der Umsatz von GSSG abhängig von der Menge an zugesetztem APK-Lysat. Diese Resultate sollten für den experimentellen Ansatz in *wells* von Microtiterplatten bestätigt werden. Deshalb wurden GSSG und Cystin in *wells* von Microtiterplatten mit verschiedenen Mengen an Lysatüberstand inkubiert. Mit steigender Lysatmenge beschleunigte sich die Abnahme der Konzentration an extrazellulärem GSSG (Abb. 22 A). Dabei nahm auch die Umsatzgeschwindigkeit von GSSG nahezu linear mit der Lysatmenge zu (Abb. 22 B). Somit bestätigt der Test in Microtiterplatten die Lysatabhängigkeit des Umsatzes von GSSG.

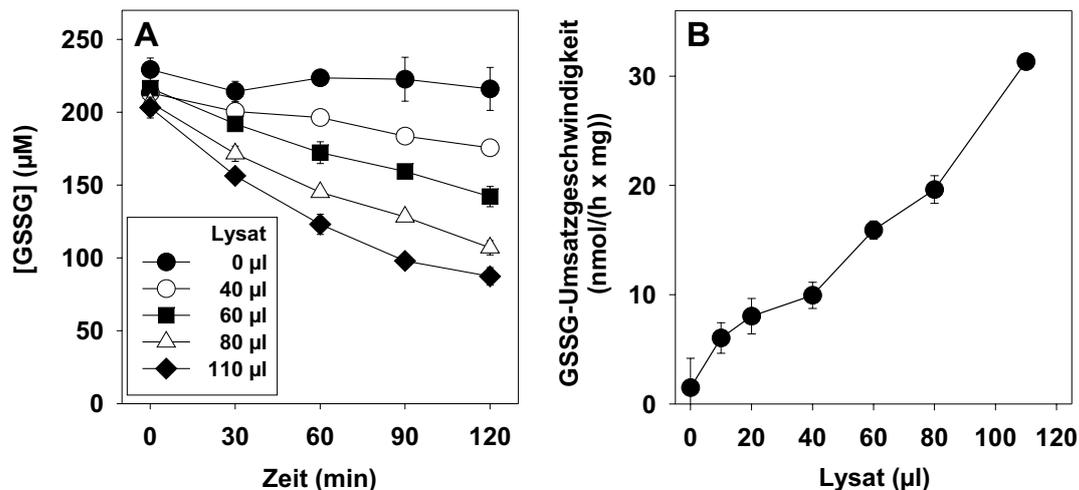


Abb. 22 Abhängigkeit des Umsatzes von GSSG von der dem Reaktionsansatz zugegebenen Menge an Lysatüberstand. GSSG (0,2 mM) wurde in Tris-HCl (25 mM, pH 8,2) mit Cystin (0,5 mM) bis zu 2 h lang mit verschiedenen Mengen an Zellysätüberstand inkubiert (A). Die Umsatzgeschwindigkeit (B) wurde aus dem linearen Absinken der Konzentration an GSSG errechnet. Der Lysatüberstand enthielt $1,46 \pm 0,04$ mg Protein pro ml. Das Lysat wurde mit Digitonin (100 μ g/ml; 1 ml pro Schale mit 50 mm Durchmesser) aus einer 20 d alten APK hergestellt.

Denaturierung und Filtration Die Geschwindigkeit des Umsatzes von GSSG war abhängig von der Anwesenheit des Lysats oder des Lysatüberstands aus APK und von deren Menge. Das ließ auf das Vorkommen eines am Umsatz von GSSG beteiligten Enzyms im Lysatüberstand schließen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Lysatüberstände vor der Inkubation 15 min gekocht oder durch Filter mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa filtriert. Danach wurden die gekochten Überstände bzw. das Filtrat mit GSSG und Cystin in *wells* einer Microtiterplatte inkubiert. Nach Filtration erzeugten Lysatüberstände keinen nachweisbaren Umsatz von GSSG mehr; Kochen der Lysatüberstände verlangsamte den Umsatz von GSSG (Abb. 23).

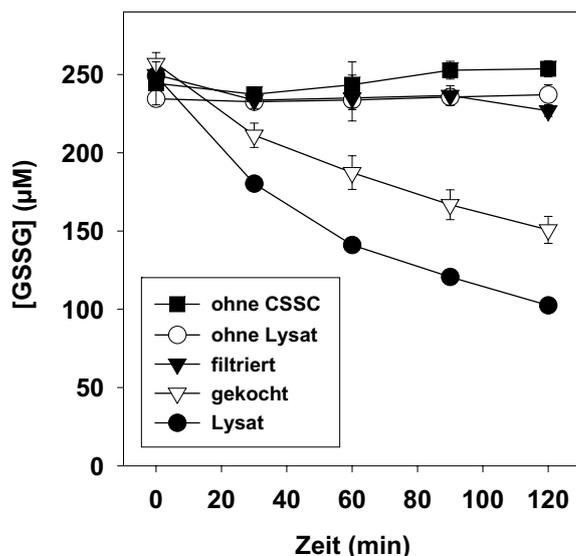


Abb. 23 Einfluß von Hitzebehandlung und Filtration von APK-Lysatüberständen auf den Umsatz von GSSG. Zellysateüberstände wurden vor der Inkubation filtriert (10 kDa Ausschlußgrenze) oder hitzebehandelt (15 min). 50 µl Lysatüberstand wurden bis zu 2 h lang mit GSSG (0,2 mM) und Cystin (0,5 mM) in Tris-HCl (25 mM, pH 8,2) inkubiert. Der Lysatüberstand enthielt $1,25 \pm 0,01$ mg Protein pro ml. Das Lysat wurde mit Digitonin (100 µg/ml; 1 ml pro Schale mit 50 mm Durchmesser) aus einer 14 d alten APK hergestellt.

3.3.2.2 Substratabhängigkeit des Glutathionumsatzes

Der Umsatz von GSSG in APK-Lysaten war abhängig von der Konzentration der Substrate GSSG und Cystin (Abb. 16). Entsprechende Untersuchungen wurden ebenfalls mit Lysatüberständen in Microtiterplatten durchgeführt. Auch hier war das Verschwinden von GSSG abhängig von den Konzentrationen an GSSG (Abb. 24 A, B) und Cystin (Abb. 24 C, D). Mit steigender Konzentration der Substrate beschleunigte sich der Umsatz von GSSG. Im Gegensatz zu der linearen Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von den Substratkonzentrationen bei der Untersuchung des Umsatzes von GSSG an intakten Zellen (Abb. 16 B, D), erreichten Umsatzgeschwindigkeiten in Experimenten mit Lysatüberständen bei hohen Konzentrationen an GSSG oder Cystin ein Plateau (Abb. 24 B, D). Die erhaltenen Daten wurden nach Lineweaver-Burk linearisiert und V_{\max} - und K_M -Werte für den Umsatz von GSSG berechnet. Dabei zeigten sich extreme Unterschiede für die kinetischen Parameter, die in den einzelnen Experimenten bestimmt worden waren (Tabelle 16). Deshalb wurden die Ergebnisse der einzelnen Experimente aufgeführt.

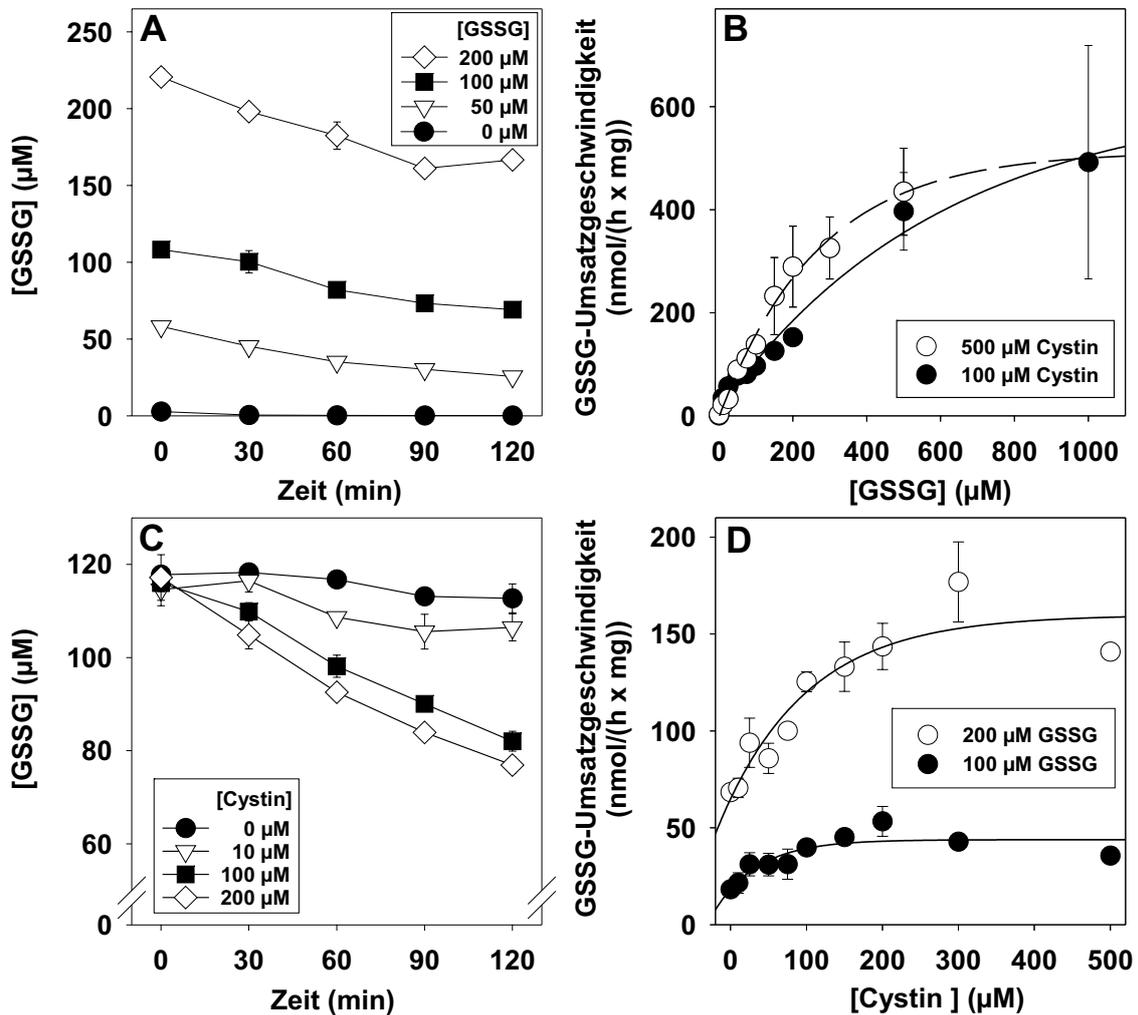


Abb. 24 Substratabhängiger GSSG-Umsatz in Lysatüberständen von APK. 50 μ l Lysatüberstand wurden in Tris-HCl (25 mM, pH 8,2) bis zu 2 h lang mit GSSG (A, B) bzw. Cystin (C, D) in den angegebenen Konzentrationen in Anwesenheit von Cystin (0,5 mM) (A, B) bzw. GSSG (0,2 mM) (C, D) inkubiert. A und C zeigen die Zeitabhängigkeit des Umsatzes von GSSG. Aus dem linearen Absinken der Konzentration an GSSG zwischen 0 und 2 h wurden die Umsatzgeschwindigkeiten berechnet, die in C und D dargestellt sind. Der Lysatüberstand enthielt $1,96 \pm 0,08$ mg Protein (A, B) bzw. $1,73 \pm 0,10$ mg (0,1 mM GSSG) und $1,92 \pm 0,05$ mg (0,2 mM GSSG) Protein (C, D) pro ml. Das Lysat wurde mit Digitonin (100 μ g/ml; 1 ml pro Schale mit 50 mm Durchmesser) aus einer 24 d alten (A, B) bzw. 21 d alten (C, D) APK hergestellt.

3 Ergebnisse

Untersuchungen zur Stöchiometrie der Substrate GSSG und Cystin beim Umsatz von extrazellulärem GSSG durch Lysatüberstände von APK zeigten ebenfalls heterogene Ergebnisse. Bei diesen Experimenten wurden Lysatüberstände von APK 48 h lang mit GSSG oder Cystin und Cystin bzw. GSSG variiertes Konzentration inkubiert. Das Verhältnis des Verbrauchs der beiden Substrate (GSSG : Cystin) lag je nach Experiment zwischen 1:2 und 1:8 (Daten nicht gezeigt). Ursache der Unterschiede zwischen den Experimenten ist vermutlich eine Inkonsistenz der experimentellen Durchführung für die Vielzahl an Ansätzen bei diesen umfangreichen Experimenten sowie die Durchführung der Experimente unter unsterilen Bedingungen.

Tabelle 16 Kinetische Parameter des Umsatzes von GSSG in Lysatüberständen von APK

	Experiment Nr.	K_M μM	V_{\max} $\text{nmol}/(\text{mg} \times \text{h})$
<u>Cystin-Abhängigkeit</u>			
100 μM GSSG	CR221	126	659
	CR226	38	192
	CR228	52	192
200 μM GSSG	CR226	125	1900
	CR228	149	4900
	CR231	251	424
<u>GSSG-Abhängigkeit</u>			
100 μM Cystin	CR223	64	223
	CR227	111	555
	CR230	247	681
500 μM Cystin	CR223	180	256
	CR227	455	936

50 μl Lysatüberstand wurden in Tris-HCl (25 mM, pH 8,2) bis zu 2 h lang mit GSSG bzw. Cystin variiertes Konzentration in Anwesenheit von 0,1 und 0,5 mM Cystin bzw. 0,1 und 0,2 mM GSSG inkubiert. Die erhaltenen Daten wurden nach Lineweaver-Burk linearisiert und V_{\max} - und K_M -Werte für den Umsatz von GSSG berechnet. Das Lysat wurde mit Digitonin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (1 ml pro Schale mit 50 mm Durchmesser) aus 14 d bis 21 d alten APK hergestellt.

Die Abhängigkeit des Umsatzes von GSSG vom Substrat Cystin war bei intakten Zellen sehr spezifisch (Abb. 17). Um zu untersuchen, ob der Umsatz von GSSG in Lysatüberständen ebenfalls spezifisch von der Anwesenheit von Cystin abhängt, oder Cystin durch andere Disulfide ersetzt werden kann, wurden Lysatüberstände von

APK mit GSSG in Gegenwart verschiedener Disulfide in *wells* von Microtiterplatten inkubiert. In Lysatüberständen war der Umsatz von GSSG nicht nur in Gegenwart von L-Cystin nachweisbar, sondern auch in Gegenwart von (GlyCys)₂, (CysGly)₂ und D-Cystin. NAC_{ox} und DTNB ermöglichten keinen Umsatz von GSSG durch Lysatüberstände von APK (Abb. 25).

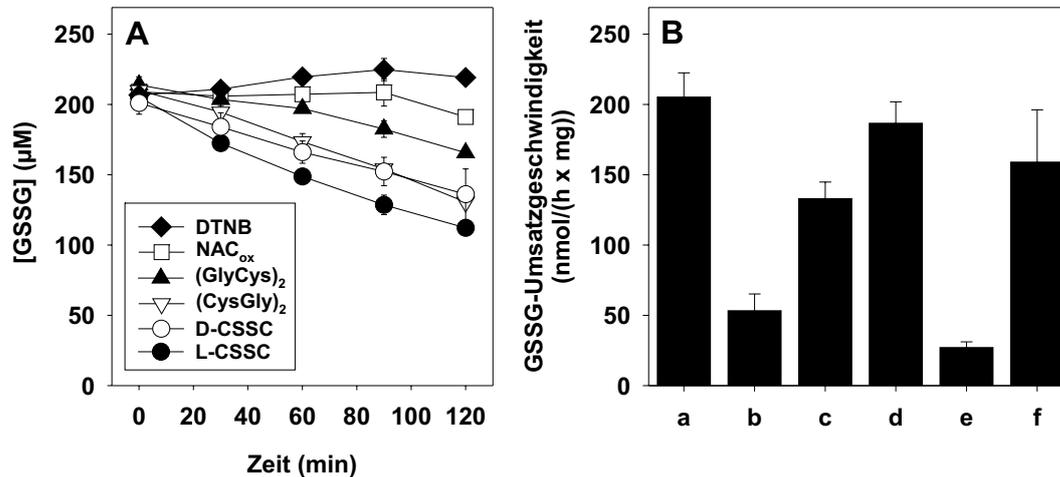


Abb. 25 Disulfidabhängigkeit des Verschwindens von GSSG in Lysatüberständen von APK. 50 µl Lysatüberstand wurden bis zu 2 h lang mit GSSG (0,2 mM) in Tris-HCl (25 mM, pH 8,2) in Anwesenheit der angegebenen Disulfide (0,5 mM) inkubiert (A). Die Umsatzgeschwindigkeiten (B) wurden aus dem linearen Absinken der Konzentrationen an GSSG errechnet. Der Lysatüberstand enthielt $1,56 \pm 0,01$ mg Protein pro ml. Das Lysat wurde mit Digitonin (100 µg/ml; 1 ml pro Schale mit 50 mm Durchmesser) aus einer 21 d alten APK hergestellt. (a: L-Cystin, b: NAC_{ox}, c: (GlyCys)₂, d: (CysGly)₂, e: DTNB, f: D-Cystin)

3.3.2.3 Inhibierung des Glutathionumsatzes

Der Umsatz von GSSG konnte in intakten APK durch Inhibitoren der PDI und ähnlicher Enzyme gehemmt werden (Abb. 18). Um zu untersuchen, ob der Umsatz von GSSG durch Lysatüberstände von APK ebenfalls durch diese Inhibitoren gehemmt werden kann, wurden Lysatüberstände von APK mit GSSG und Cystin in Gegenwart von IAA, DTNB, Bacitracin, CuSO₄, NAC_{ox} und D-Cystin in *wells* von Microtiterplatten inkubiert. Der Umsatz von GSSG durch Lysatüberstände von APK konnte durch IAA, DTNB und CuSO₄ gehemmt werden. Bacitracin verlangsamte den Umsatz von GSSG. Im Gegensatz dazu wurde der Umsatz von GSSG durch NAC_{ox} und D-Cystin nicht beeinflusst (Abb. 26).

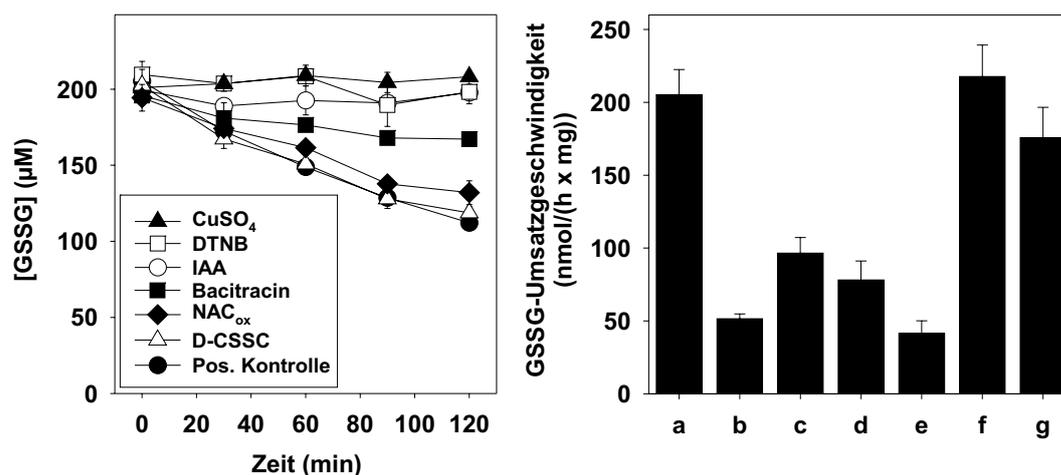


Abb. 26 Inhibition des GSSG-Umsatzes in Lysatüberständen von APK. 50 µl Lysatüberstand wurden bis zu 2 h lang mit GSSG (0,2 mM) und Cystin (0,5 mM) in Tris-HCl (25 mM, pH 8,2) in Abwesenheit (Positivkontrolle) oder Anwesenheit der angegebenen Substanzen (jeweils 1 mM, nur CuSO₄ 20 µM) inkubiert (A). Die Umsatzgeschwindigkeiten (B) wurden aus dem linearen Absinken der Konzentrationen an GSSG zwischen 0 und 120 min errechnet. Der Lysatüberstand enthielt $1,56 \pm 0,01$ mg Protein pro ml. Das Lysat wurde mit Digitonin (100 µg/ml; 1 ml pro Schale mit 50 mm Durchmesser) aus einer 21 d alten APK hergestellt. (a: Positivkontrolle, b: IAA, c: Bacitracin, d: DTNB, e: CuSO₄, f: D-Cystin, g: NAC_{ox})

3.3.3 Massenspektrometrische Analyse von Reaktionsansätzen

Die bisher beschriebenen Experimente haben den Umsatz von GSSG in Zellkulturen und in Lysaten von APK untersucht. Um auch den Verbrauch des am Umsatz von GSSG beteiligten essentiellen Cosubstrates Cystin zu untersuchen und gleichzeitig Informationen über die Identität möglicher Reaktionsprodukte zu gewinnen, wurden verschiedene Reaktionsansätze durch massenspektrometrische Analysen untersucht. Dafür wurde GSSG mit Cystin in An- oder Abwesenheit von Lysatüberstand aus APK in Microtiterplatten 2 h lang in 25 mM Tris-HCl, pH 8,2 bei 37 °C inkubiert. Die Positiv-Ionen-ESI-Massenspektren der Inkubation von GSSG mit Cystin und Lysatüberstand sind in Abb. 27 dargestellt. Die komplexe Zusammensetzung der Spektren wird durch die große Zahl von Signalen verdeutlicht. Das intensivste Signal hatte ein Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von 427,1 (Abb. 27 A). In Abwesenheit von Lysatüberstand (Abb. 27 B) oder in Anwesenheit filtrierten oder hitzedenaturierten Lysatübersänden wurde nur ein schwaches Signal bei 427,1 m/z detektiert (Abb. 27 C, D). Desweiteren sind in den in Abb. 27 gezeigten Massenspektren die einfach geladenen $[M+H]^+$ -Molekülonen der Ausgangssubstanzen GSSG (612,1 Da) und Cystin (240,3 Da) bei 613,1 bzw 241,2 m/z zu sehen, was durch die massenspektrometrischen

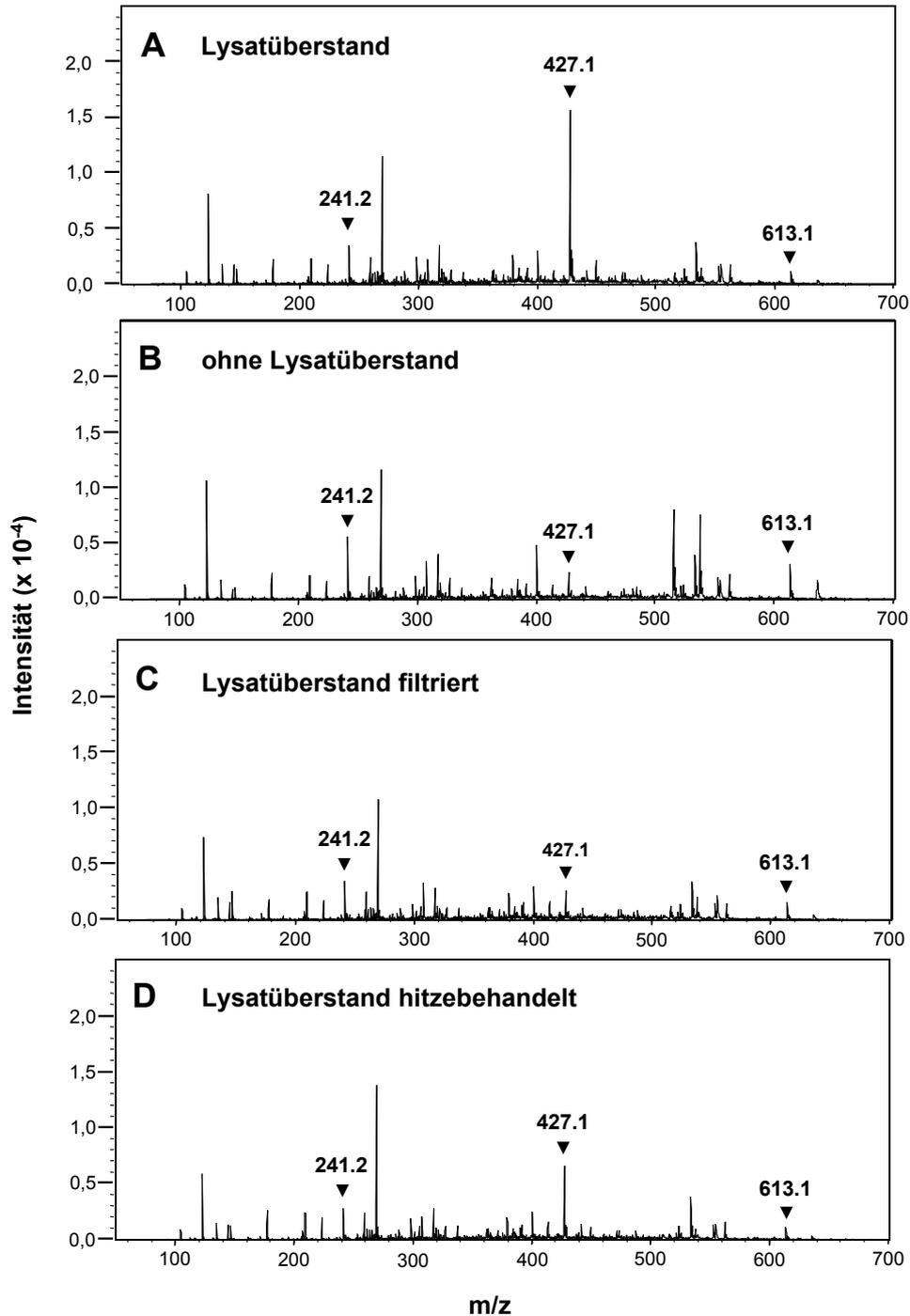


Abb. 27 Massenspektrometrische Analyse der Reaktionsansätze. GSSG (0,2 mM) und Cystin (0,5 mM) wurden 2 h lang in Tris-HCl (25 mM, pH 8,2) in Anwesenheit (A) oder Abwesenheit (B) von Lysatüberstand sowie in Anwesenheit von filtriertem (C) oder hitzebehandeltem (D) Lysatüberstand inkubiert. Der Lysatüberstand enthielt $1,14 \pm 0,02$ mg Protein pro ml. Das Lysat wurde mit Digitonin (100 μ g/ml) aus einer 14 d alten APK hergestellt. Die Abb. zeigen die Positiv-Ionen-ESI-Massenspektren (FIA-Modus) im Bereich von 75 bis 700 m/z.

Analysen der Reinsubstanzen GSSG und Cystin nachgewiesen wird (Abb. 28 A, B). Die Signalintensitäten der in Abb. 27 dargestellten massenspektrometrischen Analysen sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die Intensität des Signals bei 427,1 m/z war nach Inkubation von GSSG und Cystin in Anwesenheit von Lysatüberstand am höchsten. Bei Inkubation von GSSG und Cystin in Abwesenheit von Lysatüberstand oder in Anwesenheit von filtriertem Lysatüberstand war die Intensität des Signals bei 427 m/z 85 % niedriger als bei Inkubation mit Lysatüberstand. Im Gegensatz dazu war die Intensität des Signals bei Inkubation mit hitzebehandeltem Lysatüberstand ca. 60 % niedriger als bei Inkubation mit unbehandeltem Lysatüberstand (Tabelle 17). Die Intensitäten der Signale der Edukte GSSG und Cystin waren nach Inkubation in Abwesenheit von Lysatüberstand am höchsten. In Anwesenheit von unbehandeltem oder behandeltem Lysatüberstand waren die Intensitäten des Signals für Cystin bei 241,2 m/z um 40 bis 50 % reduziert, die Intensitäten des Signals für GSSG bei 613,1 m/z waren um 50 bis 66 % erniedrigt (Tabelle 17).

Tabelle 17 Intensitäten wichtiger Signale der massenspektrometrischen Analysen

Bedingung	Intensität $\times 10^4$		
	241,2 m/z	613,1 m/z	427,1 m/z
A: Lysatüberstand	0,35	0,10	1,60
B: ohne Lysatüberstand	0,60	0,30	0,25
C: filtrierter Lysatüberstand	0,35	0,15	0,25
D: hitzebehandelter Lysatüberstand	0,30	0,10	0,65

Die Daten sind die Intensitäten der Signale der massenspektrometrischen Analysen, die in Abb. 27 dargestellt sind.

Nach Inkubation von GSSG mit Cystein oder von GSH mit Cystin in Abwesenheit von Zellysatüberstand wurde ebenfalls ein intensives Signal bei 427,1 m/z nachgewiesen (Abb. 28 C, D). Im Gegensatz dazu entstand bei der Reaktion von Cystin mit dem Dipeptid CysGly ein Produkt, das ein intensives Signal bei 298,1 m/z aufwies (Abb. 28 E). Das Signal bei 355,1 m/z stammte vermutlich vom einfach geladenen $[M+H]^+$ -Molekülion der oxidierten Form des Dipeptids (CysGly)₂ (354,1 Da).

Zur weiteren Identifizierung des Produkts des Umsatzes von GSSG wurden die Analysen der Reaktionsansätze mit GSSG, Cystin und Lysatüberstand aus APK bzw. GSSG mit Cystein im fragmentierenden MS/MS-Modus auf die jeweiligen Analytmoleküle durchgeführt. Abb. 29 zeigt die Positiv-Ionen-ESI-Tandem-Massenspektren (FIA-Modus), die bei der MS/MS-Analyse der Signale bei 427,1 m/z aufgenom-

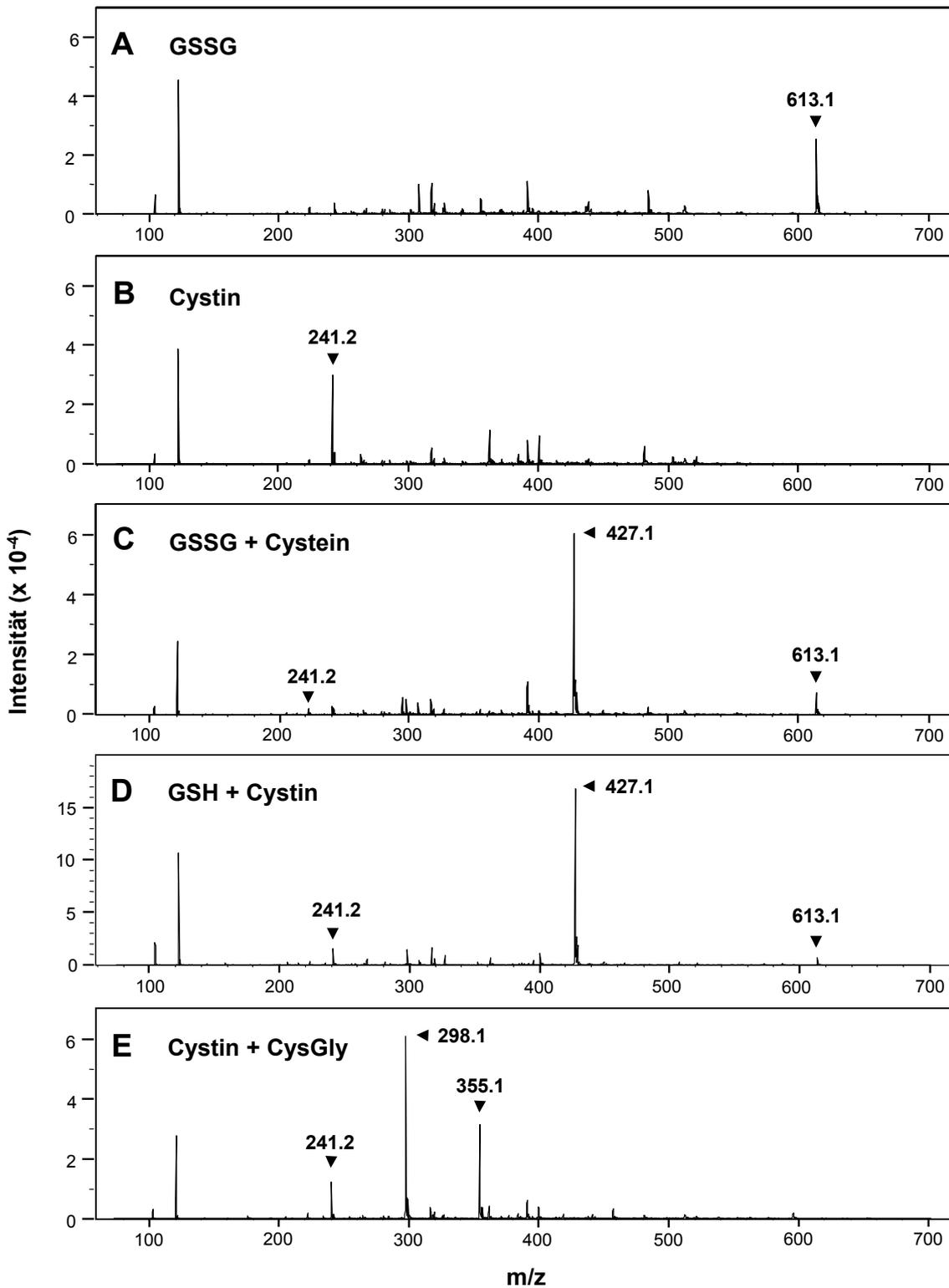


Abb. 28 Massenspektrometrische Analyse von Kontrollexperimenten. In Tris-HCl (25 mM, pH 8,2) wurden für 2 h die Ausgangssubstanzen GSSG (A) und Cystin (B) sowie GSSG mit Cystein (C) und GSH mit Cystin (D) und Cystin mit CysGly (E) (alle 0,5 mM) inkubiert. Die Abb. zeigen die Positiv-Ionen-ESI-Massenspektren (FIA-Modus) im Bereich von 75 bis 700 m/z.

3 Ergebnisse

men wurde. Bei den Analysen wurde das Molekülion ($427,1\text{ m/z}$) mittels CID (*collision induced dissociation*) in der Ionenfalle fragmentiert. Infolge der Niederenergie-Stoßaktivierung bildete sich ein charakteristisches Fragment-Ion bei $298,1\text{ m/z}$. Bei dem Fragment-Ion handelt es sich um ein Disulfid aus CysGly und Cystein ($297,1\text{ Da}$), welches sich vermutlich durch Abspaltung eines Glutamatrestes aus dem gemischten Disulfid aus GSH und Cystein bildete. Ein entsprechendes Molekülion von $298,1\text{ m/z}$ wurde ebenfalls nach Reaktion von Cystin mit dem Dipeptid CysGly nachgewiesen (Abb. 28 E).

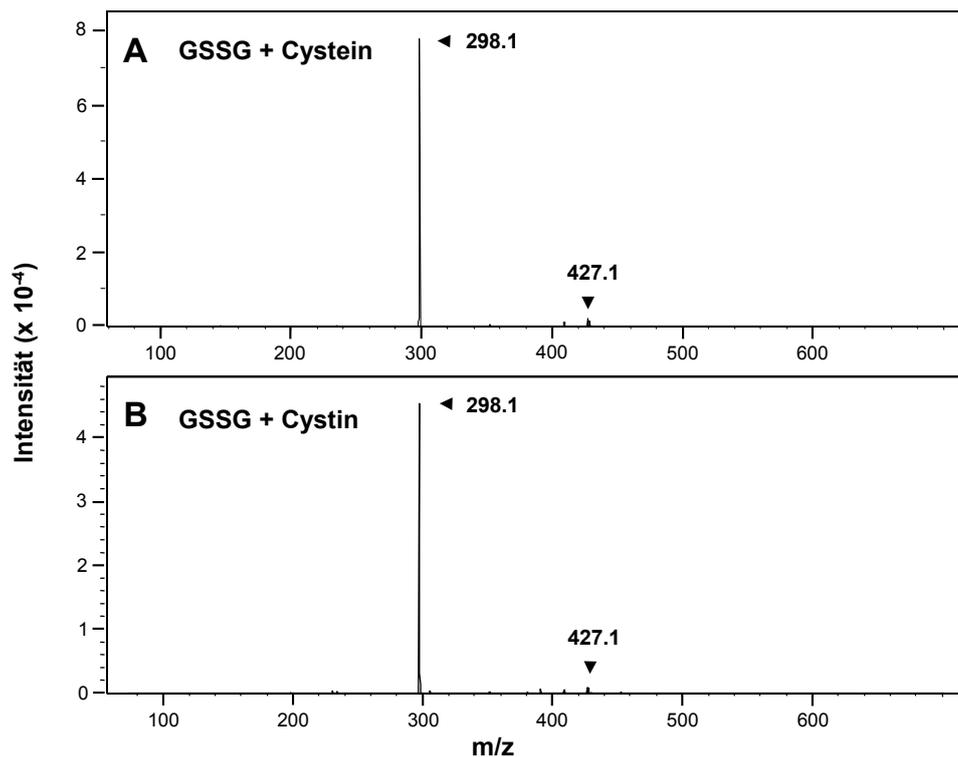


Abb. 29 Fragmentierung des $[M+H]^+$ -Molekülions bei $427,1\text{ m/z}$. Fragmentiert wurden Proben der Inkubation von GSSG mit Cystein (je $0,5\text{ mM}$) (A) sowie von GSSG ($0,2\text{ mM}$) und Cystin ($0,5\text{ mM}$) mit Lysatüberstand aus APK (B) in 25 mM Tris-HCl pH 8,2. Der Lysatüberstand enthielt $1,14 \pm 0,02\text{ mg}$ Protein pro ml. Das Lysat wurde mit Digitonin ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) aus einer 14 d alten APK hergestellt. Die Abb. zeigt die Positiv-Ionen-ESI-Tandem-Massenspektren (FIA-Modus), die bei den MS/MS-Analysen aufgenommen wurden.

Vergleichend zu den massenspektrometrischen Analysen der Reaktion von GSSG und Cystin in Gegenwart von Lysatüberständen wurden GSSG und Cystin auch in An- und Abwesenheit von nicht lysierten APK in MM 2 h lang bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Das Positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum der Inkubation von GSSG mit Cystin und nicht-lysierten APK konnte jedoch nicht ausgewertet werden, da die im MM enthaltenen

3.3 Extrazellulärer Stoffwechsel von *Glutathiondisulfid*

Salze und/oder das Phenolrot die massenspektrometrischen Analysen störten.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der verwendeten neuronalen Zellkulturen

Um den extrazellulären Glutathionstoffwechsel von Gehirnzellen zu untersuchen, wurden etablierte Zellkulturen verwendet, die für Neuronen, Astrogliazellen, Microgliazellen und Oligodendrogliazellen angereichert waren (Hamprecht und Löffler, 1985; Löffler *et al.*, 1986; Dringen *et al.*, 1999a; Hirrlinger *et al.*, 2000, 2002b). Immunocytochemische Anfärbungen von APK, NPK und MSK-A bestätigten Literaturdaten (Reinhart *et al.*, 1990; Dringen *et al.*, 1999a; Hirrlinger *et al.*, 2000), daß diese Kulturen überwiegend aus den jeweiligen Hauptzelltypen bestehen. Damit waren die Kulturen geeignete Kulturmodelle für die Untersuchung von Astrocyten, Neuronen und Microglia.

Die Präparation von MSK-A nach der Methode von Hirrlinger *et al.* (2000) basiert darauf, daß Microgliazellen sich leichter von dem Zellrasen von APK ablösen als andere Gliazellen. Dabei werden durch mehrmaliges Klopfen an den Zellkulturflaschen die aufsitzenden Microgliazellen abgelöst. Die Ausbeute an Zellen ist bei dieser Methode gering, daher wurde eine zweite Methode zur Präparation von Microgliazellkulturen (MSK-B) etabliert, die auf einer milden Trypsinierung von APK basiert (Saura *et al.*, 2003). Die Astrogliazellen werden bei dieser Methode als zusammenhängende Zellschicht vom Boden der Kulturschalen abgelöst und können leicht entfernt werden. Übrig bleibt die Population von Microgliazellen, die sich in APK unter der Astrogliazellschicht befindet. Methode B ist unkomplizierter als Methode A, weil bereits APK in die Zellkulturschalen angesät werden, in denen später MSK-B für Experimente eingesetzt werden sollten. MSK-B bestehen zu 96 % aus Ox42-positiven Zellen und sind damit hoch angereichert an Microgliazellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Saura *et al.* (2003), deren MSK zu 98 % Ox-42-positiv waren. Im Gegensatz dazu sind Zellen in MSK-A nur zu 91 % Ox-42-positiv (Hirrlinger *et al.*, 2000). Die Zellen beider Kulturarten (MSK-A und MSK-B) hatten amöboi-

de oder stäbchenähnliche Formen. Diese Morphologie von Microgliazellen in MSK-A und MSK-B ist ebenfalls bereits beschrieben worden (Hirrlinger *et al.*, 2000; Saura *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden MSK-B nur zur Untersuchung der basalen spezifischen Aktivität der γ GT genutzt, da Methode B erst zum Ende der experimentellen Phase etabliert wurde.

4.2 γ Glutamyltranspeptidase in Gehirnzellen

Die Expression der γ GT wurde für verschiedene Gehirnzelltypen in Kultur auf der Ebene der mRNA sowie auf der Ebene der Enzymaktivität untersucht. Die qualitative Untersuchung des Vorkommens von mRNA der γ GT in neuronalen Zellen mittels RT-PCR zeigte, daß in allen untersuchten Zellkulturtypen mRNA der γ GT enthalten ist.

Auch die Aktivität der γ GT wurde in den verschiedenen neuronalen Zellkulturen bestimmt. Die spezifische Aktivität der γ GT in unbehandelten APK war nahezu identisch mit bereits publizierten Daten zur γ GT-Aktivitäten in kultivierten Astrogliazellen (Shine *et al.*, 1981; Stastny *et al.*, 1988; Dringen *et al.*, 1997a). Eine wesentlich höhere spezifische γ GT-Aktivität (bis zu 6mal höher) wurde für kultivierte Astrogliazellen von anderen Autoren berichtet (Garcion *et al.*, 1999; Gegg *et al.*, 2003). Sehr wahrscheinlich sind solche Unterschiede in der spezifischen γ GT-Aktivität auf unterschiedliche Kulturbedingungen und verschiedene Meßsysteme zurückzuführen. Der γ GT-Inhibitor Acivicin (Stole *et al.*, 1994) inhibierte die analysierte Reaktion fast vollständig. Daher wurde das Testsystem als geeignet für die Quantifizierung der spezifischen Aktivität der γ GT von Gehirnzellen in Kultur angesehen.

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der γ GT verschiedener Gehirnzelltypen zeigte, daß Gliazellen in Kultur höhere spezifische Aktivitäten an γ GT enthalten als Neuronen. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen (Shine und Haber, 1981) und scheinen auch die *in vivo*-Situation widerzuspiegeln. Im Parenchym des Gehirns wurde γ GT-Immunoreaktivität hauptsächlich in Gliazellen gefunden (Shine und Haber, 1981; Philbert *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997) und nur in geringem Ausmaß in Neuronen (Shine und Haber, 1981; Philbert *et al.*, 1995). Unter den verschiedenen Zelltypen in Kultur, die hier untersucht wurden, hatten Astrogliazellen und Oligodendrogliazellen die höchsten spezifischen Aktivitäten der γ GT. Die hohen SD der Werte für OSK könnten eine Folge von Verunreinigungen der Kulturen durch Astrogliazellen sein. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß Astrocyten und Oligodendrocyten auch im Gehirn höhere γ GT-Aktivitäten aufweisen als Microglia.

4.3 Modulation der Aktivität der γ Glutamyltranspeptidase

Um mögliche Veränderungen der Aktivität der γ GT in APK hervorzurufen, wurden APK mit einer Auswahl von Substanzen inkubiert, die über verschiedene Mechanismen Einfluß auf den Glutathionstoffwechsel nehmen könnten. Dabei zeigte sich, daß $\text{TNF}\alpha$, FAC und $\text{IFN}\gamma$ + LPS die spezifische Aktivität der γ GT in APK erhöhten. Da der Anstieg der spezifischen γ GT-Aktivität durch $\text{IFN}\gamma$ und LPS in Astrogliazellen schon beschrieben war (Garcion *et al.*, 1999), wurde dieser Effekt in vorliegender Arbeit in weiteren Experimenten bestätigt, dann aber nicht weiter verfolgt.

4.3.1 Tumor-Nekrose-Faktor α und NO

Die Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ beeinflusste die Expression von γ GT in Astrogliazellen in Kultur stark. Das Cytokin ließ die spezifische Aktivität der γ GT in einer zeit- und konzentrationsabhängigen Weise ansteigen. Dieser von $\text{TNF}\alpha$ vermittelte Effekt auf die astrogliale γ GT ist analog zu der Steigerung der γ GT-Aktivitäten in Leber und Nieren transgener Mäuse, die humanen $\text{TNF}\alpha$ exprimieren (Glosli *et al.*, 2002). Die spezifische Aktivität der γ GT in Astrogliazellen stieg nach Gabe von $\text{TNF}\alpha$ innerhalb von 24 h um 40 % und innerhalb von 48 h auf das 4,5fache. Ein solcher Anstieg ist schon früher von Astrogliazellen, die 24 h lang mit LPS oder dem NO-Donor DETA/NO (Diethylentriamine/NO-Addukt) inkubiert wurden, berichtet worden (Garcion *et al.*, 1999; Gegg *et al.*, 2003). Da LPS die Produktion von $\text{TNF}\alpha$ in Astrogliazellen anregt (Chung und Benveniste, 1990; Hamano *et al.*, 2002), könnte der beobachtete Effekt von LPS auf die astrogliale γ GT-Aktivität indirekt durch $\text{TNF}\alpha$ vermittelt sein. Weiterhin können auch eine Induktion der iNOS (Da Silva *et al.*, 1997) und eine NO-vermittelte Steigerung der γ GT-Synthese zum Anstieg der spezifischen γ GT-Aktivität in Astrogliazellen durch $\text{TNF}\alpha$ beitragen.

Der durch $\text{TNF}\alpha$ stimulierte Anstieg der astroglialen γ GT wurde durch Cycloheximid unterdrückt. Daher scheinen Induktion der Expression der γ GT durch $\text{TNF}\alpha$ und *de novo*-Synthese des Enzyms verantwortlich für den beobachteten Anstieg der γ GT-Aktivität zu sein. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß $\text{TNF}\alpha$ über Stabilisierung der mRNA der γ GT oder über verlangsamten Abbau des Enzyms am Anstieg der γ GT-Aktivität beteiligt ist.

Gesteigerte Expression astroglialer Gene durch $\text{TNF}\alpha$ in Konzentrationen bis zu 100 ng/ml wurde bereits für Phospholipase A₂ (Oka und Arita, 1991), Transferrin

(Oh *et al.*, 1993), iNOS (Da Silva *et al.*, 1997) und den TNFR2 (Lung *et al.*, 2001) beschrieben.

Die Induktion der Genexpression in Astrogliazellen durch $\text{TNF}\alpha$ wird höchstwahrscheinlich über astrogliale TNFR vermittelt. Im Gehirn werden $\text{TNF}\alpha$ und TNFR-1 konstitutiv in sehr geringen Mengen exprimiert (Bette *et al.*, 2003), nach Induktion durch LPS oder bei Erkrankungen des Gehirns wird vermehrt TNFR2, hauptsächlich von Microglia, gebildet (Sippy *et al.*, 1995; Bette *et al.*, 2003). Auch Astrogliazellen in Kultur exprimieren konstitutiv TNFR1 (Tada *et al.*, 1994; Lung *et al.*, 2001; Dopp *et al.*, 1997; Aranguéz *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu benötigt die Expression von TNFR2 eine Induktion durch Cytokine (Lung *et al.*, 2001). Von TNFR ist bekannt, daß sie Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Lee *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2003) über MAP-Signalkaskaden (Chen und Goeddel, 2002; Wajant *et al.*, 2003) aktivieren. Beispielsweise vermittelt AP-1 die Transkription des Collagenase-Gens in humanen Fibroblasten, die durch $\text{TNF}\alpha$ stimuliert wurden. Auf dem humanen γGT -Gen sind potentielle Bindungsstellen für AP-1 identifiziert worden (Visvikis *et al.*, 2001). Somit könnte AP-1 auch an der Hochregulation der Expression der γGT in Astrogliazellen beteiligt sein.

Erhöhte Konzentrationen an $\text{TNF}\alpha$ sind im Gehirn von IPS-Patienten beobachtet worden (Boka *et al.*, 1994; Mogi *et al.*, 1994). Quelle des $\text{TNF}\alpha$ können sowohl eingewanderte periphere Zellen als auch Microglia und Astrocyten sein, die nach Stimulation Cytokine wie $\text{TNF}\alpha$ freisetzen (Sawada *et al.*, 1989; Chung und Benveniste, 1990; Muñoz-Fernández und Fresno, 1998; Lee *et al.*, 2003). Unter pathologischen Bedingungen könnte die Synthese von $\text{TNF}\alpha$ zumindest in Astrocyten die Expression der γGT anregen. Ein derartiges Szenario würde experimentelle Befunde erklären, bei denen erhöhte Konzentrationen an $\text{TNF}\alpha$ in der *substantia nigra* sowie eine erhöhte Immunoreaktivität für $\text{TNF}\alpha$ in Gliazellen (Boka *et al.*, 1994; Mogi *et al.*, 1994) von einer erhöhten spezifischen Aktivität der γGT in dieser Gehirnregion begleitet werden (Sian *et al.*, 1994b). Die in vorliegender Arbeit gewonnenen Daten lassen die Vermutung zu, daß die erhöhte Aktivität der γGT in der *substantia nigra* von IPS-Patienten Folge einer erhöhten $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration sein könnte.

Die Inkubation von APK mit $\text{TNF}\alpha$ beeinflusste weder den zellulären Gehalt an GSH noch die Exportgeschwindigkeiten von GSH. Extrazelluläres GSx im Kulturmedium von APK liegt fast ausschließlich als GSH vor, das von den Zellen exportiert (Sagara *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1999; Hirrlinger *et al.*, 2002c) und vor Oxidation durch einen SOD-ähnlichen Faktor geschützt wird (Stewart *et al.*, 2002). Dieses GSH dient als extrazelluläres Substrat der γGT in Astrogliazellen (Dringen *et al.*, 1997a).

In TNF α -behandelten APK war die extrazelluläre Konzentration an GSH signifikant niedriger als bei Kontrollen. Somit wurde durch den TNF α -vermittelten Anstieg der γ GT-Aktivität der Umsatz des exportierten GSH verbessert.

Neuronen benötigen für die Synthese von GSH Cystein (Sagara *et al.*, 1993a,b; Kranich *et al.*, 1996), das beim Abbau von extrazellulärem GSH durch γ GT (Dringen *et al.*, 1999b) und Aminopeptidase N (Dringen *et al.*, 2001) entsteht. Die Steigerung der Aktivität der astroglialen γ GT durch TNF α könnte somit für Neuronen von Vorteil sein, weil dadurch die extrazelluläre Verfügbarkeit des für diese Zellen essentiellen GSH-Synthesesubstrats verbessert wird. Eine erhöhte Aktivität der γ GT in der *substantia nigra* von IPS-Patienten wurde schon früher als Versuch von Zellen diskutiert, Vorstufen des GSH zu konservieren und die intrazelluläre GSH-Konzentration durch Bereitstellung von Substraten für die GSH-Synthese zu erhalten (Jenner und Olanow, 1998). Das Absinken der Konzentration an extrazellulärem GSH durch die erhöhte Aktivität der γ GT könnte an beschriebenen Veränderungen im neuronalen GSH-Metabolismus beim IPS beteiligt sein. Bei IPS-Patienten wurde ein um 40 bis 50 % verringerter Gehalt an GSH in der *substantia nigra* gefunden (Sofic *et al.*, 1992; Sian *et al.*, 1994a), während die spezifische Aktivität der γ GT nahezu verdoppelt ist im Vergleich zu Kontrollen (Sian *et al.*, 1994b). Der erhöhte Verbrauch an extrazellulärem GSH durch TNF α -induzierte γ GT könnte zum verringerten Gesamtgehalt an GSH in der *substantia nigra* von *post mortem*-Gehirnen von IPS-Patienten beitragen.

Ein weiterer Zusammenhang des IPS mit erhöhter Aktivität der γ GT kann für den extrazellulären Stoffwechsel von Glutathionkonjugaten diskutiert werden. Da γ GT auch am extrazellulären Umsatz von Glutathion-S-Konjugaten beteiligt ist (Wang und Ballatori, 1998), kann erhöhte Aktivität der γ GT zu einem schnelleren extrazellulären Abbau solcher Substanzen im Gehirn beitragen. Beispielsweise wird 5-S-Glutathionyl-Dopamin durch neurale Zellen in einer superoxidabhängigen Reaktion gebildet (Spencer *et al.*, 1995; Hirrlinger *et al.*, 2002d) und ist ein Substrat der γ GT (Wang und Ballatori, 1998). Steigerung der γ GT-Aktivität kann also zur Bildung von 5-Cysteinyl-Dopamin beitragen, das in erhöhten Konzentrationen in der *substantia nigra* von IPS-Patienten gefunden wurde (Spencer *et al.*, 1998). Cysteinylkonjugate von Catecholaminen und deren Derivate sind als neurotoxisch eingestuft worden (Spencer *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000). Daher könnte Erhöhung der Aktivität der γ GT durch TNF α auch eine Rolle bei der Bildung toxischer Substanzen im Gehirn und beim Zelltod von Neuronen spielen.

Außer TNF α hatte auch LPS in Kombination mit IFN γ eine stimulierende Wirkung auf die Aktivität der γ GT in Astrogliakulturen. Die Wirkung von LPS auf die

Aktivität der γ GT bestätigt Literaturdaten (Garcion *et al.*, 1999). Der Effekt von LPS und $\text{IFN}\gamma$ ist möglicherweise auf NO zurückzuführen, da iNOS im Gehirn (Kong *et al.*, 2000) und in kultivierten Astrogliazellen (Simmons und Murphy, 1992) durch LPS und $\text{IFN}\gamma$ induziert wird. Das durch iNOS synthetisierte NO erhöht wiederum die Aktivität der γ GT (Gegg *et al.*, 2003). Dieser Effekt des NO auf die spezifische Aktivität der γ GT in Astrogliazellen wurde in vorliegender Arbeit durch Inkubation von APK mit dem NO-Donor SNP bestätigt. Da iNOS auch durch $\text{TNF}\alpha$ induziert wird (Da Silva *et al.*, 1997) könnte der Effekt von $\text{TNF}\alpha$ auf die Aktivität der γ GT auch auf indirekte Wirkung über NO zurückzuführen sein.

4.3.2 Eisenionen

Inkubation von APK mit FAC führte zu einer dosisabhängigen intrazellulären Akkumulation von Eisen mit einem Maximum bei Inkubation mit 300 μM FAC. Die Akkumulation von Eisen in Gliazellen in Abwesenheit von Serum bestätigt Literaturdaten (Takeda *et al.*, 1998; Höpken, 2005). Ebenso war die Aufnahme von Eisen aus dem Eisen-Citrat-Komplex FAC bereits für Hepatocyten und Astrogliazellen nachgewiesen worden (Graham *et al.*, 1998; Scheiber-Mojdehkar *et al.*, 1999; Hoepken *et al.*, 2004; Riemer *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit bestätigte biphasische Akkumulation von Eisen aus FAC (Korten, 2004) ist mechanistisch nicht geklärt. Eine Abnahme der Akkumulationsrate von Eisen bei sehr hohen Konzentrationen an FAC könnte zum Schutz der Zellen gegen Überladung mit Eisen beitragen.

Durch Inkubation von APK mit FAC stieg die spezifische Aktivität der γ GT in APK. Die Ursache dieser Steigerung nach Eisengaben könnte ein Anstieg der Konzentration an RSS in APK sein, ausgelöst durch eisenvermittelte Bildung von Radikalen (Halliwell, 1992), durch unvollständige Bindung von Eisen an Ferritin oder durch Fehler im Transport von Eisenionen durch die Plasmamembran (Campbell *et al.*, 2001; Rouault, 2001; Roy und Andrews, 2001; Thompson *et al.*, 2001). In Lungenepithelzellen von Ratten beispielsweise führt oxidativer Streß zu einem Anstieg der Aktivität der γ GT (Kugelman *et al.*, 1994). RSS könnten aber auch direkt, oder indirekt nach Aktivierung der iNOS, über die Transkriptionsfaktoren AP-1 und $\text{NF}\kappa\text{B}$ die Expression der γ GT aktivieren (Christman *et al.*, 2000; Schoonbroodt und Piette, 2000; Visvikis *et al.*, 2001; Kleinert *et al.*, 2003; Aktan, 2004).

Die beobachteten Effekte von FAC-Inkubation auf die Aktivität der γ GT waren zum Teil nicht signifikant, da auch in Kontrollen mit weiteren Komponenten des FAC-Komplexes (Citrat, NH_4^+) oder in Kontrollinkubationen ohne FAC ein leicht-

ter Anstieg der spezifischen Aktivität der γ GT beobachtet wurde. Die heterogenen Ergebnisse und der oft beobachtete Anstieg der γ GT-Aktivität in Kontrollen könnte auf eine Aktivierung der iNOS in den Kulturen zurückzuführen sein, die durch geringe Mengen an LPS im Medium hervorgerufen sein könnte. LPS kann auch durch die Sterilfiltration des Mediums nicht entfernt werden. Je nach Ausmaß der Vorstimulation durch LPS könnte dann die Steigerung der γ GT-Aktivität durch Eisengaben in manchen Experimenten nicht mehr nachweisbar gewesen sein und somit könnte auch in Abwesenheit von Eisen die Aktivität der γ GT erhöht worden sein.

4.3.3 Überexpression durch adenoviralen Gentransfer

Zur Synthese von GSH sind Neuronen auf die Versorgung mit den entsprechenden Ausgangsmolekülen angewiesen. Die Aminosäuren Cystein und Glycin stammen dabei größtenteils aus dem extrazellulärem Abbau von astroglialem GSH durch γ GT und Aminopeptidase N (Kranich *et al.*, 1996; Dringen *et al.*, 1997a, 1999b, 2001). Die Expression von γ GT ist im Vergleich zu Astrocyten in Neuronen nur gering ausgeprägt (Shine und Haber, 1981; Philbert *et al.*, 1995). Um die Zellen unabhängig von der Aktivität der astroglialen γ GT zu machen und durch Überexpression der γ GT die Versorgung der Zellen mit Vorläufern der GSH-Synthese zu verbessern, sollte das Gen der γ GT über adenoviralen Gentransfer in Neuronen eingebracht werden. Immunocytochemische Analysen transfizierter Astrogliazellen zeigten, daß ca. 20 % der Zellen mit den viralen Vektoren (100 MOI) transfiziert worden waren und EGFP und das Transgen γ GT exprimierten. Der Anteil der transfizierten Zellen lag wesentlich niedriger als erwartet. Bei Neuronenkulturen (CKZ) oder Neuroblastomzellen können Transfektionsraten zwischen 70 und 100 % erreicht werden (Le Gal La Salle *et al.*, 1993; Simons *et al.*, 1999; von Coelln *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2001). Auch für Kulturen von Astrogliazellen wurden Infektionsraten von 66 % beschrieben (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). Ursachen der geringeren Effizienz der Transfektion in Experimenten der vorliegenden Arbeit könnten andere Kulturbedingungen, sowie eine unzureichende Empfindlichkeit des Nachweises positiver Zellen sein (Kügler *et al.*, 1999).

Trotz der geringen Effizienz der Transfektion konnte in den γ GT-transfizierten Zellen ein enormer Anstieg der spezifischen Aktivität der γ GT um einen Faktor 2500 gemessen werden. Allerdings stieg auch in kontrolltransfizierten APK die spezifische γ GT-Aktivität um 250 % im Vergleich zur Ausgangsaktivität. Dieser Anstieg der γ GT-Aktivität in Kontrollen könnte auf einen Streß zurückzuführen sein, dem die

Zellen durch den Transport in das S2-Labor und/oder durch die Infektion mit den Viren ausgesetzt waren. Acivicin hemmte die γ GT-Aktivität pAD- γ GT-infizierter APK zu 90 %. Möglicherweise war bei der sehr hohen Aktivität der γ GT die Vorinkubation mit Acivicin (1 mM) nicht ausreichend, um die γ GT-Aktivität vollständig zu hemmen. Wegen der hohen γ GT-Aktivität der Proben mußten diese vor der Messung verdünnt werden (1:500). Deshalb könnten die relativ hohen γ GT-Aktivitäten in Anwesenheit von Acivicin zum Teil auch aus den bei der Berechnung der Aktivität entstehenden Ungenauigkeiten resultieren.

Die Aktivität der γ GT nach Überexpression des Gens war in APK am höchsten, gefolgt von CKZ. NPK dagegen wiesen nur knapp 50 % der Aktivität auf, die in APK und CKZ erreicht wurde. Grund für die geringere Aktivität in NPK könnte geringere Effizienz der Transfektion als in APK oder CKZ sein. Im Gegensatz zu CKZ (70 bis 90 %; Simons *et al.*, 1999; Gerhardt *et al.*, 2001) weisen primäre Kulturen von Neuronen des Mesencephalons nur eine Infektionsrate von 10 bis 20 % auf (von Coelln *et al.*, 2001).

Untersuchungen zum intrazellulären Gehalt an GSx nach Transfektion der Zellen mit γ GT zeigten, daß der Gehalt an GSx in Zellen, die γ GT überexprimierten, verringert war. Ursache dafür könnten geringe Mengen aktiver γ GT im Cytosol infizierter Zellen sein, wodurch intrazelluläres GSH abgebaut wird. Alternativ dazu könnte das Fehlen von Ausgangsmolekülen für die Synthese von GSH durch einen erhöhten Verbrauch bei der Biosynthese der γ GT den GSH-Gehalt verringert haben, da die Inhibierung der Synthese von Makromolekülen die Verfügbarkeit von Cystein für die Synthese von Glutathion verbessert (Ratan *et al.*, 1994). Bei der stark erhöhten Synthese von γ GT in pAd- γ GT-infizierten Zellen reicht möglicherweise das verfügbare Cystein nicht für die zusätzliche Synthese von GSH aus, sodaß die Zellen an GSH verarmen. Zusätzliche extrazelluläre Gaben von GSH ließen den intrazellulären Gehalt an GSx wieder ansteigen.

4.4 Extrazellulärer Glutathiondisulfidmetabolismus

Der Export von GSSG ist für eine Vielzahl von Zellen und Geweben beschrieben worden (Srivastava und Beutler, 1969; Eklöv *et al.*, 1981; Sies und Akerboom, 1984; Hirrlinger *et al.*, 2001). Unter oxidativem Streß exportieren auch Astrogliazellen GSSG (Hirrlinger *et al.*, 2001, 2002d). Der weitere Verbleib von exportiertem GSSG in solchen Kulturen war aber bisher nicht untersucht worden. Als physiologische Funktionen

von extrazellulärem GSSG werden unter anderem die Modulation von Glutamatrezeptoren oder eine Rolle im Schlafrythmus diskutiert (Honda *et al.*, 1994; Ogita *et al.*, 1995; Janaky *et al.*, 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zum Verbleib von extrazellulärem GSSG zeigten, daß im Gegenwart neuraler Zellen extrazelluläres GSSG verschwand. Ein Umsatz von extrazellulärem GSSG in Anwesenheit von Cystin wurde für APK, NPK und MSK-A beobachtet. NPK und MSK-A wiesen jedoch geringere Umsatzgeschwindigkeiten als APK auf. Da Astrogliazellen der am häufigsten im Gehirn vorkommende Zelltyp sind (Nedergaard *et al.*, 2003), ist anzunehmen, daß im Gehirn GSSG hauptsächlich von APK umgesetzt wird und nur zu einem geringeren Anteil von Microglia oder Neuronen.

Im Gegensatz zu neuronalen Zellen ist der Verbleib von extrazellulärem GSSG an Leber, renalen Tubuluszellen und Dünndarmmucosazellen der Ratte untersucht worden (Hahn *et al.*, 1978; Grafström *et al.*, 1980). Die Abnahme der Konzentration von extrazellulärem GSSG wurde für diese Zellen der Aktivität der γ GT zugeschrieben, da Gaben von Serin und Borat die Abnahme hemmten, Methionin sie aber verstärkte (Hahn *et al.*, 1978; Grafström *et al.*, 1980). Serin hemmt γ GT in Gegenwart von Borat (Tate und Meister, 1978), Methionin dagegen agiert als Akzeptor in der γ GT-katalysierten Reaktion (Thompson und Meister, 1977). In APK hatten weder die Hemmung der γ GT durch Acivicin noch Inkubation der Zellen mit Methionin einen Effekt auf den Umsatz von GSSG. Somit kann für APK eine Beteiligung der γ GT am Umsatz von extrazellulärem GSSG ausgeschlossen werden und es muß ein anderer Mechanismus an dem in diesen Zellkulturen beobachteten GSSG-Umsatz beteiligt sein.

Der GSSG-Umsatz bzw. die Abnahme der Konzentration an GSSG in Zellkulturmedien in APK hing von der Anwesenheit von Zellen bzw. Zellysaten und von Cystin ab. Diese Befunde sowie der fehlende GSSG-Umsatz in konditioniertem Medium ließ auf die Beteiligung eines zellständigen Enzyms schließen. Da sich der zelluläre GSx-Gehalt von intakten APK nach Gaben von extrazellulärem GSSG (40facher Überschuß im Medium im Vergleich zum Zellgehalt) nicht änderte, kann nicht eine Aufnahme von GSSG in APK für den Umsatz von extrazellulärem GSSG verantwortlich sein. Wurden die Zellen dagegen in Abwesenheit von Cystin inkubiert, nahm die intrazelluläre GSx-Konzentration ab, da Astrogliazellen GSH freisetzen (Hirrlinger *et al.*, 2002c,d). Da Astrogliazellen extrazelluläres Cystin zur GSH-Synthese nutzen können (Kranich *et al.*, 1996, 1998), wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit der Verlust an zellulärem GSH durch die GSH-Freisetzung in Anwesenheit von Cystin im Medium von APK durch GSH-Synthese kompensiert.

In APK waren die Umsatzgeschwindigkeiten von extrazellulärem GSSG proportional abhängig von der applizierten Konzentration an Cystin sowie von der Ausgangskonzentration an GSSG. Das ist ein Hinweis auf die Beteiligung eines Enzyms am Umsatz von GSSG, da die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen von der Substratkonzentration abhängt. Eine hyperbolische Substratabhängigkeit der Geschwindigkeit des Umsatzes von GSSG in intakten Zellen wurde bei den eingesetzten Konzentrationen an GSSG und Cystin nicht beobachtet. Das Substrat Cystin konnte nicht durch andere Disulfide wie D-Cystin ersetzt werden, der Umsatz war vielmehr spezifisch für GSSG und L-Cystin. Diese Stereospezifität der Reaktion spricht wiederum für die Beteiligung eines Enzyms.

Ein weiteres Merkmal von Enzymen ist ihre Inhibierbarkeit durch Hemmstoffe. Experimente im Rahmen vorliegender Arbeit zeigten, daß der Umsatz von extrazellulärem GSSG in APK durch DTNB, einen Inhibitor der PDI (Roth, 1981; Mizunaga *et al.*, 1990; Feener *et al.*, 1990; Ryser *et al.*, 1991), sowie durch Inhibitoren (IAA, Cu^{2+} und DTNB) eines nicht näher identifizierten Enzyms, das GSSG und Cystin zu einem gemischten Disulfid reagieren lässt (Rafter und Harmison, 1979), inhibiert werden konnte. Die Inhibition durch IAA, DTNB und CuSO_4 läßt darauf schließen, daß im aktiven Zentrum des postulierten Enzyms freie Sulfhydrylgruppen an der Reaktion mitwirken.

Der zeitliche Verlauf des Umsatzes von extrazellulärem GSSG in APK begann mit einer ein- bis zweistündigen Verzögerungsphase, danach folgte ein nahezu linearer schneller Umsatz von GSSG, der sich nach 6 bis 8 h verlangsamte. Die anfängliche Verzögerungsphase beim extrazellulären GSSG-Umsatz durch APK sowie die zum Teil nicht unerheblichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Experimente können möglicherweise auf Schwankungen des pH-Wertes des Mediums (MM) zurückzuführen sein. Weil die Zellen zur Probenentnahme mehrmals aus dem Inkubator genommen werden mußten, wurde die Zufuhr von CO_2 mehrfach unterbrochen, wodurch sich der pH-Wert des offenen Puffersystems ändern kann. Experimente zum Umsatz von GSSG durch Lysatüberstände mit Puffern mit verschiedenen pH-Werten zeigten jedoch eine Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit mit steigendem pH. Eine weitere Erklärung für die anfängliche Verzögerungsphase könnte sein, daß das für den Umsatz verantwortliche Enzym zunächst an die äußere Oberfläche der Zellmembran gelangen muß. Enzyme wie PDI wurden zwar an der Oberfläche von Zellen gefunden, sind aber klassische Enzyme des ER (Turano *et al.*, 2002).

Ursache der Abnahme der Geschwindigkeit des Umsatzes von extrazellulärem GSSG mit zunehmender Inkubationszeit kann ein hoher K_M -Wert des am Umsatz beteiligten

Enzyms im Vergleich zur GSSG-Konzentration sein. Die Bestimmung der K_M -Werte des GSSG-umsetzenden Systems in Lysatüberständen von APK ergab für beide Substrate zum Teil recht hohe Konzentrationen im Bereich von 100 bis 200 μM . Damit liegt der K_M -Wert für beide Substrate im Bereich der eingesetzten Substratkonzentration.

Experimente mit Lysaten und intakten Zellen zeigten, daß der Umsatz von extrazellulärem GSSG in intakten APK nicht niedriger war als der Umsatz in Lysaten von APK. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die am GSSG-Umsatz beteiligte Aktivität auf der äußeren Zelloberfläche lokalisiert ist. Durch die Lyse der Zellen erhöhte sich die GSSG-Umsatzgeschwindigkeit nicht. Somit wurde keine weitere intrazelluläre Aktivität freigesetzt, die den GSSG-Umsatz steigert. Ebenso war nach Zentrifugation der Lysate im Lysatüberstand annähernd die gleiche GSSG-umsetzende Aktivität wie in nicht-fraktionierten Lysaten zu finden. Durch das Detergenz wurde das für den GSSG-Umsatz verantwortliche Enzym bei der Lyse der Zellen aus der Plasmamembran herausgelöst oder von der Membran abgelöst und fand sich danach im Zentrifugationsüberstand wieder. Der fehlende Umsatz von GSSG nach Filtration und der verminderte GSSG-Umsatz durch hitzebehandelte Lysatüberstände sind ein weitere Belege für die Beteiligung eines Enzyms am extrazellulären Umsatz von GSSG durch APK. Die gewisse Hitzestabilität des Enzyms deutet auf eine Reihe von Disulfidbrücken im Protein hin.

Zur Untersuchung des GSSG-Umsatzes durch Lysatüberstände von APK in einem geschlossenen Puffersystem wurde ein Testsystem im Microtiterformat entwickelt. In diesem Testsystem war der Umsatz von GSSG abhängig von den eingesetzten Konzentrationen an GSSG und Cystin. Im Gegensatz zum GSSG-Umsatz durch intakte APK schien das GSSG-umsetzende System in Lysatüberständen sättigbar zu sein. Ursache für diesen einer Absenkung des K_M -Wertes gleichkommenden Unterschied könnte eine Konformationsänderung des beteiligten Enzymsystems bei Aufhebung des Membranverbunds durch das Detergenz sein. Eine Konformationsänderung des Enzymsystems durch die Lyse könnte auch Ursache für die veränderte Substratspezifität sein. Im Gegensatz zur Situation in intakten APK war Umsatz von GSSG in Lysatüberständen auch in Gegenwart von D-Cystin oder $(\text{CysGly})_2$ sowie in geringerem Ausmaß auch in Gegenwart von $(\text{GlyCys})_2$ möglich.

Ebenso wie in intakten APK war der Umsatz von GSSG durch Lysatüberstände durch DTNB, IAA und CuSO_4 hemmbar. Anders als bei intakten APK hemmte Bacitracin den GSSG-Umsatz auch bei Lysatüberständen. Dies könnte durch eine bessere Zugänglichkeit des Enzymsystems für Bacitracin im Lysatüberstand erklärt werden,

wodurch Bacitracin in der eingesetzten Konzentration von 1 mM das Enzymsystem in Lysatüberständen besser hemmen könnte als in intakten APK. Je nach Präparation und Spezies wurde eine vollständige Inhibition der PDI bei Konzentrationen zwischen 250 μ M und 3 mM beschrieben (Roth, 1981; Mandel *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 2003).

Die Eigenschaften des Umsatzes von extrazellulärem GSSG in intakten APK und Zellysatüberständen sind in Tabelle 18 gegenübergestellt. Da die Lyse der Zellen nicht zu einer Steigerung des GSSG-Umsatzes führt, ist vermutlich eine Konformationsänderung des Enzyms nach Lyse der Zellen für die beobachteten Unterschiede verantwortlich.

Tabelle 18 Eigenschaften des GSSG-Umsatzes in APK und Lysatüberständen von APK

Eigenschaft	Zellen	Lysatüberstand
Umsatz von GSSG	ja	ja
Zell-/Lysatabhängigkeit	ja	ja
Substratabhängigkeit	linear	Sättigung
Substrate (% Aktivität)		
L-Cystin	100	100
D-Cystin	11	80
(CysGly) ₂	4	90
(GlyCys) ₂	5	65
pH-Abhängigkeit	n.b.	ja
Hemmung (%)		
DTNB	80	60
IAA	90	75
CuSO ₄	100	80
Bacitracin	0	50

Zusammengefaßt sind die Eigenschaften des Umsatzes von GSSG in intakten APK und Lysatüberständen von APK. n.b. = nicht bestimmt

Die massenspektrometrischen Analysen von Reaktionsansätzen zum Umsatz von GSSG zeigten, daß beim Umsatz von GSSG in Anwesenheit von Cystin und dem unbekanntem Enzym im Lysatüberstand ein Molekül mit m/z 427,1 entsteht. Bei diesem Molekül handelt es sich sehr wahrscheinlich um das gemischte Disulfid aus Cystein und Glutathion (426,1 Da), was durch Fragmentierung des $[M+H]^+$ -Moleküls (427,1 m/z) durch MS/MS nachgewiesen wurde. Die Strukturformeln des gemischten Disulfids sowie der Ausgangssubstanzen GSSG und Cystin sind in Abb. 30 dargestellt.

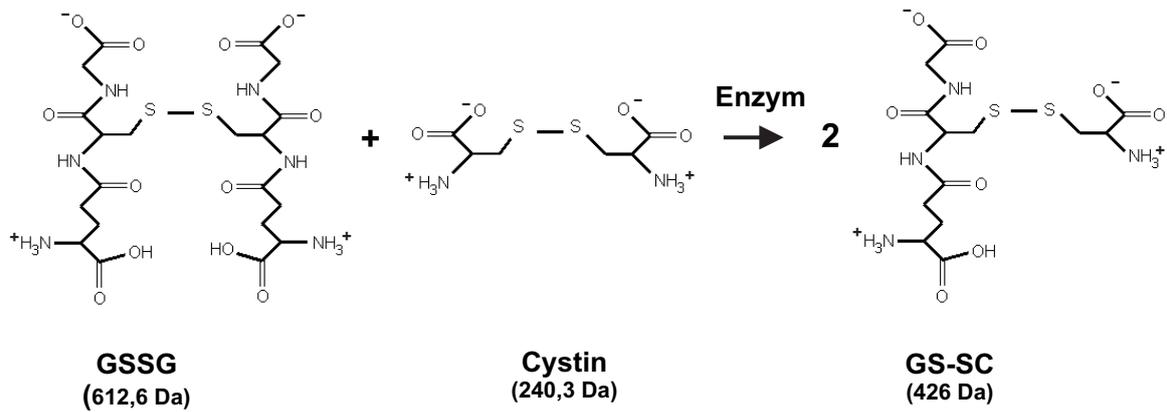


Abb. 30 Vermuteter Reaktionsweg des Umsatzes von GSSG und Cystin. Die Substrate GSSG und Cystin reagieren durch die Katalyse eines Enzyms zu dem gemischten Disulfid GS-SC.

Die Fragmentierung des $[M+H]^+$ -Molekülions mit 427,1 m/z mittels CID in der Ionenfalle ergab ein $[M+H]^+$ -Fragment-Ion mit 298,1 m/z. Die Differenz der Massen der beiden Ionen ergibt ein Molekül mit einer Masse von 129 Da. Nach Addition eines Moleküls H_2O ergibt sich die Masse von 147 Da, die Masse von Glutamat. Somit wurde durch die Fragmentierung ein Glutamatrest vom Molekülion mit 427,1 m/z abgespalten und bei dem $[M+H]^+$ -Fragmention mit 298,1 m/z handelt es sich um das Disulfid aus Cystein und Cysteinylglycin (Abb. 31). Das gleiche Molekül entsteht bei der Inkubation von Cystin mit dem Dipeptid Cysteinylglycin. Das bei dieser Inkubation ebenfalls entstehende $[M+H]^+$ -Molekülion mit 355,1 m/z entspricht der oxidierten Form des Dipeptids, $(CysGly)_2$ (354,4 Da) (Abb. 31).

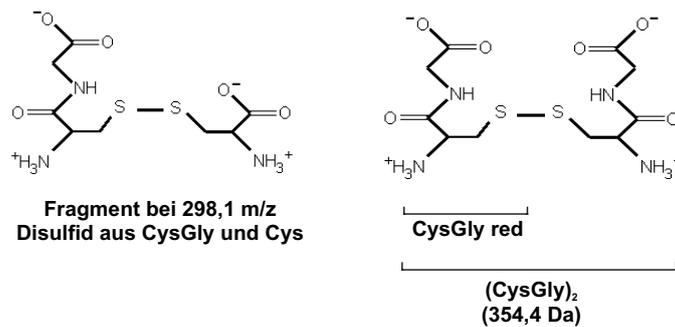


Abb. 31 Strukturformeln von GS-SC nach Fragmentierung sowie das Produkt der Reaktion von Cystin mit CysGly und das oxidierte Dipeptid $(CysGly)_2$ mit der Masse 354,4 Da.

In Abb. 30 ist der mögliche Reaktionsmechanismus des Umsatzes von GSSG und CSSC zum gemischten Disulfid dargestellt. GSSG reagiert dabei in einer enzymkata-

lysierten Reaktion mit Cystin zu dem gemischten Disulfid GS-SC. Nach diesem Reaktionsmechanismus liegt der Reaktion eine 1:1-Stöchiometrie von GSSG zu Cystin zugrunde. Die Bestimmung der Stöchiometrie aus den durchgeführten Experimenten zeigte ein Verhältnis von 1:3 bis 1:8 (GSSG : Cystin). Da die Experimente zur Stöchiometriebestimmung nicht unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurden, sind deren Ergebnisse mit Vorsicht zu bewerten. Dahingegen zeigt der Vergleich der Signalintensitäten der massenspektrometrischen Analysen, daß bei dem Umsatz von GSSG und Cystin zum gemischten Disulfid die Intensität der Edukte GSSG und Cystin zwischen 50 und 66 % niedriger ist als bei Inkubation ohne Lysatüberstand oder mit behandeltem Lysatüberstand. Die Signalintensität des gemischten Disulfids hingegen nimmt um ca. 85 % zu und ist damit etwa 7mal höher als bei Inkubation ohne Lysatüberstand oder mit filtriertem Lysatüberstand. Diese Daten der massenspektrometrischen Analysen bestätigen den angenommenen Reaktionsmechanismus, bei dem je ein Molekül GSSG und Cystin zu zwei Molekülen des gemischten Disulfids umgesetzt werden. Desweiteren zeigen die Daten der massenspektrometrischen Analysen, daß die Abnahme von GSSG und Cystin mit der Zunahme von GS-SC einhergeht. Somit ist vermutlich das gemischte Disulfid das Endprodukt des cystinabhängigen Umsatzes von GSSG in APK. Die Umsetzung kann nur bis zum thermodynamischen Gleichgewicht aller drei Typen von Disulfiden verlaufen.

Der GSSG-Umsatz in Gegenwart von intakten APK konnte massenspektrometrisch nicht analysiert werden, da das Inkubationsmedium MM die Analysen störte. Es können daher keine Aussagen dazu gemacht werden, ob die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen des GSSG-Umsatzes durch Lysatüberstände gleichermaßen für den GSSG-Umsatz durch intakte APK gelten.

Welches Enzymsystem verantwortlich ist für den Umsatz von extrazellulärem GSSG und Cystin in APK ist ungeklärt. Ein möglicher Kandidat könnte ein Mitglied der Familie der Proteindisulfidisomerasen (PDI) sein. Diese Enzyme katalysieren die Faltung von Proteinen im ER und haben eine essentielle Chaperonfunktion. Im ER fügt PDI Disulfidbrücken in Proteine ein (Oxidaseaktivität) und katalysiert die Umlagerung inkorrekt gebildener Disulfidbindungen (Isomeraseaktivität) (Turano *et al.*, 2002; Wilkinson und Gilbert, 2004). Einige Mitglieder der PDI-Familie kommen auch außerhalb des ER vor. Dazu gehören PDI selbst und die zwei Homologe ERp57 und ERp72. Obwohl alle drei Proteine eine ER-Retentionssequenz enthalten, sind sie außerhalb von Zellen als membrangebundene oder sekretierte Proteine beobachtet worden (Turano *et al.*, 2002). PDI ist an der Oberfläche verschiedener Zelltypen gefunden worden (Yoshimori *et al.*, 1990; Terada *et al.*, 1995; Mandel *et al.*, 1993). Bisher sind die Funktionen extrazel-

lulärer, an der Zelloberfläche gebundener Enzyme der PDI-Familie unklar. Diskutiert werden als Funktion solcher Enzyme Reduktion und Neubildung von Disulfidbrücken in Makromolekülen an der Zelloberfläche oder eine Rolle bei der Zelladhäsion von Leukocyten und Blutplättchen (Turano *et al.*, 2002).

Neben extrazellulärer PDI könnte für den GSSG-Umsatz in APK ein von Rafter und Harmison (1979) beschriebenes Enzym verantwortlich sein. Dieses Enzym katalysiert in Überständen von Homogenaten von Kaninchengewebe die Bildung eines gemischten Disulfids aus den Substraten GSSG und N,N'-Di-(2,4-dinitrophenyl)-L-Cystin. Das Enzym katalysiert damit eine Reaktion, die dem cystinabhängigen GSSG-Umsatz in APK analog ist. Gehirn und Leber wiesen die höchsten Aktivitäten dieses bisher nicht identifizierten Enzyms auf, gefolgt von Milz, Niere, Lunge und Muskel. Die Umsatzgeschwindigkeit stieg zwischen pH 6,8 und 9,4 proportional zum pH-Wert der Lösung und die Reaktion wurde durch IAA (1 mM) und Cu^{2+} (15 μM) gehemmt (Rafter und Harmison, 1979). Das von Rafter und Harmison (1979) beschriebene Enzym weist damit die gleichen Eigenschaften (Lokalisation im Gehirn, pH-Abhängigkeit, Hemmung durch IAA und Cu^{2+} , Substratabhängigkeit) auf wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Enzymaktivität. Unklar ist allerdings, ob das von Rafter und Harmison (1979) beschriebene Enzym auch auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembran vorkommt, wie das hier beschriebene Enzymsystem. Die in vorliegender Arbeit beschriebene Hemmung des GSSG-Umsatzes in Lysatüberständen von APK durch Bacitracin könnte zwar auf die Beteiligung von PDI am GSSG-Umsatz hinweisen, da aber kommerzielles Bacitracin häufig mit Proteaseaktivitäten verunreinigt ist (Rogelj *et al.*, 2000), ist diese Inhibierung mit Vorsicht zu bewerten. Es ist daher wahrscheinlicher, daß das gleiche oder ein dem von Rafter und Harmison (1979) beschriebenen Enzym ähnliches Enzym dasjenige ist, das auch den Umsatz von GSSG in APK katalysiert.

Die physiologische Funktion des Umsatzes von extrazellulärem GSSG mit Cystin zu einem gemischten Disulfid durch neurale Zellen ist ungeklärt. Eine mögliche Funktion könnte die Verbesserung der Löslichkeit von Cystin über die Bildung des gemischten Disulfids sein (Rafter und Harmison, 1979). Auch eine Beseitigung des extrazellulären Substrates GSSG könnte eine wichtige Funktion des am GSSG-Umsatz beteiligten Enzyms sein, da GSSG im Gehirn von Ratten und Kaninchen eine schlaffördernde Wirkung hat (Honda *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 2005). Das Reaktionsprodukt, das gemischte Disulfid aus Cystein und GSH (GS-SC), ist in den Polychaeten *Nereis succinea* als Pheromon Nereithion identifiziert worden (Ram *et al.*, 1999), das aus GSH und Cyst(e)in gebildet wird (Hardege *et al.*, 2004). Es gibt bisher keinerlei Hinweise darauf, ob das gemischte Disulfid GS-SC auch in Säugetieren eine

Hormonfunktion ausübt. Disulfide können aber bei Säugern hormonähnliche Wirkungen haben. Beispielsweise wird das gemischte Disulfid aus Glutathion und Coenzym A beim Menschen in der Nebenschilddrüse bzw. beim Rind in den Nebennieren gebildet und hat eine vasokonstriktive Wirkung (Jankowski *et al.*, 2000).

4.5 Ausblick

In vorliegender Arbeit wurden das Vorkommen und die Modulation der spezifischen Aktivität der γ GT in verschiedenen neuronalen Zellkulturen untersucht. Die Steigerung der γ GT-Aktivität durch $\text{TNF}\alpha$ könnte dabei direkt oder indirekt über die Aktivierung der iNOS erfolgen. Um diese beiden Wege voneinander zu unterscheiden, sollten Inhibitoren der iNOS wie N-Nitro-L-argininmethylester (L-NAME) (Rees *et al.*, 1990) und der beteiligten Rezeptoren eingesetzt werden, die Konzentration von NO im Medium untersucht und gegebenenfalls NO durch Bindung an Substrate wie 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (PTIO) (Akaike *et al.*, 1993) oder Melatonin (Reiter *et al.*, 1999) entfernt werden. Weiterhin sollte der Weg der Signaltransduktion untersucht werden, indem z.B. Inhibitoren von Enzymen der p38-MAP-Kinase-Signalkaskade eingesetzt werden.

Zur weiteren Untersuchung des Effektes von Eisenionen auf die Aktivität der γ GT sollte ein LPS-freies Medium verwendet werden. Kommerzielles Medium, das auf LPS untersucht und frei von LPS ist, sollte dem selbst hergestellten und sterilfiltriertem Medium, wie es in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, vorgezogen werden. Weiterhin sollten die Signalwege, die zur Expression der γ GT durch Eisen führen, untersucht werden.

Um Neuronen vor oxidativem Streß zu schützen, wurde γ GT über adenoviralen Gentransfer in Zellen überexprimiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, daß die Überexpression der γ GT den GSH-Gehalt der Zellen verringerte. Die sehr starke Überexpression von γ GT in Zellen könnte aber genutzt werden, um das Protein durch Affinitätsreinigung über das *flag-tag* zu isolieren. Das gereinigte Enzym könnte dann zur Herstellung spezifischer Antikörper eingesetzt werden, um das Vorkommen der γ GT in Gehirnzellen immunocytochemisch oder durch *Western blot* zu untersuchen. Auch die cDNA der Cystintransporteruntereinheit xCT könnte nach Beseitigung der aufgetretenen Mutationen der erhaltenen Klone zur Generierung adenoviraler Vektoren genutzt werden. Durch Gentransfer könnte dann das Gen des Transporters in Neuronen (über)exprimiert und die GSH-Synthese in Neuronen in Gegenwart von

Cystin ermöglicht werden. Für die *in vitro*-Experimente mit Adenoviren sollten aber zunächst die Infektionsbedingungen optimiert werden, um eine höhere Transfektionsrate zu erreichen. Dabei könnten das Medium, die Infektionszeit, die Konzentration der Viruspartikel, das Kulturalter und die Zelldichte variiert werden. Die Cystinaufnahme in Neuronen nach Transfektion mit xCT könnte dann den zellulären Gehalt an GSH steigern und die Widerstandsfähigkeit der Zellen bei oxidativem Stress verbessern. Erwiesen sich solche *in vitro*-Untersuchungen als erfolgreich, könnte ein *in vivo*-Gentransfer an Mäusen durchgeführt werden.

Um den Umsatz von extrazellulärem GSSG in APK und Lysatüberständen von APK zu untersuchen, ist die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsansätze eine geeignete Methode. Neben der Abnahme der GSSG-Konzentration können dabei auch der Verbrauch des zweiten Substrats Cystin und die Bildung des Produktes GS-SC quantitativ analysiert werden. Damit können dann die kinetischen Parameter der am extrazellulären GSSG-Umsatz beteiligten Reaktion exakter bestimmt werden. Bei der massenspektrometrischen Analyse des Umsatzes von GSSG in intakten APK störte das verwendete MM die Analysen der Metaboliten. Bei weiteren Untersuchungen des GSSG-Umsatzes in APK sollte daher ein Inkubationsmedium genutzt werden, daß bei der Analyse der Metaboliten keine Störungen verursacht, wie Tris-HCl-Puffer. Die bislang durchgeführten massenspektrometrischen Analysen sprechen dafür, daß GS-SC das Endprodukt des GSSG-Umsatzes ist. Auch diese Hypothese sollte experimentell bestätigt werden. Dazu könnte das gemischte Disulfid, hergestellt durch Reaktion von GSH mit Cyst(e)in, mit APK oder Lysaten von APK inkubiert werden und massenspektrometrisch analysiert werden. Durch die Inkubation neuraler Zellen mit GS-SC könnte auch eine potentielle biologische Wirkung des Moleküls auf neurale Zellen untersucht werden.

Die Daten vorliegender Arbeit sprechen dafür, daß es sich bei dem am Umsatz von GSSG beteiligten Enzym in intakten APK oder Lysatüberständen von APK um das selbe Enzym handelt. Zur Bestätigung der Hypothese sollten weitere Untersuchungen vergleichend an intakten Zellen und Lysaten durchgeführt werden. Dabei könnten auch weitere Inhibitoren, wie N,N'-Di-(2,4-dinitrophenyl)-L-Cystin als Inhibitor der PDI (Rafter und Harmison, 1979) sowie weitere Detergenzien, die Proteine konformationsschonender aus Membranen lösen, eingesetzt werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Geräte

Material

Deckgläschen	Roth (Karlsruhe); Langenbrinck (Emmendingen)
Einmal-Sterilfilter	Renner (Darmstadt)
Filterpipettenspitzen	Peqlab (Erlangen); Gilson (Middleton, WI, USA)
Filtriereinheiten	Microcon YM-10, Millipore (Schwalbach)
Nitrocellulosemembran	Millipore Corp. (Bedford, USA)
Nylonnetze	Scrynell, 20, 135 und 250 μm Maschenweite, Züricher Beuteltuchfabrik (Rüschlikon, Schweiz); 132 und 211 μm Maschenweite, Sefar GmbH (Wasserburg)
Objektträger	Neolab (Heidelberg)
PCR-Reaktionsgefäße	Peqlab (Erlangen)
Plastikwaren	Brand (Wertheim), Multimed (Kirchheim), Nunc (Wiesbaden) und BD biosciences (Heidelberg)
sterile Zellkulturartikel	Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen)

Geräte

Agarosegelkammern	PerfectBlue Mini M und L, Peqlab (Erlangen)
Autoklav	Typ 669, Aigner (München)
Elektrophoreseapparatur	Mini Trans-Blot Cell, BioRad (München)
ELISA-Reader	MRX TC Revelation, Dynex Technologies (Denkendorf)
Folienschweißgerät	Super Poly 281, Audion Elektro (AJ Weesp, Niederlande)
Haemocytometer	nach Neubauer, Bachofer (Reutlingen)

5 Experimenteller Teil

HPLC-System	HPLC-Pumpe: CapPump 1100 Series, Autoinjektor: MicroALS 1100 Series, Agilent (Waldbronn)
Massenspektrometer	Esquire3000 ^{plus} Bruker Daltonics (Bremen)
Mikroskope	Phasenkontrastmikroskop IM, Fluoreszenzmikroskope IM 35, Axiovert 200 und Axiovert 25 Zeiss (Oberkochen)
Ölpumpe	Drehschieberölpumpe Typ 317, Dürr-Dental (Bietigheim)
Osmometer	Osmometer Automatic, Knauer (Eppelheim)
pH-Meter	PHM 92 Lab-pH-Meter, Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Photoapparat	Coolpix 995, Nikon (Düsseldorf)
Photometer	Shimadzu UV-120-02, Shimadzu (Kyoto, Japan), UVIKON 80, Kontron Instruments (Watford Herts, UK)
Pipettoren	Finnpipetten Labsystem Oy (Helsinki, Finnland); Vielkanaldispenser Biohit Proline 1200, Biohit Oy (Helsinki, Finnland); Multipette Research Pro 12 Kanal und Reference, Eppendorf (Hamburg)
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein (München) und Typ TMR, Infors (Bottmingen, Schweiz); Unimax 1010 und Inkubator 1000, Heidolph (Kelheim)
Spannungsquellen	Consort E861, Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgien); 2301 Makrodrive 1, LKB (Bromma, Schweden)
Sterile Werkbank	LaminAir HLB 2448 und TL 2448, Heraeus (Hanau); 3F 150 - IIGS, Tecnoflow Integra Biosciences
Thermocycler	Mastercycler Gradient, Eppendorf (Hamburg)
Waagen	1205 und 1712, Sartorius (Göttingen); Typ P 1200, Mettler (Albstadt) und Typ 0, 152-156 Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)
Wasserbad	Typ 20-0 Julabo, Juchheim Labortechnik (Seelbach über Lahr); GFL 1083, Hilab (Düsseldorf)
Wasserreinigungsanlage	Purelab Plus, USF Elga (Ramsbach-Baumbach)
Western Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell, BioRad (München)
Zellinkubator	Typ B 5060EK CO ₂ und Function Line Model BB16, Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415C, Eppendorf (Hamburg); Zellzentrifuge Varifuge K, Biofuge pico und Biofuge fresco, Heraeus (Hanau)

5.2 Reagenzien und Chemikalien

NADH und NADPH waren von Applichem (Darmstadt). Acivicin, Ammoniumcitrat (dibasisch), Bacitracin, Rinderserumalbumin (BSA), Cycloheximid, D- und L-Cystin, Desferoxamin (DFX), Digitonin, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), Interferon γ , Iodacetamid (IAA), Lipopolysaccharid E.coli 026:B6 (LPS), Rinderinsulin, Schafnormalserum, Sulfosalicylsäure (SSS) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) wurden von Sigma (Taufkirchen) bezogen. 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), Glutathion, Glutathiondisulfid, Glutathionreduktase (GR) und „High Pure PCR Product Purification Kit“ waren von Roche Diagnostics (Mannheim). Ammoniumeisen(III)citrat (FAC), γ Glutamyl-(3-carboxy-4-nitroanilid) (GCNA), Glycylglycin, Natriumsele nit und Paraformaldehyd wurden von Fluka (Ulm) bezogen. Der „QIAprep Spin Miniprep Kit“, „QIAquick Gel Extraction Kit“, „QIAquick PCR Purification Kit“ und „Hi-Speed Plasmid Midi Kit“ waren von Qiagen (Hilden). Penicillin G, Streptomycinsulfat und Triton X-100 waren von Serva (Heidelberg). (Cysteinylglycin)₂, (Glycylcystein)₂ und N-Acetylcystin (NAC_{ox}) waren von Bachem (Bubendorf, Schweiz). RNAsin und Random-Hexamer-Primer waren von Promega (Mannheim). Der DNA-Längenstandard „Gene Ruler 100 bp ladder plus“, die Restriktionsenzyme BglII, NotI und EcoRV, T4-DNA-Ligase, Alkalische Phosphatase (Kälberintestinum), Reverse Transkriptase und die jeweils zugehörigen Puffer, rekombinante Taq-Polymerase mit zugehörigem Puffer und MgCl₂-Lösung und dNTP wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Die Taq-Polymerase „TripleMaster PCR-System“ mit zugehörigem Puffer und Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP) waren von Eppendorf (Hamburg), Agarose und der DNA-Längenstandard „PeqGold 1 kb DNA-Leiter“ von Peqlab (Erlangen). DH5 α kompetente E. coli, Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium (DMEM) und Rindertransferrin wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen, Pferdeserum (HS) von der Biochrom AG (Berlin). Acetonotril, Ameisensäure, Nitroprussidnatrium (SNP) und Wasser (für HPLC-Analytik) waren von E. Merck (Darmstadt), SOC-Medium war von Novagen (EMD Biosciences, San Diego, USA). Die PCR-Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Ziegennormalserum war von Life Technologies (Eggenstein) und Immu-Mount von Shandon (Pittsburgh, PA, USA). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19 Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Beschreibung	Verdünnung	Lieferant
Primärantikörper				
anti-GFAP	Kaninchen	polyklonal	1:400	Dako (Hamburg)
anti-GAP-43	Maus	monoklonal	1:100	Sigma (Steinheim)
anti-CD11b (OX42)	Maus	monoklonal	1:10	Serotec (Oxford, UK)
anti-GalC	Maus	monoklonal	1:5	von Prof. Hamprecht zur Verfügung gestellt
anti- <i>flag-tag</i>	Maus	monoklonal	1:1000	Stratagene (La Jolla, USA)
Sekundärantikörper				
anti-Maus-IgG– Alexa Fluor 568	Ziege	monoklonal	1:1000	Molecular Probes (Leiden)
anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor 488	Ziege	monoklonal	1:1000	Molecular Probes (Leiden)

Nicht gesondert aufgeführte Reagenzien und Chemikalien wurden von Roche Diagnostics (Mannheim), E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen. Sie hatten jeweils den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

5.3 Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden Lösungen mit hochreinem Wasser als Lösungsmittel hergestellt.

5.3.1 Zellkulturen

5.3.1.1 Allgemeine Techniken

Alle zur Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden routinemäßig auf Sterilität überprüft und auf Mycoplasmenfreiheit untersucht. Diese Arbeiten wurden von Technischen Assistentinnen des Arbeitskreises von Prof. Hamprecht durchgeführt und sind von Möller (1989) beschrieben worden. Vor dem Ansäen wurden die Zellzahl und die Lebensfähigkeit der Zellen mit der Methode des Nigrosinausschlusses bestimmt (Kaltenbach *et al.*, 1958). Für immunocytochemische Anfärbungen wurden Zellen auf

sterile quadratische (18 x 18 mm) oder runde Deckgläschen (12 mm Durchmesser) in Plastik Kulturschalen (50 mm Durchmesser) oder 24-*well*-Platten angesät.

5.3.1.2 Astrogliareiche Primärkulturen

Astrogliareiche Primärkulturen (APK) wurden aus den Gehirnen neugeborener Wistar-Ratten angelegt und kultiviert (Hamprecht und Löffler, 1985). Drei Millionen lebende Zellen wurden in 50 mm-Zellkulturschalen in 5 ml Kulturmedium (90 % DMEM, 10 % FCS, 20 U/ml Penicillin G, 20 µg/ml Streptomycinsulfat), 300.000 lebende Zellen pro *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte in 2 ml Kulturmedium, 30 Millionen lebende Zellen in Zellkulturflaschen (175 cm²) in 50 ml Kulturmedium oder 1,2 Millionen lebende Zellen in 35 mm-Zellkulturschalen in 2 ml Kulturmedium angesät. Die Kulturen wurden in einem Kulturalter von 14 d bis 21 d für Experimente verwendet. Für immunocytochemische Anfärbungen wurden Kulturen in einem Kulturalter von 8 d bis 14 d eingesetzt.

5.3.1.3 Oligodendroglareiche Sekundärkulturen

Oligodendroglareiche Sekundärkulturen (OSK) wurden nach einer Modifikation (Hirrlinger *et al.*, 2002b) der Methode von Richter-Landsberg und Vollgraf (1998) präpariert. Dabei wurden APK in Zellkulturflaschen (175 cm²) in einem Kulturalter von 15 d bis 21 d verwendet. Die Zellkulturflaschen wurden bei 37 °C für 2 h bei 190 Umdrehungen pro Minute auf einem Rotationsschüttler (Unimax 1010 mit Inkubator 1000) geschüttelt. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden mit 15 ml frischem Kulturmedium gewaschen. Dann wurden erneut 50 ml Kulturmedium auf die Zellen gegeben und die Kulturflaschen 17 h lang bei 220 Umdrehungen pro Minute und 37 °C geschüttelt. Danach wurde die Zellsuspension in sterilen Zentrifugenröhrchen gesammelt und 10 min lang bei 500 g (4 °C) zentrifugiert. Die erhaltenen Zelniederschläge wurden in je 2 ml OSK-Medium (DMEM mit Transferrin (5 µg/ml), Insulin (5 µg/ml) und Natrium-Selenit (25 ng/ml)) resuspendiert. In der vereinigten Zellsuspension wurde die Zellzahl bestimmt. Pro *well* einer 24-*well*-Platte wurden 200.000 lebende Zellen in 1 ml OSK-Medium, pro Kulturschale (50 mm Durchmesser) 1 Million lebende Zellen in 5 ml OSK-Medium angesät. Alle verwendeten Kulturgefäße waren zuvor mit einer sterilen 0,01 %igen Poly-D-Lysin-Lösung in Wasser (24-*well*-Platte: 0,3 ml; 50 mm-Kulturschale: 3 ml) über Nacht beschichtet worden, um ein Anheften der Oligodendroglia vorläuferzellen an den Kunststoff der Kulturschalen zu ermöglichen. Vor dem Ansäen der Zellsuspension wurden die Kulturschalen sorgfältig mit DMEM gewa-

schen. Am dritten Kulturtag der OSK wurde die Hälfte des OSK-Mediums erneuert. Experimente wurden am sechsten Kulturtag durchgeführt.

5.3.1.4 Microgliareiche Sekundärkulturen

Methode A

Microgliareiche Sekundärkulturen der Methode A (MSK-A) wurden nach einer Modifikation (Hirrlinger *et al.*, 2000) der Verfahren von Giulian und Baker (1986) sowie Colton und Gilbert (1987) gewonnen. Von 14 d bis 21 d alten APK in Zellkulturflaschen (175 cm²) wurden durch zehnmaliges seitliches Klopfen mit der Hand Microgliazellen abgeschüttelt und die abgelösten Zellen mit dem Medium abgenommen; die Suspension wurde in sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (500 g, 15 min, 4 °C) wurde das Medium bis auf ca. 1-2 ml abgesaugt. Die Zellen wurden resuspendiert und die Zellsuspensionen aus mehreren Röhrchen vereinigt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 300.000 Zellen pro *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte und 1 Million Zellen pro Kulturschale (50 mm Durchmesser) angesät. Nach einer Inkubationszeit von 20 bis 30 min im Zellinkubator bei 37 °C wurde dreimal mit 1 ml Kulturmedium gewaschen, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Beim dritten Waschschrift wurde dabei auf eine Mischung aus 50 % gliakonditioniertem Medium und 50 % Kulturmedium gewechselt. Zur Gewinnung des für die MSK verwendeten konditionierten Mediums wurde der Überstand des Zentrifugationsschritts während der Präparation der MSK durch 0,2 µm-Sterilfilter filtriert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Kulturen wurden in einem Alter von drei Tagen verwendet.

Methode B

Microgliareiche Sekundärkulturen der Methode B (MSK-B) wurden nach einer Modifikation des Verfahrens von Saura *et al.* (2003) durch mildes Trypsinieren von APK gewonnen. APK (14 d bis 21 d alt) in Zellkulturschalen mit 50 mm Durchmesser oder in 24-*well*-Platten wurden für 10 bis 15 min mit einer 0,1 %igen Trypsinlösung (37 °C) in DMEM inkubiert. Die Astrogliazellen, die sich als intakte Zellschicht ablösen, wurden abgesaugt und die weiterhin haftenden Zellen zweimal mit DMEM gewaschen. Danach wurden die Kulturen mit MSK-Medium (50 % gliakonditioniertes Medium und 50 % Kulturmedium) inkubiert. Die MSK-B wurden im Alter von 3 d verwendet.

5.3.1.5 Neuronenkulturen

Neuronenreiche Primärkulturen (NPK) wurden aus Gehirnen embryonaler Ratten (E16) nach der Methode von Löffler *et al.* (1986) präpariert und kultiviert. Drei Millionen lebende Zellen wurden in Zellkulturschalen (50 mm Durchmesser) in 5 ml Kulturmedium (90 % DMEM, 10 % HS, 20 U/ml Penicillin G, 20 µg/ml Streptomycinsulfat) eine Million lebende Zellen in Zellkulturschalen (35 mm Durchmesser) in 2 ml oder 500.000 lebende Zellen pro *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte in 2 ml Kulturmedium angesät. Die Kulturen wurden in einem Kulturalter von 5 d bis 7 d für Experimente verwendet. NPK enthalten ca. 5 % GFAP-positive Zellen (Dringen *et al.*, 1999a), jedoch keine Oligodendrogliazellen oder Ependymzellen (Löffler *et al.*, 1986).

Cerebellare Körnerzellen (CKZ) wurden präpariert wie von Schulz *et al.* (1996) beschrieben, in Zellkulturschalen mit 35 mm Durchmesser angesät und freundlicherweise von Prof. Jörg B. Schulz (Neurologische Klinik, Tübingen) für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

5.3.2 Anfärbungen

5.3.2.1 Immuncytochemische Anfärbungen

Die anzufärbenden Zellen wurden auf Deckgläschen (18 mm x 18 mm oder 12 mm Durchmesser) kultiviert. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 3,5 % Paraformaldehyd in phosphat-gepuffertes physiologischer Kochsalzlösung (PBS; 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 150 mM NaCl) 10 min lang fixiert. Nach zweimaligem 10minütigen Waschen mit PBS wurden die Zellen 5 min lang in 0,1 %igem Glycin in PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Inkubation mit 0,3 %igem Triton X-100 + 0,1 %igem Glycin in PBS 10 min lang permeabilisiert. Für die Anfärbung mit anti-GalC wurden die Zellen vor der Fixierung/Permeabilisierung mit HEPES-Medium (25 mM HEPES in DMEM) gewaschen und 1 h lang bei Raumtemperatur mit anti-GalC (1:5 in HEPES-Medium) inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit HEPES-Medium gewaschen und, wie oben beschrieben, fixiert und permeabilisiert. Für die Anfärbung mit anti-GAP-43 wurden die Zellen 15 min lang mit 3,5 % Paraformaldehyd in PBS und 5 min mit kaltem 30 %igem Methanol fixiert und 2 h mit anti-GAP-43 inkubiert.

Die immuncytochemischen Anfärbungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die verwendeten Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 19 angegeben. Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurden die Zellen zweimal

mit PBS je 5 min lang gewaschen. Die Antikörper wurden in PBS mit 10 % Ziegennormalserum (Schafnormalserum bei Anfärbung mit anti-GAP-43) verdünnt. Die fixierten Zellen wurden mit den Primärantikörpern 2 h lang und danach mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörpern 30 min lang unter Lichtausschluss inkubiert. Die Deckgläschen wurden in Immu-Mount eingebettet, bevor die Anfärbung im Fluoreszenzmikroskop untersucht wurde.

5.3.2.2 Chromatinanfärbung

Chromatinanfärbungen wurden verwendet, um die Zellkerne aller Zellen im Präparat sichtbar zu machen. Die Zellen wurden dazu nach Durchführung der immuncytochemischen Anfärbung 5 min lang mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Lin *et al.*, 1976) in PBS inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und in Immu-Mount eingebettet.

5.3.3 Experimentelle Inkubation von Zellkulturen

5.3.3.1 Experimente zur Bestimmung von γ Glutamyltranspeptidaseaktivität, Zellvitalität und Eisengehalt

Zellen in Zellkulturschalen mit 50 mm Durchmesser wurden mit 3 ml DMEM/PS gewaschen und in 3 ml DMEM/PS mit den in den Legenden der Abbildungen und Tabellen angegebenen Substanzen inkubiert. Dabei wurde $\text{TNF}\alpha$ aus einer Stammlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS mit 1 % BSA) bis zur endgültigen Konzentration verdünnt. Kontrollexperimente zeigten, daß BSA keinen Einfluß auf die γ GT-Aktivität hat. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle übrigen Substanzen direkt in DMEM/PS gelöst. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen zur Bestimmung der γ GT-Aktivität zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 0,5 ml Lysepuffer (20 mM Kaliumphosphatpuffer mit 0,2 mM EDTA, pH 7,4) lysiert.

Die Proteinwerte wurden aus Replica-Schalen gewonnen, da das aus den Schalen gewonnene Lysat nicht ausreichend war für die zusätzliche Bestimmung des Proteingehalts. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen, trockengesaugt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Proteinbestimmung gelagert.

Für die Messung der Vitalität der Zellen wurden 10 μl des Mediums entnommen, um die LDH-Aktivität im Medium wie unter 5.3.4.4 beschrieben zu bestimmen.

Zur Bestimmung des Eisengehalts FAC-inkubierter Zellen in Zellkulturschalen mit

50 mm Durchmesser wurden die Zellen mit 3 ml DMEM/PS gewaschen und in 3 ml DMEM/PS mit den in den Legenden der Abbildungen und Tabellen angegebenen Konzentrationen an FAC inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, trockengesaugt bei -20 °C bis zur Bestimmung des Eisengehaltes gelagert.

5.3.3.2 Experimente zur Freisetzung von Glutathion und Glutathiondisulfid

Zellen in *wells* von 24-*well*-Zellkulturplatten wurden mit 2 ml auf 37 °C vorgewärmtem Minimalmedium (MM; 44 mM NaHCO₃, 110 mM NaCl, 1,8 mM CaCl₂, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 0,92 mM NaH₂PO₄, 5 mM Glucose, mit CO₂ auf pH 7,4 eingestellt) gewaschen und in 0,5 ml MM in Anwesenheit und Abwesenheit des γ GT-Inhibitors Acivicin (100 μ M) inkubiert. Zur Bestimmung des GSx-Gehaltes des Mediums wurden 10 μ l des Mediums entnommen und mit 90 μ l 0,11 % (w/v) SSS in einem *well* einer Mikrotiterplatte gemischt. Zur Bestimmung des GSSG-Gehaltes des Mediums wurden Proben des Mediums entnommen und 1:1 mit 1 % (w/v) SSS gemischt. 130 μ l dieser Mischung wurden mit 2-Vinylpyridin (2VP) derivatisiert (Griffith, 1980; Dringen und Hamprecht, 1996). Für die Messung der Vitalität der Zellen wurden 10 μ l des Mediums entnommen, um die LDH-Aktivität im Medium wie in Abschnitt 5.3.4.4 beschrieben zu bestimmen.

5.3.3.3 Experimente zum Umsatz von extrazellulärem Glutathiondisulfid

Experimente mit Zellen Zellen in *wells* von 24-*well*-Zellkulturplatten wurden mit 2 ml auf 37 °C vorgewärmtem Minimalmedium oder DMEM/PS gewaschen und in 1 ml MM oder DMEM/PS mit den in den Legenden der Abbildungen und Tabellen zum GSSG-Umsatz angegebenen Substanzen inkubiert. Bei Experimenten mit Zellysaten wurden Zellen in 24-*well*-Zellkulturplatten nach dem Waschen für 1 h mit den in den Abbildungen angegebenen Detergenzien lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit den in den Abbildungen angegebenen Substanzen inkubiert. Zur Bestimmung des GSx-Gehaltes des Mediums wurden 10 μ l des Mediums entnommen und soweit nötig mit MM oder DMEM/PS verdünnt. Aus den Verdünnungen wurden 10 μ l entnommen und mit 90 μ l 0,11 % (w/v) SSS in einem *well* einer Mikrotiterplatte gemischt. Die GSx-Konzentration wurde wie unten beschrieben (5.3.4.2) bestimmt.

Experimente im Microtiterformat Zellen in Zellkulturschalen mit 50 mm Durchmesser wurden mit 3 ml auf 37 °C vorgewärmtem PBS gewaschen und sofern nicht

anders angegeben mit 0,5 ml Lysepuffer (25 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,2 mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Digitonin) 30 min lysiert. Dann wurde das Lysat quantitativ entnommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde in *wells* einer Microtiterplatte mit GSSG, Cystin und anderen Substanzen inkubiert, die in den Legenden von Abbildungen und Tabellen angegeben sind. Zur Bestimmung des GSx-Gehaltes wurden 10 μl Probe entnommen und, soweit nötig, mit Wasser verdünnt. Aus den Verdünnungen wurden 10 μl entnommen, mit 90 μl 0,11 % (w/v) SSS in einem *well* einer Mikrotiterplatte gemischt und die GSx-Konzentration wurde bestimmt.

5.3.3.4 Experimente mit adenoviralen Vektoren

Ein Plasmid (PGT-12) mit der DNA der γGT wurde freundlicherweise von Dr. Helmut Deisler (Universität Ulm) zur Verfügung gestellt. Die DNA der γGT wurde als Transgen über den *shuttle*-Vektor pTrack-CMV des AdEasy Systems (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in ein adenovirales DNA-Gerüst eingebracht und über kompetente Zellen wurden dann die Viruspartikel generiert. Die Klonierung und die Generierung der Viruspartikel für die γGT wurden freundlicherweise von Dr. Ellen Gerhart (Neurologische Klinik Tübingen) im S2-Bereich des Verfügungsgebäudes der Universität Tübingen durchgeführt. Das Transgen wurde zunächst in den *shuttle*-Vektor pTrack-CMV kloniert. Das Produkt wurde über spezifische Schnittstellen linearisiert und mit dem viralen Grundgerüst AdEasy1 in Bakterien kotransfiziert. Das daraus neu entstandene Plasmid wurde wieder linearisiert und in HEK293-Zellen transfiziert. Diese Zellen haben die Fähigkeit aus dem viralen Gerüst Viruspartikel zu generieren (Imperiale und Kochanek, 2004; Volpers und Kochanek, 2004). Durch Gendelektion haben die Viren selbst diese Fähigkeit verloren (Imperiale und Kochanek, 2004; Volpers und Kochanek, 2004). In Abbildung 32 ist der virale Vektor schematisch dargestellt.

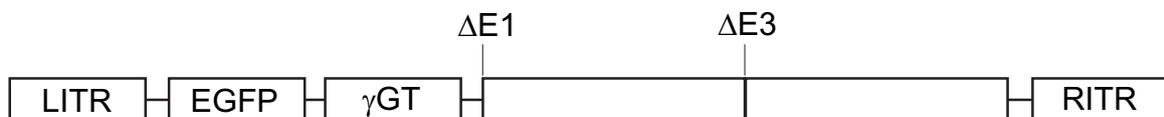


Abb. 32 Schematische Darstellung des viralen Vektors pAD- γGT . Die Expression des Transgens und des Markerproteins EGFP steht unter der Kontrolle von Cytomegalovirus (CMV)-Promotern. Das virale Genom ist in den E1 und E3 Regionen deletiert (ΔE1 , ΔE3). Die inversen terminalen Repetitionen (ITR) enthalten Polymerasebindungssequenzen. (LITR: linke inverse terminale Repetition; RITR: rechte inverse terminale Repetition)

Zum Infizieren der Zellen wurde das jeweilige Zellkulturmedium bis auf einen Rest

abgenommen, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, und die Viruspartikelsuspension entsprechend der Endkonzentration an Partikeln pro Zelle (MOI) zugegeben. Nach 30 min Inkubation wurde das Medium wieder auf das Ausgangsvolumen (2 ml) aufgefüllt und die Zellen wurden je nach Kulturtyp 2 d bis 5 d lang inkubiert. APK wurden im Kulturalter von 14 d bis 21 d mit der in den Legenden der Abbildungen und Tabellen angegebenen Anzahl an Viruspartikeln pro lebender Zelle (MOI) für 2 d bis 3 d inkubiert. NPK wurden im Alter von 4 d für 2 d inkubiert, CKZ im Alter von 2 d bis 3 d für 5 d. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS (4 °C) gewaschen. Nach dem Waschen galten die Zellen als virusfrei und konnten entsprechend den Bestimmungen der Sicherheitsstufe S1 weiter behandelt werden. Die konstruierten Viruspartikel haben nicht die Fähigkeit sich in der Wirtszelle neu zu generieren (Imperiale und Kochanek, 2004; Volpers und Kochanek, 2004).

5.3.4 Bestimmungsmethoden

5.3.4.1 γ Glutamyltranspeptidase

Die γ GT-Aktivität von Zellen wurde nach einer Modifikation der von Dringen *et al.* (1997a) beschriebenen Methode bestimmt. Das Testprinzip beruht auf dem von der γ GT vermittelten Transfer des γ -Glutamyl-Anteils von GCNA auf das Substrat Glycylglycin. Die Entstehung des 3-Carboxy-4-nitroanilins kann photometrisch bei 405 nm verfolgt werden.

Zur Bestimmung der Aktivität der γ GT in Zellen wurden neurale Zellkulturen für 10 min in 500 μ l Lysepuffer (20 mM Kaliumphosphatpuffer mit 0,2 mM EDTA, pH 7,4) auf Eis lysiert. Das Zellysate wurde quantitativ in Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (5 min, 15.000 g, 4 °C). Der Niederschlag der Zentrifugation wurde in 100 μ l Lysepuffer mit 1 % (w/v) Triton X-100 (50 μ l bei Schalen mit 35 mm Durchmesser) 20 min lang resuspendiert und erneut zentrifugiert wie oben beschrieben. Zur Bestimmung der γ GT-Aktivität wurden 40 μ l Überstand der zweiten Zentrifugation in *wells* einer Mikrotiterplatte mit 140 μ l 6,4 mM GCNA in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 180 μ l 50 mM Glycylglycin in 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, gestartet und im ELISA-Reader verfolgt. Die Aktivität der γ GT wurde mittels des zuvor ermittelten Extinktionskoeffizienten für 3-Carboxy-4-nitroanilin $\varepsilon_{405} = 8,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet.

5.3.4.2 Glutathion und Glutathiondisulfid

Die Konzentration an GSx (Menge an GSH plus zweifache Menge an GSSG) von Lysaten und Medien wurde nach der Modifikation der Methode von Tietze (1969) nach Dringen und Hamprecht (1996) in *wells* von Microtiterplatten bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der Reduktion von DTNB durch GSH zu 5-Thio-2-nitrobenzoat, dessen Entstehung photometrisch bei 405 nm verfolgt werden kann. Um diese Nachweisreaktion spezifisch für GSH zu machen, wurden der Reaktionsmischung NADPH und GR zugesetzt, die entstandenes GSSG wieder zu GSH reduziert. Die Bedingungen wurden so gewählt, daß nur die Menge an GSx im Testansatz limitierend für die Reaktionsgeschwindigkeit ist. Der Extinktionsanstieg pro Zeiteinheit ist somit ein Maß für den Glutathiongehalt einer Probe, der durch Vergleich mit GSx-Standards berechnet wird. Zur Bestimmung von Glutathion in Zellysaten oder Medien wurden Proben mit H₂O auf 100 µl Volumen (Endkonzentration SSS: 0,1 %) in *wells* einer Microtiterplatte verdünnt, bevor 100 µl Reaktionsmischung (0,3 mM DTNB, 0,4 mM NADPH, 192 mU GR, 1 mM EDTA in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5) zugegeben wurden. Der Anstieg der Extinktion bei 405 nm pro *well* wurde mit dem *ELISA-Reader* gemessen und mit dem von GSx-Standards verglichen.

Der Gehalt an Glutathiondisulfid in den Proben wurde nach vorheriger Derivatisierung von GSH mit 2VP (Griffith, 1980) bestimmt. Dazu wurden zur Bestimmung des GSSG-Gehaltes in den Zellen je 130 µl der Lysatüberstände in 1 % (w/v) SSS, zur Bestimmung des GSSG-Gehaltes in den Medien je 130 µl der Mischung aus Medium und 1 %iger SSS, bzw. die GSx-Standards in 1 % (w/v) SSS mit 5 µl 2VP versetzt. Dann wurde mit 0,2 M Tris ein pH-Wert zwischen 5 und 7 eingestellt (Griffith, 1980). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 10 µl zur GSx-Bestimmung nach dem oben beschriebenen Verfahren eingesetzt. Mit Hilfe des Auswerteprogrammes „Revelation“ (Dynex Technologies, Denkendorf) des *ELISA-Readers* wurde aus den Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit der Ansätze mit GSx-Standards eine Eichgerade erstellt, die zur Auswertung der Proben herangezogen wurde.

5.3.4.3 Eisen

Die Quantifizierung von Eisen wurde nach einer Modifikation (Riemer *et al.*, 2004; Höpken, 2005) der von Fish (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode basiert auf zwei Schritten. Im ersten Schritt wird Eisen durch die Behandlung mit saurer Kaliumpermanganatlösung (KMnO₄/HCl) aus Komplexen und Proteinen freigesetzt. Im zweiten Schritt wird das freigesetzte Eisen durch den Eisenchelator

Ferrozin gebunden. Die Absorption des Ferrozin-Eisen-Komplexes bei 550 nm wird zur Quantifizierung des Eisens genutzt. Da Ferrozin spezifisch Fe^{2+} bindet, wird zur Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} Ascorbat zugesetzt. Der Kupferchelator Neocuproin verhindert zudem, daß Ferrozin Kupfer bindet und dadurch Kupferionen das Ergebnis der Eisenbestimmung verfälschen.

Eingefrorene APK in Zellkulturschalen wurden durch Zugabe von 800 μl 50 mM NaOH lysiert. 100 μl Lysat wurden mit 100 μl 10 mM HCl (Lösungsmittel für FeCl_3 -Standard) und 100 μl Freisetzungsreagenz (1:1 Mischung von 4,5 % (w/v) Kaliumpermanganatlösung und 1,4 M HCl) gemischt und für 2 h bei 60 °C in der Dampf-atmosphäre eines geschlossenen Wasserbads inkubiert. Anschließend wurden in jedes Gefäß 30 μl des Detektionsreagenz (6,5 mM Ferrozin; 6,55 mM Neocuproin; 2,5 M Ammoniumacetat; 1 M Ascorbat) gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit wurden jeweils 280 μl der zu untersuchenden Proben in *wells* einer Microtiterplatte pipettiert und die Absorption wurde bei 550 nm gemessen. Der Eisengehalt wurde durch Vergleich der Absorption mit der von Standardmengen an FeCl_3 bestimmt. Die Proteinwerte wurden für *Replica-wells* bestimmt.

Zur Herstellung der Eisenstandards wurden 0 bis 30 nmol in 100 μl 10 mM HCl gelöstes FeCl_3 mit 100 μl 50 mM NaOH, 100 μl 0,7 M HCl und 30 μl Detektionsreagenz gemischt. Nach 30 min Inkubationszeit wurden 280 μl jedes Standards in *wells* einer Microtiterplatte pipettiert und die Absorption bei 550 nm gemessen.

5.3.4.4 Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde durch die Messung der Aktivität der LDH im Inkubationsmedium bestimmt. Dazu wurde eine Modifikation (Dringen *et al.*, 1998b) des Tests von Vassault (1983) auf Microtiterplattenmaßstab verwendet. Ein aliquoter Teil des Inkubationsmediums (10 μl) wurde mit 80 mM Tris-HCl-Puffer, 200 mM NaCl, pH 7,2 in einem *well* einer Microtiterplatte auf ein Volumen von 170 μl verdünnt. Nach Zugabe von 180 μl Reaktionsmischung (0,7 mM Natriumpyruvat, 0,4 mM NADH, 200 mM NaCl in 80 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,2) wurde die Abnahme der Absorption bei 340 nm mit dem ELISA-Reader aufgezeichnet. Die LDH-Aktivität des aliquoten Teils des Inkubationsmediums wurde mit der Aktivität im Inkubationmedium nach völliger Lyse der Zellen (30 min Inkubation bei Raumtemperatur nach Zugabe von Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 1 % (w/v)) verglichen. Null Prozent Lebensfähigkeit entspricht 100 % LDH-Aktivität im Inkubationsmedium.

5.3.4.5 Protein

Der Proteingehalt von Zellkulturen wurde nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) bestimmt. Dabei wurde BSA als Standardprotein verwendet. Das Protein von Zellen in *wells* von 24-*well*-Zellkulturplatten wurde, wie in Hirrlinger *et al.* (1999) beschrieben, in 0,2 ml 0,5 M NaOH solubilisiert. Das Protein von Zellen in Kulturschalen mit 50 mm Durchmesser wurde in 2 ml (APK) oder 1 ml (NPK, MSK, OSK) 0,5 M NaOH solubilisiert.

5.3.5 Molekularbiologische Methoden

5.3.5.1 Sequenzanalyse und *Primerdesign*

Als Grundlage von Sequenzvergleichen wurden cDNA-Sequenzen aus der *Gene bank*-Datenbank der *National Institutes of Health* oder des EMBL herangezogen. Sequenzen wurden mit Hilfe des Blast-Programmpaketes (Altschul *et al.*, 1997; Tatusova und Madden, 1999) miteinander und mit der Datenbank verglichen.

Zum Design von PCR-*Primern* für γ GT und xCT wurden die bekannten humanen und murinen cDNA-Sequenzen verwendet (*Accession number* siehe Tab. 20). Aus diesen cDNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „primer3“ (Rozen und Skaletsky, 2000) *Primer* gesucht, die den offenen Leserahmen (ORF) des Gens bzw. Amplifikationsprodukte von 200 bis 400 bp Länge einschlossen. Um das Risiko der Amplifikation anderer Gene möglichst gering zu halten, wurden alle verwendeten PCR-*Primer* durch Vergleich mit der *Gene bank*-Datenbank auf Komplementarität zu anderen bekannten Sequenzen überprüft. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 20 aufgeführten PCR-*Primer* verwendet.

5.3.5.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der γ Glutamyltranspeptidase-mRNA

RNA aus APK, NPK, MSK und OSK sowie aus Leber und Hirn adulter Ratten wurde freundlicherweise von Dr. Johannes Hirrlinger (Hirrlinger *et al.*, 2002a) zur Verfügung gestellt. Ein μg Gesamt-RNA in 11,5 μl H₂O wurde mit 1 μg *Random-Hexamer-Primer* für 5 min bei 70 °C inkubiert und sofort auf Eis überführt. Nach Zugabe von 4 μl 5fach RT-Puffer vom Hersteller der Reversen Transkriptase, 2 μl dNTP (je 10 mM) und 0,5 μl RNAsin auf ein Volumen von 19 μl wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit 200 U Reverser Transkriptase auf ein Gesamtvolumen

Tabelle 20 PCR-Primer für die Amplifikation von γ GT und hxCTb.

cDNA	Accession number	Name des Primers	Sequenz 5' → 3'	Produktgröße (bp)
γ GT	RNGLTP01	gGT-2for gGT-2rev	GCCACCAGTACCATCAACCT CTTCAGACCAGCAGTCACCA	399
hxCTb	AB040875	xCTb.for.bgIII xCTb.rev.not1	GAAGATCTATGGTCAGAAAG CCTGTTGTGT AAGGAAAAAAGCGGCCGCTC ACTTATCGTCCTGATCCTTG TAATCCATATCACATGCTTG TGCACC	1483 (ORF)
β -Actin	V01217	β -Act.for β -Act.rev	GGGTCAGAAGGACTCCTACG GGTCTCAAACATGATCTGGGG	237

von 20 μ l aufgefüllt und nach 10minütiger Inkubation bei 25 °C 1 h lang bei 37 °C revers transkribiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 10minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Die erhaltenen einzelsträngigen cDNA wurden mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ nach der Anleitung des Herstellers aufgereinigt und in 50 μ l Elutionspuffer (1 mM Tris-HCl, pH 8,5) aufgenommen.

Die PCR wurden in einem Ansatz aus 1,5 mM MgCl₂, 1,25 U Taq-DNA-Polymerase, 0,2 μ M Primern, je 0,2 mM dNTP und 2 μ l der aufgereinigten cDNA in 50 μ l PCR-Puffer (vom Hersteller der Polymerase als 10fach konzentrierte Stammlösung geliefert) durchgeführt. Nach 3 min Denaturierung bei 94 °C und 35 Zyklen mit je 1 min Denaturierung (94 °C), 30 s Anlagerung (52 °C) und 1,5 min DNA-Synthese (72 °C) gefolgt von einer abschließenden Synthesephase von 15 min bei 72 °C wurden die PCR-Produkte auf einem Gel aus 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) analysiert.

5.3.5.3 Klonierung der cDNA des xCT-Gens in einen *shuttle*-Vektor

Die DNA des hxCTb-Proteins (*Gene bank*-Datenbank der *National Institutes of Health* Accession number AB040875) (Abb. 34) wurde freundlicherweise von Prof. Y. Kanai, Tokyo, Japan, in einem Plasmid zur Verfügung gestellt. Um einen viralen Vektor mit dem pAd-Easy-System (Stratagene) generieren zu können, muß die DNA in den *shuttle*-Vektor pTrack-CMV überführt werden. Dazu wurde mittels PCR die cDNA

des hxCTb-Gens amplifiziert und gleichzeitig über die *Primer* (Tab. 20) Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Bgl II und Not I sowie eine Markierung (*flag-tag*; Brizzard *et al.*, 1994) eingeführt. Abb. 33 zeigt die schematische Karte des *shuttle*-Vektors pTrack-CMV und des Transgens hxCTb.

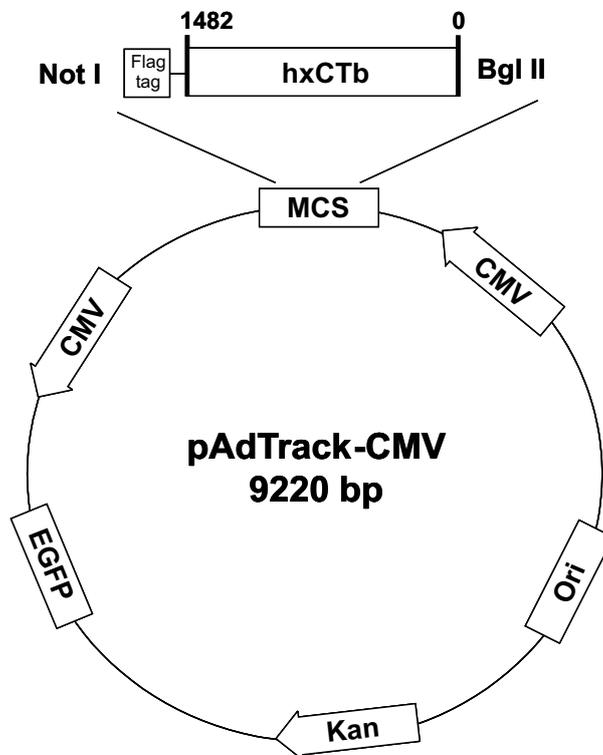


Abb. 33 Schematische Darstellung des *shuttle*-Vektors pTrack-CMV und des Transgens hxCTb. Das Transgen mit der Markierung (*flag-tag*) wird über Schnittstellen von Restriktionsenzymen in die *multiple cloning site* MCS eingebracht. Die Expression des Transgens und des Markerproteins EGFP steht unter der Kontrolle von Cytomegalovirus (CMV)-Promotern. (Ori: Ursprung, Origin; Kan: Kanamycinresistenz).

Die PCR wurde in einem Ansatz aus 2,5 U MasterTaq-DNA-Polymerase, je 0,2 μ M *Primern*, je 0,2 mM dNTP und 2 μ l des die humane xCT-DNA enthaltenden Plasmids in 50 μ l High-fidelity-PCR-Puffer (vom Hersteller der Polymerase als 10fach konzentrierte Stammlösung mit 25 mM Mg^{2+} geliefert) durchgeführt. Nach 3 min Denaturierung bei 94 °C und 40 Zyklen mit je 1 min Denaturierung (94 °C), 30 s Anlagerung (52 °C) und 1,5 min DNA-Synthese (72 °C) gefolgt von einer abschließenden Synthesephase von 15 min bei 72 °C wurden das PCR-Produkt auf einem Gel aus 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer analysiert, die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ gereinigt.

Die amplifizierte DNA (6 μl) und der *shuttle*-Vektor pTrack-CMV (1 μl) wurden mit den Restriktionsenzymen Not I und Bgl II (je 10 U) in dem vom Hersteller beigelegten Puffer (10fach konzentrierte Stammlösung) in einem Gesamtvolumen von 50 μl in einem Doppelverdau bei 37 °C über Nacht geschnitten. Nach dem Verdau wurde der Vektor pTrack-CMV mit Alkalischer Phosphatase (2 U) in 60 μl Gesamtvolumen 30 min lang bei 37 °C dephosphoryliert um eine Religation zu verhindern. Vektor und hxCTb-DNA wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ gereinigt wie vom Hersteller angegeben und zum Vergleich der Mengenverhältnisses zwischen der hxCTb-DNA und dem Vektor auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen. Zum Ligieren der DNA und des Vektors wurden 2 μl der hxCTb-DNA und 1 μl des pTrack-CMV mit 2,5 U T4-DNA Ligase in dem von Hersteller beigelegten Puffer (10fach konzentrierte Stammlösung) bei 16 °C über Nacht inkubiert.

Mit 5 μl des Ligationsansatzes wurden 50 μl kompetente *E. coli* (DH5 α) Bakterien chemisch transformiert. Dazu wurde das Gemisch aus ligierten Plasmiden und Bakterien zunächst 30 min lang auf Eis gestellt, dann 30 s auf 42 °C erwärmt (Hitzeschock) und sofort wieder 2 min lang auf Eis gestellt. Zu den Zellen wurden dann 500 μl warmes (37 °C) SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1987) gegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. 150 μl Zellsuspension wurden auf Agarplatten mit 50 μg Kanamycin/ml ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden Zellen in Selektionsmedium (LB-Medium mit 50 μg Kanamycin/ml) unter Schütteln bei 37 °C vermehrt. Aus den Zellen wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem „Mini-Prep-Kit“ die Plasmid-DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym Eco321 (EcoRV) analysiert. Dabei wiesen zwei Klone das erwartete Eco321 (EcoRV) Fragment von 1159 bp auf. Die zwei positiven Klone wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sequenziert.

Die Sequenzanalyse der beiden Plasmide (xCT-D3 und xCT-D10) zeigte, daß die Sequenzen mit der ursprünglichen hxCTb-Sequenz größtenteils übereinstimmten. Bei den Plasmiden xCT-D3 und xCT-D10 war vor dem Stopcodon die cDNA des *flag-tag* (24 bp), eingefügt worden. Die Sequenzierung des Plasmids xCT-D3 zeigte im Vergleich zur hxCTb-Sequenz Mutationen an fünf Positionen. Die Mutationen in den Positionen 540 und 549 verursachen keine Änderung in der Aminosäuresequenz. Verändert wird die Aminosäuresequenz aber durch die Mutationen an den Positionen 241 (T zu A), 455 (E zu G) und 595 (L zu H). Die Veränderungen sind alle erheblich, da die Seitenketten der eingeführten Aminosäuren im Vergleich zu den ursprünglichen Aminosäuren unterschiedliche chemische Eigenschaften haben. Eine polare Aminosäure (T) wird gegen eine unpolare (A) getauscht, eine geladene Seitenkette (E) gegen

```

1   ATGGTCAGAAAGCCTGTTGTGTCCACCATCTCCAAAGGAGGTTACCTGCAGGGAAATGTT
61  AACGGGAGGCTGCCTTCCCTGGGCAACAAGGAGCCACCTGGGCAGGAGAAAGTGCAGCTG
121 AAGAGGAAAGTCACTTTACTGAGGGGAGTCTCCATTATCATTGGCACCATCATTGGAGCA
181 GGAATCTTCATCTCTCCTAAGGGCGTGCTCCAGAACACGGGCAGCGTGGGCATGTCTCTG
241 ACCATCTGGACGGTGTGTGGGGTCCCTGTCACTATTTGGAGCTTTGTCTTATGCTGAATTG
301 GGAACAACATAAAAGAAATCTGGAGGTCATTACACATATATTTTGGAAAGTCTTTGGTCCA
361 TTACCAGCTTTTGTACGAGTCTGGGTGGAACCTCTCATAATACGCCCTGCAGCTACTGCT
421 GTGATATCCCTGGCATTGGACGCTACATTCTGGAACCATTTTTTATTCAATGTGAAATC
481 CCTGAACTTGCATCAAGCTCATTACAGCTGTGGGCATAACTGTAGTGATGGTCCTAAAT
541 AGCATGAGTGTGAGCTGGAGCGCCCGGATCCAGATTTTCTTAACCTTTTGCAAGCTCACA
601 GCAATTCTGATAATTATAGTCCCTGGAGTTATGCAGCTAATTAAGGTCAAACGCAGAAC
661 TTTAAAGACGCCTTTTTCAGGAAGAGATTCAAGTATTACGCGGTTGCCACTGGCTTTTTAT
721 TATGGAATGTATGCATATGCTGGCTGGTTTTACCTCAACTTTGTTACTGAAGAAGTAGAA
781 AACCCTGAAAAAACCATTCCCTTGCAATATGTATATCCATGGCCATTGTCACCATTGGC
841 TATGTGCTGACAAATGTGGCCTACTTTACGACCATTAATGCTGAGGAGCTGCTGCTTTCA
901 AATGCAGTGGCAGTGACCTTTTCTGAGCGGCTACTGGGAAATTTCTCATTAGCAGTTCGG
961 ATCTTTGTTGCCCTCTCCTGCTTTGGCTCCATGAACGGTGGTGTGTTTGTCTCTCCAGG
1021 TTATTCTATGTTGCGTCTCGAGAGGGTCACTTCCAGAAATCCTCTCCATGATTCATGTC
1081 CGCAAGCACACTCCTCTACCAGCTGTTATTGTTTTGCACCCTTTGACAATGATAATGCTC
1141 TTCTCTGGAGACCTCGACAGTCTTTTGAATTCCTCAGTTTTGCCAGGTGGCTTTTTATT
1201 GGGCTGGCAGTTGCTGGGCTGATTTATCTTCGATACAAATGCCAGATATGCATCGTCCT
1261 TTCAAGGTGCCACTGTTTCATCCAGCTTTGTTTTCTTCACATGCCTCTTCATGGTTGCC
1321 CTTTCCCTCTATTCCGACCCATTTAGTACAGGGATTGGCTTCGTCATCACTCTGACTGGA
1381 GTCCCTGCGTATTATCTCTTTATTATATGGGACAAGAAACCCAGGTGGTTTAGAATAATG
1441 TCAGGGTTCCTAGCACTGATGCCTGCACAAGCATGTGATATGTGA

```

Abb. 34 Sequenz der humanen xCT-Untereinheit hxCTb. Die Abbildung zeigt den offenen Leserahmen (ORF) des Gens (Genbank-Datenbank des National Institutes of Health *Accessionnumber* AB040875).

eine ungeladene (G), eine unpolare Aminosäure (L) gegen eine basische (H). Mögliche Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Funktionalität des Proteins sind nicht voraussagbar. Das Plasmid xCT-D10 war an der Position 1239 mutiert. Bei diesem Plasmid ist zusätzlich das *flag-tag* an der Position 19 des *flag-tag* verändert. Es fehlt die ursprüngliche Base. Dadurch verschiebt sich die Sequenz des gesamten Gens und das ursprüngliche Stopcodon existiert nicht mehr. Ein neues Stopcodon ergibt sich aber 21 bp weiter, sodaß das gesamte Protein um sieben Aminosäuren länger wird. Auch hier sind die Auswirkungen auf die Funktionalität des Proteins nicht voraussehbar. Aus zeitlichen Gründen konnten die Mutationen der klonierten Plasmide bisher nicht beseitigt werden. Nach Beseitigung der Mutationen könnten die Plasmide zur Generierung adenoviraler Vektoren des AdEasy Systems genutzt werden.

5.3.6 Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen zur Untersuchung von Produkten des Umsatzes von GSSG wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Alexander Beck (Medizinische Klinik Abt. VI, Tübingen) durchgeführt. GSSG wurde einzeln oder in Kombination mit oder ohne Lysatüberständen von APK in Microtiterplatten (5.3.3.3) 2 h lang bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben filtriert (10 kDa Ausschlußgrenze), mit 10 % Lösungsmittel (40 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (v/v/v)) gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Die massenspektrometrischen Bestimmungen (positiv-Ionenmodus) wurden im FIA-Modus (FIA: *flow injection analysis*) durchgeführt. Für die Bestimmungen von Metaboliten wurde keine HPLC-Säule verwendet, d.h. vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgte keine chromatographische Trennung. Die HPLC-Anlage förderte die Spraylösung (40 % Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in Wasser (v/v/v)) konstant bei einem Fluß von 10 µl/min in die Electrospray-Ionisationsquelle (ESI-Quelle). Die Probe (1 µl Injektionsvolumen) wurde mit dem Autoinjektor aufgetragen und direkt in die ESI-Quelle geleitet. Jede Probe wurde zunächst im Übersichtsmodus (75 bis 750 m/z) ohne Kollisionsaktivierung vermessen. Zur quantitativen Analyse der Einzelkomponenten (GSSG: 613,1 m/z; Cystin: 241,2 m/z; GS-SC: 427,1 m/z) wurde das jeweilige Molekülion in separaten Läufen unter MS/MS-Bedingungen analysiert. Für jede Komponente wurde dazu eine separate MS/MS-Methode erstellt (Tabelle 21).

Tabelle 21 Parameter der MS/MS-Analysen.

Parameter (Einheiten)	analysiertes Ion		
	613,1 m/z	241,2 m/z	427,1 m/z
generelle Parameter			
<i>Scanbereich</i> (m/z)		75-750	
<i>normal scan mode</i> (m/z × s ⁻¹)		13000	
<i>instrument charge control</i>		50000	
max. Akkumulationszeit (ms)		200	
ESI-Spannung (V)		3300	
<i>nebulizer gas</i> (psi)		18.00	
Trockengas (N ₂) (l/min)		6	
Temperatur (°C)		325	
spezielle Parameter			
<i>isolation mass</i> (m/z)	613,1	241,2	427,1
<i>isolation width</i> (m/z)	3	3	3
<i>fragmentation cut off</i> (m/z)	170	64	117
<i>fragmentation amplitude</i> (V)	0,75	1,1	0,85

6 Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit sollten Vorkommen und Modulation der γ Glutamyltranspeptidase (γ GT) in neuronalen Zellen sowie der Verbleib extrazellulären Glutathiondisulfids (GSSG) in neuronalen Zellkulturen untersucht werden.

Das Vorkommen von γ GT konnte in allen vier verwendeten neuronalen Zellkulturtypen (astrogliareiche und neuroneneiche Primärkulturen (APK bzw. NPK), microgliareiche und oligodendroglareiche Sekundärkulturen (MSK bzw. OSK)) nachgewiesen werden, wobei die spezifische Aktivität in Astrogliazellen am höchsten war. Die Aktivität der γ GT stieg in APK in Anwesenheit von Tumor-Nekrose-Faktor α ($\text{TNF}\alpha$) innerhalb von 72 h auf das 4,5fache des Ausgangswertes an. Mit steigender Konzentration an $\text{TNF}\alpha$ erhöhte sich die spezifische Aktivität der γ GT. Der $\text{TNF}\alpha$ -abhängige Anstieg der γ GT-Aktivität konnte durch Gaben des γ GT-Inhibitors Acivicin verhindert werden. Der Proteinbiosyntheseinhibitor Cycloheximid unterdrückte die Erhöhung der γ GT-Aktivität durch $\text{TNF}\alpha$. Somit beruhte der $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Anstieg der spezifischen γ GT-Aktivität in APK auf einer *de novo*-Synthese des Proteins. Physiologisches Substrat der γ GT ist extrazelluläres Glutathion (GSH). Die durch $\text{TNF}\alpha$ erhöhte Aktivität der γ GT bewirkte, daß von APK exportiertes GSH signifikant schneller abgebaut wurde als in Kontrollen ohne $\text{TNF}\alpha$. Nach Inkubation von APK mit Lipopolysacchariden und Interferon γ oder dem Stickstoffmonooxid-donor Nitroprussidnatrium konnte ebenfalls ein Anstieg der spezifischen γ GT-Aktivität beobachtet werden. Eine Steigerung der spezifischen γ GT-Aktivität in APK sowie ein erhöhter Eisengehalt der Zellen wurde nach Inkubation mit Eisenionen in Form von Ammoniumeisen(III)citrat erreicht. Nach Überexpression der γ GT durch adenoviralen Gentransfer in verschiedenen neuronalen Zelltypen konnte eine 1000-2500fache Erhöhung der spezifischen γ GT-Aktivität gemessen werden. Die Transfektionsrate lag dabei bei ca. 20 %. Die intrazelluläre GSH-Konzentration war bei γ GT-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen verringert.

Extrazelluläres GSSG verschwand in Anwesenheit von Cystin in intakten APK oder lysaten oder zellfreien Extrakten daraus. Dabei war der Umsatz von extrazellulärem GSSG abhängig von der eingesetzten Lysatmenge, der Konzentration der Substrate

und vom pH-Wert des eingesetzten Puffers. Der GSSG-Umsatz war in intakten Zellen spezifisch für das Substrat L-Cystin. Im Gegensatz dazu wurde GSSG in Überständen von APK-Lysaten auch in Anwesenheit von D-Cystin, (CysGly)₂ und (GlyCys)₂ umgesetzt. Inhibiert wurde der Umsatz von GSSG in intakten Zellen durch 5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoesäure), Iodacetamid und CuSO₄, in Lysatüberständen außerdem durch Bacitracin. Massenspektrometrische Analysen von Reaktionsansätzen mit Lysatüberständen ergaben bei dem Umsatz von GSSG ein verstärktes Signal bei 428,1 m/z im Vergleich zu Kontrollen. Die Signale der Molekülonen von GSSG und Cystin nahmen dagegen im Vergleich zu den Kontrollen in Anwesenheit von Lysatüberstand ab. Das Molekülion mit 428,1 m/z wurde durch Fragmentierung als gemischtes Disulfid aus GSH und Cystein identifiziert. Die Stöchiometrie der Reaktion von je einem Molekül GSSG und Cystin zu zwei Molekülen des gemischten Disulfids wurde durch die Signalintensitäten der Molekülonen bei der massenspektrometrischen Analyse bestätigt.

Literaturverzeichnis

- Aggarwal B, Kohr W, Hass P, Moffat B, Spencer S, Henzel W, Bringman T, Nedwin G, Goeddel D und Harkins R (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 260: 2345–2354.
- Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohno M, Sasamoto K, Miyazaki K, Ueda S und Maeda H (1993) Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/ \cdot NO through a radical reaction. *Biochemistry* 32: 827–832.
- Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G und Probert L (2003) Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 709–714.
- Akerboom T und Sies H (1989) Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol* 173: 523–534.
- Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford-Perricaudet L, Poenaru L, Perricaudet M, Kahn A und Peschanski M (1993) Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat Genet* 3: 224–228.
- Aktan F (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75: 639–653.
- Allen J, Shanker G und Aschner M (2001) Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor cystine in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res* 894: 131–140.
- Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W und Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl: S18–25.
- Anderson M, Allison R und Meister A (1982) Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified γ -glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D₄ and γ -glutamyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 1088–1091.

- Anderson M, Underwood M, Bridges R und Meister A (1989) Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *FASEB J* 3: 2527–2531.
- Arakawa T und Yphantis D (1987) Molecular weight of recombinant human tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 262: 7484–7485.
- Aranguéz I, Torres C und Rubio N (1995) The receptor for tumor necrosis factor on murine astrocytes: characterization, intracellular degradation, and regulation by cytokines and Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Glia* 13: 185–194.
- Araujo D (1992) Contrasting effects of specific lymphokines on the survival of hippocampal neurons in culture. In Meyer E (Hrsg.), *Treatment of Dementias*, Plenum Press, New York, S. 113–122.
- Arthur J (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 57: 1825–1835.
- Bajocchi G, Feldman S, Crystal R und Mastrangeli A (1993) Direct in vivo gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant adenovirus vectors. *Nat Genet* 3: 229–234.
- Ballatori N und Rebbert J (1998) Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis* 18: 377–387.
- Bannai S (1984) Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 779: 289–306.
- Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27: 595–600.
- Barkats M, Bilang-Bleuel A, Buc-Caron M, Castel-Barthe M, Corti O, Finiels F, Horellou P, Revah F, Sabate O und Mallet J (1998) Adenovirus in the brain: recent advances of gene therapy for neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 55: 333–341.
- Barna B, Estes M, Jacobs B, Hudson S und Ransohoff R (1990) Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. *J Neuroimmunol* 30: 239–243.
- Baumann N und Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81: 871–927.
- Bender A, Reichelt W und Norenberg M (2000) Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 37: 269–276.
- Benveniste E, Tang L und Law R (1995) Differential regulation of astrocyte TNF- α expression by the cytokines TGF- β , IL-6 and IL-10. *Int J Dev Neurosci* 13: 341–439.
- Bette M, Kaut O, Schäfer MKH und Weihe E (2003) Constitutive expression of p55TNFR mRNA and mitogen-specific up-regulation of TNF α and p75TNFR mRNA in mouse brain. *J Comp Neurol* 465: 417–430.
- Bissel SJ und Wiley CA (2004) Human immunodeficiency virus infection of the brain: pitfalls in evaluating infected/affected cell populations. *Brain Pathol* 14: 97–108.

- Black R, Rauch C, Kozlosky C, Peschon J, Slack J, Wolfson M, Castner B, Stocking K, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley K, Gerhart M, Davis R, Fitzner J, Johnson R, Paxton R, March C und Cerretti D (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385: 729–733.
- Bock E, Moller M, Nissen C und Sensenbrenner M (1977) Glial fibrillary acidic protein in primary astroglial cell cultures derived from newborn rat brain. *FEBS Lett* 83: 207–211.
- Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y und Hirsch E (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 172: 151–154.
- Borst P und Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71: 537–592.
- Borst P, Evers R, Kool M und Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461: 347–357.
- Breder C, Tsujimoto M, Terano Y, Scott D und Saper C (1993) Distribution and characterization of tumor necrosis factor- α -like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol* 337: 543–567.
- Brenner D, O'Hara M, Angel P, Chojkier M und Karin M (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . *Nature* 337: 661–663.
- Brizzard B, Chubet R und Vizard D (1994) Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* 16: 730–735.
- Brown GC und Borutaite V (2004) Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 1658: 44–49.
- Brown-Borg HM, Rakoczy SG und Uthus EO (2004) Growth hormone alters components of the glutathione metabolic pathway in Ames dwarf mice. *Ann NY Acad Sci* 1019: 317–320.
- Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen A, Skinhøj P und Pedersen B (1999) A high plasma concentration of TNF- α is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54: M357–364.
- Buc-Caron M (1995) Neuroepithelial progenitor cells explanted from human fetal brain proliferate and differentiate in vitro. *Neurobiol Dis* 2: 37–47.
- Butt A (2005) Structure and function of oligodendrocytes. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 36–47.

- Butterworth J, Yates C und Reynolds G (1985) Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and γ -glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J Neurol Sci* 67: 161–171.
- Cagen L, Fales H und Pisano J (1976) Formation of glutathione conjugates of prostaglandin A₁ in human red blood cells. *J Biol Chem* 251: 6550–6554.
- Campbell A, Smith M, Sayre L, Bondy S und Perry G (2001) Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 55: 125–132.
- Camussi G, Albano E, Tetta C und Bussolino F (1991) The molecular action of tumor necrosis factor- α . *Eur J Biochem* 202: 3–14.
- Carswell E, Old L, Kassel R, Green S, Fiore N und Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666–3670.
- Chance B, Sies H und Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527–605.
- Changeux J (1986) Coexistence of neuronal messengers and molecular selection. *Prog Brain Res* 68: 373–403.
- Chao C, Hu S, Sheng W und Peterson P (1995) Tumor necrosis factor- α production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines. *Dev Neurosci* 17: 97–105.
- Chen G und Goeddel D (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634–1635.
- Chikhi N, Holic N, Guellaen G und Laperche Y (1999) Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 122: 367–80.
- Christman J, Blackwell T und Juurlink B (2000) Redox regulation of nuclear factor κ B: therapeutic potential for attenuating inflammatory responses. *Brain Pathol* 10: 153–162.
- Chung I und Benveniste E (1990) Tumor necrosis factor- α production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN- γ , and IL-1 β . *J Immunol* 144: 2999–3007.
- Clancy R, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J und Abramson S (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3680–3684.

- Clarke D und Sokoloff L (1999) Circulation and energy metabolism. In Siegel G, Agranoff B, Albers R, Fisher S und Uhler M (Hrsg.), *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Lippincott Williams und Wilkins, Philadelphia, USA, S. 637–670.
- Coles J und Deitmer J (2005) Extracellular potassium and pH: homeostasis and signalling. In Kettenmann H und Ransom BR (Hg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 334–345.
- Collins J, Mungall A, Badcock K, Fay J und Dunham I (1997) The organization of the γ -glutamyl transferase genes and other low copy repeats in human chromosome 22q11. *Genome Res* 7: 522–531.
- Colton C und Gilbert D (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 223: 284–288.
- Combs C, Karlo J, Kao S und Landreth G (2001) β -Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21: 1179–1188.
- Commandeur J, Stijntjes G und Vermeulen N (1995) Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev* 47: 271–330.
- Cooper A (1997) Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In Rosenberg R, Prusiner S, DiMauro S, Barchi R und Kunk L (Hrsg.), *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*, Butterworth-Heinemann, Boston, S. 1195–1230.
- Cotgreave I und Gerdes R (1998) Recent trends in glutathione biochemistry—glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 242: 1–9.
- da Cruz MTG, Simões S und de Lima MCP (2004) Improving lipoplex-mediated gene transfer into C6 glioma cells and primary neurons. *Exp Neurol* 187: 65–75.
- Damier P, Hirsch E, Zhang P, Agid Y und Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52: 1–6.
- Da Silva J, Pierrat B, Mary J und Lesslauer W (1997) Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem* 272: 28373–28380.
- Davidson B, Allen E, Kozarsky K, Wilson J und Roessler B (1993) A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat Genet* 3: 219–223.
- Day BJ, van Heeckeren AM, Min E und Velsor LW (2004) Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary pseudomonas infection. *Infect Immun* 72: 2045–2051.

- Declèves X, Regina A, Laplanche J, Roux F, Boval B, Launay J und Scherrmann J (2000) Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 60: 594–601.
- Denis-Donini S, Glowinski J und Prochiantz A (1984) Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* 307: 641–643.
- D’Erasmus E, Acca M, Medici F und Pisani D (1993) Clinical aspects of early increase in serum γ -glutamyl transferase in cerebral infarction. *Biomed Pharmacother* 47: 89–92.
- Dexter D, Sian J, Rose S, Hindmarsh J, Mann V, Cooper J, Wells F, Daniel S, Lees A und Schapira A (1994) Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 35: 38–44.
- Dickinson DA und Forman HJ (2002) Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann NY Acad Sci* 973: 488–504.
- Ding M, St Pierre B, Parkinson J, Medberry P, Wong J, Rogers N, Ignarro L und Merrill J (1997) Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia. A kinetic analysis. *J Biol Chem* 272: 11327–11335.
- Dityateva G, Hammond M, Thiel C, Ruonala MO, Delling M, Siebenkotten G, Nix M und Dityatev A (2003) Rapid and efficient electroporation-based gene transfer into primary dissociated neurons. *J Neurosci Methods* 130: 65–73.
- Do K, Trabesinger A, Kirsten-Kruger M, Lauer C, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P und Cuenod M (2000) Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci* 12: 3721–3728.
- Dopp J, Mackenzie-Graham A, Otero G und Merrill J (1997) Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol* 75: 104–112.
- Doran S, Ren X, Betz A, Pagel M, Neuwelt E, Roessler B und Davidson B (1995) Gene expression from recombinant viral vectors in the central nervous system after blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery* 36: 965–970.
- Draghia R, Caillaud C, Manicom R, Pavirani A, Kahn A und Poenaru L (1995) Gene delivery into the central nervous system by nasal instillation in rats. *Gene Ther* 2: 418–423.
- Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62: 649–671.
- Dringen R, Gutterer J, Gros C und Hirrlinger J (2001) Aminopeptidase N mediates the utilization of the GSH precursor CysGly by cultured neurons. *J Neurosci Res* 66: 1003–1008.

- Dringen R und Gutterer JM (2002) Glutathione reductase from bovine brain. *Methods Enzymol* 348: 281–288.
- Dringen R und Hamprecht B (1996) Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J Neurochem* 67: 1375–1382.
- Dringen R, Hamprecht B und Bröer S (1998a) The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 71: 388–393.
- Dringen R und Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* 384: 505–516.
- Dringen R, Kranich O und Hamprecht B (1997a) The γ -glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. *Neurochem Res* 22: 727–733.
- Dringen R, Kranich O, Löschmann P und Hamprecht B (1997b) Use of dipeptides for the synthesis of glutathione by astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 69: 868–874.
- Dringen R, Kussmaul L, Gutterer J, Hirrlinger J und Hamprecht B (1999a) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* 72: 2523–2530.
- Dringen R, Kussmaul L und Hamprecht B (1998b) Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res Brain Res Protoc* 2: 223–228.
- Dringen R, Pawlowski PG und Hirrlinger J (2005) Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 79: 157–165.
- Dringen R, Pfeiffer B und Hamprecht B (1999b) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19: 562–569.
- Dulbecco R und Freeman G (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: 396–397.
- Eberhardt O und Schulz J (2004) Gene therapy in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 318: 243–260.
- Eklöv L, Thor H und Orrenius S (1981) Formation and efflux of glutathione disulfide studied in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 127: 125–128.
- Emerit J, Edeas M und Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58: 39–46.
- Ennis H und Lubin M (1964) Cycloheximide: aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science* 146: 1474–1476.

- Feener E, Shen W und Ryser H (1990) Cleavage of disulfide bonds in endocytosed macromolecules. A processing not associated with lysosomes or endosomes. *J Biol Chem* 265: 18780–18785.
- Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B und Feldon J (2004) Genetic ablation of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *J Neurochem* 89: 822–833.
- Figlewicz D, Delattre O, Guellaen G, Krizus A, Thomas G, Zucman J und Rouleau G (1993) Mapping of human γ -glutamyl transpeptidase genes on chromosome 22 and other human autosomes. *Genomics* 17: 299–305.
- Fillit H, Ding W, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B und Wolf-Klein G (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 129: 318–320.
- Fish W (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* 158: 357–364.
- Flynn J und McBean G (2000) Kinetic and pharmacological analysis of L-[³⁵S]cystine transport into rat brain synaptosomes. *Neurochem Int* 36: 513–521.
- Frey A, Meckelein B, Weiler-Guttler H, Mockel B, Flach R und Gassen H (1991) Pericytes of the brain microvasculature express γ -glutamyl transpeptidase. *Eur J Biochem* 202: 421–429.
- Gahring L, Carlson N, Kulmar R und Rogers S (1996) Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain. *Neuroimmunomodulation* 3: 289–303.
- Galimberti D, Baron P, Meda L, Prat E, Scarpini E, Delgado R, Catania A, Lipton J und Scarlato G (1999) α -MSH peptides inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α by microglial cells activated with β -amyloid and interferon γ . *Biochem Biophys Res Commun* 263: 251–256.
- Garcion E, Sindji L, Leblondel G, Brachet P und Darcy F (1999) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of γ -glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* 73: 859–866.
- Garcion E, Thanh X, Bled F, Teissier E, Dehouck M, Rigault F, Brachet P, Girault A, Torpier G und Darcy F (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates γ -glutamyl transpeptidase activity in rat brain. *Neurosci Lett* 216: 183–186.
- Gearing A, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson A, Drummond A, Galloway W, Gilbert R, Gordon JL, Leber TM, Mangan M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM und Woolley K (1994) Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 370: 555–557.

- Gegg M, Beltran B, Salas-Pino S, Bolanos J, Clark J, Moncada S und Heales S (2003) Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem* 86: 228–237.
- Gendron R, Nestel F, Lapp W und Baines M (1991) Expression of tumor necrosis factor α in the developing nervous system. *Int J Neurosci* 60: 129–136.
- Gerhardt E, Kügler S, Leist M, Beier C, Berliocchi L, Volbracht C, Weller M, Bähr M, Nicotera P und Schulz J (2001) Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 17: 717–731.
- Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P und Youdim M (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 63: 793–807.
- Ghandour M, Langley O und Varga V (1980) Immunohistological localization of γ -glutamyltranspeptidase in cerebellum at light and electron microscope levels. *Neurosci Lett* 20: 125–129.
- Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, Civitareale P und Ciriolo M (1998) Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 12: 479–486.
- Giulian D (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 18: 155–153.
- Giulian D und Baker T (1985) Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. *J Cell Biol* 101: 2411–2415.
- Giulian D und Baker T (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6: 2163–2178.
- Glosli H, Tronstad K, Wergedal H, Muller F, Svardal A, Aukrust P, Berge R und Prydz H (2002) Human TNF- α in transgenic mice induces differential changes in redox status and glutathione-regulating enzymes. *FASEB J* 16: 1450–1452.
- Goodwin R, Anderson D, Jerzy R, Davis T, Brannan C, Copeland N, Jenkins N und Smith C (1991) Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 11: 3020–3026.
- Graeber M, Streit W und Kreutzberg G (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res* 21: 18–24.
- Grafström R, Stead A und Orrenius S (1980) Metabolism of extracellular glutathione in rat small-intestinal mucosa. *Eur J Biochem* 106: 571–577.
- Graham R, Morgan E und Baker E (1998) Ferric citrate uptake by cultured rat hepatocytes is inhibited in the presence of transferrin. *Eur J Biochem* 253: 139–145.

- Griffith O (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207–212.
- Grune T, Jung T, Merker K und Davies KJA (2004) Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2519–2530.
- Hahn R, Wendel A und Flohé L (1978) The fate of extracellular glutathione in the rat. *Biochim Biophys Acta* 539: 324–337.
- Hall A (1999) Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 29: 238–245.
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59: 1609–1623.
- Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18: 685–716.
- Halliwell B (2002) Hypothesis: proteasomal dysfunction: a primary event in neurodegeneration that leads to oxidative and nitrosative stress and subsequent cell death. *Ann NY Acad Sci* 962: 182–194.
- Halliwell B und Gutteridge J (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- Hamano H, Noguchi M, Fukui H, Issiki A und Watanabe Y (2002) Regulation of brain cell environment on neuronal protection: role of TNF α in glia cells. *Life Sci* 72: 565–574.
- Hammond J, Potter M, Sim K und Wilcken B (1999) Reduced glutathione, γ -glutamylcysteine, cysteine and γ -glutamylglutamine in γ -glutamyltransferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 22: 235–239.
- Hamprecht B und Löffler F (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol* 109: 341–345.
- Han J, Cheng F, Yang Z und Dryhurst G (1999) Inhibitors of mitochondrial respiration, iron (II), and hydroxyl radical evoke release and extracellular hydrolysis of glutathione in rat striatum and substantia nigra: potential implications to Parkinson's disease. *J Neurochem* 73: 1683–1695.
- Hardege JD, Bartels-Hardege H, Müller CT und Beckmann M (2004) Peptide pheromones in female *Nereis succinea*. *Peptides* 25: 1517–1522.
- Harding C, Williams P, Wagner E, Chang D, Wild K, Colwell R und Wolff J (1997) Mice with genetic γ -glutamyl transpeptidase deficiency exhibit glutathionuria, severe growth failure, reduced life spans, and infertility. *J Biol Chem* 272: 12560–12567.

- Hasegawa G, Suwa M, Ichikawa Y, Ohtsuka T, Kumagai S, Kikuchi M, Sato Y und Saito Y (2003) A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochem J* 373: 793–803.
- Heales SJR, Lam AAJ, Duncan AJ und Land JM (2004) Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res* 29: 513–519.
- Hehlgans T und Mannel D (2002) The TNF-TNF receptor system. *Biol Chem* 383: 1581–1585.
- Hemmings S und Storey K (1999) Brain γ -glutamyltranspeptidase: characteristics, development and thyroid hormone dependency of the enzyme in isolated microvessels and neuronal/glia cell plasma membranes. *Mol Cell Biochem* 202: 119–130.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A und Robinson S (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57: 417–428.
- Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Nishida M und Morita I (2003) Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. *J Neural Transm* 110: 1337–1348.
- Hirrlinger J, Gutterer J, Kussmaul L, Hamprecht B und Dringen R (2000) Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Dev Neurosci* 22: 384–392.
- Hirrlinger J, Hamprecht B und Dringen R (1999) Application and modulation of a permanent hydrogen peroxide-induced oxidative stress to cultured astroglial cells. *Brain Res Brain Res Protoc* 4: 223–229.
- Hirrlinger J, König J und Dringen R (2002a) Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* 82: 716–719.
- Hirrlinger J, König J, Keppler D, Lindenau J, Schulz J und Dringen R (2001) The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J Neurochem* 76: 627–636.
- Hirrlinger J, Resch A, Gutterer J und Dringen R (2002b) Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *J Neurochem* 82: 635–644.
- Hirrlinger J, Schulz J und Dringen R (2002c) Glutathione release from cultured brain cells: multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells. *J Neurosci Res* 69: 318–326.
- Hirrlinger J, Schulz JB und Dringen R (2002d) Effects of dopamine on the glutathione metabolism of cultured astroglial cells: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 82: 458–467.

- Hirsch E, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A und Michel P (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* 991: 214–228.
- Hirsch E, Hunot S, Damier P und Faucheux B (1998) Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol* 44: S115–120.
- Ho Y, Magnenat J, Bronson R, Cao J, Gargano M, Sugawara M und Funk C (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 272: 16644–16651.
- Hökfelt T, Holets V, Staines W, Meister B, Melander T, Schalling M, Schultzberg M, Freedman J, Björklund H und Olson L (1986) Coexistence of neuronal messengers—an overview. *Prog Brain Res* 68: 33–70.
- Hoepken HH, Korten T, Robinson SR und Dringen R (2004) Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J Neurochem* 88: 1194–1202.
- Honda K, Komoda Y und Inoué S (1994) Oxidized glutathione regulates physiological sleep in unrestrained rats. *Brain Res* 636: 253–258.
- Höpken HH (2005) *Untersuchungen zum Eisenstoffwechsel neuraler Zellen*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Hyun DH, Gray DA, Halliwell B und Jenner P (2004) Interference with ubiquitination causes oxidative damage and increased protein nitration: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 90: 422–4–30.
- Iida M, Yasuhara T, Mochizuki H, Takakura H, Yanagisawa T und Kubo H (2005) Two Japanese brothers with hereditary γ -glutamyl transpeptidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 28: 49–55.
- Ikeda M, Ikeda-Sagara M, Okada T, Clement P, Urade Y, Nagai T, Sugiyama T, Yoshioka T, Honda K und Inoué S (2005) Brain oxidation is an initial process in sleep induction. *Neuroscience* 130: 1029–1040.
- Imperiale M und Kochanek S (2004) Adenovirus vectors: biology, design, and production. *Curr Top Microbiol Immunol* 273: 335–357.
- Inoue M, Horiuchi S und Morino Y (1977) Affinity labeling of rat-kidney γ -glutamyl transpeptidase. *Eur J Biochem* 73: 335–342.
- Jacobson R, Virág I und Skene J (1986) A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci* 6: 1843–1855.
- Jain A, Mårtensson J, Stole E, Auld P und Meister A (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1913–1917.

- Janaky R, Ogita K, Pasqualotto B, Bains J, Oja S, Yoneda Y und Shaw C (1999) Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem* 73: 889–902.
- Jankowski J, Schröter A, Tepel M, van der Giet M, Stephan N, Luo J, Zidek W und Schlüter H (2000) Isolation and characterization of coenzyme A glutathione disulfide as a parathyroid-derived vasoconstrictive factor. *Circulation* 102: 2548–2552.
- Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3: S26–S36.
- Jenner P, Dexter D, Sian J, Schapira A und Marsden C (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 32 Suppl: S82–87.
- Jenner P und Olanow C (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44: S72–584.
- Johnson J, el Barbary A, Kornguth S, Brugge J und Siegel F (1993) Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia. *J Neurosci* 13: 2013–2023.
- Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL und Deucher GP (2004) Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 25: 5–16.
- Kaltenbach J, Kaltenbach M und Lyons W (1958) Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp Cell Res* 15: 112–117.
- Kannan R, Kuhlenkamp J, Ookhtens M und Kaplowitz N (1992) Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: inhibition by glutathione analogs and age-dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 964–970.
- Kaplowitz N, Fernández-Checa J, Kannan R, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M und Yi J (1996) GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 377: 267–273.
- Keegan BM und Noseworthy JH (2002) Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53: 285–302.
- Keppler D, Leier I, Jedlitschky G und König J (1998) ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact* 111-112: 153–161.
- Kettenmann H und Ransom BR (Hrsg.) (1995) *Neuroglia*. Oxford University Press, New York.
- Kim J, Kanai Y, Chairoungdua A, Cha S, Matsuo H, Kim D, Inatomi J, Sawa H, Ida Y und Endou H (2001) Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells. *Biochim Biophys Acta* 1512: 335–344.
- Kimura M, Kapás L und Krueger J (1998) Oxidized glutathione promotes sleep in rabbits. *Brain Res Bull* 45: 545–548.

- Kirchhoff F, Dringen R und Giaume C (2001) Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251: 159–169.
- Klegeris A, Walker D und McGeer P (1997) Interaction of Alzheimer β -amyloid peptide with the human monocytic cell line THP-1 results in a protein kinase C-dependent secretion of tumor necrosis factor- α . *Brain Res* 747: 114–121.
- Klein I, Sarkadi B und Váradi A (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1461: 237–262.
- Kleinert H, Schwarz PM und Förstermann U (2003) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384: 1343–1364.
- Knollema S, Hom H, Schirmer H, Korf J und Horst GT (1996) Immunolocalization of glutathione reductase in the murine brain. *J Comp Neurol* 373: 157–172.
- Knowles R und Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249–258.
- Kofler P, Wiesenhofer B, Rehrl C, Baier G, Stockhammer G und Humpel C (1998) Liposome-mediated gene transfer into established CNS cell lines, primary glial cells, and in vivo. *Cell Transplant* 7: 175–185.
- Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Kidd JF, Wang Y, Leslie EM, Cole SPC und Bear CE (2003) CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* 22: 1981–1989.
- Kojima S, Matsuki O, Nomura T, Shimura N, Kubodera A, Yamaoka K, Tanooka H, Wakasugi H, Honda Y, Honda S und Sasaki T (1998) Localization of glutathione and induction of glutathione synthesis-related proteins in mouse brain by low doses of γ -rays. *Brain Res* 808: 262–269.
- Kong G, Peng Z, Costanzo C, Kristensson K und Bentivoglio M (2000) Inducible nitric oxide synthase expression elicited in the mouse brain by inflammatory mediators circulating in the cerebrospinal fluid. *Brain Res* 878: 105–118.
- Korten T (2004) *Untersuchungen zum Eisentransport in Astrogliazellen*. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Kranich O, Dringen R, Sandberg M und Hamprecht B (1998) Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine. *Glia* 22: 11–18.
- Kranich O, Hamprecht B und Dringen R (1996) Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. *Neurosci Lett* 219: 211–214.
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I und Lu S (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45–53.

- Kugelman A, Choy H, Liu R, Shi M, Gozal E und Forman H (1994) γ -Glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 586–592.
- Kügler S, Klöcker N, Kermer P, Isenmann S und Bähr M (1999) Transduction of axotomized retinal ganglion cells by adenoviral vector administration at the optic nerve stump: an in vivo model system for the inhibition of neuronal apoptotic cell death. *Gene Ther* 6: 1759–1767.
- Lada M und Kennedy R (1997) In vivo monitoring of glutathione and cysteine in rat caudate nucleus using microdialysis on-line with capillary zone electrophoresis-laser induced fluorescence detection. *J Neurosci Methods* 72: 153–159.
- Lai L und Tan TMC (2002) Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem J* 361: 497–503.
- Lan J und Jiang D (1997) Excessive iron accumulation in the brain: a possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 104: 649–660.
- Le Gal La Salle G, Robert J, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M und Mallet J (1993) An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259: 988–990.
- Lee J, Choi S, Won J und Suh H (2003) The regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor α in C6 cells: involvement of AP-1 and NF κ B. *Life Sci* 73: 595–609.
- Lee S, Liu W, Dickson D, Brosnan C und Berman J (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 β . *J Immunol* 150: 2659–2667.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole S, Deeley R und Keppler D (1996) ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* 314: 433–437.
- Lewis M, Tartaglia L, Lee A, Bennett G, Rice G, Wong G, Chen E und Goeddel D (1991) Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2830–2834.
- Li L, Meier P und Ballatori N (2000) Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* 58: 335–340.
- Li X, Wallin C, Weber S und Sandberg M (1999) Net efflux of cysteine, glutathione and related metabolites from rat hippocampal slices during oxygen/glucose deprivation: dependence on γ -glutamyl transpeptidase. *Brain Res* 815: 81–88.

- Lie DC, Song H, Colamarino SA, li Ming G und Gage FH (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 399–421.
- Lieberman M, Barrios R, Carter B, Habib G, Lebovitz R, Rajagopalan S, Sepulveda A, Shi Z und Wan D (1995) γ -Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? *Am J Pathol* 147: 1175–1185.
- Lieberman M, Wiseman A, Shi Z, Carter B, Barrios R, Ou C, Chevez-Barrios P, Wang Y, Habib G, Goodman J, Huang S, Lebovitz R und Matzuk M (1996) Growth retardation and cysteine deficiency in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7923–7926.
- Lin M, Alfi O und Donnell G (1976) Differential fluorescence of sister chromatids with 4'-6-diamidino-2-phenylindole. *Can J Genet Cytol* 18: 545–547.
- Lindenau J, Noack H, Asayama K und Wolf G (1998) Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 24: 252–6.
- Loetscher H, Pan Y, Lahm H, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H und Lesslauer W (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61: 351–359.
- Löffler F, Lohmann S, Walckhoff B, Walter U und Hamprecht B (1986) Immunocytochemical characterization of neuron-rich primary cultures of embryonic rat brain cells by established neuronal and glial markers and by monospecific antisera against cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the synaptic vesicle protein synapsin I. *Brain Res* 363: 205–221.
- Lopez-Barea J, Barcena J, Bocanegra J, Florindo J, Garcia-Alfonso C, Lopez-Ruiz A, Martinez-Galisteo E und Peinado J (1990) Structure, mechanism, functions, and regulatory properties of glutathione reductase. In Vina J (Hrsg.), *Glutathione: Metabolism and physiological functions*, CRC Press, Boca Raton, USA, S. 105–116.
- Lottspeich F und Zorbas H (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A und Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Lung H, Leung K, Stadlin A, Ma C und Tsang D (2001) Induction of tumor necrosis factor receptor type 2 gene expression by tumor necrosis factor- α in rat primary astrocytes. *Life Sci* 68: 2081–2091.
- Makowske M und Christensen H (1982) Contrasts in transport systems for anionic amino acids in hepatocytes and a hepatoma cell line HTC. *J Biol Chem* 257: 5663–5670.

- Mandel R, Ryser H, Ghani F, Wu M und Peak D (1993) Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4112–4116.
- McBean G (2002) Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. *Trends Pharmacol Sci* 23: 299–302.
- Meda L, Cassatella M, Szendrei G, Otvos L, Baron P, Villalba M, Ferrari D und Rossi F (1995) Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature* 374: 647–650.
- Meister A (1974) Glutathione Synthesis. In Boyer P (Hrsg.), *The Enzymes*, Academic Press, New York, Bd. 10, 3. Aufl., S. 671–697.
- Meister A und Anderson M (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711–760.
- Meister A und Tate S (1976) Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 45: 559–604.
- Misra I und Griffith O (1998) Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr Purif* 13: 268–276.
- Mizunaga T, Katakura Y, Miura T und Maruyama Y (1990) Purification and characterization of yeast protein disulfide isomerase. *J Biochem (Tokyo)* 108: 846–851.
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T und Kagawa Y (1989) Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 1450–1455.
- Möller A (1989) *Untersuchungen über das Enzym Creatinkinase und sein Substrat Creatin an glialen und neuronalen Zellkulturen des Gehirns*. Dissertation, Universität Frankfurt am Main.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K und Nagatsu T (1994) Tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 165: 208–210.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H und Nagatsu T (2000) Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm* 107: 335–341.
- Morrison B und Morrison J (1999) Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in superoxide dismutase: a putative mechanism of degeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 121–135.
- Muñoz-Fernández M, Armas-Portela R, Díaz-Nido J, Alonso J, Fresno M und Avila J (1991) Differential effects of tumor necrosis factor on the growth and differentiation of neuroblastoma and glioma cells. *Exp Cell Res* 194: 161–164.

- Muñoz-Fernández M, Cano E, O'Donnell C, Doyle J, Liew F und Fresno M (1994) Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ , and interleukin-6 but not TNF- β induce differentiation of neuroblastoma cells: the role of nitric oxide. *J Neurochem* 62: 1330–1336.
- Muñoz-Fernández M und Fresno M (1998) The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56: 307–340.
- Nakamura K, Wang W und Kang U (1997) The role of glutathione in dopaminergic neuronal survival. *J Neurochem* 69: 1850–1858.
- Nash B und Tate S (1982) Biosynthesis of rat renal γ -glutamyl transpeptidase. Evidence for a common precursor of the two subunits. *J Biol Chem* 257: 585–588.
- Nash B und Tate S (1984) In vitro translation and processing of rat kidney γ -glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 259: 678–685.
- Nedergaard M, Ransom B und Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26: 523–530.
- Nelson P, Soma L und Lavi E (2002) Microglia in diseases of the central nervous system. *Ann Med* 34: 491–500.
- Newman E (2005) Glia and synaptic transmission. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 355–367.
- Nies A, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner H, Schmitt HP und Keppler D (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 129: 349–360.
- Obregón E, Punzón M, González-Nicolás J, Fernandez-Cruz E, Fresno M und Muñoz-Fernández M (1997) Induction of adhesion/differentiation of human neuroblastoma cells by tumour necrosis factor- α requires the expression of an inducible nitric oxide synthase. *Eur J Neurosci* 9: 1184–1193.
- Ogita K, Enomoto R, Nakahara F, Ishitsubo N und Yoneda Y (1995) A possible role of glutathione as an endogenous agonist at the N-methyl- D-aspartate recognition domain in rat brain. *J Neurochem* 64: 1088–1096.
- Oh Y, Markelonis G und Oh T (1993) Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on the expression of glial fibrillary acidic protein and transferrin in cultured astrocytes. *Glia* 8: 77–86.
- Ohki E, Tilkins M, Ciccarone V und Price P (2001) Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods* 112: 95–99.
- Oka S und Arita H (1991) Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. *J Biol Chem* 266: 9956–9960.

- Okamoto T, Darbouy M, Brouillet A, Lahuna O, Chobert M und Laperche Y (1994) Expression of the rat γ -glutamyl transpeptidase gene from a specific promoter in the small intestine and in hepatoma cells. *Biochemistry* 33: 11536–11543.
- Okonkwo P, Orłowski M und Green J (1974) Enzymes of the γ -glutamyl cycle in the choroid plexus and brain. *J Neurochem* 22: 1053–1058.
- Olanow C (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* 16: 439–444.
- Ooboshi H, Welsh M, Rios C, Davidson B und Heistad D (1995) Adenovirus-mediated gene transfer in vivo to cerebral blood vessels and perivascular tissue. *Circ Res* 77: 7–13.
- Orłowski M, Sessa G und Green J (1974) γ -glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science* 184: 66–68.
- Parpura V, Basarsky T, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S und Haydon P (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744–747.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T und Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17: 7817–7830.
- Paulusma C, van Geer M, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P und Elferink RO (1999) Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 338: 393–401.
- Pearce R, Owen A, Daniel S, Jenner P und Marsden C (1997) Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 104: 661–677.
- Pennica D, Hayflick J, Bringman T, Palladino M und Goeddel D (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6060–6064.
- Pennica D, Nedwin G, Hayflick J, Seeburg P, Derynck R, Palladino M, Kohr W, Aggarwal B und Goeddel D (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724–729.
- Philbert M, Beiswanger C, Manson M, Green J, Novak R, Primiano T, Reuhl K und Lowndes H (1995) Glutathione S-transferases and γ -glutamyl transpeptidase in the rat nervous systems: a basis for differential susceptibility to neurotoxicants. *Neurotoxicology* 16: 349–362.
- Pileblad E und Magnusson T (1992) Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of γ -glutamylcysteine. *Biochem Pharmacol* 44: 895–903.

- Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G und Butterfield DA (2004) Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med* 20: 329–359.
- Poot M, Teubert H, Rabinovitch P und Kavanagh T (1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J Cell Physiol* 163: 555–560.
- Porter N (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105: 273–282.
- Pow D (2001) Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to amino adipic acid, a selectively transported substrate. *Glia* 34: 27–38.
- Prochiantz A und Mallat M (1988) Astrocyte diversity. *Ann N Y Acad Sci* 540: 52–63.
- Rafter G und Harmison G (1979) Disulfide-disulfide interchange catalyzed by a liver supernatant enzyme. *Biochim Biophys Acta* 567: 18–23.
- Raine C (1999) Neurocellular anatomy. In Siegel G, Agranoff B, Albers R, Fisher S und Uhler M (Hrsg.), *Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, S. 3–30.
- Rajagopalan S, Wan D, Habib G, Sepulveda A, McLeod M, Lebovitz R und Lieberman M (1993) Six mRNAs with different 5' ends are encoded by a single γ -glutamyltransferase gene in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6179–6183.
- Ram J, Muller C, Beckmann M und Hardege J (1999) The spawning pheromone cysteine-glutathione disulfide ('nereithione') arouses a multicomponent nuptial behavior and electrophysiological activity in *Nereis succinea* males. *FASEB J* 13: 945–952.
- Ranscht B, Clapshaw P, Price J, Noble M und Seifert W (1982) Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2709–2713.
- Ratan R, Murphy T und Baraban J (1994) Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione. *J Neurosci* 14: 4385–4392.
- Rees D, Palmer R, Schulz R, Hodson H und Moncada S (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101: 746–752.
- Reinhart P, Pfeiffer B, Spengler S und Hamprecht B (1990) Purification of glycogen phosphorylase from bovine brain and immunocytochemical examination of rat glial primary cultures using monoclonal antibodies raised against this enzyme. *J Neurochem* 54: 1474–1483.
- Reiter R, Cabrera J, Sainz R, Mayo J, Manchester L und Tan D (1999) Melatonin as a pharmacological agent against neuronal loss in experimental models of Huntington's disease, Alzheimer's disease and parkinsonism. *Ann NY Acad Sci* 890: 471–485.

- Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin J und Owens T (1995) TNF- α expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* 154: 944–953.
- Richman P und Meister A (1975) Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 250: 1422–1426.
- Richter-Landsberg C und Vollgraf U (1998) Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res* 244: 218–229.
- Ridoux V, Robert J, Zhang X, Perricaudet M, Mallet J und Le Gal La Salle G (1994a) Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers. *Brain Res* 648: 171–175.
- Ridoux V, Robert J, Zhang X, Perricaudet M, Mallet J und Le Gal La Salle G (1994b) The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells. *Neuroreport* 5: 801–804.
- Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR und Dringen R (2004) Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem* 331: 370–375.
- Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G und Keppler D (2003) Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38: 374–384.
- Robbins D, Shirazi Y, Drysdale B, Lieberman A, Shin H und Shin M (1987) Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J Immunol* 139: 2593–2597.
- Rogelj S, Reiter K, Kesner L, Li M und Essex D (2000) Enzyme destruction by a protease contaminant in bacitracin. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 829–832.
- Roth R (1981) Bacitracin: an inhibitor of the insulin degrading activity of glutathione-insulin transhydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 98: 431–438.
- Rothwell N und Luheshi G (1996) Brain TNF: damage limitation or damaged reputation? *Nat Med* 2: 746–747.
- Rouault T (2001) Iron on the brain. *Nat Genet* 28: 299–300.
- Roy C und Andrews N (2001) Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum Mol Genet* 10: 2181–2186.
- Rozen S und Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365–386.
- Ruedig C und Dringen R (2004) TNF α increases activity of γ -glutamyl transpeptidase in cultured rat astroglial cells. *J Neurosci Res* 75: 536–543.

- Ryser H, Mandel R und Ghani F (1991) Cell surface sulfhydryls are required for the cytotoxicity of diphtheria toxin but not of ricin in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 266: 18439–18442.
- Sabaté O, Horellou P, Vigne E, Colin P, Perricaudet M, Buc-Caron M und Mallet J (1995) Transplantation to the rat brain of human neural progenitors that were genetically modified using adenoviruses. *Nat Genet* 9: 256–260.
- Sachs L (2002) *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Saez G, Bannister W und Bannister J (1990) Free radicals and thiol compounds - the role of glutathione against free radical toxicity. In Vina J (Hrsg.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, CRC Press, Boca Raton, USA, S. 237–254.
- Sagara J, Makino N und Bannai S (1996) Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem* 66: 1876–1881.
- Sagara J, Miura K und Bannai S (1993a) Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* 61: 1667–1671.
- Sagara J, Miura K und Bannai S (1993b) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem* 61: 1672–1676.
- Salinas A und Wong M (1999) Glutathione S-transferases—a review. *Curr Med Chem* 6: 279–309.
- Sambrook J, Fritsch E und Maniatis T (1987) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Laboratory Press, Cold Spring Harbor (N.Y.), 2. Aufl.
- Sato H, Tamba M, Ishii T und Bannai S (1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* 274: 11455–11458.
- Sato H, Tamba M, Kuriyama-Matsumura K, Okuno S und Bannai S (2000) Molecular cloning and expression of human xCT, the light chain of amino acid transport system x_c⁻. *Antioxid Redox Signal* 2: 665–671.
- Saura J, Tusell J und Serratos J (2003) High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44: 183–189.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A und Marunouchi T (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491: 394–397.
- Schall T, Lewis M, Koller K, Lee A, Rice G, Wong G, Gatanaga T, Granger G, Lentz R und Raab H (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61: 361–370.
- Schapira A, Cooper J, Dexter D, Clark J, Jenner P und Marsden C (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54: 823–827.

- Scheiber-Mojdehkar B, Zimmermann I, Dresow B und Goldenberg H (1999) Differential response of non-transferrin bound iron uptake in rat liver cells on long-term and short-term treatment with iron. *J Hepatol* 31: 61–70.
- Schlomann U, Rathke-Hartlieb S, Yamamoto S, Jockusch H und Bartsch J (2000) Tumor necrosis factor α induces a metalloprotease-disintegrin, ADAM8 (CD 156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. *J Neurosci* 20: 7964–7971.
- Schoonbroodt S und Piette J (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor- κ B activation pathways. *Biochem Pharmacol* 60: 1075–1083.
- Schulman J, Goodman S, Mace J, Patrick A, Tietze F und Butler E (1975) Glutathionuria: inborn error of metabolism due to tissue deficiency of gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 65: 68–74.
- Schulz J, Weller M und Klockgether T (1996) Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci* 16: 4696–4706.
- Selmaj K, Farooq M, Norton W, Raine C und Brosnan C (1990) Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 144: 129–135.
- Selmaj K und Raine C (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 23: 339–346.
- Sen C (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 36: 1–30.
- Shine H und Haber B (1981) Immunocytochemical localization of γ -glutamyl transpeptidase in the rat CNS. *Brain Res* 217: 339–349.
- Shine H, Hertz L, De Vellis J und Haber B (1981) A fluorometric assay for γ -glutamyl transpeptidase: demonstration enzymatic activity in cultured cells of neural origin. *Neurochem Res* 6: 453–463.
- Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd C und Wallace R (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* 313: 803–806.
- Sian J, Dexter D, Lees A, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P und Marsden C (1994a) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36: 348–355.
- Sian J, Dexter D, Lees A, Daniel S, Jenner P und Marsden C (1994b) Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 36: 356–361.
- Sies H und Akerboom T (1984) Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods Enzymol* 105: 445–451.

- Simmons M und Murphy S (1992) Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem* 59: 897–905.
- Simons M, Beinroth S, Gleichmann M, Liston P, Korneluk R, MacKenzie A, Bähr M, Klockgether T, Robertson G, Weller M und Schulz J (1999) Adenovirus-mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis protein delays apoptosis in cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 72: 292–301.
- Singh S, Wishnok J, Keshive M, Deen W und Tannenbaum S (1996) The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14428–14433.
- Sippy B, Hofman F, Wallach D und Hinton D (1995) Increased expression of tumor necrosis factor- α receptors in the brains of patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 10: 511–521.
- Sofic E, Lange K, Jellinger K und Riederer P (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 142: 128–130.
- Somjen G (1988) Nerven Kitt: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1: 2–9.
- Spencer J, Jenner P, Daniel S, Lees A, Marsden D und Halliwell B (1998) Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem* 71: 2112–2122.
- Spencer J, Jenner P und Halliwell B (1995) Superoxide-dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease. *Neuroreport* 6: 1480–1484.
- Spencer J, Whiteman M, Jenner P und Halliwell B (2002) 5-S-Cysteinyl-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *J Neurochem* 81: 122–129.
- Sriram K, Matheson J, Benkovic S, Miller D, Luster M und O'Callaghan J (2002) Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 16: 1474–1476.
- Srivastava S und Beutler E (1969) The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes. *J Biol Chem* 244: 9–16.
- Stastný F und Lisý V (1981) Cortisol regulation of γ -glutamyl transpeptidase in liver, choroid plexus, blood plasma and cerebrospinal fluid of developing chick embryo. *Dev Neurosci* 4: 408–415.
- Stastny F, Hilgier W, Albrecht J und Lisy V (1988) Changes in the activity of γ -glutamyl transpeptidase in brain microvessels, astroglial cells and synaptosomes derived from rats with hepatic encephalopathy. *Neurosci Lett* 84: 323–328.

- Stewart V, Stone R, Gegg M, Sharpe M, Hurst R, Clark J und Heales S (2002) Preservation of extracellular glutathione by an astrocyte derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. *J Neurochem* 83: 984–991.
- Stole E, Seddon A, Wellner D und Meister A (1990) Identification of a highly reactive threonine residue at the active site of γ -glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1706–1709.
- Stole E, Smith T, Manning J und Meister A (1994) Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with acivicin. *J Biol Chem* 269: 21435–21439.
- Stone R, Stewart V, Hurst R, Clark J und Heales S (1999) Astrocyte nitric oxide causes neuronal mitochondrial damage, but antioxidant release limits neuronal cell death. *Ann NY Acad Sci* 893: 400–403.
- Streit W (2005) Microglial cells. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 60–71.
- Sun X, Erb H und Murphy TH (2005) Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 371–377.
- Suzuki H und Kumagai H (2002) Autocatalytic processing of γ -glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem* 277: 43536–43543.
- Swanson R (2005) Astrocyte neurotransmitter uptake. In Kettenmann H und Ransom B (Hrsg.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, S. 346–354.
- Tada M, Diserens A, Desbaillets I und de Tribolet N (1994) Analysis of cytokine receptor messenger RNA expression in human glioblastoma cells and normal astrocytes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Neurosurg* 80: 1063–1073.
- Takeda A, Devenyi A und Connor J (1998) Evidence for non-transferrin-mediated uptake and release of iron and manganese in glial cell cultures from hypotransferrinemic mice. *J Neurosci Res* 51: 454–462.
- Takizawa S, Matsushima K, Shinohara Y, Ogawa S, Komatsu N, Utsunomiya H und Watanabe K (1994) Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in infarcted human brain. *J Neurol Sci* 122: 66–73.
- Tang P, Hung MC und Klostergaard J (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35: 8216–8225.
- Taniguchi N und Ikeda Y (1998) γ -Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 72: 239–278.
- Tansey F und Cammer W (1991) A pi form of glutathione-S-transferase is a myelin- and oligodendrocyte-associated enzyme in mouse brain. *J Neurochem* 57: 95–102.
- Tarkowski E, Blennow K, Wallin A und Tarkowski A (1999) Intracerebral production of tumor necrosis factor- α , a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol* 19: 223–230.

- Tate S (1985) Microvillus membrane peptidases that catalyze hydrolysis of cysteinylglycine and its derivatives. *Methods Enzymol* 113: 471–484.
- Tate S (1986) Single-chain precursor of renal γ -glutamyl transpeptidase. *FEBS Lett* 194: 33–38.
- Tate S und Meister A (1976) Subunit structure and isozymic forms of γ -glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2599–2603.
- Tate S und Meister A (1977) Affinity labeling of γ -glutamyl transpeptidase and location of the γ -glutamyl binding site on the light subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 931–935.
- Tate S und Meister A (1978) Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of γ -glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4806–4809.
- Tate S und Meister A (1981) γ -Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol Cell Biochem* 39: 357–368.
- Tate S und Meister A (1985) γ -Glutamyl transpeptidase from kidney. *Methods Enzymol* 113: 400–419.
- Tate S und Orlando J (1979) Conversion of glutathione to glutathione disulfide, a catalytic function of γ -glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 254: 5573–5575.
- Tate S, Ross L und Meister A (1973) The γ -glutamyl cycle in the choroid plexus: its possible function in amino acid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1447–1449.
- Tatusova T und Madden T (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174: 247–250.
- Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui H, Stockert R und Schilsky M (1995) Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 270: 20410–20416.
- Thompson G und Meister A (1977) Interrelationships between the binding sites for amino acids, dipeptides, and γ -glutamyl donors in γ -glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 252: 6792–6798.
- Thompson K, Shoham S und Connor J (2001) Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* 55: 155–164.
- Thompson R (2000) *The brain. A Neuroscience Primer*. Worth, New York.
- Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502–522.
- Todorich BM und Connor JR (2004) Redox metals in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1012: 171–178.

- Togo T, Katsuse O und Iseki E (2004) Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. *Neurol Res* 26: 563–566.
- Tracey K, Vlassara H und Cerami A (1989) Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet* 1: 1122–1126.
- Trépanier G, Furling D, Puymirat J und Mirault M (1996) Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. *Neuroscience* 75: 231–243.
- Tsao M und Batist G (1988) Induction of gamma-glutamyl transpeptidase activity by all-trans retinoic acid in cultured rat liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1039–1045.
- Turano C, Coppari S, Altieri F und Ferraro A (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* 193: 154–163.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann K, Roveri A, Schomburg D und Flohé L (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252: 38–53.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R und Fiers W (2002) Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5: 392–399.
- Vassault A (1983) Lactate dehydrogenase: UV-method with pyruvate and NADH. In Bergmeyer H (Hrsg.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, S. 118–126.
- Ventura J, Kennedy N, Lamb J, Flavell R und Davis R (2003) c-Jun NH₂-terminal kinase is essential for the regulation of AP-1 by tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 23: 2871–2882.
- Verani A, Gras G und Pancino G (2005) Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol* 42: 195–212.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Guégan C, Wu D, Teismann P, Choi D, Tieu K und Przedborski S (2001) The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14: 483–489.
- Visvikis A, Pawlak A, Accaoui M, Ichino K, Leh H, Guellaen G und Wellman M (2001) Structure of the 5' sequences of the human γ -glutamyltransferase gene. *Eur J Biochem* 268: 317–325.
- Volpers C und Kochanek S (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S164–171.
- von Coelln R, Kügler S, Bähr M, Weller M, Dichgans J und Schulz J (2001) Rescue from death but not from functional impairment: caspase inhibition protects dopaminergic cells against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not against the loss of their terminals. *J Neurochem* 77: 263–273.

- Wade L und Brady H (1981) Cysteine and cystine transport at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 37: 730–734.
- Wajant H, Pfizenmaier K und Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45–65.
- Walther W und Stein U (2000) Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 60: 249–271.
- Wang W und Ballatori N (1998) Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 50: 335–356.
- Wiesinger H (2001) Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 64: 365–391.
- Wilkinson B und Gilbert HF (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699: 35–44.
- Wingfield P, Pain R und Craig S (1987) Tumour necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Lett* 211: 179–184.
- Winterbourn C und Metodiewa D (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 314: 284–290.
- Wright E, Stern J, Ersser R und Patrick A (1980) Glutathionuria: γ -glutamyl transpeptidase deficiency. *J Inher Metab Dis* 2: 3–7.
- Wu DC, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Vila M, Jackson-Lewis V, Teismann P und Przedborski S (2002) Glial cell response: A pathogenic factor in Parkinson's disease. *J Neurovirol* 8: 551–558.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR und Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489–492.
- Wüllner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Löschmann P, Schulz J, Weller M und Klockgether T (1999) Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res* 826: 53–62.
- Xia X, Harding T, Weller M, Bieneman A, Uney J und Schulz J (2001) Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10433–10438.
- Xiang J, Ennis SR, Abdelkarim GE, Fujisawa M, Kawai N und Keep RF (2003) Glutamine transport at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Neurochem Int* 43: 279–288.
- Yakes F und van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 514–519.

- Yang C, Chou S, Lin N, Liu L, Tsai P, Kuo J und Lai J (1994) Determination of extracellular glutathione in rat brain by microdialysis and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 661: 231–235.
- Yates S, Burgess L, Kocsis-Angle J, Antal J, Dority M, Embury P, Piotrkowski A und Brunden K (2000) Amyloid β and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem* 74: 1017–1025.
- Yoshimori T, Semba T, Takemoto H, Akagi S, Yamamoto A und Tashiro Y (1990) Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. *J Biol Chem* 265: 15984–15990.
- Youdim M und Riederer P (1993) The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 40: 57–67.
- Yudkoff M, Pleasure D, Cregar L, Lin Z, Nissim I, Stern J und Nissim I (1990) Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [^{15}N]glutamate. *J Neurochem* 55: 137–145.
- Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR und Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5: 863–873.
- Zhang H, Ong W, Leong S und Laperche Y (1997) Species differences in the localisation of γ -glutamyl transpeptidase immunopositive cells at the blood-brain interface. *J Hirnforsch* 38: 323–330.
- Zhang J, Kravtsov V, Amarnath V, Picklo M, Graham D und Montine T (2000) Enhancement of dopaminergic neurotoxicity by the mercapturate of dopamine: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 74: 970–978.
- Zhu S, McGeer E und McGeer P (1990) γ -Glutamyltransferase activity is unchanged in acutely quinolinate-lesioned rat neostriatum but is elevated in Huntington's disease caudate. *Exp Neurol* 107: 106–9.
- Zlokovic B, Mackic J, McComb J, Weiss M, Kaplowitz N und Kannan R (1994) Evidence for transcapillary transport of reduced glutathione in vascular perfused guinea-pig brain. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 402–408.
- Zängerle L, Cuenod M, Winterhalter K und Do K (1992) Screening of thiol compounds: depolarization-induced release of glutathione and cysteine from rat brain slices. *J Neurochem* 59: 181–189.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Rainer Askani
Prof. Dr. Johannes Beck
Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg
Prof. Dr. Andreas Bodenstedt
Prof. Dr. Jörg Bottler
Prof. Dr. Gerhard Breves
Prof. Dr. Hans-Otto Brückner
Prof. Dr. Hannelore Daniel
Prof. Dr. Ralf Dringen
PD Dr. Frank Döring
Prof. Dr. Gerd Esser
Prof. Dr. Dieter Eichelberg
Prof. Dr. Georg Erhardt
PD Dr. Anna Barbara Fischer
Prof. Dr. Wolfgang Friedt
Prof. Dr. Bernd Hamprecht
Prof. Dr. Roland Herrmann
Prof. Dr. Junes Ipaktschi
Prof. Dr. Dr. hc Hans-Jürgen Jäger
Prof. Dr. Hans-Ulrich Klör
Prof. Dr. Christian Kunze
Prof. Dr. Christoph Lämmler
Prof. Dr. Peter Langer
Prof. Dr. Ingrid-Ute Leonhäuser
PD Dr. Thomas Linn
Prof. Dr. Günther Maier
Prof. Dr. Monika Neuhäuser-Berthold
Prof. Dr. Karl-Hermann Neumann
PD Dr. Frank Ordon
Prof. Dr. Konrad Otto
Prof. Dr. Johannes Ottow
Prof. Dr. Josef Pallauf
Prof. Dr. Klaus Pleschka
Prof. Dr. Elmar Schlich
Prof. Dr. PhD. Edgar Weigand

Lebenslauf

14.01.1976	geboren in Gronau/Westf.
08/82 - 08/83	Grundschule: Kirchsule Papenburg
08/83 08/90	Gymnasium / Grundschule: Deutsche Schule Barcelona
08/90 - 05/95	Gymnasium: Ratsgymnasium Osnabrück Abitur im Mai 1995
09/95 - 04/01	Studium der Ökotoxikologie, Fachrichtung Ernährungswissenschaft an der Justus-Liebig-Universität Gießen
17.04.2001	Diplom in Ökotoxikologie
08/01 - 11/04	Ausführung des experimentellen Teils der Dissertation mit dem Titel „Umsatz von extrazellulärem Glutathion und Glutathiondisulfid durch Gehirnzellen“ am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Ralf Dringen