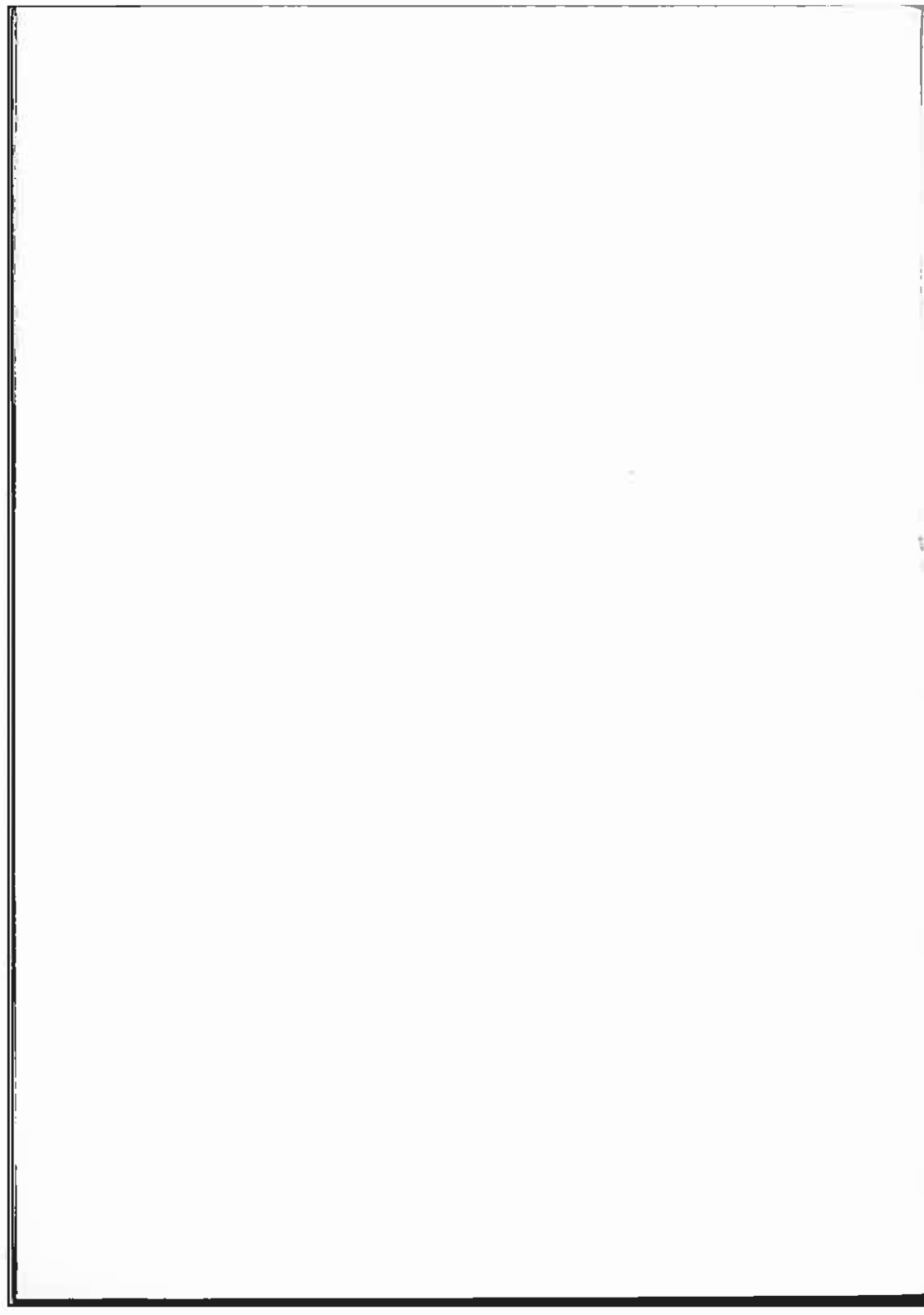




**Chemo-taxonomische Untersuchung von Enzymsystemen für die
Umsetzung von Xenobiotika in niederen Pflanzen und
marinen Makroalgen:
Ein Beitrag zum Konzept der "Grünen Leber"**

**von
Stephan Pflugmacher**

Dissertationsverlag NG Kopierladen GmbH, München

© 1996 by Dissertationsverlag NG Kopierladen GmbH, München

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Pflugmacher, Stephan:

Chemo-taxonomische Untersuchung von Enzymsystemen für
die Umsetzung von Xenobiotika in niederen Pflanzen und
marinen Makroalgen : ein Beitrag zum Konzept der "grünen
Leber" / von Stephan Pflugmacher. – München : Diss.-Verl.
NG-Kopierladen, 1996

Zugl.: München, Univ., Diss., 1996

ISBN 3-928536-62-1

I. Einleitung

1.	Das 3-Phasen-Modell der Detoxifizierung	1
2.	Phase I-Reaktionen	6
3.	Phase II-Reaktionen	11
3.1	Konjugation mit Glutathion	12
3.2	Konjugation mit Glucose	13
3.2.1	O-Glucoside	14
3.2.2	N-Glucoside	15
3.2.3	S-Glucoside	15
4.	Phase III-Reaktionen	16
5.	Das Konzept der „Grünen Leber“	16
6.	Themenstellung	19

II. Material und Methoden

1.	Material	20
1.1	Geräte	20
1.2	Software	20
1.3	Chemikalien	20
1.3.1	Radiochemikalien	20
1.3.2	Substrate für enzymatische Bestimmungen	21
1.3.3	Induktoren/Inhibitoren	21
1.3.4	Standards	21
1.3.5	Sonstige Chemikalien	22
1.4	Puffersysteme	23
1.5	Materialien für die Chromatographie	23
1.5.1	Dünnschichtchromatographie	23
1.5.2	Säulenchromatographie	23
1.6	Pflanzenmaterial	24
1.6.1	Zellsuspensionskulturen	27

1.6.2	Kultur von <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	27
1.6.3	Kontrollierte Algenanzucht	28
1.6.4	Freilandmakroalgen	29
1.6.5	Systematik und Morphologie der wichtigsten Versuchsalgen	29
2.	Methoden	31
2.1	Messung der Radioaktivität	31
2.1.1	Radioaktivitätsmessung auf Dünnschichtplatten	31
2.1.2	Radioaktivitätsmessung in Flüssigkeiten	31
2.1.3	Radioaktivitätsmessung in festen Proben	31
2.2	Chromatographische Methoden	32
2.2.1	Dünnschichtchromatographie	32
2.2.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	32
2.2.3	Entsalzungssäule	32
2.3	Methoden der Protein- und Aktivitätsbestimmung	33
2.3.1	Proteinbestimmung	33
2.3.2	Gewinnung der löslichen und mikrosomalen Extrakte	33
2.3.3	Enzymatische Aktivitätsmessungen	36
2.3.3.1	Berechnung von Enzymaktivitäten	36
2.3.3.1.1	Photometrisch bestimmte Aktivitäten	36
2.3.3.1.2	Mit ^{14}C -markierten Substanzen bestimmte Enzymaktivitäten	37
2.3.3.2	Der Blindwert	38
2.3.3.3	Cytochrom P-450 Monooxygenase	39
2.3.3.3.1	Enzymatische Aktivitätsbestimmung	39
2.3.3.3.2	Metabolitidentifizierung mittels GC/MS	41
2.3.3.3.3	Aufnahme von CO-Differenzspektren	42
2.3.3.4	Glutathion S-Transferasen	43
2.3.3.5	Glucosyltransferasen	47
2.3.3.5.1	Identifizierung des S-GT-Metaboliten	49
2.3.3.6	Markerenzyme	50
2.3.3.6.1	Glutathionreduktase	50
2.3.3.6.2	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase	50

2.3.3.6.3	Isocitrat-Dehydrogenase	50
2.4	Bestimmung des GSH/GSSG Gehaltes	51
2.5	Chlorophyllbestimmung in marinen Algen	53
2.6	Aufnahme und Metabolisierung von ^{14}C -markierten Xenobiotika in Algen	54
2.6.1	Aufnahmekinetik von ^{14}C -markierten Xenobiotika	54
2.6.1.1	Zeitkinetische Studie der ^{14}C -Benzo(a)pyren-Aufnahme in <i>Fucus vesiculosus</i>	55
2.6.1.2	Clearance-Versuch von ^{14}C -Benzo(a)pyren in <i>Fucus vesiculosus</i>	57
2.6.1.3	Aufnahme von ^{14}C -Benzo(a)pyren in Algen unterschiedlicher Klassen	57
2.6.1.4	Beeinflussung des Metabolismus von ^{14}C -3-Chlorbiphenyl	57
2.7	Induktion von GST und P-450 Monooxygenasen in Algen	58
2.8	Statistik	59

III. Ergebnisse

1.	Screening detoxifizierender Enzyme in niederen Pflanzen und marinen Makroalgen	60
1.1	Cytochrom P-450 Monooxygenase-System	60
1.1.1	Testsystem und Produktidentifizierung	60
1.1.2	Hasse-Diagramme	67
1.1.2.1	Hasse-Diagramm der Cytochrom P-450 Monooxygenasen	68
1.2	Glutathion S-Transferasen	70
1.2.1	Testsystem und Produktidentifizierung	70
1.2.2	Mikrosomale Glutathion S-Transferase	78
1.2.2.1	Hasse-Diagramm der mGST	84
1.2.3	Lösliche Glutathion S-Transferasen	86
1.2.3.1	Hasse-Diagramm der cGST	92
1.3	Glucosyltransferasen	95
1.3.1	Testsystem und Produktidentifizierung	95
1.3.2	O-Glucosyltransferasen	97
1.3.3	N-Glucosyltransferasen	101
1.3.4	S-Glucosyltransferasen	103

1.3.5	Hasse-Diagramm der Glucosyltransferasen	106
2.	Spezialisierung auf marine Makroalgen	108
2.1	Charakterisierung von Cytochrom P-450 in marinen Algen	108
2.1.1	Enzymatische Daten der Laurinsäurehydroxylase	108
2.1.1.1	Apparente K_m - und V_{max} -Werte	108
2.1.1.2	Proteinmengenabhängigkeit	109
2.1.1.3	Zeitabhängigkeit	111
2.1.1.4	Temperaturabhängigkeit	112
2.1.1.5	Hemmung der IC-LAH-Aktivität	113
2.1.1.6	Substratspezifität	114
2.1.1.7	Nachweis von Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 in Algen	124
3.	Metabolismusstudien an marinen Makroalgen	129
3.1	Zeitkinetik der Benzo(a)pyren-Aufnahme in <i>Fucus vesiculosus</i>	129
3.2	Clearance-Versuch von Benzo(a)pyren in <i>Fucus vesiculosus</i>	131
3.3	Aufnahme von Benzo(a)pyren in verschiedenen marinen Makroalgen	132
3.4	Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus	133
4.	Induktion des Cytochrom P-450- und des GST-Systems in Algen	136
4.1	Zeitkinetik der Induktion	136
4.1.1	P-450 Monooxygenase-System	136
4.1.2	Glutathion S-Transferase System	137
4.1.2.1	mGST	138
4.1.2.2	cGST	139
4.2	Induktorscreening in marinen Makroalgen	141

IV. DISKUSSION

1.	Validierung der Methoden	149
2.	Screening der detoxifizierenden Enzymsysteme	149

2.1	Cytochrom P-450 Monooxygenase-System	152
2.2	Glutathion S-Transferase-System	154
2.3	Glucosyltransferasen	159
2.4	Hasse-Diagramme der detoxifizierenden Enzyme	162
3.	Spezialisierung auf marine Makroalgen	166
3.1	Enzyme in marinen Makroalgen	167
3.2	Metabolismusstudien an marinen Makroalgen	171
3.3	Induktionsversuche an marinen Makroalgen	172
4.	Ausblick	174
V. ZUSAMMENFASSUNG		175
VI. LITERATURVERZEICHNIS		178

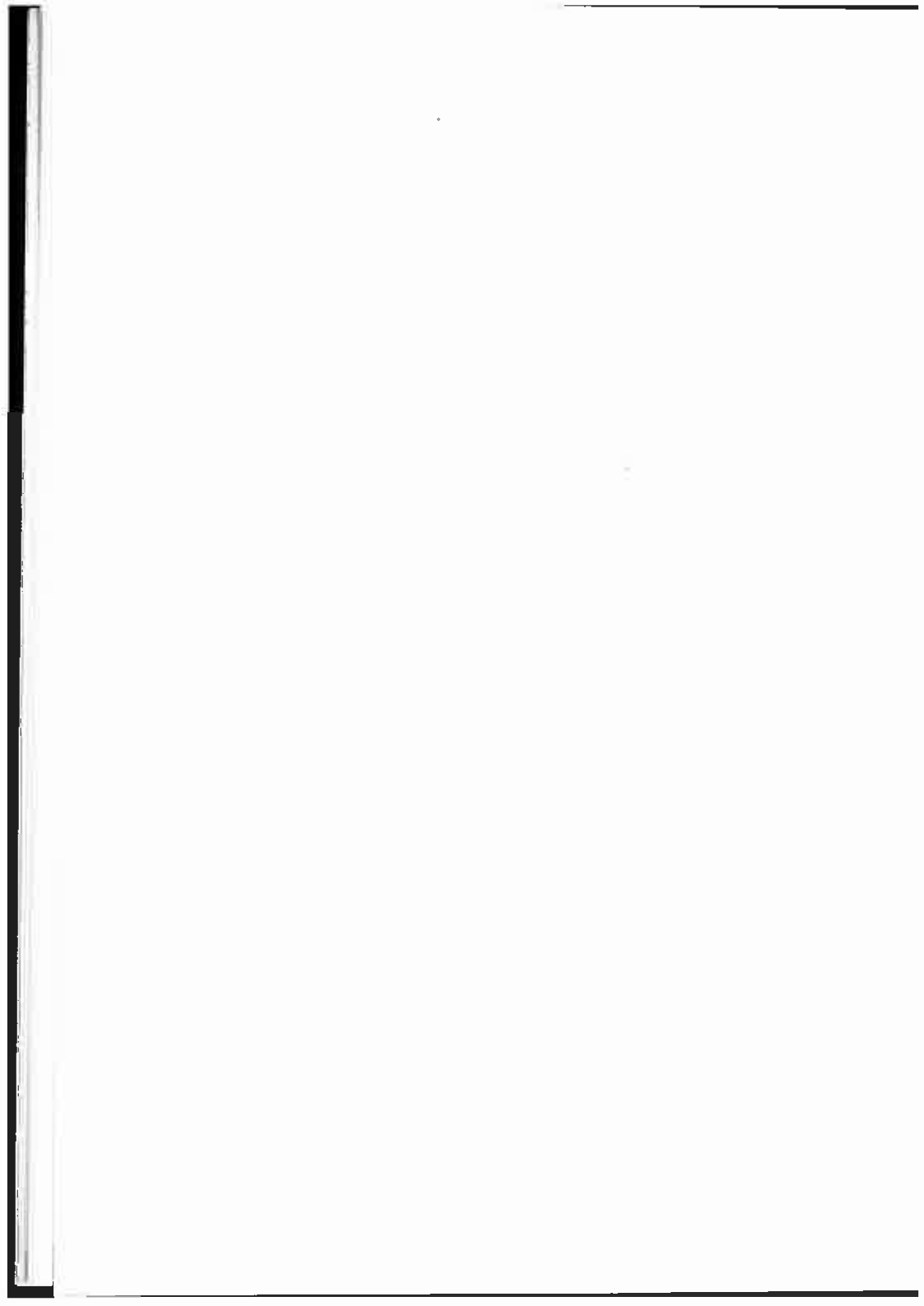


Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A	Anzahl der Nichtübereinstimmungen
ABT	1-Aminobenzotriazol
AMP	5'-Adenosinmonophosphat
asym	asymmetrisch
AWI	Alfred-Wegener Institut für Polar- und Meeresforschung
bar	Bar (Einheit des Druckes)
BIS	1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propan
BP	Benzo(a)pyren
c	Konzentration
°C	Grad Celsius (Einheit der Temperatur)
CA4H	Zimtsäurehydroxylase
CBP	Chlorbiphenyl
cDNA	komplementäre DNA
4-CTP	4-Chlorthiophenol
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
3-CA	3-Chloranilin
cGST	lösliche Glutathion S-Transferase
cm	Zentimeter (Einheit der Länge)
cpm	Zahl der registrierten (Zerfalls-) Ereignisse pro Minute
CoA	Coenzym A
d	Schichtdicke der Küvette
Da	Dalton
DCA	3,4-Dichloranilin
DCBP	Dichlorbiphenyl
DCNB	2,4-Dichlor-1-nitrobenzol
DDA	2,2,-bis-(4-Chlorphenyl)essigsäure
DDT	1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2,2,-trichlorethan
ΔE	Extinktionsänderung/min
DEHP	Bis(2-ethylhexyl)phthalat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Zahl der tatsächlichen (Zerfalls-) Ereignisse pro Minute
Δt	Meßzeitintervall
DTE	Dithioerythritol
DTNB	2,4-Dinitro-1-fluorbenzol
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E	Einstein (Einheit der Lichtenergie)
eV	Elektronenvolt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPNP	1,2-Epoxy-3-(4-nitrophenoxy)propan
EPTC	(S-Ethyl-N-N-dipropylthiocarbamat)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FG	Frischgewicht
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm (Einheit des Gewichts)
GAP	Garmisch-Partenkirchen
GC	Gaschromatographie
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
GR	Glutathionreduktase
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert

GST	Glutathion S-Transferase
γ -Glu-Glu	γ -Glutamylglutaminsäure
GT	Glucosyltransferase
h	Stunde (Einheit der Zeit)
ha	Hektar (Einheit der Fläche)
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine N'-(2-ethansulfonsäure)
HOAc	Essigsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IAA	Indolessigsäure
IC-LAH	in-chain Laurinsäurehydroxylase
IDH	Isocitratdehydrogenase
IDNB	1-Iod-2,4-dinitrobenzol
IPU	Isoproturon
kat	Katal (Einheit der Enzymaktivität)
K _m	Michaelis-Konstante
K-Pi	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter (Einheit des Volumens)
LAH	Laurinsäurehydroxylase
LM	Laufmittel
LSC	Liquid Scintillation Counting
m	Meter (Einheit der Länge)
M	Molar (Einheit der Stoffmenge)
m ²	Quadratmeter (Einheit der Fläche)
mGST	mikrosomale Glutathion S-Transferase
M ⁺	Molpeak
MES	(2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute (Einheit der Zeit)
MS	Massenspektrometrie
M/z	Masse/Ladungs-Verhältnis (Massenspektrometrie)
n	Anzahl der Bestimmungen
N	Normalität
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid reduziert
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
NER	Nichtextrahierbare Rückstände
ng	Nanogramm (Einheit des Gewichts)
N-GT	N-Glucosyltransferase
nm	Nanometer (Einheit der Länge)
4-NPG	4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid
O-GT	O-Glucosyltransferase
P	Anzahl der Übereinstimmungen
p.a.	pro analysis
PAH	Palmitinsäurehydroxylase
PAKs	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
PCP	Pentachlorphenol
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
pNBC	4-Nitrobenzoylchlorid
PFO	2,5-Diphenyloxazol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
%	Prozent
rel. Int.	relative Intensität des Fragments
R _f	Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde (Einheit der Zeit)
SA	Standardabweichung
STAH	Stearinsäurehydroxylase
SAM	S-Adenosinmethionin

S-GT	S-Glucosyltransferase
sym	symmetrisch
t	Tonnen (Einheit des Gewichts)
Γ	Gleichheit
TCA	Trichloressigsäure
TCB	Tetrachlorbiphenyl
TCP	Trichlorphenol
TLC	Dünnschichtchromatographie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
UDP	5'-Uridindiphosphat
UV	ultraviolette Strahlung
V _{max}	maximale Geschwindigkeit
VIS	sichtbare Strahlung
v/v	Volumen/Volumen
v/w	Volumen/Gewicht
W	Anzahl der Widersprüche
w/v	Gewicht/Volumen
Z	Zählausbeute
ZK	Zellsuspensionskultur



I. Einleitung

1. Das 3-Phasen-Modell der Detoxifizierung

Im Laufe seines Lebens kommt jeder Organismus, ob Tier oder Pflanze, mit einer Vielzahl von biogen und synthetisch entstandenen Substanzen in Berührung. Viele der synthetischen Stoffe, die vom Menschen absichtlich in die Natur eingebracht werden, wie beispielsweise die Pestizide in der Landwirtschaft, oder auch Stoffe, die unabsichtlich durch den Menschen in die Natur verlagert werden, wie beispielsweise die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK's) und chlorierten Biphenyle (PCB's), sind aufgrund ihrer chemischen Struktur der Natur fremd. Sie werden daher als Xenobiotika (griech. *xenos bios* = der Natur fremd) bezeichnet (Hutzinger & Veerkamp, 1981).

Wichtige anthropogene Emissionsquellen für xenobiotische Schadstoffe sind beispielsweise stationäre Feueranlagen in Kraftwerken, Industriebetrieben und bei Kleinverbrauchern (Hausbrand), aber auch mobile Quellen in Form von Verbrennungsmotoren in Kraftfahrzeugen. Neben diesen Emissionen, die etwa 60 % der Gesamtemission organischer Schadstoffe ausmachen, muß eine Vielzahl weiterer Emittenten in Betracht gezogen werden, die flüchtige Substanzen freisetzen, wie z.B. Lösungsmittel in Farben, Lacke, Entfettungsmittel, Reinigungsmittel und Klebstoffe (Friedrich *et al.*, 1987, Debus *et al.*, 1989).

Neben diesen anthropogenen Emissionsquellen gibt es auch eine Vielzahl natürlicher Emittenten für organische Moleküle, wie etwa niedere Pflanzen, Bäume oder Tiere (Rasmussen, 1972, Althuller, 1983, Saini *et al.*, 1995). Pflanzen geben insgesamt fast 100 Millionen Tonnen ätherischer Öle und anderer flüchtiger organischer Substanzen ab, darunter zum Großteil Stoffe aus der Substanzklasse der Alkene (Ratte, 1995). Einen wichtigen Teil dieser Emissionen bilden die chlorierten Naturstoffe, beispielsweise die zwei Millionen Jahrestonnen Tetrachlormethan (Naumann, 1993). Diese Chlororganika, wie z.B. auch das Methylchlorid (CH_3Cl), werden zu 70 % von marinen Organismen abgegeben und stellen mit 5 Millionen Tonnen jährlicher Abgaberate die Emission von Methylchlorid durch die Industrie mit ca. 30.000 t in den Schatten (Wuosmaa & Hager, 1990). Hauptproduzenten dieser chlorierten Naturstoffe sind Bakterien, Pilze und marine Meeresalgen (Naumann, 1993).

Bei Untersuchungen von marinen Makroalgen wurde Mitte der siebziger Jahre eine große Anzahl an Organohalogenverbindungen identifiziert (Woolard *et al.*, 1976, Moore, 1977). Diese Verbindungen reichen von einfachen Monohalogenmethanen bis hin zu höher molekularen, mehrfach mischhalogenierten Kohlenwasserstoffen (Burreson *et al.*, 1976, Sakata *et al.*, 1991). Neben dem oben erwähnten Methylchlorid werden von den Meeresalgen

größtenteils kurzkettige halogenierte Kohlenwasserstoffe (McConnell & Fenical, 1977, Laturnus, 1993) und halogenierte Terpene (Sakata *et al.*, 1991) produziert und an das Meerwasser bzw. die Atmosphäre abgegeben. Weiterhin produzieren die Meeresalgen wichtige Pharmazeutika, nämlich algenspezifische Hydrochinone, Terpene und Bromphenole mit antiviraler und antibakterieller Wirkung (Lüning, 1985).

Aufgrund ihres vielfach lipophilen Charakters können Xenobiotika leicht vom Organismus angereichert werden. Aufgenommen werden sie beim Tier entweder oral über die Nahrung und Flüssigkeiten oder auch über Haut und Schleimhäute der Atemwege. Bei Pflanzen kann die Aufnahme von Xenobiotika prinzipiell über die Wurzel oder durch direkten Eintrag auf Blatt und Sproß erfolgen, wobei die Geschwindigkeit der Schadstoffaufnahme von verschiedenen Parametern wie der Oberflächenstruktur der Pflanze (Wachsgehalt, Behaarung) oder auch, wenn es sich um gasförmige Xenobiotika handelt, von der Öffnung der Stomata abhängig ist (Debus *et al.*, 1989).

Auch die Akkumulation von Xenobiotika im Gewebe eines Organismus bzw. die erschwerte Ausscheidung aus dem Organismus wird durch die Lipophilie dieser Stoffe begünstigt (Scheunert *et al.*, 1993, Bacci & Gaggi, 1987, Villeneuve *et al.*, 1985).

Die Akkumulation von Fremdstoffen im Körper kann unerwünschte Auswirkungen auf den Organismus haben. So können beispielsweise DNA-Schäden und damit einhergehende Mutationen auftreten (Sims *et al.*, 1974). Es können auch Entkopplungsreaktionen stattfinden, die den Energiehaushalt der Zelle nachhaltig stören (Kaufmann *et al.*, 1976). Zudem spielt die Akkumulation von Fremdstoffen in Pflanzen vor allem durch die mögliche weitere Anreicherung dieser Chemikalien in der Nahrungskette eine Rolle für den Menschen (Suess, 1976).

Schon früh wurden in Tieren Enzyme entdeckt, die den Organismus in die Lage versetzen, unpolare Fremdstoffe in polare Metabolite umzuwandeln und diese dann, meist über den Urin, wieder auszuschcheiden (Sandermann, 1994).

Enzymsysteme, die eine Veränderung bzw. einen Umbau aufgenommener Substanzen bewirken können, sind:

Oxidative Enzyme

Reduktive Enzyme

Hydrolytische Enzyme

Konjugationsenzyme

Processing-Enzyme

Die unterschiedlichen Reaktionen dieser Enzymsysteme lassen sich in ein dreiphasiges Modellsystem einordnen (Abb. 1).

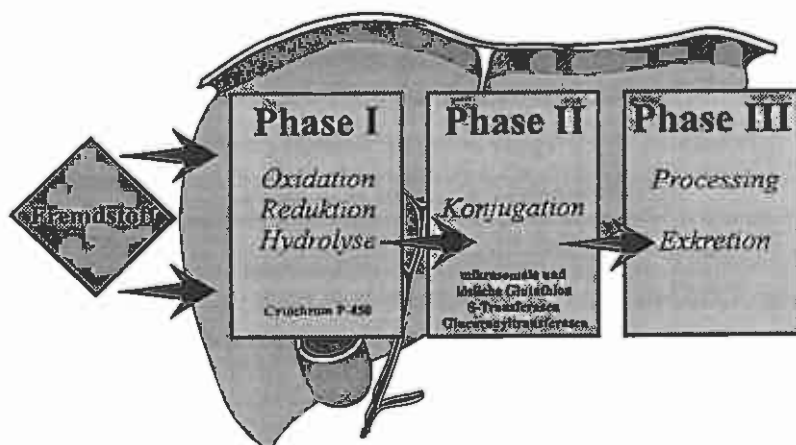


Abb. 1 Dreiphasige Modellvorstellung der Detoxifizierung von Fremdstoffen in der tierischen Leber. In Phase I (Transformation) arbeiten Enzyme wie das Cytochrom P-450-System, das die Substanzen für die Phase II-Enzyme aktiviert. In Phase II (Konjugation) sind Enzymsysteme wie die mikrosomalen und löslichen Glutathion S-Transferasen und die Glucuronyltransferasen aktiv, die die lipophilen Substanzen durch Konjugation mit Glucuronsäure bzw. dem Tripeptid Glutathion hydrophil machen, damit in Phase III weitere Abbaureaktionen (Processing) und/oder die Exkretion des Fremdstoffes erfolgen können (verändert nach Coupland, 1992).

Ein Beispiel für einen Fremdstoff, der diese drei Phasen der Detoxifizierung im tierischen Organismus durchläuft, ist das Benzo(a)pyren (Abb. 2, Seite 4). Die anfängliche Umsetzung dieses PAK's wird durch das Cytochrom P-450 1A1 katalysiert. Das entstehende Epoxid kann dann über die Epoxidhydrolase oder über den NIH-Shift¹ geöffnet werden. Es kann eine Konjugation mit Glutathion an das Epoxid oder mit Sulfat oder Glucuronsäure an Hydroxylgruppen (Phase II) erfolgen, wobei hydrophile Metabolite gebildet werden, die dann in Phase III durch den Urin ausgeschieden werden können (Harvey, 1991, Guengerich, 1992).

¹ NIH-Shift: Der Substituent H- oder Cl-am Aromat wird durch eine OH-Gruppe ersetzt und wandert dabei zur benachbarten Ringposition. Dies deutet auf eine Epoxidzwischenstufe bei der Hydroxylierung hin (Diesperger & Sandermann, 1979). Das National Institute of Health (NIH) ist namensgebend für diese Reaktion, da sie dort erstmals entdeckt wurde.

I. Einleitung

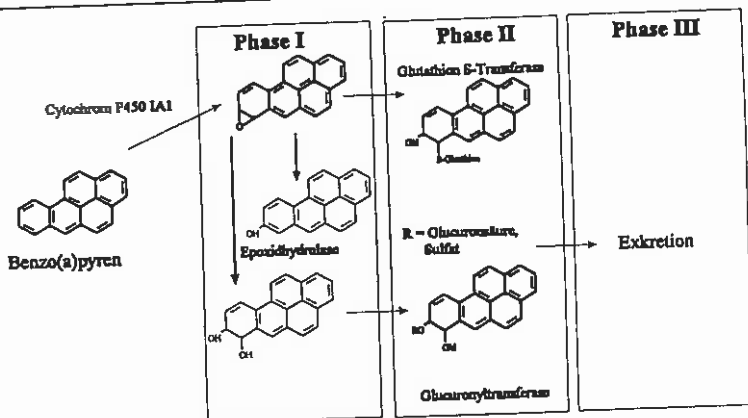


Abb. 2 Vereinfacht dargestellter Metabolismus von Benzo(a)pyren im Säugetier nach Harvey (1991) und Guengerich (1992), eingefügt in das Drei-Phasen-Modell der Entgiftung.

Auch Pflanzen besitzen einen Entgiftungsmetabolismus. Dieser ähnelt dem der Tiere und kann ebenfalls in drei Phasen unterteilt werden. Allerdings fehlt den Pflanzen die Möglichkeit einer effektiven Exkretion der hydrophilen Fremdstoffmetabolite. Dafür sind die Reaktionen der Phase I und Phase II an interne Kompartimentierungs- bzw. Speicherprozesse gekoppelt (Sandermann, 1992). Überträgt man nun das obige Drei-Phasen-Modell aus dem Entgiftungsstoffwechsel der Tiere auf die Detoxifizierung von Xenobiotika in Pflanzen, kann folgendes Schema erstellt werden (Abb. 3).

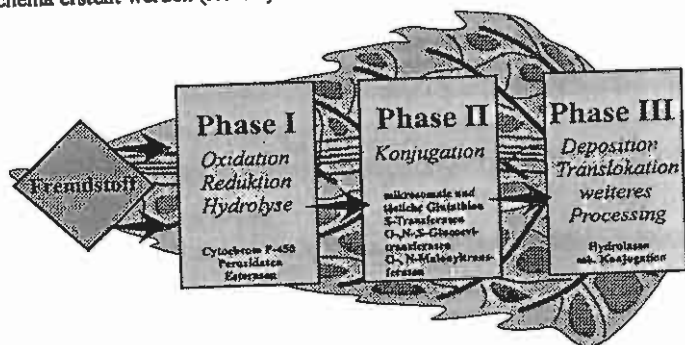


Abb. 3

Dreiphasige Modellvorstellung der Detoxifizierung von Fremdstoffen in Pflanzen (Sandermann, 1987 und 1992). Phase I und Phase II entsprechen denen des tierischen Modells. In Phase III (Kompartimentierung) können die hydrophilen Metabolite der Fremdstoffe beispielsweise in die Vakuole oder den Apoplasten (lösliche Konjugate) eingelagert oder auch in die Zellwand (unlösliche Konjugate) eingebaut werden, auch ein weiteres Processing durch Konjugation mit Malonyl-CoA ist möglich.

Als Beispiele für die Entgiftung eines Fremdstoffes innerhalb des Drei-Phasen-Modells in der Pflanze kann das Pestizid Pentachlorphenol (PCP) und das Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4,-D) (Abb. 4 und 5) gelten.

Das PCP wird in Phase I hydroxyliert, in Phase II mit Lignin konjugiert und schließlich in Phase III in die apoplastatische Zellwand eingebaut. Das Herbizid 2,4-D wird in Phase I ebenfalls hydroxyliert, in Phase II mit D-Glucose und einem Malonylrest konjugiert und in Phase III in der Vakuole der Pflanzenzelle abgelagert (Sandermann, 1994).

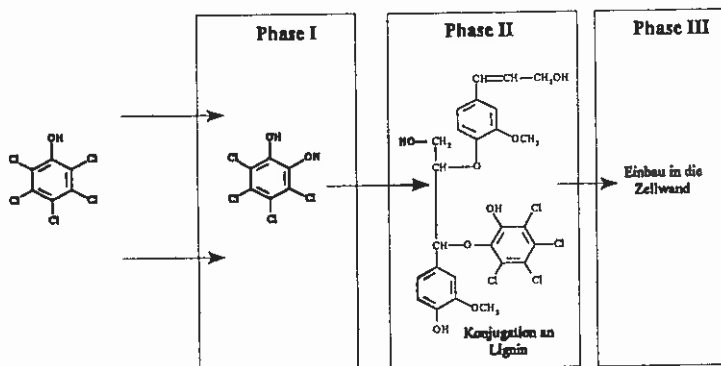


Abb. 4 Metabolismus des Pestizids Pentachlorphenol (PCP) in der Pflanze, eingeteilt in die drei Phasen des Entgiftungsmodells (Sandermann, 1987).

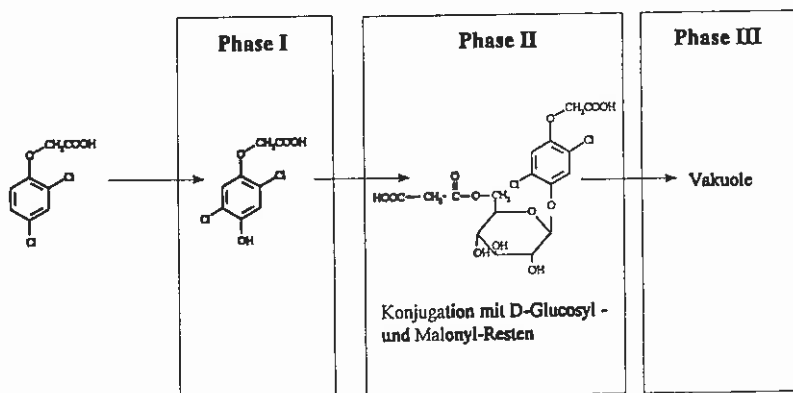


Abb. 5 Metabolismus des Herbizids 2,4-D in der Pflanze, eingeteilt in die drei Phasen des Entgiftungsmodells (Sandermann, 1987).

Im folgenden soll nun anhand von Beispielen aus Tier und Pflanze auf die einzelnen Phasen der Entgiftung und besonders auf die in der vorliegenden Dissertation bearbeiteten detoxifizierenden Enzymsysteme eingegangen werden.

I. Einleitung

2. Phase I-Reaktionen

In Phase I finden in Tier und Pflanze Hydrolysen und Isomerisierungen, Reduktionen und Oxidationen statt. Diese Reaktionen bewirken durch den Einbau funktioneller Gruppen eine Erhöhung der Polarität der Fremdstoffmoleküle.

Bei der Detoxifizierung von Fremdstoffen durch hydrolytische Enzyme spielen die Arylacylamidase (Sandermann, 1982) bzw. die Esterasen (Krell & Sandermann, 1984) eine wichtige Rolle. So wurde von Krell & Sandermann (1984) eine Esterase aus *Triticum aestivum* L. isoliert und gereinigt, die den Weichmacher Bis(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) zum Mono-(2-ethylhexyl)phthalat hydrolysieren konnte.

Nitroreduktasen katalysieren die Reduktion von Nitrogruppen zu Aminogruppen und verändern so die aufgenommene Substanz. Bekannt ist diese Reaktion von der Detoxifizierung des Herbizids Parathion zu Aminoparathion im Spinat (Suzuki & Uchiyama, 1975).

Die Oxidationsreaktionen der Phase I nehmen hier eine hervorzuhebende Stellung ein. Die oxidierenden Enzyme der Phase I werden in zwei Gruppen eingeteilt, die Oxidasen und die Oxygenasen.

Die Oxidasen reduzieren den Sauerstoff unter Bildung von O_2^- , H_2O_2 oder H_2O , ohne ihn in ein Substratmolekül einzubauen.

Oxygenasen katalysieren den Einbau von molekularem Sauerstoff in organische Substrate. Dabei werden entweder nur ein Sauerstoffatom oder beide Sauerstoffatome in das Substrat eingebaut. Die Oxygenasen können folglich in die Monooxygenasen (a) und in die Dioxygenasen (b) eingeteilt werden.

- a) Bei der Monooxygenase-Reaktion wird ein einzelnes Sauerstoffatom in ein organisches Substrat eingebaut. Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert. Die Mehrzahl der Monooxygenasen braucht einen externen Elektronendonator, um ihre Aktivität entfalten zu können. Als Reduktionsmittel können NADH, NADPH, Ascorbat oder Tetrahydropteridin dienen. Die von den Monooxygenasen katalysierte Reaktion ist in Abb. 6 zu sehen.



Abb. 6 Allgemeines Reaktionsschema der Monooxygenase-Reaktion. In das Substratmolekül (SH) wird nur ein Sauerstoffatom eingebaut, das andere wird zu Wasser reduziert (DH_2 = Elektronendonator) (Hagmann, 1983). Das * soll ein Sauerstoffatom markieren, um zu zeigen, daß nur ein O-Atom in das Substratmolekül eingebaut wird.

Beispiele für Monooxygenasen sind die p-Hydroxybenzoat Hydroxylase mit FAD oder die Zimtsäure 4-Hydroxylase mit einem Häm als prosthetischer Gruppe in einem spezifischen Cyochrom P-450.

b) Bei der Dioxygenase-Reaktion werden beide Sauerstoffatome in das Substrat eingebaut (Abb. 7). Dabei können die Sauerstoffatome von einem einzigen Akzeptor (intramolekulare Dioxygenasen) oder von zwei verschiedenen Substraten (intermolekulare Dioxygenasen) aufgenommen werden.

Durch die intramolekularen Dioxygenasen werden meist C-C-Doppelbindungen zwischen zwei hydroxylierten C-Atomen in Indolringen oder neben einem hydroxylierten C-Atom gespalten. Die intermolekularen Dioxygenasen übertragen ein Sauerstoffatom auf 2-Oxoglutarat. Sie benötigen Fe^{2+} -Ionen und ein Reduktionsmittel als Cofaktoren.

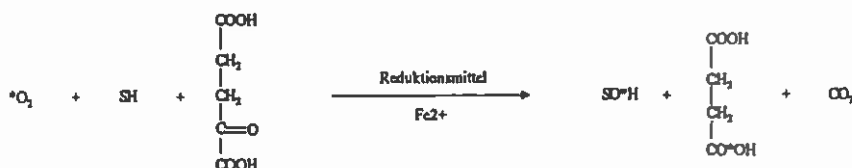


Abb. 7 Allgemeines Reaktionsschema der intermolekularen Dioxygenasen, die Fe^{2+} -Ionen und Reduktionsmittel als Cofaktoren für die von ihnen katalysierte Reaktion benötigen. S = Substrat (nach Hagmann, 1983)

Beispiele für Dioxygenasen sind die 5-Hydroxytryptophan 2,3-Dioxygenase mit FAD, oder die Indol-Dioxygenase mit einem Kupfer-Komplex als prosthetischer Gruppe.

Monooxygenasen kommen in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor. Sie sind zum Teil an der Biosynthese, der Umwandlung und dem Abbau wichtiger Metabolite, aber auch am Abbau von Fremdstoffen beteiligt. Erste Versuche zur Oxidation von Fremdstoffen wurden in der Mikrosomenfraktion aus Rattenleberhomogenisat in Anwesenheit von NADPH gemacht. Mittels spektroskopischer Methoden konnte im Homogenisat aus Rattenleber ein Cytochrom nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Mikrosomen mit Natriumdithionit reduziert und mit Kohlenmonoxid begast. Im Differenzspektrum der Mikrosomen trat eine Absorptionsbande bei 450 nm auf. Weitere Untersuchungen zeigten, daß es sich bei dieser Häm-Komponente um den

I. Einleitung

Hauptbestandteil eines Fremdstoffe metabolisierenden Enzymsystems, des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems, handelte (Omura & Sato, 1964).

Die Enzyme des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems gewannen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Dieses Enzymsystem wurde in sehr vielen Säugetierspezies wie Affen, Hunden, Ratten, aber auch in Vögeln, Fischen, Insekten sowie in Hefepilzen und Bakterien mit Hilfe molekularbiologischer Methoden charakterisiert. Somit konnten evolutionäre Zusammenhänge dargelegt werden (Nelson *et al.*, 1993). Allgemein katalysiert das Cytochrom P-450 Enzymsystem Stoffwechselreaktionen wie die aliphatische und aromatische Hydroxylierung, die Epoxidierung olefinischer und aromatischer Doppelbindungen, die oxidative Desalkylierung von N-, O- und S-Alkylverbindungen und die oxidative Desaminierung von Thioethern und Aminen zu Sulfoxiden bzw. Hydroxylaminen (Woggen, 1988, Mougín *et al.*, 1990, Moreland & Corbin, 1991). In Pflanzen wurde das P-450 Monooxygenase-System beispielsweise in Zellsuspensionskulturen von *Helianthus tuberosus* (Salaün *et al.*, 1978) und im Mesokarp der Avocado (Durst *et al.*, 1992) nachgewiesen. Payne (1977) veröffentlichte eine Untersuchung über das P-450 Monooxygenase-System in verschiedenen marinen Organismen, u. a. auch in einigen Spezies der marinen Makroalgen. In den Algen konnte aber keine P-450 Aktivität nachgewiesen werden. Zur Aktivitätsbestimmung des pflanzlichen P-450 Monooxygenase-Systems wurden meist endogene Substrate wie die trans-Zimtsäure (Zimtsäurehydroxylase, CA4H) sowie verschiedene Fettsäuren (Laurinsäurehydroxylase, LAH), Flavonoide und Terpene verwendet. Xenobiotische Substrate für das P-450 Monooxygenase-System konnten vor allem in tierischen Systemen wie Fischen (Ahokas & Pelkonen, 1984) und Mollusken (Stegemann, 1985, Livingstone *et al.*, 1989) untersucht werden. Als Substrate wurden hier meist Benzo(a)pyren (Livingstone, 1984) oder verschiedene PCB's (den Besten *et al.*, 1993) eingesetzt. Herbizide wie 2,4-D, Primisulfuron oder Isoproturon wurden ebenfalls als xenobiotische Substrate getestet (Frear *et al.*, 1991, Mougín *et al.*, 1991, Fonné-Pfister *et al.*, 1990). Die Anzahl der möglichen Substrate für das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System geht mittlerweile in die Tausende (Guengerich, 1993).

Eine schnelle Messung des Einflusses bestimmter Substrate auf das P-450 Monooxygenase-System wurde durch Aufnahme von Substratbindungsspektren erzielt. Durch die Bindung des Substrates an Cytochrom P-450 wird eine drastische Änderung des Absorptionsspektrums für das Cytochrom aufgrund der Änderung des Spinzustandes im Hämeisen beobachtet.

Diese Substratbindungsspektren werden in zwei Typen, Typ I mit einem Maximum bei 390 nm und einem Minimum bei 420 nm und Typ II mit einem Maximum bei 425 - 435 nm und einem Minimum bei 390 - 410 nm, eingeteilt. Das Typ I-Spektrum spiegelt die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes wieder. Der Typ II wird in der Regel von stickstoffhaltigen Verbindungen erzeugt, die nur schwache bzw. keine Substrate darstellen und in den meisten Fällen die Cytochrom P-450 Aktivität sogar unterdrücken (Kahl & Kahl, 1981).

Unter dem Begriff Cytochrom P-450 wurde eine Gruppe von Häm-Proteinen zusammengefaßt, die ähnliche Komponenten für ihre katalytische Aktivität benötigen (Abb. 8).

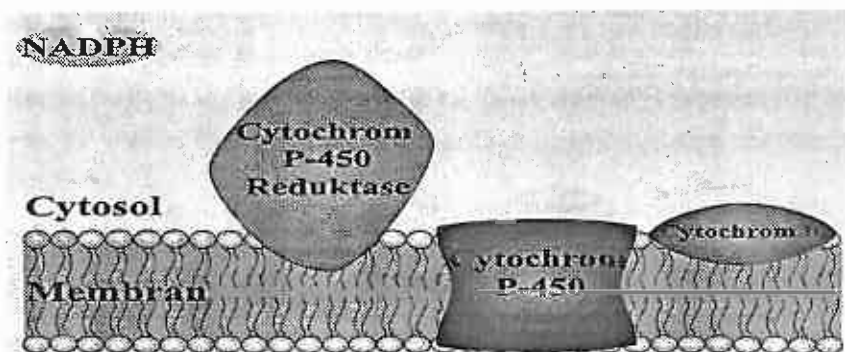


Abb. 8 Modellvorstellung des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems, welches in die Membran eingebettet ist. Damit sich die Enzymaktivität des Enzymsystems entfalten kann, muß das Zusammenspiel der Cytochrom P-450 Reduktase und des Cytochrom b₅ gewährleistet sein. Die Cytochrom P-450 Reduktase enthält zwei Cofaktoren, das Flavinadenindinukleotid (FAD) und das Flavinmononucleotid (FMN). Beide werden als interne Moleküle zum Elektronentransfer genutzt (nach Guengerich, 1993).

Im Zentrum des Cytochrom P-450 sitzt ein Eisen²⁺ oder Eisen³⁺, das mit dem Protoporphyrin einen Chelatkomplex bildet. Das Protoporphyrin besteht aus einem Porphyringerüst mit vier Methyl-, zwei Vinyl- und zwei Propionsäureresten und ist demnach ein vierzähliger Ligand. Die vier Bindungsstellen zum Eisen werden durch die vier Stickstoffatome des Protoporphyrin geliefert. So entsteht ein quadratischer Komplex (Abb. 9, Seite 10).

Die verbleibenden fünften und sechsten Koordinationsstellen des Eisens sind mit weiteren Liganden besetzt. Dies sind zum einen Seitengruppen spezifischer Aminosäuren eines Proteins, zum anderen Moleküle wie Wasser, Sauerstoff, Kohlenmonoxid oder Kohlendioxid.

I. Einleitung

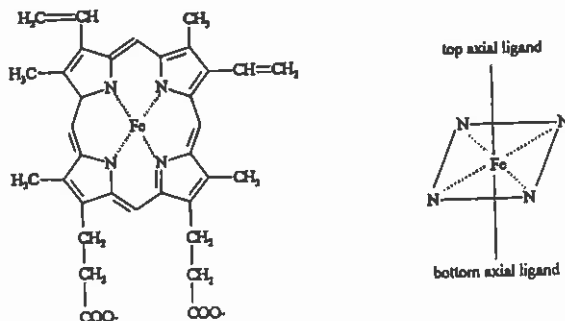


Abb. 9 Aufbau des Cytochrom P-450. Im Zentrum befindet sich das Fe^{3+} bzw. Fe^{2+} , das mit dem Protoporphyrin einen Chelatkomplex bildet (Ortiz de Montellano, 1988).

Der katalytische Mechanismus des P-450 Monooxygenase-Systems besteht aus mehreren chemischen Schritten (Abb. 10).

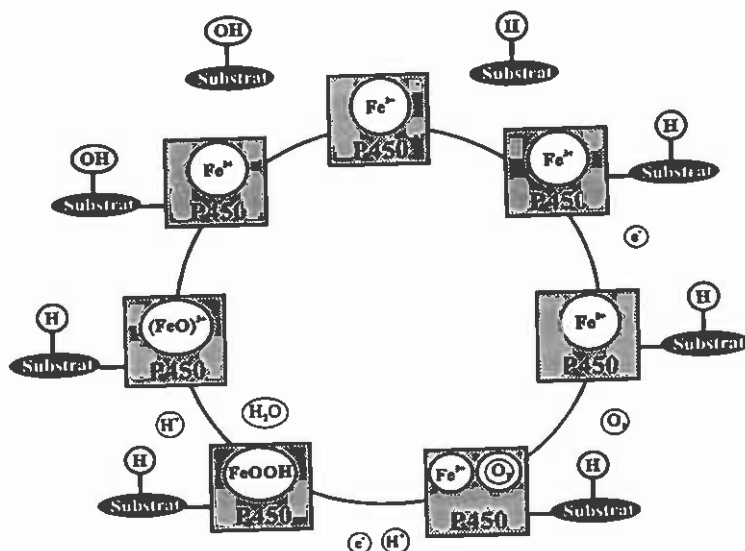


Abb. 10 Katalytischer Kreislauf des Cytochrom P-450. In diesem dargestellten Fall wird die Hydroxylierungsreaktion beschrieben. Nach der Bindung des Substrates an das Cytochrom P-450 wird das Fe^{3+} -Atom durch Aufnahme eines Elektrons eines anderen Donors (NADPH-Cytochrom P450 Reduktase) zum Fe^{2+} reduziert. Nach der Reduktion des Fe-Atoms ist es möglich, ein Sauerstoffmolekül zu binden. Nach Aufnahme eines weiteren Elektrons und eines Protons bildet sich der P-450 Dioxxygenkomplex. Die weitere Aufnahme eines Protons führt zur Wasserabspaltung und zur direkten Oxidierung des Substrates. Dieses löst sich vom P-450 Protein, so daß der Zyklus erneut beginnen kann (Guengerich, 1993).

Das Substrat bindet zuerst an die Fe^{3+} -Form des Enzyms. In einem zweiten Schritt erfolgt die Reduktion der Cytochrom P-450 Reduktase durch NADPH. Dadurch wird das erste Elektron auf das Cytochrom P-450 übertragen, welches zur Fe^{2+} -Form des Enzyms reduziert wird. Diese Form bindet nun ein Molekül Sauerstoff und bildet den P-450 Dioxygen-Komplex. Es erfolgt die Übertragung eines zweiten Elektrons, das entweder von der NADPH-Reduktase oder über das Cytochrom b_5 zur Verfügung gestellt wird, und eines zweiten Protons (H^+) auf das Fe^{3+} . Von diesem Komplex wird ein Wassermolekül abgespalten. Das verbleibende Sauerstoffatom wird nun auf das Substrat übertragen, und das entstandene oxidierte Produkt trennt sich vom Enzym (Guengerich, 1993).

Neben den oben beschriebenen Oxidationsreaktionen durch das P-450 Monooxygenase-System sind in Pflanzen weitere oxidative Reaktionen, katalysiert durch Peroxidasen, Peroxygenasen und Phenolasen, bekannt (Sandermann, 1982).

Eine Substanz kann nun mehrmals Reaktionen der Phase I durchlaufen, es können sich aber auch, mit einem in Phase I modifizierten Fremdstoff, Konjugationsreaktionen der Phase II anschließen.

3. Phase II-Reaktionen

Durch die Phase I wurden in organische Fremdstoffe funktionelle Gruppen mittels Oxidations-, Reduktions- und Hydrolysevorgängen eingeführt. Dadurch sind nun in Phase II Konjugationsreaktionen mit Glutathion, Aminosäuren, Malonsäure, Zuckern oder Polymeren möglich. Eine Zusammenstellung der wichtigsten Konjugationsmechanismen, die lösliche Konjugate bilden, ist in Tab. 1 aufgezeigt.

Tab. 1 Zusammenstellung der wichtigsten Reaktionen zur Bildung löslicher Konjugate von Fremdstoffen im Pflanzenreich (Diesperger, 1979).

Reaktion	Konjugationssubstanz	funktionelle Gruppe
Methylierung	SAM	$-\text{NH}_2$, $-\text{NH}$, $-\text{N}^=$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$
Acetylierung	Acetyl-SCoA	NH_2 (in Aminen, Hydrazinen, Aminosäuren)
Sulfatierung	AMP-Sulfat	$-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$
Glucose-Konjugation	UDP-Glucose	$-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, SH
Malonyl-Konjugation	Malonyl-CoA	$-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$
GSH-Konjugation	Glutathion	Substitution von Halogeniden, NO_2 , Addition an Epoxide und Alkene

Auch eine Detoxifizierung durch den Einbau des modifizierten Fremdstoffs in Biopolymere (bound residues) gilt als Phase II-Reaktion. Dies bedeutet gleichzeitig eine Verlagerung in den apoplasmatischen Raum. Letzteres konnte für verschiedene Substanzen, beispielsweise 2,4-D, Benzo(a)pyren und PCP, durch den kovalenten Einbau der Phase I-Produkte in Lignin gezeigt werden (Scheel & Sanderman, 1981, v.d.Trenck & Sandermann, 1981, Scheel *et al.* 1984). Im weiteren soll nur auf die in dieser Arbeit untersuchten Konjugationsreaktionen mit dem Tripeptid Glutathion und mit UDP-Glucose eingegangen werden.

3.1 Konjugation mit Glutathion

Die Konjugation mit dem Tripeptid Glutathion (GSH) wird durch die Enzyme aus der Klasse der Glutathion S-Transferasen (GST, EC 2.5.1.18) katalysiert. Sie sind multifunktionelle Entgiftungsenzyme der Phase II, die eine Konjugation von GSH mit einer Vielzahl elektrophiler Substanzen durchführen können. Die Konjugationsreaktion mit GSH ist ubiquitär verbreitet und wurde in allen lebenden Organismen, von Mikroorganismen bis zu Tieren und Pflanzen, nachgewiesen. Eine Charakterisierung der GST wurde in verschiedenen Stämmen des Tierreichs (Ketterer, 1986, Stenersen *et al.*, 1987, Mannervik & Danielson, 1988, Clark, 1989), in Bakterien und Hefen (Shishido, 1981, Ando *et al.*, 1988, Sheehan & Casey, 1993) und in höheren Pflanzen (Lamoureux & Rusness, 1989, Schröder *et al.*, 1990) vorgenommen. Bei den GST's handelt es sich zum größten Teil um cytosolische Proteine. Es wurden jedoch auch membranassoziierte Formen isoliert (Diesperger & Sandermann, 1979, Morgenstern *et al.*, 1985).

Das Tripeptid GSH (Abb. 11), bestehend aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin, das zur Konjugation mit der Akzeptorsubstanz dient, kommt in Bakterien, Pflanzen und Tieren in Konzentrationen von 0,18 - 32 µmol/g FG vor (Lamoureux & Rusness, 1989).

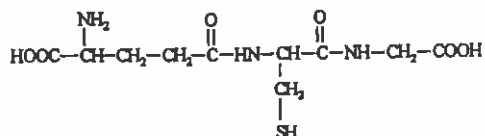


Abb. 11 Das Tripeptid Glutathion (GSH), bestehend aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Das GSH wird in Konjugationsreaktionen, katalysiert durch die GST, verwendet. Die reaktive Gruppe kann enzymatisch und in einigen Fällen auch nichtenzymatisch mit elektrophilen Substanzen reagieren.

Für den Konjugationsmechanismus wurden vier unterschiedliche Reaktionen beschrieben, die in Tab. 2 aufgeführt sind.

Tab. 2 Mechanismen der GST-katalysierten Konjugation von GSH an elektrophile Substanzen am Beispiel unterschiedlicher Herbizide (Komoßa *et al.*, 1995).

Reaktionstyp	Herbizidklasse	Herbizid / Pflanze	Literaturzitat
Nukleophile Substitution	<i>sym</i> -Triazine	Atrazin / Mais	Shimabukuro, 1985
	Chloracetamide	Propachlor / Soja	Lamoureux & Rusness, 1989
		Pretilachlor / Reis	Han & Hatzios, 1991
		Metolachlor / Mais	LeBaron <i>et al.</i> , 1988
	Sulfonylharnstoffe	Chlorimuron	Brown & Neighbors, 1987
Etherspaltung	Diphenylether	Fluorodifen / Fichte	Lamoureux <i>et al.</i> , 1991
		Acifluorfen / Soja	Frear <i>et al.</i> , 1983
Sulfoxidspaltung	Thiocarbamate	EPTC / Mais	Lamoureux & Rusness, 1987
		EPTC / Baumwolle	dto.
	<i>asym</i> -Triazinone	Metribuzin / Soja	Hatzios & Penner, 1988
Addition an ein Epoxid		Tridiphane / Mais	Lamoureux & Rusness, 1986

3.2 Konjugation mit Glucose

Endogene und auch exogene Substanzen mit OH-, NH₂- oder SH-Gruppen können in Pflanzen glucosidiert werden. Die Glucosidierung ist eine wichtige Reaktion im sekundären Stoffwechsel der Pflanzen. Als Glucoside bezeichnet man Halbacetale aus dem Zucker D-Glucose und einem anderen Molekül (endogener oder exogener Alkohol), das als Aglykon bezeichnet wird. Im pflanzlichen Stoffwechsel sind es meist phenolische Substanzen, die glucosidiert werden. Die Glucosidierung von endogenen Substanzen wie beispielsweise von Vanillinsäure (Eckey, 1987) oder von Flavonoiden (Heller & Forkmann, 1988) ist sehr gut untersucht. Auch die Glucosidierung von Fremdstoffen konnte nachgewiesen werden. Dies gilt für sehr viele Substanzen wie beispielsweise Pentachlorphenol (Schmitt *et al.*, 1985), 4-Chloranilin, 3,4-Dichloranilin (Winkler & Sandermann, 1989, Sandermann *et al.*, 1991) oder die hydroxylierten Metabolite des Herbizides Bentazon (Gallandt & Balke, 1995).

Neben O-, N- und S-Glucosiden (3.2.1, 3.2.2., 3.2.3) sind Glucoseester und komplexe Glycoside bekannt. Glucoseester werden bei der Konjugation von UDP-Glucose mit Xenobiotika, die freie Carboxylgruppen aufweisen, gebildet. Wetzel & Sandermann (1994) konnten eine spezielle Glucosyltransferase aus einer Sojazellsuspensionskultur reinigen, die die 2,2-bis-(4-Chlorphenyl)essigsäure (DDA), einen Metaboliten aus dem DDT-Stoffwechsel, in ein solches Glucosekonjugat überführt. Weiterhin konnte dies für das Herbizid Diclofop in verschiedenen Wildgräsern, beispielsweise *Lolium rigidum* und dem Wildweizen (*Avena fatua*), gezeigt werden (Owen, 1989, Shimabukuro & Hoffer, 1991, Holtum *et al.*, 1991, Dahroug & Müller, 1990).

Die komplexen Glycoside werden durch Addition weiterer Zuckerreste gebildet. Neben Glucose treten dabei am häufigsten die Xylose und die Arabinose auf. In der Tomate konnten diese komplexen Glycoside in Form von Gentiobiosiden von o-Chlorphenol und Chloralhydrat durch Müller (1940) nachgewiesen werden, ebenso im Weizen durch Yahama & Cardini (1960). Neu ist die Entdeckung von Bis-Coumaroyl-Glucosiden, die in der Pflanze als UVB-Schutz dienen können (Schnitzler *et al.*, 1996).

3.2.1 O-Glucoside

Die Substratspezifität der O-Glucosyltransferasen wurde lange als sehr breit gefächert angesehen (Storm & Hassid, 1974, Lamoureux & Frear, 1979), wohingegen die Spezifität für UDP-Glucose stark ausgeprägt ist. Neuere Untersuchungen von Sandermann *et al.* (1991) und Wetzel (1993) bzw. Wetzel & Sandermann (1994) mit hochgereinigten O-Glucosyltransferasen für die Substrate PCP und DDA, einen Metaboliten des DDT-Stoffwechsels, haben gezeigt, daß die Substratbreite für die Akzeptorsubstrate sehr eng gefaßt sein kann. In Tab. 3 sind einige der vielen O-Glucosyltransferasen und die getesteten Substrate aufgelistet.

Tab.3 Liste der bisher isolierten und charakterisierten O-Glucosyltransferasen sowie ihre Substratspezifitäten.

Pflanze bzw. Zellkultur	Akzeptorsubstrat	Literaturstelle
Sojazellkultur	PCP	Sandermann <i>et al.</i> , 1991
Sojazellkultur	DDA	Wetzel & Sandermann, 1994
Sojazellkultur	6-Hydroxybentazon	Gallandt & Balke, 1995
Raps	Thiohydroxymat	Reed <i>et al.</i> , 1993
Erdbeerfrucht	Quercetin	Cheng <i>et al.</i> , 1994

3.2.2 N-Glucoside

Die Bildung von N-Glucosiden ist neben der O-Glucosidbildung eine ebenfalls sehr weit verbreitete Reaktion im Fremdstoffwechsel (Lamoureux & Rusness, 1986). N-Glucoside werden in einer der O-Glucosidbildung vergleichbaren Reaktion gebildet. Von Frear (1968) konnte eine N-Glucosyltransferase isoliert werden, die als Akzeptorsubstrate verschiedene Arylamine wie das Chloramben und das 3,4-Dichloranilin glucosidierte. Es konnten bis heute verschiedene N-Glucosyltransferasen isoliert und ihre Substratspezifität näher untersucht werden. In Tab. 4 sind einige der bisher untersuchten N-Glucosyltransferasen und die getesteten Substrate aufgelistet.

Tab. 4 Liste der bisher isolierten und charakterisierten N-Glucosyltransferasen sowie ihre Substratspezifitäten.

Pflanze bzw. Zellkultur	Akzeptorsubstrat	Literaturstelle
Tomatenzellkultur	Metribuzin	Davis <i>et al.</i> , 1991
Erdaußkallus	Hydroxypyridat	Kroath <i>et al.</i> , 1988
Sojazzellkultur	chlorierte Aniline und verschiedene Naturstoffe	Sandermann <i>et al.</i> , 1991
Soja- und Weizenzellkultur	3,4-Dichloranilin	Schmidt <i>et al.</i> , 1995

3.2.3 S-Glucoside

Die Bildung von S-Glucosiden wurde bisher kaum beschrieben, wenngleich Thioglucosidverbindungen wie die Glucosinolate der Brassicaceen eine große Gruppe in den natürlichen Pflanzenprodukten darstellen (Grootwassink *et al.*, 1994). Beschrieben wurden S-Glucoside als Metabolite von Dimethyldithiocarbamat in Tomaten und Gurken, von 4-Chlor-4',6-bis(isopropylamino)-6'-ethylamino-di(s-triazinyl)sulfid und Fluorodifen (Lamoureux & Rusness, 1986, Lamoureux *et al.*, 1991) sowie von 4-Chlorthiophenol, einer dem PCP strukturell ähnlichen Chemikalie (Eckey, 1987).

4. Phase III-Reaktionen

Die Phase III, die bei Tieren durch die Exkretion der hydrophilen Fremdstoffkonjugate in Urin oder Faeces beschrieben ist, ist bei Pflanzen durch drei verschiedene bisher bekannte Kompartimentierungsprozesse gekennzeichnet: 1) Export in die Vakuole (Schmitt, & Sandermann, 1982), 2) Export in den extrazellulären Raum (Schmitt *et al.*, 1985, Winkler & Sandermann, 1989) und 3) Einbau in Lignin oder andere Zellwandbestandteile (Sandermann *et al.*, 1983, Lange, 1995). In der Vakuole wurden beispielsweise die vermutlich 6-O-(Malonyl)-substituierten β -D-Glucoside des Herbizids 2,4-D gefunden (Schmitt & Sandermann, 1982). Ein Transport eines Konjugates in den apoplastischen Raum wurde für das N-Malonylkonjugat von DCA nachgewiesen (Winkler, 1991). Die Speicherung von unlöslichen oder löslichen Xenobiotikakonjugaten ähnelt der Speicherung pflanzlicher Naturstoffe. Bei vielen unlöslichen Konjugaten wurde eine feste Bindung an Zellwandbestandteile nachgewiesen (Kaufmann *et al.*, 1976), so daß dem Lignin auch eine Funktion als Senke für Xenobiotika im pflanzlichen Entgiftungsstoffwechsel zukommt.

5. Das Konzept der „Grünen Leber“

Dieses Konzept wurde von Sandermann *et al.* (1977) entwickelt und basiert auf verschiedenen Ähnlichkeiten des Xenobiotika-Metabolismus in der tierischen Leber mit dem in Pflanzen.

a) Ähnliche Stoffwechselwege

Einige frühe Arbeiten konnten Gemeinsamkeiten in den verschiedenen Phasen der Detoxifizierung von Tier und Pflanze sowie in der Bildung gemeinsamer Metabolite im Entgiftungsstoffwechsel aufzeigen (Freed & Montgomery, 1963, Casida & Lykken, 1969, Menn, 1978). Das „Grüne Leber“-Konzept wurde bis jetzt überwiegend durch Arbeiten an Zellsuspensionskulturen und Keimlingen untermauert. Dort konnte gezeigt werden, daß nicht nur eine Vergleichbarkeit des Metabolismus in Tier und Pflanze existiert, sondern insbesondere der Metabolismus von lipophilen Substanzen wie PAK's, PCB's, DDT, Benzo(a)pyren und DEHP auch in Pflanzen existiert (Sandermann, 1994). Beispielhaft sind hier die Untersuchungen der Totalherbizide Glyphosat und Phosphinothricin in pflanzlichen Zellkulturen durch Komoßa & Sandermann (1992) bzw. Komoßa *et al.* (1992) zu nennen. Dort wurden die Hauptmetabolite des tierischen und mikrobiellen Metabolismus dieser beiden

Herbizide, die Aminomethylphosphonsäure und die 3-Methylphosphinopropionsäure, als Phase I-Metabolite in der pflanzlichen Zellkultur nachgewiesen. Weiterhin sind Untersuchungen zum DDT- und zum Benzo(a)pyren-Metabolismus anzuführen. Das DDT wird in Phase I in DDA umgewandelt, welches in Phase II durch eine Glucosyltransferase mit D-Glucose konjugiert wird (Arjmand & Sandermann, 1985, Wetzell & Sandermann, 1994). Untersuchungen zum Benzo(a)pyren zeigten, daß Benzo(a)pyren in Quinone überführt wird (v.d.Trenck & Sandermann, 1981) und diese wiederum mit Glutathion konjugiert werden können (Diesperger & Sandermann, 1979, v.d. Trenck & Sandermann, 1981). Bei diesen Untersuchungen wurden ähnliche Metabolite gefunden wie bereits im Tier.

b) Ähnliche Enzymsysteme

Im Tier und in der Pflanze wurden zudem Enzymsysteme entdeckt, die ähnliche Reaktionen katalysieren. Diese Ähnlichkeit konnte beispielsweise für die pflanzliche Zimtsäure 4-Hydroxylase anhand von fünf für Leber-P-450 typische Eigenschaften gezeigt werden:

a) die spektralen Eigenschaften von P-450, b) die Lokalisation des Enzymsystems in Membranen, c) die Aktivierung durch molekularen Sauerstoff, d) die Abhängigkeit von NADPH und einer zugehörigen Reduktase und e) der bevorzugte Umsatz lipophiler Substanzen (Sandermann *et al.*, 1977, Riviere & Cabanne, 1987).

Auch das System der Glutathion S-Transferasen konnte in der Pflanze nachgewiesen werden (Frear & Swanson, 1970). Beispielsweise konnten Diesperger & Sandermann (1979) die Konjugation der Zimtsäure durch eine mikrosomale und eine lösliche Glutathion S-Transferase aus der Erbse zeigen. Durch Morgenstern *et al.* (1979) wurde in der Mikrosomenfraktion aus Rattenleber ebenfalls eine mikrosomale GST (mGST) isoliert, die im hohen Maße die Zimtsäure konjugierte.

Durch chromatographische Methoden konnte die lösliche Glutathion S-Transferase (cGST) aus der Erbse, die die Konjugation von Zimtsäure mit GSH katalysierte, von einer löslichen GST-Aktivität für das Herbizid Fluorodifen getrennt werden (Diesperger & Sandermann, 1979). Damit wurde erstmals auf das Vorhandensein verschiedener Isoenzyme der cGST in der Pflanze hingewiesen. Bis zu 11 Isoenzyme der cGST konnten im weiteren aus Mais, Hirse und Weizen mit Hilfe der FPLC-Technik isoliert werden (Dean *et al.*, 1990, Fuerst *et al.*, 1993, Mauch & Dudler, 1993). Im tierischen System war das Vorkommen verschiedener Isoformen der cGST bereits aus der Rattenleber bekannt (Mannervik, 1985, Robertson *et al.*, 1985).

Auch die Formaldehyddehydrogenase, ein glutathionabhängiges Enzym zur Detoxifizierung von Formaldehyd, konnte sowohl in der tierischen Leber (Uotila & Koivusalo, 1983) als auch in einigen Pflanzenspezies nachgewiesen werden (Giese *et al.*, 1995).

c) Ähnliche cDNA Sequenzen

Durch molekularbiologische Methoden konnte das Konzept der „Grünen Leber“ weiter ausgebaut werden. Viele der pflanzlichen Entgiftungsenzyme konnten isoliert und näher charakterisiert werden. Die Molekulargewichte der pflanzlichen Enzyme ähneln denen der Leberenzyme, auch einige cDNA-Sequenzen zeigen Homologien zu tierischen Enzymen. Für das P-450 Monooxygenase-System und für die cGST konnte eine Evolution auf DNA-Ebene gezeigt werden (Gibson, 1989, Nelson *et al.*, 1993, Sandermann, 1994). Beispielsweise weist ein Isoenzym der GST aus Mais, welches als Substrat das Herbizid Alachlor verwendet, eine Region von 44 Aminosäuren auf, die eine 66%-ige Homologie zu einer vergleichbaren Region einer GST aus *Drosophila* zeigt (Toung *et al.*, 1990).

Für die anderen Enzymklassen ist die Erforschung der Evolution in Bezug auf die DNA-Ebene erst in Bearbeitung.

Ein Vergleich der bisher bearbeiteten Protein- und cDNA-Sequenzen zeigt aber, daß eine Evolution der für den Abbau von Xenobiotika verantwortlichen Enzyme von Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und Tieren bis zum Menschen stattgefunden hat (Sandermann, 1994).

6. Themenstellung

Die vorliegende Arbeit geht von dem Konzept der „Grünen Leber“ aus, welches von Sandermann *et al.* (1977) entwickelt und von Sandermann (1992 u. 1994) aktualisiert wurde. Die Enzymsysteme des Drei-Phasen-Modells wurden bereits in den verschiedensten Organismen und Modellsystemen untersucht. Es wird aber deutlich, daß ein wichtiger Teil des Pflanzenreichs unbeachtet gelassen wurde. Bei allen bisherigen Untersuchungen im Rahmen des Konzepts der „Grünen Leber“ wurden die niederen Pflanzen und die marinen Makroalgen ausgeklammert. Aufgrund der großen Biomasse ($3,9 \times 10^9$ t Trockengewicht, Lüning, 1985) und der weltweiten Verbreitung beispielsweise der Makroalgen können gerade diese marinen Pflanzen bei der Detoxifizierung von xenobiotischen Substanzen eine nicht unerhebliche Rolle spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Lücke im Konzept der „Grünen Leber“ zu schließen und anhand eines Screeningprogramms die Aktivität der detoxifizierenden Enzymsysteme wie des P-450 Monooxygenase-Systems, der mikrosomalen und löslichen Glutathion S-Transferasen und der O-, N- und S-Glucosyltransferasen in niederen Pflanzen und marinen Makroalgen zu untersuchen. Die Aktivitätsbestimmungen sollten sowohl mit natürlichen Substraten der einzelnen Enzymsysteme als auch mit xenobiotischen Substraten durchgeführt werden. Ein Vergleich der Aktivitäten der detoxifizierenden Enzymsysteme in den niederen Pflanzen und Makroalgen mit ausgewählten höheren Pflanzen und sterilen Zellsuspensionskulturen sollte eine Einschätzung der Entgiftungsleistung ermöglichen.

Als Beitrag zur Meeresökologie sollten außerdem Erkenntnisse über den Xenobiotikametabolismus und die Induzierbarkeit ausgewählter detoxifizierender Enzymsysteme in marinen Makroalgen gewonnen werden. Da viele dieser Algen halogenierte Naturstoffe im Bereich von 10-100 ng/g Trockengewicht produzieren (Gschwend *et al.*, 1985, Laturnus, 1993), sollte untersucht werden, ob auch halogenierte (chlorierte) Fremdstoffe in marinen Algen umgesetzt werden können.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Autoklav VST 40/60
 Chromatopac Integrator C-R1A
 Hewlett 5890 Packard Series II GC
 HPLC Model 110
 Inkubationsschüttler TR-150
 Lyovac GT 2
 Mikroliter Tischzentrifuge
 Minibeta 1211 Szintillationszähler
 MS Finnigan Mat SSQ 7000
 Oxidizer OX 500
 Radiodünnschichtanalysator
 Schüttelwasserbad
 Spektralphotometer UV-160A
 Sterilbank HF 6.15
 Szintillationszähler LS 6000SC
 Ultrazentrifuge LE-70, mit Festwinkelrotor Ti-70.1
 Universal-Tischzentrifuge
 Zentrifuge J2-21, mit Festwinkelrotor J-14 und JA-21

Zirbus, (Osterode)
 Shimadzu, (Duisburg)
 Hewlett Packard (Boise, U.S.A.)
 Beckmann, (München)
 Infors, (Basel)
 Leybold-Heraeus (Hanau)
 Hettich, (Tuttligen)
 Pharmacia LKB, (Freiburg)
 Finnigan (Bremen)
 Zinsser, (Frankfurt)
 Raytest, (Straubenhardt)
 Infors, (Basel)
 Shimadzu, (Duisburg)
 BDK, (Sonnenbühl-Genkingen)
 Beckmann, (München)
 Beckmann, (München)
 Hettich, (Tuttligen)
 Beckmann, (München)

1.2 Software

ISIS Draw 4.0
 MS-Word for Windows 6.0a
 Sigma Plot for Windows
 RITA 2.0
 Xact 4.0
 Hasse

Molecular Design, (San Leandro)
 Microsoft, (Unterschleißheim)
 Jandel, (Erkrath)
 Raytest, (Straubenhardt)
 Scilab, (Hamburg)
 Brüggemann, (PUC, GSF München)

1.3 Chemikalien

1.3.1 Radiochemikalien

[7,10-¹⁴C] Benzo(a)pyren (63 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] Biphenyl (15 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] 3-Chlorbiphenyl (15 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] 4-Chlorbiphenyl (15 mCi/mmol)
 [Ring U-¹⁴C] 4,4'-DDA (13,4 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] DEHP (15 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] 3,4-Dichloranilin (20,5 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] 2,2-Dichlorbiphenyl (15 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] 2,3-Dichlorbiphenyl (15 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] 2,4,5,2',4',5'-Hexachlorbiphenyl (19 mCi/mmol)
 [U-¹⁴C] Isoproturon (50 mCi/mmol)

Amersham, (Braunschweig)
 New England Nuclear, (Boston, U.S.A.)
 International Isotopes, (München)
 New England Nuclear, (Boston, U.S.A.)
 Pathfinder Laboratories, (St. Louis, U.S.A.)
 New England Nuclear, (Boston, U.S.A.)
 Amersham, (Braunschweig)
 International Isotopes, (München)
 International Isotopes, (München)
 New England Nuclear, (Boston, U.S.A.)
 Institute of Isotopes of Hungarian Academy of Science, (Budapest)

[1- ¹⁴ C] Laurinsäure (53 mCi/mmol)	Amersham, (Braunschweig)
[1- ¹⁴ C] Palmitinsäure (48 mCi/mmol)	Amersham, (Braunschweig)
[U- ¹⁴ C] Pentachlorphenol (12 mCi/mmol)	International Isotopes, (München)
[U- ¹⁴ C] Phenanthren (61 mCi/mmol)	Amersham, (Braunschweig)
[1- ¹⁴ C] Stearinsäure (48 mCi/mmol)	Sigma, (Deisenhofen)
[U- ¹⁴ C] 3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl (27,3 mCi/mmol)	New England Nuclear, (Boston, U.S.A.)
Uridindiphospho-D-[U- ¹⁴ C] Glucose (335 mCi/mmol)	Amersham, (Braunschweig)
[Ring U- ¹⁴ C] Zimtsäure (3,5 mCi/mmol)	Sigma, (Deisenhofen)

1.3.2 Substrate für enzymatische Bestimmungen

Atrazin	Riedel-de Haën, (Seelze)
1-Chloro-2,4-dinitrobenzol	Riedel-de Haën, (Seelze)
4-Chlorthiophenol	Sigma, (Deisenhofen)
2,2-bis-(4-Chlorphenyl)essigsäure)	Riedel-de Haën, (Seelze)
2,4-Dichloro-1-nitrobenzol	Fluka, (Neu-Ulm)
1,2-Epoxy-3-(4-nitrophenoxy)propan	Sigma, (Deisenhofen)
Fluorodifen	Riedel-de Haën, (Seelze)
1-Iod-2,4-dinitrobenzol	Sigma, (Deisenhofen)
DL-Isocitronensäure	Sigma, (Deisenhofen)
Laurinsäure	Sigma, (Deisenhofen)
4-Nitrobenzoylchlorid	Kodak, (New York, U.S.A.)
Palmitinsäure	Sigma, (Deisenhofen)
Pentachlorphenol	Fluka, (Neu-Ulm)
Stearinsäure	Sigma, (Deisenhofen)
2,3,4-Trichlorphenol	Riedel-de Haën, (Seelze)
2,4,5-Trichlorphenol	Riedel-de Haën, (Seelze)
trans-Zimtsäure	Sigma, (Deisenhofen)

1.3.3 Induktoren/Inhibitoren

1-Aminobenzotriazol	Sigma, (Deisenhofen)
Clofibrate	Serva, (Heidelberg)
3-Methylcholanthren	Sigma, (Deisenhofen)
β-Naphthoflavin	Sigma, (Deisenhofen)
Phenobarbital	Sigma, (Deisenhofen)

1.3.4 Standards

Albumin aus Rinderserum, Fraktion V	Merck, (Darmstadt)
L-Cystein	Sigma, (Deisenhofen)
γ-Glu-Glu	Sigma, (Deisenhofen)
S-(4-Nitrobenzyl)glutathion	Sigma, (Deisenhofen)

1.3.5 Sonstige Chemikalien

Amberlite XAD-4	Serva, (Heidelberg)
Bathophenanthrolindisulfonsäure	Sigma, (Deisenhofen)
Benzo(a)pyren	Sigma, (Deisenhofen)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagenz	Bio-Rad, (München)
3-Chlorbiphenyl	Lancaster, (Morecambe, England)
Dieselloil	Aral, (München)
2,4-Dinitro-1-fluorbenzol	Sigma, (Deisenhofen)
2,5-Diphenyloxazol	Zinsser, (Frankfurt)
5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)	Sigma, (Deisenhofen)
Dithioerythritol	Sigma, (Deisenhofen)
Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz	Merck, (Darmstadt)
D-Glucose-6-phosphat	Boehringer, (Mannheim)
D-Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Boehringer, (Mannheim)
Glutathion oxidiert	Sigma, (Deisenhofen)
Glutathion reduziert	Sigma, (Deisenhofen)
Hydroluma Szintillationscocktail	J.T. Baker, (Groß-Gerau)
Iodessigsäure	Sigma, (Deisenhofen)
Kohlenmonoxid	Messer Geisheim, (München)
3-Methylphenol	Sigma, (Deisenhofen)
NAD	Boehringer, (Mannheim)
NADH	Boehringer, (Mannheim)
NADP	Boehringer, (Mannheim)
NADPH	Boehringer, (Mannheim)
4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid	Sigma, (Deisenhofen)
Perchlorsäure	Aldrich, (Deisenhofen)
Phenanthren	Sigma, (Deisenhofen)
Phenylmethansulfonsäurefluorid	Sigma, (Deisenhofen)
Phthalsäure-bis-(2-ethylhexyl)ester	Riedel-de Haën, (Seelze)
D(-)-Salicin	Fluka, (Neu-Ulm)
Trichloressigsäure	Sigma, (Deisenhofen)
Tris(hydroxymethyl)aminoethan	Sigma, (Deisenhofen)

Die übrigen verwendeten Laborchemikalien und Lösungsmittel waren von p.a.-Qualität, die HPLC-Laufmittel hatten HPLC-grade-Qualität.

1.4 Puffersysteme

Puffer 1	100 mM Natriumphosphat, pH 6,5
Puffer 2	50 mM Natriumphosphat, pH 7,0
Puffer 3	20 mM Tris/HCl, pH 7,0
Puffer 4	100 mM Kaliumphosphat, pH 6,5
Puffer 5	100 mM Kaliumphosphat, pH 7,5
Puffer 6	100 mM Triethanolamin/HCl, pH 7,6
Puffer 7	100 mM Imidazol/HCl, pH 8,0
Puffer 8	200 mM Tris/HCl, 2 mM MgCl ₂ , pH 7,5

1.5 Materialien für die Chromatographie

1.5.1 Dünnschichtchromatographie

Kieselgel 60 F 254 Glasfertigplatten
20 x 20 cm
Schichtdicke analytisch 0,25 mm

Merck, (Darmstadt)

1.5.2 Säulenchromatographie

PD-10 (Sephadex-G25M) Fertigsäulen
3-Aminopropyl Spherisorb 5 μ , 4,6 x 200 mm,
LiChroCART RP-18, 5 μ , 10 x 250 mm
DB-5 fused Silica ID, 0,25 mm x 30 m

Pharmacia, (Freiburg)
Sykam, (Gilching)
Merck, (Darmstadt)
Finigan, (Bremen)

1.6 Pflanzenmaterial

Die hier verwendeten Pflanzenspezies (Tab. 5, Seite 25, Abb. 13, Seite 26) wurden vornehmlich in der Umgebung von Murnau und Garmisch-Partenkirchen (Abb. 12, Bayern) gesammelt, oder wurden vom Botanischen Garten München zur Verfügung gestellt. Die Pflanzen wurden bis zur Art mit den Bestimmungsschlüsseln Rothmaler (1988) und Kremer & Muhle (1991) charakterisiert.

Die marinen Makroalgen wurden mit Genehmigung der Biologischen Anstalt Helgoland (Prof. Dr. C. Buchholz) im östlichen Felswatt der Nordseeinsel Helgoland (Abb. 12) und an den Küsten von Neuuharlingersiel, Norddeich und der Insel Spiekeroog (Ostfriesland) im Sommer 1993 und 1994 gesammelt. Die Bestimmung der Algenarten erfolgte unter Zuhilfenahme der Bestimmungsschlüssel von Grams (1974), Kormann & Sahling (1993) und van den Hoek *et al.* (1993) und wurde durch Herrn Dr. Sahling (Biologische Anstalt Helgoland) bestätigt.

Bei den arktischen und antarktischen Algenarten handelt es sich um im Labor unter polaren Bedingungen bezüglich Temperatur, Licht und Nährstoffbedingungen (siehe 1.6.3., Seite 28) aufgezogene und kultivierte Makroalgen. Diese Algen wurden von Herrn Dr. C. Wiencke (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven) zur Verfügung gestellt.

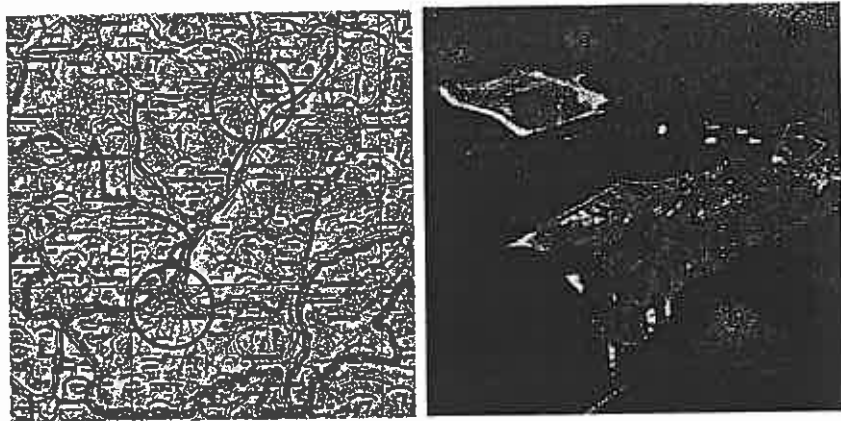


Abb. 12 Umgebungskarte Murnau/Garmisch-Partenkirchen und Umriss der Nordseeinsel Helgoland. Die Fund- und Sammelstellen sind jeweils durch einen Kreis gekennzeichnet.

Tab. 5 Übersicht der untersuchten Pflanzenspezies und ihre Einordnung in das System der Pflanzen unter Zuhilfenahme der Systematik von Weberling & Schwantes (1987). Die Nr. 1-4 wurde für die untersuchten Zellkultursysteme vergeben: 1. *Glycine max* L. Merr. cv. Mandarin, 2. *Triticum aestivum* L. cv. Heines Koga II, 3. *Zea mays* L. cv. Black Mexican Sweet und 4. *Picea abies* L. Excelsa RJ80

Abteilung	Klasse	Art	Fundort	Nr	
Spermatophyta	Dicotyledonae	<i>Rosa canina</i> L.	München	5	
		<i>Helianthus giganteus</i> L.	Botanischer Garten	6	
		<i>Salicornia europaea</i> L.	Neuharlingersief	7	
		<i>Lemna minor</i> L.	Botanischer Garten	8	
	Ginkgoatae	<i>Ginkgo biloba</i> L.	München	9	
	Anacardiaceae	<i>Rhus typhina</i> L.	Murnau	10	
	Coniferae	<i>Sequoiadendron giganteum</i> Buchh.	Murnau	11	
	Cycadatae	<i>Cycas revoluta</i>	Botanischer Garten	12	
	Pteridophyta	Filicatae	<i>Athyrium filix-femina</i> (L.) Roth.	GAP	13
			<i>Blechnum spicant</i> (L.) Roth.	GAP	14
<i>Azolla filiculoides</i> Lamk.			Botanischer Garten	15	
<i>Selaginella lepidophylla</i>			Botanischer Garten	16	
Psilophytatae		<i>Psilotum nudum</i>	Botanischer Garten	17	
Lycopodiatae		<i>Lycopodium annotinum</i> L.	Murnau	18	
Articulatae		<i>Equisetum hyemale</i> L.	Wiblingen	19	
		<i>Equisetum arvense</i> L.	Murnau	20	
Bryophyta		Musci	<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	Murnau	21
			<i>Equisetum giganteum</i> L.	Botanischer Garten	22
	<i>Plagomnium undulatum</i> (Hedw.) B.S.G.		Murnau	23	
	<i>Polytrichum formosum</i> Hedw.		Murnau	24	
	Hepaticae	<i>Sphagnum capillifolium</i> (Ehrh.) Hedw.	GAP	25	
		<i>Fontinalis antipyretica</i> Hedw.	Iffeldorf	26	
		<i>Marchantia polymorpha</i> L.	GAP	27	
		<i>Conocephalum conicum</i> (L.) Lindb.	GAP	28	
	Mycobionta	Basidiomycetes	<i>Sarcodon imbricatum</i>	GAP	29
			<i>Lactarius deterrimus</i>	GAP	30
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burdsall			GSF München	31	
<i>Alectoria samentosa</i> (Ach.) Ach.			Umeå Schweden	32	
Lichenes		<i>Peltigera aphotosa</i> (L.) Willd.	GAP	33	
		<i>Zygnema</i> sp.	Murnau	34	
Chlorophyta		Chlorophyceae	<i>Chlorella fusca</i>	Laborkultur	35
			<i>Chara corallina</i>	Botanischer Garten	36
			<i>Caulerpa mexicana</i> Harv.	Laborkultur	37
			<i>Ulva lactuca</i> L.	Helgoland	38
	<i>Enteromorpha compressa</i> (L.) Grev.		Helgoland	39	
	<i>Enteromorpha bulbosa</i> (L.) Grev.		Laborkultur	40	
	<i>Cladophora rupestris</i> (L.) Kütz.		Helgoland	41	
	<i>Halimeda opuntia</i> (L.) Lamour.		Laborkultur	42	
	<i>Acrosiphonia sonderi</i> (Kütz.) Kottm.		Laborkultur	43	
	<i>Lambia antarctica</i> (Skottsb.) Delepine		Laborkultur	44	
	<i>Monostroma arcticum</i> Wütz.		Laborkultur	45	
	<i>Ascophyllum nodosum</i> (L.) Lelel		Spiekeroog	46	
	<i>Cystoseira baccata</i> (Gmel.) Silva		Norddeich	47	
	<i>Laminaria digitata</i> (Huds.) Lamouroux		Helgoland	48	
	<i>Laminaria hyperborea</i> (Gmel.) Fensholt		Helgoland	49	
	<i>Laminaria saccharina</i> (L.) Lamouroux		Laborkultur	50	
	<i>Halydrys siliquosa</i> (L.) Lyngb.		Helgoland	51	
	<i>Fucus vesiculosus</i> L.		Helgoland	52	
	<i>Fucus serratus</i> L.		Helgoland	53	
	<i>Fucus spiralis</i> L.		Helgoland	54	
Rhodophyta	Floridiophyceae	<i>Delesseria sanguinea</i> (Huds.) Lamour.	Helgoland	55	
		<i>Chondrus crispus</i> Stackh.	Helgoland	56	
		<i>Plocamium cartilagineum</i> (L.) Dixon	Helgoland	57	
		<i>Porphyra umbilicalis</i> (L.) J. Ag.	Helgoland	58	
		<i>Cystoclonium purpureum</i> (Huds.) Bañ.	Helgoland	59	
		<i>Iridaea cordata</i> Kütz.	Laborkultur	60	
		<i>Palmaria decipiens</i> (A. & E.S. Gepp) Kylin	Laborkultur	61	
		<i>Pantoneura plocamiioides</i> (J. Ag.) Kyt.	Laborkultur	62	
		<i>Polysiphonia urceolata</i> (Lightf. ex Dillw.)	Laborkultur	63	

*Ginkgo biloba**Lycopodium annotinum**Marchantia polymorpha**Ulva lactuca**Enteromorpha compressa**Fucus vesiculosus**Laminaria hyperborea**Plocanium cartilagineum**Delesseria sanguinea*

Abb. 13 Einige ausgewählte Pflanzenspezies aus den Abteilungen Spermatophyta (*Ginkgo biloba*), Pteridophyta (*Lycopodium annotinum*), Bryophyta (*Marchantia polymorpha*), Chlorophyta (*Ulva lactuca*, *Enteromorpha compressa*), Chromophyta (*Laminaria hyperborea*, *Fucus vesiculosus*) und Rhodophyta (*Delesseria sanguinea*, *Plocanium cartilagineum*), die im Screeningteil der Arbeit auf verschiedene Entgiftungsenzymsysteme getestet wurden.

1.6.1 Zellsuspensionskulturen

Die als Modellsystem untersuchten Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* (L.) Merr. cv Mandarin, *Triticum aestivum* L. cv Heines Koga II und *Zea mays* L. cv Black Mexican Sweet wurden in Medien nach Murashige & Skoog (1962, MS-Medium, 2 mg/l Kinetin und 2 mg/l 2,4-D) oder in B5-Medium (1 mg/l bzw. 2 mg/l 2,4-D) nach Gamborg *et al.* (1968) kultiviert (Komoša *et al.*, 1994). Die Suspensionskultur von *Picea abies* L. Excelsa RJ80 wurde in einem leicht modifizierten Murashige & Skoog-Medium mit 1 mg/l Benzylaminopurin und 2 mg/l 2,4-D gehalten (Messner & Boll, 1994).

Die Suspensionskulturen von *Triticum aestivum* und *Zea mays* wurden jeweils aus Sproßgewebe gewonnen, die Kulturen von *Glycine max* aus Wurzelgewebe und die Kulturen von *Picea abies* aus Primärnadeln aseptisch kultivierter Keimlinge.

Sämtliche Kulturen wurden im Institut für Biochemische Pflanzenpathologie (GSF, München) angelegt und seit mehreren Jahren in Zeitintervallen von 7 bzw. 14 Tagen subkultiviert. Die Suspensionskulturen wurden in 200 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml Nährmedium auf einem Rundschtüttler mit 120 rpm bei 27 °C im Dunkeln kultiviert. Die Ausnahme bildet die Suspensionskultur von *Picea abies* mit 12 h Beleuchtung pro Tag.

Die Sterilität der verschiedenen Kulturen wurde durch Ausstrich auf Standard I und Czapek-Dox Agarplatten in regelmäßigen Abständen überprüft.

1.6.2 Kultur von *Phanerochaete chrysosporium*

Die weißige Kultur von *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24725) wurde in einem unlimitierten Medium nach Kirk *et al.* (1978), das nach Arjmand & Sandermann (1985) leicht modifiziert wurde, angezogen. Die Pilzkultur wurde auf einem Rundschtüttler (40 rpm) bei 39 °C im Dunkeln kultiviert.

Die Kulturen von *Phanerochaete chrysosporium* wurden von Herrn R.G. May (Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, GSF München) zur Verfügung gestellt.

1.6.3 Kontrollierte Algenanzucht

Die im Labor kultivierten Makroalgen wurden von Herrn Dr. C. Wiencke (Alfred-Wegener Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven) herangezogen. Wiencke (1990a/b) zeigte, daß sich diese Laborkultivare in Bezug auf das Wachstumsverhalten nicht von Freilandmakroalgen unterscheiden. Laturnus (1993) zeigte zudem, daß sich die Laboralgen auch in Bezug auf die Abgabe leichtflüchtiger Halogenkohlenwasserstoffe gleich wie Freilandmakroalgen verhalten. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß das Wachstum der Algen im Labor unter optimierten Bedingungen erfolgte. Wachstumseinschränkende Faktoren wie Lichtmangel, Schlechtwettertage oder Eisbedeckung sowie Nährstoffmangel treten nicht auf. Auch wachsen die Laboralgen aufgrund des beschränkten Platzes in den Kulturgefäßen nicht zur normalen Größe heran, sondern werden in der Regel nur wenige Zentimeter groß.

Für alle hier untersuchten Algen wurde als Kulturmedium original Nordseewasser verwendet. Dieses wurde durch das Forschungsschiff Victor Hensen (AWI) aus dem Hochseefeld 1 (Koordinaten Breite 6°50' Ost, Länge 55° Nord) durch Pumpen aufgenommen. Dieses Nordseegebiet gilt als unbelastet. Zusätzlich wurde das Wasser am Institut (AWI) über GF/C-Filter (Porengröße 0,2 µm) filtriert, um Verunreinigungen, Mikroalgen und Mikroorganismen zu entfernen.

Die hier untersuchten Makroalgen wurden in Simulationsräumen in 5 Liter Bechergläsern herangezogen. Die Beleuchtung erfolgte im angegebenen Hell-Dunkelrhythmus durch Tageslichtlampen (Osram L18W/11, 20 µE/cm⁻¹) im Abstand von 60 cm. Die Luftversorgung der Algenkultivare erfolgte über eine handelsübliche Aquariumpumpe mit Raumluft.

A) Chlorophyta

- * *Enteromorpha bulbosa* (King Georg Island): kultiviert bei 0 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase
- * *Acrosiphonia sonderi* (Spitzbergen): kultiviert bei 5 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase
- * *Lambia antarctica* (King Georg Island): kultiviert bei 0 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase
- * *Monostroma arcticum* (Spitzbergen): kultiviert bei 5 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase

B) Chromophyta

- * *Laminaria saccharina* (Spitzbergen): kultiviert bei 5 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase

C) Rhodophyta

- * *Iridaea cordata* (King Georg Island): kultiviert bei 0 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase
- * *Palmaria decipiens* (King Georg Island): kultiviert bei 0 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase
- * *Pantoneura polcamiioides* (King Georg Island): kultiviert bei 0 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase
- * *Polysiphonia urceolata* (King Georg Island): kultiviert bei 0 °C, 18 : 6 Hell-Dunkelphase

Die Algen wurden 2-3 Monate im Labor herangezogen, dann wurden sie aus dem Medium entnommen, kurz abgetrocknet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Transport der gefrorenen Algen von Bremerhaven nach München erfolgte in einer Trockeneispackung per Bahnexpress.

1.6.4 Freilandmakroalgen

Die hier untersuchten Freilandmakroalgen wurden hauptsächlich wie oben beschrieben im östlichen Felswatt der Nordseeinsel Helgoland bei Ebbe gesammelt. An Substrat anhaftende Algen wurden vorsichtig mit einem Messer von ihrem natürlichen Substrat abgelöst, um die Algen so wenig wie möglich zu beschädigen. Die für das Screening der detoxifizierenden Enzyme vorgesehenen Algenproben wurden vor Ort in Alutüten verpackt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Die Algen für die Metabolismus- und Induktionsversuche wurden im Labor mit sterilfiltriertem Meerwasser gewaschen, um anhaftende Verunreinigungen und auch Schnecken (z.B. *Littorina littorina* L.) zu entfernen, dann wurden sie zur Akklimatisierung an die Laborbedingungen in 5 Liter Bechergläsern in der Regel 24 h bei 20 °C und einer Hell-Dunkelphase von 18 : 6 (Tageslichtlampen Osram L18W/11, 20 $\mu\text{E}/\text{cm}^{-1}$) gehältert.

1.6.5 Systematik und Morphologie der wichtigsten Versuchsalgen

Die für einige Zusatzversuche verwendeten Makroalgen *Ulva lactuca*, *Fucus vesiculosus* und *Polysiphonia urceolata* werden im folgenden näher beschrieben, um nicht nur die Unterschiede in ihrer systematischen Einordnung, sondern auch in ihrer Morphologie deutlich zu machen.

A) *Ulva lactuca*

Systematik	Abteilung	Chlorophyta
	Klasse	Chlorophyceae
	Ordnung	Ulvaes
	Familie	Ulvaceae
	Art	<i>Ulva lactuca</i>

Morphologie

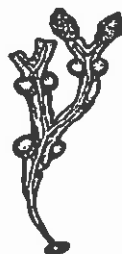
Die Größe des zweizellschichtigen, meist ovalen Thallus schwankt je nach Nährstoffbedingungen zwischen mehreren Zentimetern bis hin zu einem Meter. Die Thallusfläche ist stark wellig. Die Pflanzen sind meist mit einem deutlich sichtbaren Haftorgan an festen Substraten (z.B. Felsen) angewachsen. Im Wattenmeer sind aber häufig auch freischwimmende Pflanzen zu beobachten.

B) *Fucus vesiculosus*

Systematik	Abteilung	Chromophyta
	Klasse	Phaeophyceae
	Ordnung	Fucales
	Familie	Fucaceae
	Art	<i>Fucus vesiculosus</i>

Morphologie

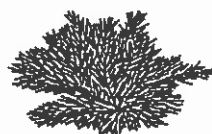
Der kräftige bis 1 m lange Thallus ist durch ein deutlich erkennbares Haftorgan an festen Substraten festgewachsen. Der flache Thallus besteht aus einem Stiel und einem bandförmigen Thalluslappen mit Mittelrippe und ist meist gabelförmig verzweigt. Auffällig sind die paarig am Thallussaum angeordneten Luftblasen.

C) *Polysiphonia urceolata*

Systematik	Abteilung	Rhodophyta
	Klasse	Florideophyceae
	Ordnung	Ceramiales
	Familie	Rhodomelaceae
	Art	<i>Polysiphonia urceolata</i>

Morphologie

Der zartfädige etwa 10-15 cm große Thallus von *Polysiphonia urceolata* ist rund und besteht aus Segmenten gleichhoher Zellen. Dabei ist eine Zentralzelle von vier Perizentralzellen umgeben. Eine Hauptachse wird nicht gebildet. Diese Alge bildet dichte Rasen und verankert sich mit Hilfe von Rhizoidzellen im Substrat.



2. Methoden

2.1 Messung der Radioaktivität

2.1.1 Radioaktivitätsmessung auf Dünnschichtplatten

Zur Detektion von ^{14}C -markierten Substanzen auf Dünnschichtplatten wurde ein Radio-dünnschichtanalysator verwendet. Die Auswertung der Chromatogramme durch Integration der Peakflächen erfolgte mittels Radio-Chromatographie System Software (RITA). Die prozentuale Radioaktivitätsverteilung wird dabei durch Integration der Substrat- und Produktflächen ermittelt.

2.1.2 Radioaktivitätsmessung in Flüssigkeiten

Die quantitative Erfassung der Radioaktivität in Flüssigkeiten wurde mit einem Flüssigszintillationszähler durchgeführt. Aliquots der zu messenden Proben wurden in Polyvials, im Fall von wäßrigen Proben mit 10 ml Hydroluma Szintillationscocktail und im Fall von organischen Proben mit 10 ml Toluol-Cocktail (5 g PPO auf 700 ml Toluol und 300 ml Methanol), versetzt und die Radioaktivität während 5 min Meßdauer erfaßt. Die Standardisierung der Radioaktivität erfolgte mit ^{14}C -Toluol als internem Standard. Hierzu wurde zu den Proben zur Bestimmung der Zählausbeute eine bekannte Menge ^{14}C -Toluol zugegeben und die Radioaktivität der Probe erneut gemessen. Die Zählausbeute (Z) errechnete sich nach Gleichung (1).

(Gleichung 1)

$$Z = \frac{\text{cpm (Probe + Standard)} - \text{cpm (Probe)}}{\text{dpm (Standard)}}$$

2.1.3 Radioaktivitätsmessung in festen Proben

Die festen Proben wurden zur Radioaktivitätsmessung in einem Oxidizer (Zinsser) verbrannt. Dazu wurden 5 mg in ein Verbrennungsgefäß eingewogen. Die Verbrennungszeit betrug 1 min bei 900 °C. Das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ wurde in 20 ml CarboSorb II / Perma Fluor V absorbiert und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Zur Bestimmung des Nullwertes wurden leere Gefäße verbrannt. Die Wiederfindungsrate wurde durch Verbrennung eines Standards ermittelt und betrug 90-95 % (n = 10 Verbrennungen).

2.2 Chromatographische Methoden

2.2.1 Dünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographische Analyse wurden Kieselgelplatten mit Fluoreszenzbeschichtung verwendet. Die Position der aufgetragenen Substanzen konnte zum einen unter UV-Licht (254 nm) durch Löschung der Fluoreszenz und zum anderen mittels eines Radiodünnschichtanalysators festgestellt werden.

Folgende Laufmittelsysteme (v/v) wurden zur Entwicklung der Platten verwendet:

LM 1	Ethylacetat / Eisessig / Wasser	(63 / 1 / 2)	(Sandermann <i>et al.</i> , 1991)
LM 2	Diethylether / Petroleumbenzin / Ameisensäure	(70 / 30 / 1)	(Salaün <i>et al.</i> , 1978)
LM 3	n-Hexan / Chloroform / Aceton / Ethanol	(8 / 8 / 4 / 1)	(Cabanne <i>et al.</i> , 1987)
LM 4	n-Butanol / Eisessig / Wasser	(12 / 3 / 5)	(Schröder <i>et al.</i> , 1990)

2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für die analytische HPLC wurde eine 3-Aminopropyl Spherisorb Säule (5 μ , 4,6 x 200 mm) eingesetzt. Die Proben wurden mit einem Gradienten (Siller-Cepeda *et al.*, 1991) aus Laufmittel A (80 % Methanol) und Laufmittel B (64 % Methanol, 0,5 M Natriumacetat, 2,6 M Essigsäure) eluiert. Das Injektionsvolumen betrug 100 μ l. Für die präparative HPLC wurde eine LiChroCART RP-18 Säule (5 μ , 10 x 250 mm) verwendet. Die Proben wurden mit einem Gradienten (Schröder *et al.*, 1990) aus Laufmittel A (Bidest. Wasser mit 1 % Essigsäure) und Laufmittel B (Acetonitril mit 1 % Essigsäure) eluiert. Das Injektionsvolumen betrug 50 μ l. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

2.2.3 Entsalzungssäule

Zur Entsalzung der gefällten Proteinextrakte wurden PD-10 Säulen (Sephadex G-25M) laut Herstellerangaben (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die Säulen (Bettvolumen 9,1 ml, Betthöhe 5 cm) wurden mit 20 ml Puffer 3 äquilibriert. Dann wurden 2,5 ml des zu entsalzenden Extraktes auf die Säule aufgetragen. Das Eluat des Probenauftrags wurde verworfen. Anschließend wurden die Proteine mit 3,5 ml Puffer 3 eluiert, wobei sich ein Verdünnungsfaktor von 1,4 ergab.

2.3 Methoden der Protein- und Aktivitätsbestimmung

2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung in den pflanzlichen Extrakten wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Bio-Rad Protein-Assay durchgeführt. Die Testdurchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden (Abb. 14) wurde Rinderserum Albumin Fraktion V verwendet. Anhand der Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt der Probe in [mg Protein / ml Extrakt] bestimmt.

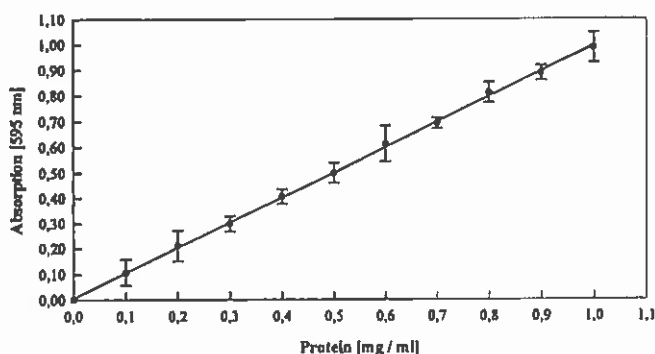


Abb. 14 Kalibriergerade zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) mit Rinderserum Albumin Fraktion V im Bereich von 0 - 1 mg/ml Protein. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 5$).

2.3.2 Gewinnung der löslichen und mikrosomalen Extrakte

Die verschiedenen Pflanzen wurden noch am Fundort von anhaftendem Substrat gesäubert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden sie bei -80°C gelagert. Die verwendeten Zellkulturen wurden über eine Porzellannutsche geerntet, mit Wasser gewaschen, kurz trockengesaugt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die folgenden Arbeiten wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Präparation (Abb. 16 Seite 35) erfolgte in Anlehnung an die Methoden von Diesperger & Sandermann (1979) für mikrosomale GST (mGST), von Mougin *et al.* (1991) für Cytochrom P-450 und von Schröder *et al.* (1992) für lösliche GST (cGST).

Für die Extraktion der löslichen und mikrosomalen Fraktionen wurden 30–40 g pflanzliches Frischmaterial unter flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser zu einem feinem Pulver zerrieben. Dieses Pulver wurde in einen zweiten vorgekühlten Mörser überführt und mit kaltem Puffer 1 (v/w, 2/1) versetzt. Dem Puffer 1 wurden 20 % Glycerol, 14 mM DTE, 20 mM Ascorbinsäure, 1 % unlösliches PVP, 1 mM EDTA und 1 mM PMSF zugegeben. Das unlösliche PVP wurde über Nacht in Puffer 1 vorgequollen. Diese Mischung wurde dann für 10 min auf Eis gerührt. Danach wurde der Extrakt (50–80 ml) zur Abtrennung der Zelltrümmer und Fragmente durch ein Nylonnetz (Miracloth, Maschengröße 50 μ) filtriert. Der jetzt trübe Rohextrakt wurde für 20 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Um phenolische Bestandteile aus dem so erhaltenen Extrakt I zu entfernen, wurde ihm 10 % (w/v) mit dest. Wasser gewaschenes Amberlite XAD-4 zugesetzt und 3 min leicht gerührt. Das Amberlite wurde dann in einem zweiten Filtrationsschritt über ein Nylonnetz aus dem Extrakt entfernt. Dann wurde der pH-Wert des so erhaltenen Extrakts II mit 1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Darauf folgte eine Ultrazentrifugation für 60 min bei 100.000 x g. Der Überstand wird als löslicher Extrakt bezeichnet, das Pellet stellt die Mikrosomenfraktion dar. Die nach der ersten Ultrazentrifugation erhaltene Membranfraktion wurde zweimal mit Puffer 2, dem 0,7 mM DTE und 10 % Glycerol zugesetzt waren, in einem Glaspotter vorsichtig homogenisiert und danach nochmals 60 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Damit ließ sich eine cytosolische Verunreinigung der Mikrosomen minimieren. Dann wurden die Mikrosomen (2–4 ml) in Puffer 2 resuspendiert, indem sie vorsichtig in einem Glaspotter homogenisiert wurden.

Der nach der Ultrazentrifugation gewonnene lösliche Extrakt wurde zur Aufkonzentrierung einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung im Bereich von 0–35 % und 35–80 % Ammoniumsulfatsättigung unterzogen. Die hierfür benötigte Ammoniumsulfatmenge wurde mit Hilfe der Abb. 15, Seite 35 (Jaenicke, 1984) bestimmt. Das Ammoniumsulfat wurde vor der Zugabe zu einem feinen Pulver zermörser und dann unter schnellem Rühren innerhalb 30 min bis zur jeweiligen Konzentration dem Extrakt zugegeben. Dabei wurde der pH-Wert ständig kontrolliert und durch Zugabe von 1 N NaOH bei pH 7,0 gehalten. Zur Abtrennung der ausgefällten Proteine wurde der Extrakt 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das Pellet der ersten Fällung von 0–35% Ammoniumsulfat wurde verworfen. Das Pellet der zweiten Fällung von 35–80 % wurde in Puffer 3 (1,5 ml) resuspendiert, dem 5 mM DTE zugesetzt worden waren. Zur Entfernung des Ammoniumsulfats aus dem Extrakt wurde dieser über PD-10 Fertigsäulen entsalzt. Die Elution erfolgte mit Puffer 3.

Anfangskonzentration Ammoniumsulfat [% Sättigung]	Endkonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)																		
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100		
0	56	114	144	179	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767		
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	496		
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619		
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583		
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546		
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522		
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506		
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469		
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431		
50										33	66	101	137	176	214	302	392		
55											33	67	103	141	179	264	353		
60												34	69	105	143	227	314		
65													34	70	107	190	275		
70														35	72	153	223		
75															36	115	198		
80																77	157		
90																	79		

Abb. 15 Diagramm zur Ermittlung der für die einzelnen Fällungsschritte benötigten Ammoniumsulfatmengen nach Jaenicke (1984) in g Ammoniumsulfat / l Extrakt.

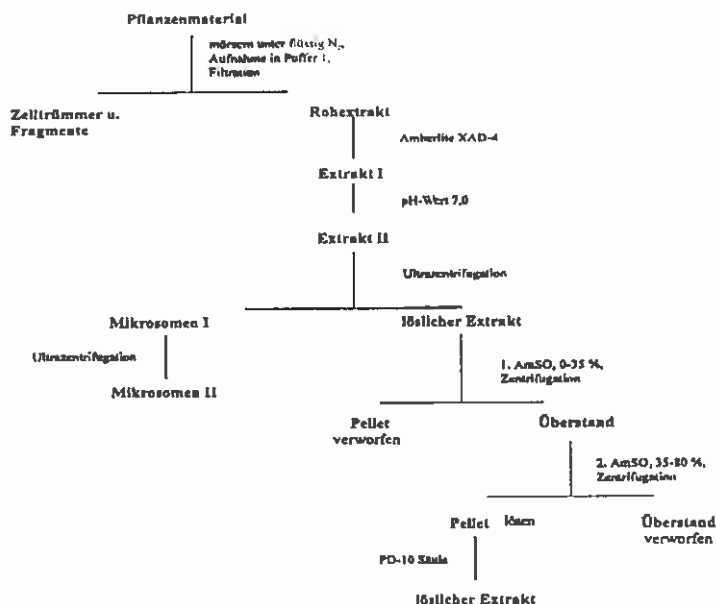


Abb. 16 Schema der Extraktion von mikrosomalen und löslichen Enzymen aus Pflanzenmaterial in Anlehnung an die Methoden von Diesperger & Sandermann (1979), Mougín *et al.* (1991) und Schröder *et al.* (1990).

2.3.3 Enzymatische Aktivitätsmessungen

2.3.3.1 Berechnung von Enzymaktivitäten

2.3.3.1.1 Photometrisch bestimmte Aktivitäten

Die Messung der katalytischen Aktivität z eines Enzyms erfolgt durch die Bestimmung der Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion, d.h. durch den Substratumsatz pro Zeiteinheit in $\mu\text{mol/s}$ (Katal = kat) (Gleichung 2).

(Gleichung 2)

$$z = \frac{(\Delta E * V)}{(\epsilon * d * \Delta t)}$$

ΔE = Extinktionsänderung pro min

V = Testvolumen [μl]

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{l}/\text{mmol cm}$]

d = Schichtdicke Kuvette [mm]

Δt = Meßzeitintervall [s]

Als Einheit der Enzymaktivität ist diejenige Enzymmenge definiert, die die Bildung von 1 μmol Produkt bei 25 °C unter den jeweils vorgegebenen Testbedingungen katalysiert (Bergmeyer & Gawehn, 1977). Die in einem bestimmten Volumen enthaltene katalytische Aktivität b kann mit Gleichung (3) berechnet werden.

(Gleichung 3)

$$b = \frac{(\Delta E * V)}{(\epsilon * d * \Delta t * v)}$$

Definitionen aus Gleichung 2

v = Volumen Enzymextrakt im Test [μl]

Aus Gleichung (4) kann unter Zugrundelegung der Gleichung (3) die auf eine Proteinmasse bezogene katalytische Aktivität berechnet werden. Diese Angabe der Enzymaktivität z wurde im folgenden in dieser Arbeit verwendet und besitzt die Dimension [$\mu\text{kat}/\text{mg Protein}$].

(Gleichung 4)

$$z = \frac{(\Delta E * V)}{(\epsilon * d * \Delta t * v * c)}$$

Definitionen aus Gleichung 2 und 3

c = Proteinmenge im Test [μg]

2.3.3.1.2 Mit ^{14}C -markierten Substraten bestimmte Enzymaktivitäten

Radioaktiv markierte Substrate können ebenfalls zur Bestimmung einer enzymatischen Aktivität herangezogen werden. Dabei wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit ^{14}C -markierten Substanzen gearbeitet. Die Halbwertszeit beträgt für dieses Nuklid 5760 Jahre.

Die Meßgenauigkeit in Tests mit radioaktiv markierten Substanzen ist prinzipiell durch zwei Fehlerquellen limitiert, so zum einen der Pipettierfehler und zum anderen die Messung der Radioaktivität.

Die Detektion der enzymatisch entstandenen Metabolite wurde in der Regel mit Hilfe von TLC und Radiodünnschichtchromatographie durchgeführt. Dabei wurde durch Integration der erhaltenen Produktpeaks und des Substratpeaks ein prozentualer Umsatz ermittelt. Mit Hilfe der Gleichung (5) wurde von diesem prozentualen Umsatz auf die Enzymaktivität umgerechnet:

(Gleichung 5)

$$z = \frac{c \text{ } ^{14}\text{C}\text{-Produkt}}{t * c \text{ Protein} * 60}$$

c = Konzentration ^{14}C Produkt [$\mu\text{mol/ml}$]
 t = Zeit [min]
 c = Konzentration Protein [mg/ml]
 z = Enzymaktivität [$\mu\text{kat/mg Protein}$]

Die Konzentration des ^{14}C -Produkt errechnet sich aus dem prozentualen Anteil der Radioaktivität des Produktes an der Ausgangsradioaktivität des Substrates, dessen anfängliche Konzentration bekannt ist und zur Berechnung 100 % gleichgesetzt wird.

2.3.3.2 Der Blindwert

Es wurden in dieser Arbeit sowohl bei den photometrischen Bestimmungen als auch bei den Enzymtests mit ^{14}C -markierten Substraten mindestens einer der drei hier beschriebenen Blindwertansätze durchgeführt:

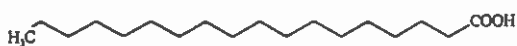
- 1) Testansatz: Wasser statt Enzym
- 2) Testansatz: ohne Cosubstrate
- 3) Testansatz: mit abgekochtem Protein (10 min, 100 °C)

Durch diese drei Ansätze lassen sich zum einen nichtenzymatische Konjugationsraten von Substrat und Cosubstrat (Ansatz 1 und 3) bestimmen, wie sie beispielsweise für viele GST-Substrate beschrieben wurden (Habig *et al.*, 1974, Jablonkai & Hatzios, 1993). Die oben beschriebenen Kontrollen sind alle Negativkontrollen der Enzymtests, eine Positivkontrolle mit dem Markerenzym Glucose-6-phosphat Dehydrogenase wurde nur im Rahmen der Induktionsversuche durchgeführt.

2.3.3.3 Cytochrom P-450 Monooxygenasen

2.3.3.3.1 Enzymatische Aktivitätsbestimmungen

Die Aktivität von P-450 Monooxygenasen wurde durch die Messung verschiedener Fettsäurehydroxylasen mit ^{14}C -Laurinsäure, ^{14}C -Stearinsäure und ^{14}C -Palmitinsäure (Abb. 17) bestimmt. Neben diesen natürlichen Substraten wurden auch xenobiotische Substrate wie ^{14}C -Benzo(a)pyren, ^{14}C -3-Chlorbiphenyl, ^{14}C -4-Chlorbiphenyl, ^{14}C -3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl und ^{14}C -2,4,5,2',4',5'-Hexachlorbiphenyl (Abb. 17) in den Mikrosomenfraktionen getestet.



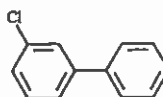
Stearinsäure, C18



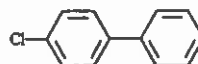
Palmitinsäure, C16



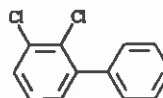
Laurinsäure, C12



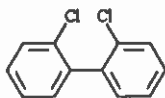
3-Chlorbiphenyl



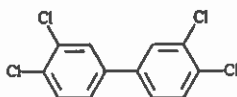
4-Chlorbiphenyl



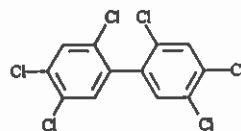
2,3-Dichlorbiphenyl



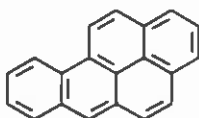
2,2'-Dichlorbiphenyl



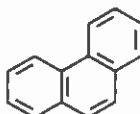
3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl



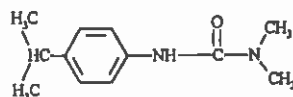
2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl



Benzo(a)pyren



Phenanthren



Isoproturon

Abb. 17 Substrate zur Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P-450 Enzymen in der pflanzlichen Mikrosomenfraktion. Sämtliche Substrate waren ^{14}C -markiert.

Die Messung der Fettsäuresubstrate wurden in Anlehnung an die Methode von Salaün *et al.* (1981 und 1988) durchgeführt, die Messung mit Benzo(a)pyren erfolgte nach v.d. Trenck & Sandermann (1980) und Fries & Lee (1984), die Aktivitätsbestimmung mit den Biphenylen nach Borlakoglu & John (1989) und die mit dem Herbizid Isoproturon nach Mougín *et al.* (1992).

Für die einzelnen Enzymtests (Tab. 6) wurden die aufgeführten Lösungen in ein Reagenzglas pipettiert. Gestartet wurden die Reaktionen nach 2 min Vorinkubation der Mikrosomen bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Substrat in Methanol durch Zugabe des regenerierenden Systems. Dieses System enthielt 6,7 mM Glucose-6-Phosphat, 0,4 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 2 mM NADPH. Dann erfolgte eine weitere Inkubation in offenen Reagenzgläsern für 60 min bei 25 °C im Schüttelwasserbad. Die Enzymtests wurden mit 10 µl 20 % TCA terminiert, dann mit Chloroform / n-Hexan (1:1, v/v) versetzt und für 20 min gut durchmischt. Danach wurden Aliquots der unteren organischen Phase auf Kieselgelplatten aufgetragen und die Platten im Laufmittel LM 2 bzw. LM 3 entwickelt. Im Fall von Benzo(a)pyren und Phenanthren wurde die Kieselgelplatte im Dunkeln entwickelt, um einen möglichen Photoabbau (Thomas & Furlong, 1976) zu vermeiden. Die Identifizierung der Metabolite erfolgte mittels GC/MS.

Tab. 6 Testansätze für die Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P-450 in der mikrosomalen Fraktion unterschiedlicher pflanzlicher Extrakte nach Methoden von Salaün *et al.* (1981 und 1988), v.d. Trenck & Sandermann (1980), Fries & Lee (1984), Borlakoglu & John (1989) und Mougín *et al.* (1992).

	Laurinsäure	BP	3-CBP	2,3-DCBP	IPU	3,3',4,4'	2,4,5,
	Stearinsäure	Phenanthren	4-CBP	2,2'-DCBP		-	2',4',5'-
Stammlösung	Palmitinsäure					TCB	HCB
in Ethanol	2,8 mM	0,25 mM	1,2 mM	1,9 mM	5,0 mM	1,0 mM	1,5 mM
Puffer	Puffer 2	Puffer 2	Puffer 2	Puffer 2	Puffer 2	Puffer 2	Puffer 2
Volumen	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Substrat	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Mikrosomen	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Reg. System	20 µl	40 µl	20 µl	20 µl	40 µl	20 µl	20 µl
Gesamt-volumen	230 µl	250 µl	230 µl	230 µl	250 µl	230 µl	230 µl
20% TCA	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Chloroform/n-Hexan	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Laufmittel	LM 2	LM 2	LM 2	LM 2	LM 3	LM 2	LM 2

2.3.3.3.2 Metabolitidentifizierung mittels GC/MS

In der Massenspektrometrie wird die zu untersuchende Substanz im gasförmigen Zustand im Hochvakuum durch Elektronenstoß ionisiert und in Molekülbruchstücke zerlegt (fragmentiert). Die Probe wird durch Beschuß mit Elektronen ionisiert, wodurch man ein positives Molekül-Ion (Radikal-Kation) erhält. Die geladenen Partikel werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und in einem angelegten Magnetfeld entsprechend ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt. Das Massenspektrum wird als Strichspektrum wiedergegeben, wobei die Intensität des stärksten Signals (base peak) willkürlich gleich 100 gesetzt wird.

Die Proben waren entweder in Ethanol (Ausgangssubstanzen) oder in Chloroform (Metaboliten) gelöst. Es wurden Volumina von jeweils 3 µl entnommen und in den GC-Injektor eingespritzt. Die Untersuchung wurde unter den folgenden GC-Bedingungen nach einer Methode von Borlakoglu & John (1989) durchgeführt (Tab. 7). Bei wurde folgende Gerätekombination verwendet:

Tab. 7 GC-Bedingungen zur Identifizierung der Ausgangssubstanzen und hydroxylierten Metabolite der chlorierten Biphenyle. GC Hewlett Packard Series II, DB-5 fused Silica ID, 0,25 mm x 30 m

Bedingungen
Temperaturprogramm: 40 °C 2 min, 40 °C → 100 °C mit 20 °C / min, 100 °C 1 min, 100 °C → 270 °C, 270 °C 10 min
Carriergas: Helium 1ml / min
Einlaßdruck: 0,5 bar

Die Identität der auftretenden GC-Peaks wurde durch Analyse mittels GC-MS überprüft. Dazu wurde folgendes System verwendet (Tab. 8):

Tab. 8 GC-MS-Bedingungen zur Identifizierung der chlorierten Biphenyle und ihrer enzymatisch entstandenen hydroxylierten Metabolite. Gerät: Finnigan MAT SSG 7000.

Bedingungen
Carriergas: Helium
Einlaßdruck: 0,6 - 1,0 bar
Ionisierung: Electron Impact bei 70 eV, Ionenquelle bei 100 °C, Interface 270 °C
Scanning Range: 20 - 250 a.u.

2.3.3.3.3 Aufnahme von CO-Differenzspektren

Für die Quantifizierung des Cytochrom b_5 - und des Cytochrom P-450-Gehaltes in einer Pflanze ist eine spektrophotometrische Messung notwendig (Omura & Sato, 1964). Hierzu wurde die Mikrosomenfraktion in Puffer 2 (2 ml) suspendiert und vorsichtig mit einem Glaspotter homogenisiert. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

In allen Fällen wurden die Küvetten mit der matten Seite in den Strahlengang des Photometers gestellt, da dies die von der inhomogenen Mikrosomenfraktion erzeugte Streustrahlung ausschaltet. Durch die sehr regelmäßige Lichtstreuung wurde eine gleichmäßige Lichtausbeute erzielt (Shibata *et al.*, 1954).

Dann wurde die Mikrosomensuspension, die in der Regel eine Konzentration von 0,8-1,5 mg/ml Protein enthielt, auf zwei Quarzglasküvetten verteilt und am Photometer eine Basislinie im Bereich von 400-500 nm aufgenommen. Diese Basislinie wurde vom Photometer automatisch auf Null korrigiert. Dies ist notwendig, da eine Messung Mikrosomen gegen Puffer aufgrund der trüben Mikrosomensuspension nicht möglich ist. Die Mikrosomen in der Probenküvette wurden dann zur Reduktion mit einigen Körnern Natriumdithionit versetzt und gut durchgemischt. Dann wurde sofort das Differenzspektrum zwischen reduzierten und oxidierten Mikrosomen aufgenommen. Das Spektrum zeigte ein Maximum bei 430 nm. Dieses Maximum gibt den Gehalt an Cytochrom b_5 an. Beide Küvetteninhalte wurden nun vereinigt und mit weiterem Natriumdithionit reduziert. Anschließend wurden die Mikrosomen wieder gleichmäßig auf beide Küvetten verteilt und eine neue Basislinie von den nun reduzierten Mikrosomen aufgezeichnet. Die Probenküvette wurde dann für 30 s blasenweise mit Kohlenmonoxid begast und sofort ein Differenzspektrum zwischen reduzierten und reduzierten mit CO-begasten Mikrosomen aufgenommen. Hier zeigte das Spektrum zwei Maxima, bei 420 nm das Maximum des inaktiven Cytochrom P-450, welches bei der Präparation bzw. der Vorbereitung für die Differenzmessungen durch Denaturierung des Cytochrom P-450 entsteht, und bei 450 nm das des aktiven Cytochrom P-450.

Zur Berechnung der Konzentrationen wurde für Cytochrom b_5 ein molarer Extinktionskoeffizient von $185 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($A_{410-425\text{nm}}$) und für Cytochrom P-450 von $91 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($A_{450-490\text{nm}}$) (Omura & Sato, 1964) verwendet.

2.3.3.4 Glutathion S-Transferasen

Die Bestimmung der mikrosomalen und löslichen GST-Aktivität (mGST und cGST) mit dem Modellsubstrat 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) in den untersuchten Pflanzenextrakten wurde nach der Methode von Habig *et al.* (1974) durchgeführt.

Das Substrat CDNB wird im Verlauf der enzymkatalysierten Reaktion mit GSH konjugiert. Die lineare Zunahme des S-2,4-Dinitrobenzylglutathion-Konjugates kann im Spektrophotometer bei 340 nm gemessen werden. Die Meßdauer beträgt 5 min.

Zur Testdurchführung wurde von CDNB eine 30 mM Lösung in Ethanol, von GSH eine 90 mM Lösung in bidestilliertem Wasser angesetzt und in einem Eisbad gekühlt. Der verwendete Puffer 4 wurde in einem Wasserbad auf 25 °C vortemperiert. Der Testansatz (Tab. 9) wurde in eine Quarzglasküvette pipettiert und gut durchmischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet.

Zur Bestimmung der nichtenzymatischen Konjugationsrate wurde der gleiche Ansatz ohne Enzymlösung bzw. mit hitzedenaturiertem Enzym (10 min, 100 °C) angesetzt. Die Nettokonjugation (Meßwert - Blindwert) wurde durch einen integrierten Drucker aufgezeichnet.

Tab. 9 Pipettierschema für die photometrische Aktivitätsbestimmung der GST mit dem Substrat CDNB.

Testkomponente	Pipettiervolumen
Puffer 4	1080 µl
CDNB-Lösung	40 µl
GSH-Lösung	20 µl
Enzymextrakt	40 µl
Gesamtvolumen des Tests	1180 µl

Die Substratspezifität der unterschiedlichen pflanzlichen Extrakte wurde mit weiteren Modellsubstraten, nämlich 1-Iod-2,4-dinitrobenzol (IDNB), 2,4-Dichlor-1-nitrobenzol (DCNB), 4-Nitrobenzoylchlorid (pNBC), 1,2-Epoxy-3-(4-nitrophenoxy)propan (EPNP), getestet. Weiterhin wurde die GST-Aktivität mit dem endogenen Substrat Zimtsäure (Diesperger & Sandermann, 1979) sowie mit den beiden Herbiziden Atrazin und Fluorodifen als exogenen Umweltchemikalien bestimmt (Abb. 18, Seite 44).

Die photometrische Bestimmung der Konjugation von DCNB und pNBC wurde in Anlehnung an die Methoden von Booth *et al.* (1961) und Schröder *et al.* (1990) mit dem in Tab. 9 angegebenen allgemeinen Pipettierschema und den in Tab. 10 (Seite 45) angegebenen Konzentrationen durchgeführt. Wurde EPNP als Substrat verwendet, wurde die Messung nach Fjellstedt *et al.* (1973) vollzogen, wobei auch hier das GST-Pipettierschema und die in Tab. 10 angegebenen Konzentrationen zur Anwendung kamen. Die GST-Aktivitätsmessung mit trans-Zimtsäure als Substrat erfolgte in Anlehnung an Diesperger & Sandermann (1979), die mit Atrazin nach Jablonkai & Hatzios (1993) und die mit Fluorodifen nach Schröder *et al.* (1992) und ist auf Seite 45/46 näher beschrieben.

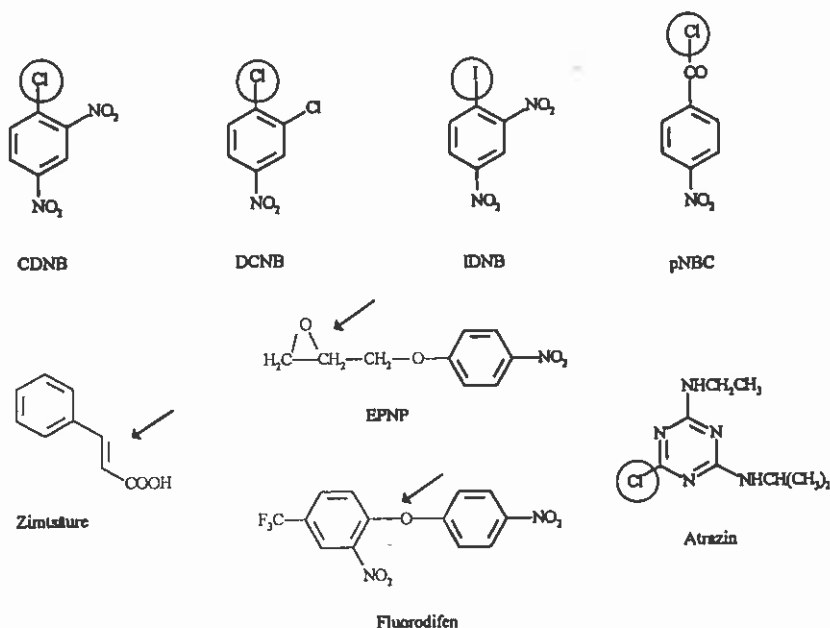


Abb. 18 Substrate zur Messung der löslichen und mikrosomalen Glutathion S-Transferase-Aktivität in den verschiedenen pflanzlichen Extrakten. Die bei der Konjugation abgespaltenen Gruppen sind eingekreist. Die Pfeile markieren die Additionstellen von GSH (nach Shimabukuro *et al.*, 1970, Fjellstedt *et al.*, 1973, Habig *et al.*, 1974, Diesperger & Sandermann, 1979, Lamoureux *et al.*, 1991).

Die Quantifizierung der Konjugation von GSH mit den Substraten IDNB, DCNB, und pNBC wurde in gleicher Weise wie der Standardtest mit CDNB durchgeführt. Alle Substrate wurden in Ethanol gelöst. Die Endkonzentration an Ethanol in den verschiedenen Tests lag bei unter

4 %. Die jeweilige Konzentration von Substrat und Cosubstrat im Enzymtest sowie die jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten zur Berechnung der Enzymaktivität sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10 Testansätze und molare Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung der Substratspezifität mit den Modellsubstraten CDNB, IDNB, DCNB, pNBC und EPNP nach Methoden von Habig *et al.* (1974), Schröder *et al.* (1990) und Fjellstedt *et al.* (1973).

	CDNB	DCNB	pNBC	EPNP	IDNB
	Puffer 4	Puffer 5	Puffer 4	Puffer 4	Puffer 5
Puffer	Puffer 4	Puffer 5	Puffer 4	Puffer 4	Puffer 5
pH-Wert	6,5	7,5	6,5	6,5	7,5
Puffer im Test [mM]	100	100	100	100	100
Substrat im Test [mM]	1	1	1	0,5	1
GSH im Test [mM]	1	1	1	10	1
Meßwellenlänge [nm]	340	345	310	360	354
ϵ [1/mmol cm]	9,6	8,5	1,9	0,5	9,2

Der jeweilige pH-Wert und die Temperatur wurden so gewählt, daß nach Habig *et al.* (1974) die nichtenzymatische, spontane Reaktion gegenüber der enzymatischen Konjugation minimiert ist.

Für das Modellsubstrat IDNB wurde ein neuer Photometertest entwickelt, der auf den Standardbedingungen der übrigen Modellsubstrate basiert. IDNB als Substrat für die GST wurde von Clark (1982) getestet, der im Gelsystem keinen enzymatischen Umsatz mit der GST aus Rattenleber und aus Hausfliegen fand.

Neben den Modellsubstraten zur Messung der mikrosomalen und löslichen GST-Aktivität wurden, wie oben erwähnt, auch das endogene Substrat Zimtsäure sowie zwei exogene Substrate in Form der Herbizide Atrazin und Fluorodifen eingesetzt.

Das allgemeine Pipettierschema und die Bedingungen für die mit diesen Substraten durchgeführten enzymatischen Bestimmungen sind in Tabelle 11 und 12 (Seite 46) aufgeführt. Die Bestimmungen mit den Substraten Zimtsäure, Atrazin und Fluorodifen erfolgten in Anlehnung an die oben angegebene Literatur.

Tab. 11 Allgemeines Pipettierschema für die GST-Messung mit den Substraten Zimtsäure und Atrazin. Für das Fluorodifen wurde das Pipettierschema von Tab. 12 verwendet.

Testkomponente	Pipettiervolumen
Puffer 2	120 µl
Substratlösung in Ethanol	10 µl
GSH-Lösung in Wasser	20 µl
Enzymlösung	50 µl
Gesamtvolumen	200 µl

Tab. 12 Endogene und exogene Substrate zur Messung der GST-Aktivität in den unterschiedlichen pflanzlichen Extrakten (nach Diesperger & Sandermann, 1979, Jablonkai & Hatzios, 1993, Schröder *et al.* 1992).

	¹⁴ C-Zimtsäure	¹⁴ C-Atrazin	Fluorodifen
Puffer	Puffer 2	Puffer 2	Puffer 5
pH - Wert	7,5	7,5	7,5
Substrat im Test [mM]	0,5	0,6	0,25
GSH im Test [mM]	1	1	1
ε [l/mmol cm]	—	—	3,1
20 % TCA	10 µl	10 µl	--
Dichlormethan	200 µl	200 µl	--
Detektion	TLC / LSC	TLC / LSC	Photometer 370 nm

2.3.3.5 Glucosyltransferasen

Die Messungen von O-, N- und S-Glucosyltransferasen erfolgten nach Methoden von Sandermann *et al.* (1991) und Wetzel & Sandermann (1994). Es wurde jeweils der in Tab. 13 (Seite 48) beschriebene Ansatz in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Bei allen durchgeführten Tests wurde die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Dann wurde der Ansatz kurz durchmischt und für 60 min bei 28 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Terminierung der Reaktion erfolgte bei den säurestabilen O-Glucosiden (Overend, 1972) durch Zugabe von 4 bzw. 5 µl 3 N H₃PO₄. Im Fall der säurelabilen N-Glucoside (Winkler & Sandermann, 1989) sowie der S-Glucoside wurde die Termination der Reaktion mit dem Extraktionsmittel durchgeführt. Zur Extraktion wurden alle Ansätze mit 200 bzw. 400 µl Ethylacetat versetzt und 30 min gleichmäßig geschüttelt. Dann wurden die Ansätze zur Phasentrennung 5 min bei 1500 x g zentrifugiert. Die organische Oberphase wurde abgenommen und Aliquots von 50 bzw. 100 µl auf Kieselgel-DC-Platten aufgetragen. Die Platten wurden dann in Laufmittel LM 5 ca. 1 h entwickelt. Danach wurden die Platten im Abzug getrocknet. Die Auswertung erfolgte mittels eines Radiodünnschichtscanners, mit dessen Software (RITA) die Substrat- und Produktflächen integriert wurden.

Bei ¹⁴C-markierten Substraten (Abb. 19) wurde UDP-Glucose, bei unmarkierten Substraten ¹⁴C-markierte UDP-Glucose als Glucose-Donor eingesetzt.

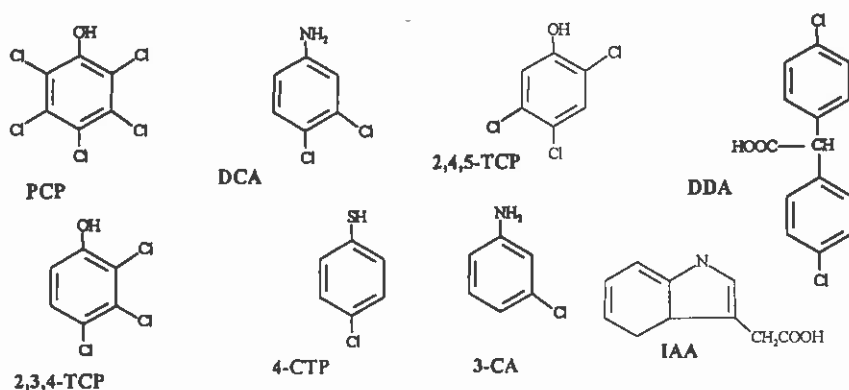


Abb. 19 Für die Aktivitätsbestimmung der O-, N- und S-Glucosyltransferasen verwendete Substrate.

	PCP	2,3,4-TCP	2,4,5-TCP	DDA	IAA	3,4-DCA	3-Chloranilin	p-Chlorthiophenol
Stammlösung in Ethanol	0,4 mM	0,9 mM	0,9 mM	0,4 mM	0,9 mM	0,2 mM	0,9 mM	0,9 mM
Substratvolumen	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Puffer	Puffer 8	Puffer 8	Puffer 8	Puffer 8	Puffer 8	Puffer 4	Puffer 4	Puffer 8
Puffervolumen	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Salicin	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Stammlösung 12mM								
4-NPG	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Stammlösung								
12mM								
UDP-Glc bzw. 14C-UDP-Glc	20 µl	40 µl	40 µl	20 µl	40 µl	20 µl	20 µl	40 µl
Stammlösung								
20mM								
Enzymlösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl	50 µl	100 µl
Gesamtvolumen	200 µl	220 µl	220 µl	200 µl	220 µl	200 µl	200 µl	220 µl
Abbruchlösung 3N H ₃ PO ₄	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	-	-	-
Ethylacetat	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	200 µl	200 µl	400 µl
GT-Art	O-GT	O-GT	O-GT	O-GT	O-GT	N-GT	N-GT	S-GT

Tab. 13 Ansätze zur enzymatischen Bestimmung der O-, N- und S-Glucosyltransferasen in den pflanzlichen Extrakten mit unterschiedlichen Substraten nach Sandermann *et al.* (1991), Wetzel & Sandermann (1994).

Um die entstandenen Glucoside vor der Spaltung durch endogene Glucosidasen zu schützen, wurden dem Testansatz Salicin und 4-NPG zugesetzt. Da aber diese Schutzsubstanzen inhibitorische Wirkung auf die zu messenden Enzyme haben können, wurde die Konzentration der beiden Stoffe im Vergleich zur Literatur (Sandermann *et al.* 1991, Wetzel & Sandermann, 1994) von 2,5 mM auf 1,2 mM je Schutzsubstanz gesenkt. Zusätzlich wurden bei Enzymtests mit wenig Protein diese Substanzen ganz weggelassen.

2.3.3.5.1 Identifizierung des S-GT-Metaboliten

Da keine Referenzsubstanz zu Verfügung stand, wurde der entstandene Metabolit mit einer käuflichen β -Glucosidase (Sigma, G 0395) behandelt. Hierfür wurde die Methode von Wetzel (1993) verwendet. 100 μ g β -Glucosidase wurden mit einem Aliquot des Metaboliten (50 μ l in Ethylacetat) und 100 μ l 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0) gelöst und 2 h bei 28 °C im Wasserbad inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym. Abgestoppt wurde mit 5 μ l Phosphorsäure, und anschließend wurde mit 200 μ l Ethylacetat extrahiert. Dann wurden die organischen Extrakte dünnschichtchromatographisch im Laufmittel LM 1 aufgetrennt.

2.3.3.6 Markerenzyme

Für die Induktionsstudien des P-450 Monooxygenase-Systems und der löslichen und mikrosomalen GST wurden in den verschiedenen Extrakten Markerenzyme aus dem Primärstoffwechsel gemessen.

2.3.3.6.1 Glutathionreduktase

Die Aktivitätsbestimmung der Glutathion-Reduktase (E.C. 1.6.4.2) erfolgte in Anlehnung an die Methode von Tanaka *et al.* (1994). Dabei wurden 550 µl Puffer 5, 250 µl 3 mM DTNB, 50 µl 2 mM NADPH und 50 µl 20 mM GSSG in eine Quarzglasküvette pipettiert und kurz durchmischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Proteinlösung gestartet. Die Zunahme der Reduktion von DTNB durch enzymatisch entstandenes GSH wurde bei 412 nm beobachtet.

2.3.3.6.2 Glucose-6-phosphat Dehydrogenase

Die Aktivität der G-6-PDH (E.C. 1.1.1.49) wurde in Anlehnung an Bergmeyer (1970) ermittelt. Hierfür wurden 870 µl 100 mM Puffer 6, 70 µl 6,7 mM MgCl₂, 30 µl 1,0 mM G-6-P-Na-Salz, 30 µl 0,38 mM NADP in eine Quarzglasküvette pipettiert, kurz durchmischt und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Proteinlösung gestartet. Die Enzymaktivität wurde bei 340 nm durch die Bildung von NADPH gemessen.

2.3.3.6.3 Isocitrat-Dehydrogenase

Die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.42) wurde in Anlehnung an Bergmeyer (1970) gemessen. Hierfür wurden 1500 µl 100 mM Puffer 7 und 500 µl 0,39 mM NADP mit 0,12 mM MnSO₄ in eine Quarzglasküvette pipettiert und kurz durchmischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl Proteinlösung gestartet. Die Zunahme an NADPH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt.

2.4 Bestimmung des GSH/GSSG Gehaltes

Für diese Bestimmung wurde die Methode von Farris & Reed (1987) sowie von Siller-Cepeda *et al.* (1991) verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Von diesem Pulver wurden 0,5 g in einen Glaspotter überführt und mit 2 ml 10 % Perchlorsäure, die 1 mM Bathophenanthrolindisulfonsäure enthielt, versetzt. Unter Eiskühlung wurde die Probe zur Homogenität gebracht. Das Homogenisat wurde 5 min bei 13.500 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 500 µl abgenommen und mit 50 µl einer Lösung aus 100 mM Iodessigsäure in 0,2 mM 3-Methylphenol versetzt. Durch Zugabe von 480 µl einer Lösung aus 2 M KOH und 2,4 M KHCO₃ wurde der pH-Wert auf 9-10 eingestellt. Daraufhin erfolgte während 15minütiger Inkubation im Dunkeln die Carboxymethylierungsreaktion. Nach Ablauf dieser Zeit wurde mit 1000 µl einer 1 % (v/v) ethanolischen 2,4-Dinitro-1-fluorbenzol-Lösung über Nacht bei 4 °C derivatisiert. Nach 24 h wurde die Probe 5 min bei 13.500 x g zentrifugiert und der Überstand mit Minisart RC4 Filtern (0,45 µm Porengröße) abfiltriert. Vom Filtrat wurden dann 100 µl für die HPLC-Analytik auf einer 3-Aminopropyl-Spherisorb-Säule (5 µm, 4,6 x 200 mm) verwendet. Die Detektion erfolgte über einen UV-Detektor bei 365 nm (Abb. 20, Seite 54). Die Elution der Thiole (Abb. 20, Seite 52) wurde mit einem Gradienten aus Laufmittel A (80 % Methanol, v/v) und Laufmittel B (64 % Methanol v/v, 0,5 M Natriumacetat und 2,6 M Essigsäure) durchgeführt. Der Gradient steigt nach 5 min von 20 % Laufmittel B innerhalb von 20 min auf 99 % Laufmittel B an, verbleibt 5 min bei 100 % Laufmittel B und fällt dann innerhalb von 5 min wieder auf 20 % Laufmittel B ab. Nach jedem Lauf wurde die Säule 30 min mit 20 % Laufmittel B gespült. Um die Vollständigkeit der Carboxymethylierung und der anschließenden Derivatisierung zu überprüfen, wurden den Proben 50 µl γ-Glu-Glu (0,5 M) als interner Standard zugegeben. Dieser Standard ist im natürlichen Thiolextrakt der Pflanzen nicht zu finden. Zur Quantifizierung der GSH- und GSSG-Konzentrationen in den Pflanzen wurde von GSH im Bereich von 5-1000 µM und für GSSG im Bereich von 5-200 µM eine Kalibriergerade (Abb. 21, Seite 52) aufgenommen. Zur Berechnung der Konzentration wurde das Verhältnis des GSH- bzw. GSSG-Peaks zum internen Standard γ-Glu-Glu-Peak gebildet und die jeweilige Konzentration pro g Frischgewicht berechnet.

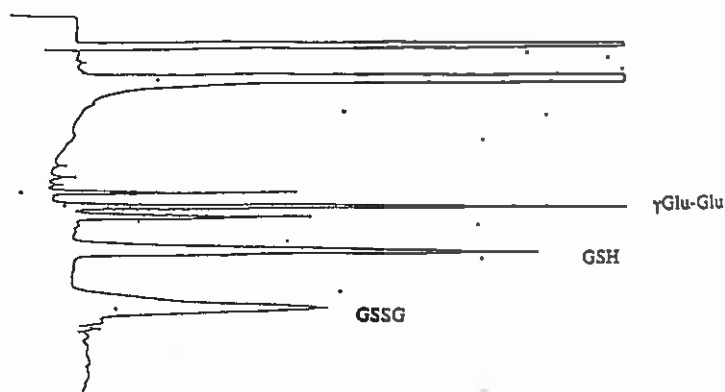


Abb. 20 Thiolstandard aus GSH, GSSG und γ -Glu-Glu für die Kalibrierung der GSH/GSSG-Bestimmung nach der Methode von Siller-Cepeda (1991) und Farris & Reed (1987). Die Thiole wurden bei 365 nm photometrisch detektiert.

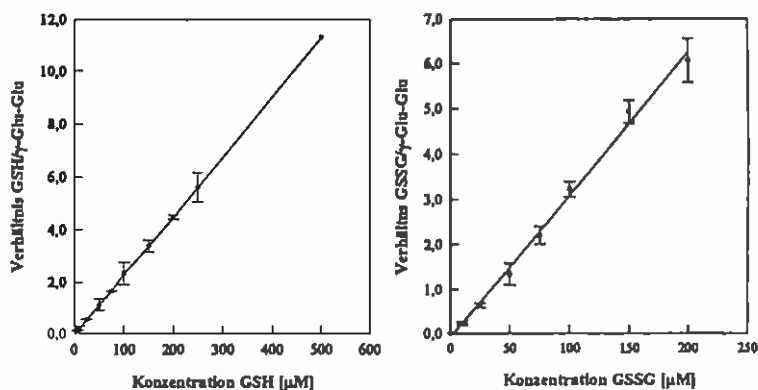


Abb. 21 Kalibriergeraden für die Quantifizierung von GSH und GSSG in Anlehnung an die Methoden von Siller-Cepeda (1991) und Farris & Reed (1987). Für die Kalibrierung wurde den Proben eine konstante Konzentration (12 mM) γ -Glu-Glu zugegeben. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

2.5 Chlorophyllbestimmung in marinen Algen

Die Bestimmung des Chlorophyll a/b- und des Gesamtchlorophyllgehaltes der Makroalgen erfolgte in Anlehnung an die von Inskeep & Bloom (1985) beschriebene Methode. Der Algenthallus wurde hierzu unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Dann wurde 1 g des Algenpulvers in ein verschraubbares Reagenzglas überführt, mit 2 ml eisgekühltem DMF überschichtet und gut durchmischt. Die Proben wurden dann sofort abgedunkelt und bei 4 °C gelagert. Nach 3 Tagen war das Algenpulver vollständig entfärbt. Die Proben wurden 5 min bei 13.500 x g zentrifugiert und die Oberphase abgenommen. Die Extrakte wurden am UV-Photometer bei 647 nm und 645 nm gegen reines DMF gemessen. Aus den erhaltenen Extinktionswerten wurden die Chlorophyllwerte [mg Chlorophyll/Liter DMF] nach folgenden Formeln berechnet:

a) Für die Chlorophyceae

$$\text{(Gleichung 6)} \quad \text{Chlorophyll a} = [12,7 * E_{664,5}] - [2,79 * E_{647}]$$

$$\text{(Gleichung 7)} \quad \text{Chlorophyll b} = [20,7 * E_{647}] - [4,62 * E_{664,5}]$$

$$\text{(Gleichung 8)} \quad \text{Gesamtchlorophyll} = [17,9 * E_{647}] - [8,08 * E_{664,5}]$$

b) Für die Phaeophyceae und Florideophyceae

Da die Braun- und Rotalgen kein Chlorophyll b enthalten, entfallen die Gleichungen (7) und (8). Zur Berücksichtigung der Chlorophyll b-Adsorption dient der Term $[2,79 * E_{647}]$, deshalb entfällt dieser hier.

$$\text{(Gleichung 9)} \quad \text{Chlorophyll a} = [12,7 * E_{664,5}]$$

Die ermittelten Werte [mg Chlorophyll / l DMF] aus den Gleichungen (6)–(9) werden in die Gleichung (10) eingesetzt und sowohl auf 1 g Algengewicht als auch auf die eingesetzte DMF-Menge umgerechnet.

$$\text{(Gleichung 10)} \quad C = E * v / m$$

C = Chlorophyllgehalt in mg Chlorophyll pro Gramm Algengewicht

E = berechnete Chlorophyllgehalte [mg Chlorophyll/Liter DMF] aus Gleichung (6) - (9)

v = eingesetzte Menge an DMF

m = eingesetzte Probenmenge

2.6 Aufnahme und Metabolisierung von ^{14}C -markierten Xenobiotika in

Algen

Die Aufnahme von ^{14}C -markierten Xenobiotika in marine Makroalgen wurde in Inkubationsversuchen untersucht. Als Inkubationsgefäße wurden 1 Liter-Erlenmeyerkolben verwendet. Durch die Verwendung von Glas wird ein nahezu ungehinderter Lichteinfall gewährleistet und so eine optimale Belichtung der Alge während des Versuches erzielt. Bei der Wahl des Mediums wurde darauf geachtet, daß dies weitgehend dem natürlichen Medium der Algen entspricht, um Störungen des Algenmetabolismus zu vermeiden. So wurde sowohl bei den Algen aus dem Helgoländer Felswatt als auch bei den im Labor kultivierten Algen Nordseewasser aus dem Hochseefeld 1 (Koordinaten Breite $6^{\circ}50'$ Ost, Länge 55° Nord, unbelastet) verwendet. Dieses Wasser wurde zusätzlich über GF/C-Filter (Porengröße $0.2\text{ }\mu\text{m}$) filtriert, um Verunreinigungen, Mikroalgen und Mikroorganismen zu entfernen.

Zur Akklimatisierung der Algen an die Laborbedingungen wurden diese vor dem Versuch 24 h in einem 5 Liter-Becherglas unter Sauerstoffzufuhr kultiviert. Die Algen wurden dann vor Versuchsbeginn vorsichtig mit einem Filterpapier abgetupft, von anhaftenden Verunreinigungen befreit und gewogen. Zur Inkubation wurden die Algen (10 g Frischgewicht) in 1 Liter-Erlenmeyerkolben mit 600 ml filtriertem MeerwassermEDIUM überführt. Die Beleuchtung erfolgte in Anlehnung an die natürlichen Lichtverhältnisse durch Tageslichtlampen (Osram L18W/11, $20\text{ }\mu\text{E}/\text{cm}^{-1}$) im Abstand von 60 cm (Laternus, 1993). Die Temperatur lag während der Versuche bei 20°C . Zur Belüftung wurden die Erlenmeyerkolben unverschlossen auf einem Rundschüttler (40 rpm) geschüttelt.

2.6.1 Aufnahmekinetik von ^{14}C -markierten Xenobiotika

Die Metabolismusstudien an marinen Makroalgen wurden in Anlehnung an die Prozedur nach Langebartels & Harms (1985) und Komoßa & Sandermann (1995) für Zellsuspensionskulturen durchgeführt (Abb. 22, Seite 56).

Es wurden für alle Metabolismusversuche jeweils 10 g Algenfrischgewicht pro Inkubations- bzw. Kontrollkolben eingesetzt.

Da Makroalgen von einer mehr oder weniger dicken Schleimschicht aus Mucopolysacchariden umgeben sind (Lüning, 1985), wurden diese nach der Inkubation mit 10 ml 70 % Ethanol abgewaschen und als getrennte Fraktion behandelt. Der weitere Aufschluß des Algenmaterials erfolgte durch Mörsern der Thalli unter flüssigem Stickstoff. Das feine Pulver wurde einer

zweimaligen Bligh-Dyer-Extraktion (40 ml, Dichlormethan / Methanol / Wasser 1 : 2 : 0,8) unterzogen. Dazu wurde das Pulver mit Bligh-Dyer-Lösung vermischt und gut 15 min geschüttelt. Dann erfolgte die Extraktion über Nacht bei 4 °C im Kühlraum. Am nächsten Tag wurde die Probe abfiltriert und die Phasentrennung des Bligh-Dyer-Extraktes im Schütteltrichter vorgenommen. Die organische Unterphase wurde so von der wäßrigen Oberphase getrennt und beide Phasen auf TLC in unterschiedlichen Laufmitteln analysiert. Der feste Rückstand wurde nochmals mit 20 ml Bligh-Dyer-Lösung extrahiert. Die jeweiligen organischen bzw. wäßrigen Phasen wurden vereinigt.

Um die gebundene Radioaktivität bzw. die nicht extrahierbaren Rückstände (NER) in der Probe zu ermitteln, wurden Aliquots (0,2 g Trockengewicht) lyophilisiert und in einem Oxidizer (Zinsser) verbrannt. Damit konnte eine Gesamtbilanz der jeweiligen Versuche erstellt werden.

2.6.1.1 Zeitkinetische Studie der Benzo(a)pyren-Aufnahme in *Fucus vesiculosus*

Die Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Xenobiotika wurde mit *Fucus vesiculosus* und ^{14}C -BP als Xenobiotikum durchgeführt.

Dazu wurden je Probezeitpunkt (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h) jeweils ein Kontrollkolben ohne Alge und ein Kolben mit 10 g Algenfrischgewicht angesetzt. In jedem Kolben befanden sich 600 ml sterilfiltriertes Meerwasser und 2.563.200 dpm ^{14}C -BP (Endkonzentration von 20 μM). Sämtliche Kolben wurden auf einem Rundschüttler (40 rpm) unter dem Abzug inkubiert. Zum jeweiligen Probezeitpunkt wurden die entsprechenden Kolben entfernt und die Algen nach der unter 2.6.1 beschriebenen Methode aufgeschlossen.

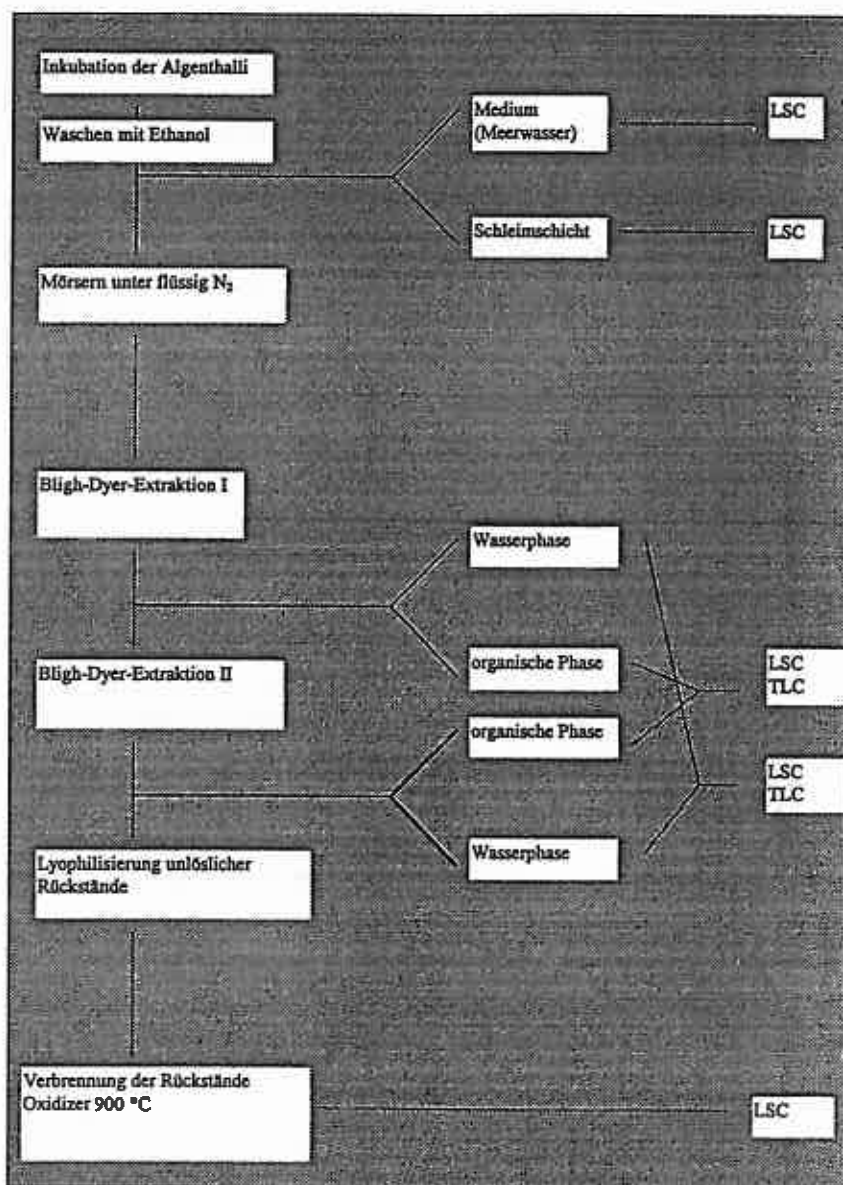


Abb. 22 Aufschluß des Algenmaterials nach einer modifizierten Methode von Langebartels & Harms (1985) und Konoša & Sandermann (1995). In allen Fraktionen wird der Anteil der enthaltenen Radioaktivität mittels LSC und gleichzeitig das Entstehen von Metaboliten aus dem Stoffwechsel über TLC bestimmt.

2.6.1.2 Clearance-Versuche von Benzo(a)pyren in *Fucus vesiculosus*

Dieser Versuch wurde in Anlehnung an die von Roy *et al.* (1994) durchgeführten Versuche mit ^{14}C -BP und dem Quellmoos *Fontinalis antipyretica* durchgeführt. Er soll zeigen, daß eine aufgenommene Substanz auch wieder abgegeben werden kann (Clearance).

Für diesen Versuch wurden 10 g (Frischgewicht) Algenhalm von *Fucus vesiculosus* mit ^{14}C -BP (1.706.100 dpm, Endkonzentration 13 μM) 24 h in 300 ml steriltfiltriertem Nordseewasser in einem 1 Liter-Erlenmeyerkolben inkubiert. Danach wurden die Algen zweimal mit je 20 ml Nordseewasser abgewaschen und in frisches Nordseewasser (300 ml) überführt. In diesem Medium wurde dann über 96 h (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h, 96 h) die von der Alge wieder abgegebene Radioaktivität in Aliquots von je 1 ml gemessen. Eine zweite Versuchsreihe mit identischen Bedingungen wurde angesetzt, um das Clearance-Verhalten von ^{14}C -BP durch Extraktion der Alge zu beobachten. Dazu wurde je Meßzeitpunkt wieder ein Kontrollkolben ohne Alge und ein Inkubationskolben mit 10 g *Fucus vesiculosus* angesetzt (300 ml Nordseewasser, 1.706.100 dpm ^{14}C -BP). Die Extraktion der Algen erfolgte mit der unter 2.6.1 angegebenen Methode.

2.6.1.3 Aufnahme von ^{14}C -Benzo(a)pyren in unterschiedlichen Algen

Für diesen Versuch wurde als Vertreter der Chlorophyta *Ulva lactuca* und *Enteromorpha compressa*, als Vertreter der Chromophyta *Fucus vesiculosus* und als Vertreter der Rhodophyta *Porphyra umbilicalis* ausgesucht. Von allen vier Algenspezies wurden 10 g Frischgewicht abgewogen und in jeweils 300 ml Nordseewasser mit 1.706.100 dpm ^{14}C -BP (Endkonzentration 13 μM) für 24 h inkubiert. Dann erfolgte die Extraktion der Algen mit der unter 2.6.1 beschriebenen Methode.

2.6.1.4 Beeinflussung des Metabolismus von ^{14}C -3-Chlorbiphenyl

Um den Einfluß von Inhibitoren und Induktoren auf den Metabolismus von ^{14}C -3-Chlorbiphenyl zu untersuchen, wurde *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) verwendet. Jeweils 10 g Frischgewicht dieser Alge wurden nach erfolgter Akklimatisierung an die Laborbedingungen (24 °C für 12 h) auf unterschiedliche Erlenmeyerkolben mit je 300 ml Medium verteilt. In Kolben 1 wurde die Inkubation mit 800.000 dpm ^{14}C -3-Chlorbiphenyl

(Endkonzentration 10 μM) durchgeführt. In Kolben 2 wurde zusätzlich zum 3-Chlorbiphenyl 0,6 mM Phenobarbital als Induktor des Cytochrom P-450 Systems zugegeben. In Kolben 3 wurde neben dem ^{14}C -3-Chlorbiphenyl 0,6 mM ABT als Inhibitor des P-450 Systems zugegeben. Nach erfolgter Inkubation wurden die verschieden behandelten Algenhali mit der unter 2.6.1 beschriebenen Extraktionsmethode analysiert. Die organischen Extrakte wurden zudem dünn-schicht-chromatographisch aufgetrennt.

2.7 Induktion von GST und P-450 Monooxygenasen in Algen

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der löslichen und mikrosomalen GST sowie des P-450 Monooxygenase-Systems in Algen wurden neben den aus der Literatur bekannten Induktoren (Tab. 14) auch verschiedene andere, umweltrelevante Xenobiotika eingesetzt. Die verwendeten Stoffe zur Induktion wurde alle in einer Konzentration von 2. mM in Ethanol angesetzt (Endkonzentration 0,6 mM). Das Dieselöl wurde ebenfalls vorher in Ethanol gelöst (500 μl in 1,5 ml Ethanol). Die Alkoholkonzentration lag dabei im Test unter 0,2 %. Die Induktion wurde nach 16 h abgebrochen und die Proben sorgfältig mit sauberem, sterilfiltriertem Meerwasser gewaschen. Dann wurden die Algenhali sofort in flüssigem N_2 schockgefroren und mit der unter 2.3.2 beschriebenen Methode analysiert.

Tab. 14 Induktoren für das GST- und P-450 Enzymsystem anhand von Literaturstellen

Induktor	Enzymsystem	Tier / Pflanze	Literatur
Phenobarbital	P-450	<i>Helianthus tuberosus</i>	Reichart <i>et al.</i> , 1979
	GST	<i>Rattus norvegicus</i>	Gopalan <i>et al.</i> , 1993
3-Methylcholanthren	P-450	<i>Stenotomus chrysops</i>	Klotz <i>et al.</i> , 1984
	GST	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Datta <i>et al.</i> , 1994
β -Naphthoflavon	P-450	<i>Brachydanio rerio</i>	Collodi <i>et al.</i> , 1994
Clofibrate	P-450	<i>Helianthus tuberosus</i>	Salaün <i>et al.</i> , 1986
	GST	<i>Rattus norvegicus</i>	Ito <i>et al.</i> , 1993
Dieselöl	P-450	<i>Mytilus edulis</i>	Livingstone <i>et al.</i> , 1991

Zur weiteren Induktion der detoxifizierenden Enzyme in marinen Algen wurden neben den bekannten Induktoren auch umweltrelevante Xenobiotika wie das BP, das Phenanthren als

Vertreter der PAK's, das 3-Chlorbiphenyl als Vertreter der PCB's und die Herbizide Atrazin und Fluorodifen eingesetzt.

Als Kontrolle wurde für jeden verwendeten Induktor ein eigener Kolben mit je 10 g Algenfrischgewicht in 300 ml sterilfiltriertem Meerwasser angesetzt. In diese Kontrolle wurde dieselbe Menge Ethanol gegeben wie auch in die Induktionskolben. Die Alkoholkonzentration lag in jedem Kolben unter 0,2 %.

2.8 Statistik

Der statistische Parameter $n = 3$ im Screeningteil dieser Arbeit bedeutet, daß hier die jeweilige Pflanze aufgrund beschränkten Pflanzenmaterials nur einmal aufgearbeitet wurde, mit den erhaltenen Extrakten aber drei unabhängige Tests pro Substrat durchgeführt wurden.

Im Induktionsteil dieser Dissertation bedeutet $n = 3$, daß hier jeweils drei unabhängige parallele Experimente durchgeführt wurden und aus den Messungen dieser Experimente der Mittelwert gebildet wurde.

III. Ergebnisse

1. Screening detoxifizierender Enzyme in niederen Pflanzen und marinen Makroalgen

In der Reihe der detoxifizierenden Entgiftungsenzymsysteme im Pflanzenreich soll zunächst auf das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System (Phase I-Enzym) eingegangen werden. Anschließend folgen Ergebnisse der Untersuchungen über die mikrosomalen und löslichen Glutathion S-Transferasen und die Glucosyltransferasen (Phase II-Enzyme).

1.1 Cytochrom P-450 Monooxygenase-System

Die Aktivität dieses membrangebundenen Enzymsystems wurde mit den endogenen Fettsäuresubstraten Laurinsäure, Stearinsäure und Palmitinsäure bestimmt. Weiterhin wurde als Repräsentant der xenobiotischen Substrate das 3-Chlorbiphenyl ausgewählt.

1.1.1 Testsystem und Produktidentifizierung

Das zur Zeit am besten untersuchte pflanzliche Cytochrom P-450 Enzym ist, neben der Zimtsäurehydroxylase, die Laurinsäurehydroxylase (E.C. 1.14.14.-). Die Hydroxylierung der Laurinsäure kann innerhalb der C-Kette (in-chain, IC) am C-8, C-9 oder C-10 erfolgen. In den Gramineen kann diese Hydroxylierung aber auch am C-10 oder C-11 durch die (ω -1)-Laurinsäurehydroxylase oder in Leguminosen auch am C-12 durch die ω -Laurinsäurehydroxylase erfolgen (Durst *et al.*, 1992). Dabei wird im Laufmittelsystem LM 2 für die IC-Hydroxylierung der Laurinsäure ein R_F -Wert von 0,54 angegeben (Salaün *et al.*, 1989). Dieser R_F -Wert korreliert mit den in dieser Arbeit beobachteten R_F -Werten der Laurinsäurehydroxylasereaktion, die über TLC-Bestimmung erzielt wurden (Abb. 23, Seite 61). Damit ist ein Hinweis dafür gegeben, daß in dieser Arbeit ebenfalls die IC-LAH-Aktivität bestimmt wurde.

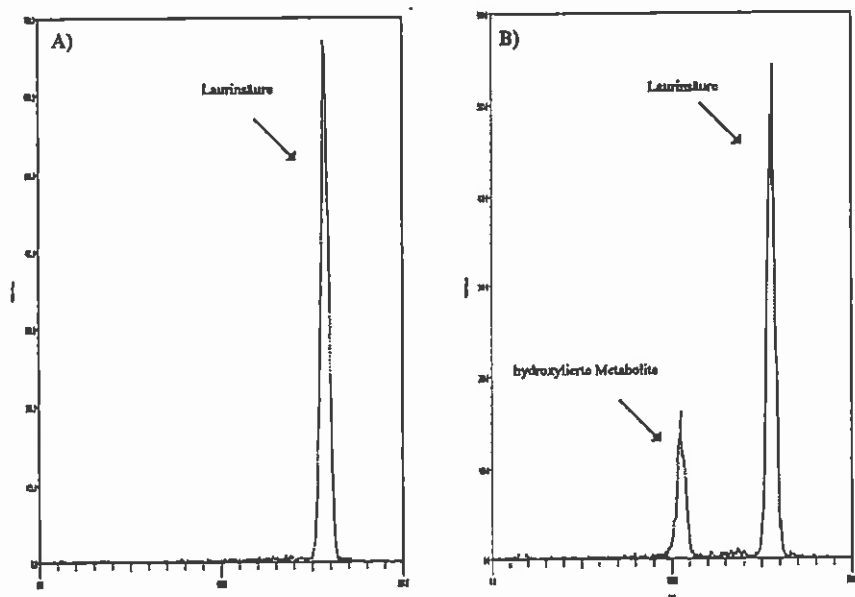


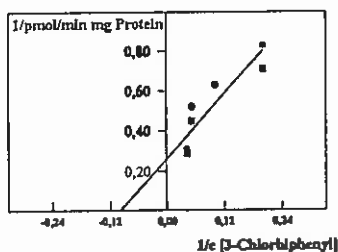
Abb. 23 IC-LAH-Reaktion am Beispiel einer Mikrosomenpräparation der Braunalge *Fucus vesiculosus* aus dem Helgoländer Felswatt. Die Enzymreaktion wurde wie in 2.3.3.3.1 beschrieben, sowie in Anlehnung an die Methoden von Salaün *et al.* (1981 und 1988) durchgeführt. A) Blindwert mit abgekochten Mikrosomen (10 min, 100 °C), B) Enzyminkubation der LAH. R_f der Laurinsäure bei 0,88, der hydroxylierten Produkte bei 0,53.

Für die LAH in *Helianthus tuberosus* wurde von Salaün *et al.* (1978) und Benveniste *et al.* (1982) ein apparenter K_m -Wert von 20 μM für Laurinsäure angegeben. Da die Konzentration an Substrat in dem hier verwendeten Test 6-fach höher gewählt wurde, kann in der Regel davon ausgegangen werden, daß in den verschiedenen Enzymtests der unterschiedlichen Pflanzenpräparationen im $V_{\max}$ -Bereich gearbeitet wurde. Weil von der Stearinsäure und der Palmitinsäure keine K_m -Werte aus der Literatur bekannt sind, wurde aufgrund der ähnlichen Struktur dieser Fettsäuren mit der Laurinsäure dieselbe Konzentration gewählt, die für diese in der Literatur angegeben ist (Salaün *et al.*, 1981 und 1988). Die Produktidentifizierung erfolgte durch den Vergleich der R_f -Werte für die hydroxylierten Produkte mit der Literatur.

Das xenobiotische Substrat 3-Chlorbiphenyl wurde bisher in Pflanzen als P-450-Substrat nicht untersucht. Borlakoglu & John (1989) nahmen für ihre Untersuchungen an *Helianthus*

tuberosus das strukturell und vom Chlorierungsgrad her vergleichbare 2-Chlorbiphenyl als Substrat. Die Produktidentifizierung wurde durch Reinigung des entstandenen Metaboliten mit R_F -Wert 0,26–0,28 (Abb. 60, Seite 116) über TLC in Laufmittelgemisch LM 2 und anschließender Massenbestimmung durch GC/MS durchgeführt.

Da auch für dieses Substrat keine K_m -Werte verfügbar waren, wurde der Test in Anlehnung an die Methode der oben genannten Autoren durchgeführt. Dabei wurde ein K_m -Wert mit 3-Chlorbiphenyl in Mikrosomen der marinen Makroalge *Ulva lactuca* aufgenommen (Abb. 24). Dazu wurde im unter 2.3.3.3.1 beschriebenen Test die Konzentration an 3-Chlorbiphenyl im Bereich von 5–25 μM variiert und der K_m -Wert mit Hilfe des Programms Enzpack durch Berechnung nach Lineweaver-Burk bestimmt.



Lineweaver-Burk: K_m 8,6 μM ,
 V_{max} 3,4 pmol/min mg Protein

Abb. 24 Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für die Hydroxylierung des 3-Chlorbiphenyls in Mikrosomen der marinen Makroalge *Ulva lactuca*.

In den folgenden Tests wurde eine 6-fach höhere Konzentration an 3-Chlorbiphenyl eingesetzt, so daß in der Regel davon ausgegangen werden kann, daß die Messungen im V_{max} -Bereich erfolgten.

Die Aktivitätsverteilung der LAH in den verschiedenen Pflanzenabteilungen ist in Abb. 25, Seite 63 und Abb. 26, Seite 64 zu sehen. Dabei konnte im Modellsystem der Zellsuspensionskulturen bei *Glycine max* die höchste Aktivität der LAH mit 60,0 pkat/mg Protein bestimmt werden. In den anderen Zellkultursystemen konnte nur noch in *Triticum aestivum* LAH-Aktivität mit 0,7 pkat/mg Protein nachgewiesen werden. Im Modellsystem der Spermatophyta konnte die LAH im Aktivitätsbereich von 0,1 pkat/mg Protein (*Lemna minor*) bis 0,8 pkat/mg Protein (*Salicornia europaea*) gemessen werden. In der Abteilung der Pteridophyta konnte in der Klasse der Filicatae nur in *Cycas revoluta* mit 29,1 pkat/mg

Protein und in *Selaginella lepidophylla* mit 0,9 pkat/mg Protein eine LAH-Aktivität nachgewiesen werden. Eine hohe LAH-Aktivität konnte auch in *Psilotum nudum* aus der Klasse der Psilophytatae mit 3,2 pkat/mg Protein gemessen werden. Die Spezies der Klasse Articulatae zeigten im Durchschnitt LAH-Aktivitäten von 0,2 pkat/mg Protein (*Equisetum giganteum*) bis 0,5 pkat/mg Protein (*Equisetum arvense*).

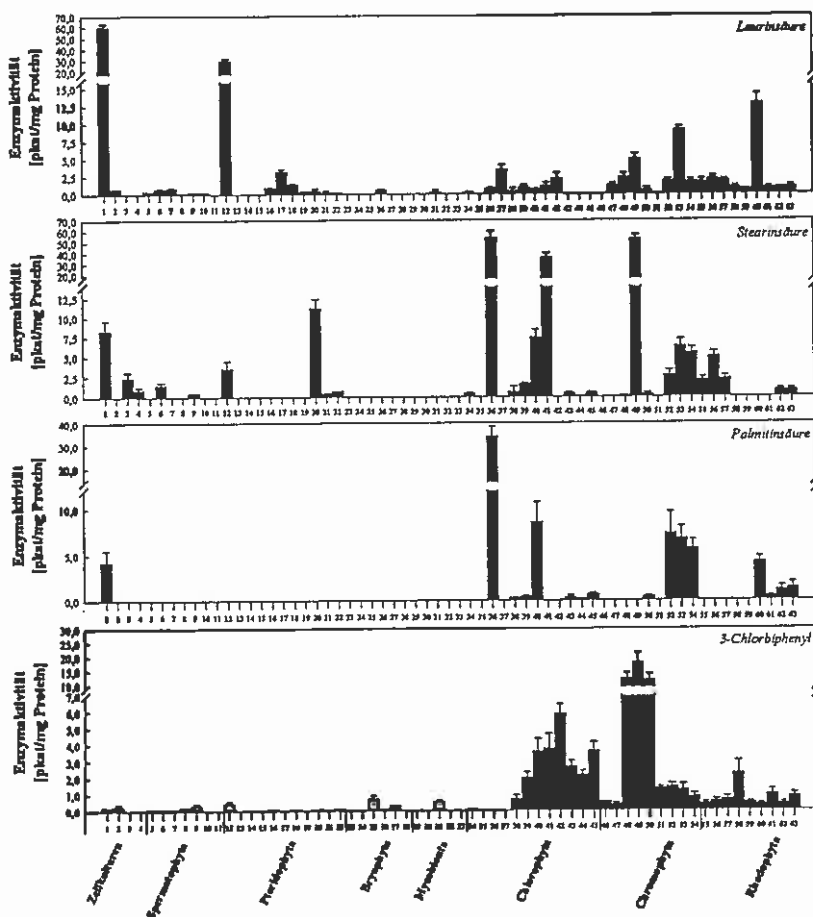


Abb. 25 Aktivitätsverteilung des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems, bestimmt mit den drei endogenen Fettsäuresubstraten Laurinsäure, Stearinsäure und Palmitinsäure nach der Methode von Salaün *et al.* (1981 und 1988) sowie mit dem xenobiotischen Substrat 3-Chlorbiphenyl aus der Gruppe der PCB's. Die Messung erfolgte hier nach der Methode von Borlakoglu & John (1989). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$). Die Zahlen der Abszisse stehen für die einzelnen Pflanzenspezies und sind in Tab. 5, Seite 25 aufgelistet.

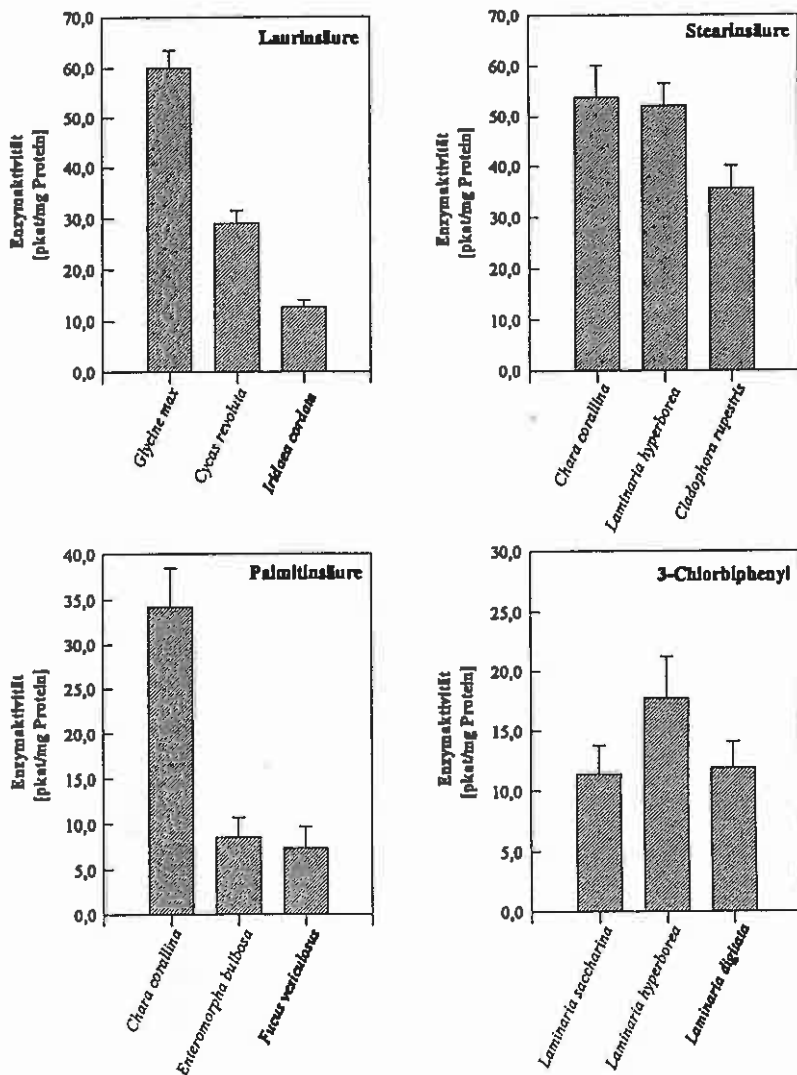


Abb. 26 Maximal gemessene Aktivitäten des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems, bestimmt mit den drei endogenen Fettsäuresubstraten Laurinsäure, Stearinsäure und Palmitinsäure sowie mit dem xenobiotischen Substrat 3-Chlorbiphenyl. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

In der Abteilung der Bryophyta war das aquatische Moos *Fontinalis antipyretica* der einzige Vertreter, der die Laurinsäure unter den Testbedingungen hydroxylieren konnte. Dabei wurde eine Enzymaktivität von 0,6 pkat/mg Protein gemessen.

Phanerochaete chrysosporium war die einzige Art aus der Abteilung der Mycobionta, bei der ein Nachweis der LAH-Aktivität mit 0,2 pkat/mg Protein gelang. In den Makroalgen der Abteilung Chlorophyta wurden Enzymaktivitäten von 0,2 pkat/mg Protein bei *Zygnema sp.*, einer limnischen Makroalge, bis 3,5 pkat/mg Protein bei *Caulerpa mexicana*, einer Makroalge aus dem Mittelmeergebiet, gemessen.

Die Vertreter der Abteilung Chromophyta zeigten im Vergleich zu den bisher besprochenen Arten etwas erhöhte LAH-Aktivität. Aktivitätsspitzen lagen bei *Laminaria hyperborea* mit 4,9 pkat/mg Protein und *Fucus spiralis* mit 9,1 pkat/mg Protein. Die Aktivität der LAH in den übrigen Spezies lag in der Regel über 1,5 pkat/mg Protein. Keine LAH-Aktivität unter den angewendeten Testbedingungen war in *Ascophyllum nodosum* und *Halydris siliquosa* zu finden. Dagegen konnte in allen untersuchten Spezies der Abteilung Rhodophyta LAH-Aktivität nachgewiesen werden. Hier lagen die Aktivitätsspitzen bei der Makroalge *Chondrus crispus* aus Helgoland mit 2,2 pkat/mg Protein und bei der antarktischen Alge *Iridaea cordata* mit 12,8 pkat/mg Protein.

Die Stearinsäurehydroxylase (SAH) (Abb. 25, Seite 63 und Abb. 26, Seite 64) zeigte im Zellkultursystem bei *Glycine max* mit 8,2 pkat/mg Protein den höchsten Wert. Im Gegensatz zur LAH ist mit der Stearinsäure als Substrat sowohl in *Zea mays* als auch in *Picea abies* Enzymaktivität zu messen. Einzige Ausnahme bildet die Zellsuspensionskultur von *Triticum aestivum*, in der unter den verwendeten Testbedingungen keine SAH-Aktivität gemessen werden konnte. Auch bei dem zweiten Modellsystem, den Spermatophyta-Arten, sind es nur noch zwei Spezies, die Stearinsäure hydroxylieren können, nämlich *Helianthus giganteus* mit 1,4 pkat/mg Protein und *Ginkgo biloba* mit 0,5 pkat/mg Protein. In der Abteilung der Pteridophyta konnte SAH-Aktivität nur in einem Vertreter der Filicatae, nämlich *Cycas revoluta*, mit 3,5 pkat/mg Protein und in drei Vertretern der Klasse Articulatae, *Equisetum arvense* mit 11,1 pkat/mg Protein, *Equisetum telmateia* mit 0,4 pkat/mg Protein und *Equisetum giganteum* mit 0,7 pkat/mg Protein, bestimmt werden. Sowohl in der Abteilung der Bryophyta als auch in der Abteilung der Mycobionta konnte unter den Testbedingungen keine SAH-Aktivität gemessen werden. Erst bei den Spezies der Abteilung Chlorophyta konnte die SAH wieder nachgewiesen werden. Aktivitätsspitzen lagen bei der limnischen

53,8 pkat/mg Protein und der marinen Makroalge *Cladophora rupestris* mit 35,7 pkat/mg Protein. In der Abteilung der Chromophyta ähnelt das Aktivitätsmuster der SAH dem der LAH insofern, daß in jeder Alge, in der LAH-Aktivität gemessen werden konnte, auch SAH-Aktivität zu finden war. Einzige Ausnahme war hier *Cystoseira baccata*. Ein Aktivitätsmaximum wurde mit 52,2 pkat/mg Protein bei *Laminaria hyperborea* bestimmt.

Die Aktivitätsbestimmung der PAH (Abb. 27, Seite 63 und Abb. 28, Seite 64) zeigte, daß dieses endogene Substrat bei dem Modellsystem Zellsuspensionskultur nur bei *Glycine max* mit 4,22 pkat/mg Protein gemessen werden konnte. In den anderen Zellkulturen konnte keine entsprechende Aktivität gefunden werden. Auch in den Abteilungen Spermatophyta, Pteridophyta, Bryophyta und Mycobionta war keine PAH-Aktivität nachzuweisen. Erst bei den Spezies der Abteilung Chlorophyta konnte die PAH wieder bestimmt werden. Die Aktivität dieses Enzyms lag nur bei der limnischen Makroalge *Chara corallina* (34,2 pkat/mg Protein) und der marinen Makroalge *Enteromorpha bulbosa* (8,5 pkat/mg Protein) über 1,0 pkat/mg Protein. Die Vertreter der Abteilung Chromophyta zeigten ebenfalls PAH-Aktivität mit einem Aktivitätsmaximum bei der Klasse der Fucales mit durchschnittlich über 5 pkat/mg Protein. Auch in der Abteilung Rhodophyta wurde die PAH gefunden. Hier waren Aktivitäten von 0,4 pkat/mg Protein (*Palmaria decipiens*) bis 4,2 pkat/mg Protein (*Iridaea cordata*) zu messen.

Das xenobiotische Substrat 3-Chlorbiphenyl zeigte im Vergleich zur PAH ein gleichmäßigeres Verteilungsmuster (Abb. 27, Seite 63 und Abb. 28, Seite 64). Hier sind sowohl Aktivitäten im Modellsystem der Zellsuspensionskulturen (*Triticum aestivum* mit 0,3 pkat/mg Protein) als auch in dem der Spermatophyta (0,2 pkat/mg Protein bei *Lemna minor*) zu finden. Bei den Vertretern der Cycadatae wurde ein Aktivitätsmaximum bei *Cycas revoluta* mit 0,4 pkat/mg Protein gemessen. Cytochrom P-450 Aktivität für dieses Substrat wurde auch in den Bryophyta (*Sphagnum capillifolium* mit 0,7 pkat/mg Protein) und in *Phanerochaete chrysosporium* mit 0,5 pkat/mg Protein als einem Vertreter der Abteilung Mycobionta bestimmt. Allerdings lagen alle Aktivitäten unterhalb der 1 pkat/mg Protein-Grenze. In den marinen Algenarten der Abteilungen Chlorophyta und Chromophyta war die Enzymaktivität für den Umsatz von 3-CBP meist um den Faktor 10 höher. Aktivitätsspitzen lagen bei den Chlorophyta-Arten bei *Enteromorpha bulbosa* (3,6 pkat/mg Protein) und bei *Halimeda opuntia* (5,9 pkat/mg Protein) und bei den Chromophyta-Arten bei *Laminaria digitata*

(11,9 pkat/mg Protein) und bei *Laminaria hyperborea* (17,7 pkat/mg Protein). Die Alge *Porphyra umbilicalis* aus der Abteilung Rhodophyta zeigte mit diesem Substrat eine Aktivität von 2,2 pkat/mg Protein. Bei allen anderen Rhodophyta-Arten lag die Aktivität unter 1 pkat/mg Protein.

1.1.2 Hasse-Diagramme

Um nun den pflanzlichen Evolutionsstammbaum mit den oben gewonnenen Daten zu vergleichen bzw. Ähnlichkeiten oder Unterschiede aufzuzeigen, wurde die Statistikmethodik der Hasse¹-Diagramme verwendet. Mit diesen Diagrammen ist es möglich, Korrelationen in verschiedensten Systemen darzustellen (Brüggemann *et al.*, 1994, Brüggemann *et al.*, 1995). Zu bewertende Objekte werden von einer Reihe von Attributen charakterisiert. Jedes dieser Attribute erhebt für sich den Anspruch auf Relevanz. Daher ist für einen Vergleich von Objekten eine Vielfalt von charakterisierenden Attributen eher von Nachteil, da jedes Attribut eine ihm vorgegebene Reihung induziert. Diese Reihungen sind in der Regel widersprüchlich, da, gemessen am Attribut x , eine andere Reihung aufgezeigt wird als mit dem Attribut y oder z . Im Rahmen der Hasse-Diagrammtechnik werden die oben geschilderten Schwierigkeiten umgangen, indem ein Gesamtindex operational definiert wird und dieser dann die Grundlage der Reihung bildet. Mathematisch ausgedrückt tritt anstelle der linearen Ordnung die partielle Ordnung mit ihrem mathematischen Werkzeug, der Verbandstheorie (Brüggemann *et al.*, 1995). Zur Berechnung von Hasse-Diagrammen wird zuerst eine Objektmenge gebildet. Anschließend wird das Ziel der vergleichenden Bewertung definiert sowie die Eigenschaften in Abhängigkeit von der Objektmenge und dem Bewertungsziel ausgewählt. Ziel dieser Schritte ist es, eine Reihenfolge, das sogenannte Ranking der ausgewählten Objekte, zu zeigen sowie unterschiedliche Qualitäten der Objekte sichtbar zu machen. Das Hasse-Diagramm ist ein azyklischer Digraph und enthält somit keine Zyklen, als normaler Graph ist er aber dreiecksfrei. Dies ist eine Folge der Transitivität der Ordnungsrelation. Eine Linie zwischen zwei Objekten deutet auf eine Vergleichbarkeit dieser beiden Objekte hin. Es besteht folglich eine Ordnungsrelation, die die anfangs definierten Objekte durch die ausgewählten Attribute bewertet. Objekte, die

¹ Hasse-Diagramm ist benannt nach dem Mathematiker H. Hasse. Der Grundstein für die Disziplin der „Verbandstheorie“ wurde in den 30er Jahren dieses Jahrhunderts durch Arbeiten von Birkhoff gelegt (Brüggemann & Halfon, 1995).

nicht durch Linien verbunden sind, sind nicht miteinander vergleichbar. Die Auswertung von Hasse-Diagrammen erfolgt visuell bzw. über die Struktur dieser dimensionslosen Diagramme. Als Struktur werden in diesem Fall die minimalen Elemente, das sind solche Elemente, die keinen unteren Nachbarn haben, die maximalen Elemente, solche Elemente, die keinen oberen Nachbarn haben, das größte und kleinste Element und das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Linien definiert. Die Abszisse gibt die Diversität der Antwort wieder, die Ordinate die Ausprägung der Enzymantwort (Brüggemann & Halfon, 1995).

Für die Erstellung dieser Diagramme wurden zum einen die Pflanzenarten in ihre entsprechenden Abteilungen zusammengefaßt und dort, wo es möglich war, noch in ihre Klassen unterteilt und als Objekte definiert. Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Enzyme in den einzelnen Pflanzenarten wurden pro Substrat addiert, dann durch die Anzahl der pro Abteilung bzw. Klasse bearbeiteten Pflanzenarten dividiert und als Attribute definiert. Die enzymatischen Daten wurden nach einer Normalverteilungsanalyse einer Klassifizierung unterzogen und so für das Hasse-Diagramm aufbereitet.

1.1.2.1 Hasse-Diagramm der Cytochrom P-450 Monooxygenasen

Die Aktivitäten des P-450 Monooxygenase-Systems pro Pflanzenabteilung bzw. -klasse wurden getrennt nach den verwendeten Substraten addiert und durch die Anzahl der untersuchten Spezies dividiert. Die Klassifizierung der Werte erfolgte nach einer Normalverteilungsanalyse. Das berechnete Hasse-Diagramm ist in Abb. 27 (Seite 69) zu sehen. Das Hasse-Diagramm der P-450 Monooxygenasen zeigt fünf Objektenebenen. Die Minimale ist durch die Angiospermae (Bedecktsamer), Gymnospermae (Nacktsamer), Musci (Laubmoose), Hepaticae (Lebermoose), Basidiomycetes (Ständerpilze), Ascomycetes (Schlauchpilze) und Lichenes (Flechten) gekennzeichnet, die Maximalen durch die Chromophyta, Chlorophyta und durch das Modellsystem der Zellsuspensionskulturen. Die Zellsuspensionskulturen wurden als eigene Gruppe zusammengefaßt und nicht auf die Angiospermae und Gymnospermae aufgeteilt. Damit wurden die Zellkulturen nicht taxonomisch aufgeteilt, sondern als Modellsystem betrachtet.

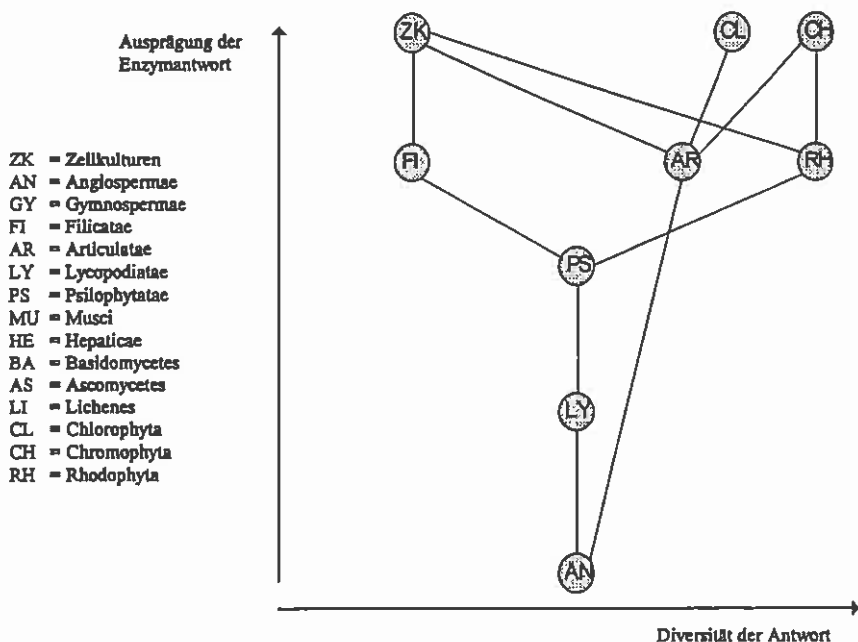


Abb. 27 Hasse-Diagramm der Cytochrom P-450 Monooxygenase-Aktivität zur Korrelation dieses Enzymsystems mit dem Evolutionsstammbaum der Pflanzen. Eine Linie zwischen zwei Objekten bedeutet, daß diese vergleichbar sind. Objekte, die nicht durch eine Linie verbunden sind, sind nicht miteinander vergleichbar. Äquivalente Objekte sind: AN=GY, MU, HE, BA, AS, LI.

Die verschiedenen Klassen der Pteridophyta liegen auf einer Kette zusammen. Nur die Articulatae (Schachtelhalmgewächse) machen hier eine Ausnahme. Sie zeigen größere Vergleichbarkeit mit den Vertretern der Minimale und mit dem Modellsystem der Zellsuspensionskulturen. Die marinen Makroalgen zeigen untereinander kaum Vergleichbarkeiten, die Chlorophyta und Chromophyta unterscheiden sich nicht in Bezug auf die Höhe der Enzymantwort. Die Rhodophyta hingegen sind mit den Chromophyta vergleichbar, die Ausprägung ihrer Enzymantwort ist jedoch geringer.

1.2 Glutathion S-Transferasen

Die Aktivität der mikrosomalen und löslichen GST's wurde zum einen mit Modellsubstraten, die bestimmte chemische Gruppen (Aryle, Alkyle, Epoxide) repräsentieren, zum anderen mit xenobiotischen Substraten und auch mit der trans-Zimtsäure, einem der natürlichen Substrate der GST's, bestimmt.

1.2.1 Testsystem und Produktidentifizierung

Für die Aktivitätsbestimmung der GST wird meist das Modellsubstrat CDNB verwendet. In der Literatur wurden für dieses Substrat in Pflanzen K_m -Werte im Bereich von 0,8-2,9 mM angegeben (Lamoureux & Rusness, 1989). Für die Substrate DCNB, pNBC und EPNP wurden im tierischen System K_m -Werte von 1,1-3,0 mM (DCNB), 0,6-3,4 mM (pNBC) und 0,2 mM (EPNP) angegeben (Clark, 1989). Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen liegen für jedes Substrat 10-fach höher als der angegebene K_m -Bereich. Damit ist sichergestellt, daß die Messung in der Regel im V_{max} -Bereich der jeweiligen Substrate durchgeführt wurde.

Das Substrat IDNB wurde bereits 1982 von Clark getestet, der aber mit der GST aus Hausfliegen im Gelsystem keine Aktivität fand. Da aber IDNB eine ähnliche Struktur besitzt wie das CDNB, sollte ein enzymatischer Umsatz über die GST photometrisch meßbar sein.

Für dieses Substrat wurde der Enzymtest mit Hilfe käuflicher Schweineleber-GST in Anlehnung an den CDNB-Test dargestellt. Die Konjugation von IDNB und CDNB folgt dem selben Schema der Halogensubstitution, es muß folglich das gleiche Konjugat (S-2,4-Dinitrobenzylglutathion) entstehen. In Abb. 28 (Seite 71) sind die Spektren der vorläufigen Enzymtests mit IDNB als Substrat dargestellt. Zur Aufnahme der UV-Spektren wurde der Standard-GST-Ansatz verwendet und statt CDNB in gleicher Konzentration IDNB zugegeben. Dann wurden Küvetten mit dem Testansatz und dem Blindwert 15 min bei 25 °C inkubiert und anschließend das Spektrum gegen den Testansatz ohne Enzym im Bereich von 200 bis 800 nm aufgenommen. Deutlich ist im Vergleich zur Blindprobe nach Inkubation ein neuer Peak bei 354 nm zu erkennen.

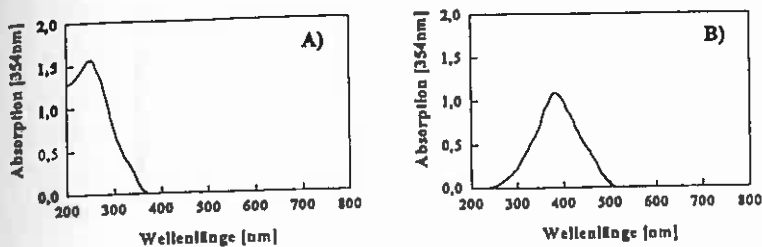


Abb. 28 UV/VIS-Spektren des vorläufigen GST-Tests mit IDNB als Substrat in einer Konzentration von 1,0 mM in der Küvette, durchgeführt mit käuflicher Schweineleber-GST (affinitätsgereinigt). A) Blindwert ohne Enzym, B) Meßwert mit 40 µg Enzym.

Die Proteinmengenabhängigkeit der IDNB-GSH-Konjugation ist in Abb. 29 zu sehen

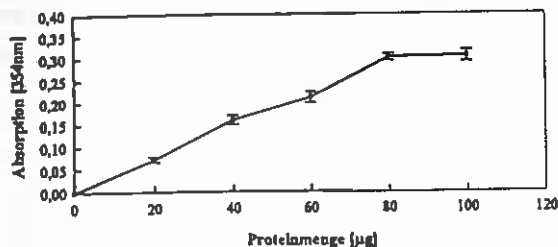


Abb. 29 Proteinmengenabhängigkeit der enzymkatalysierten IDNB-Konjugation mit GSH durch käufliche Schweineleber-GST. Die Menge an eingesetztem Protein wurde von 0-100 µg variiert und die Absorptionszunahme des Enzymtests bei 354 nm gegen einen Blindwert ohne Protein aufgezeichnet. Das Testvolumen betrug 1180 µl. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Die Zeitlinearität der enzymatischen Reaktion wurde mit einer Enzymmenge von 40 µg im Testvolumen von 1080 µl über eine Zeit von 10 min untersucht (Abb. 30, Seite 72).

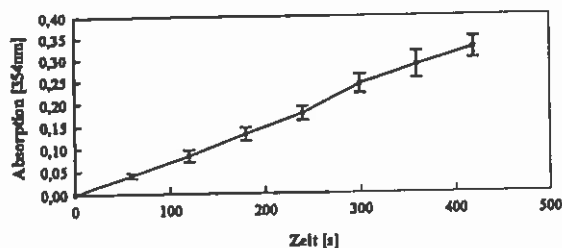


Abb. 30 Zeitlinearität der GST-katalysierten Konjugation von IDNB mit GSH mit 40 μg Protein bei 354 nm Wellenlänge mit käuflicher Schweineleber-GST. Die Zunahme der Extinktion, d.h. die Produktbildung, wurde über einen Zeitbereich von 7 min verfolgt. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Das pH-Optimum der Konjugation von IDNB mit GSH wurde mit folgenden Puffersystemen getestet: 100 mM MES/HCl (pH 5,5), 100 mM KPP (pH 6,4), 100 mM KPP (pH 7,5), 100 mM HEPES/NaOH (pH 8,0) und 100mM BIS/TRIS/NaOH (pH 9,5). Die Kurve durchläuft ein Maximum bei pH 7,5 (Abb. 31).

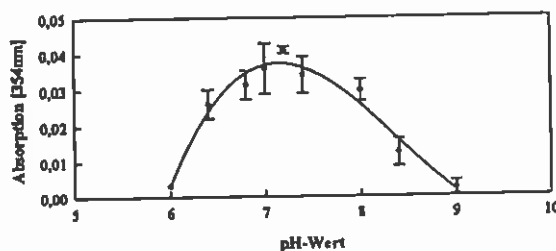


Abb. 31 pH-Optimum der GST-katalysierten Konjugation von IDNB mit GSH und einer Proteinmenge von 40 μg käuflicher Schweineleber-GST in einem Testvolumen von 1080 μl und 5minütiger Meßdauer. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Da nach Habig *et al.* (1974) die nichtenzymatische Konjugationsrate bei höheren pH-Werten stark ansteigt und so die korrekte Messung der Enzymaktivität beeinflussen kann, wurde zusätzlich im pH-Bereich von 6-8 die nichtenzymatische Konjugationsrate im Vergleich zur enzymatisch katalysierten Konjugation bestimmt (Abb. 32, Seite 73).

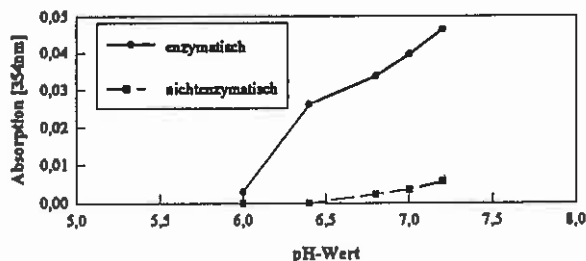


Abb. 32 Vergleich der enzymatischen mit der nichtenzymatischen Konjugationsrate von IDNB und GSH, mit 40 μg Protein (käufliche Schweineleber-GST), pH 6,5-7,5, 354 nm und 5 min Meßzeit.

Die Temperaturabhängigkeit der IDNB-GSH-Konjugation wurde im Bereich von 5-50 $^{\circ}\text{C}$, bei pH 7,5, 354 nm und 40 μg Protein (käufliche Schweineleber-GST) bestimmt (Abb. 33). Hierfür wurde nicht nur der verwendete Puffer (Puffer 2) in einem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur gebracht, sondern auch der Küvettenhalter im Photometer, um dort auftretende Temperaturschwankungen zu vermeiden.

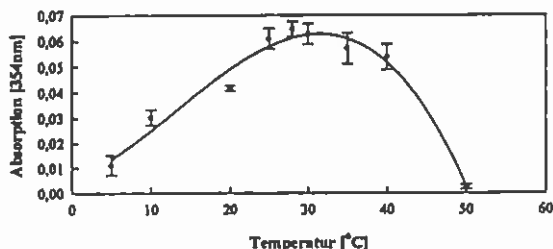
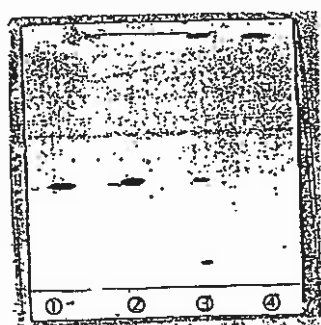


Abb. 33 Temperaturoptimum der GST-katalysierten Konjugation von IDNB mit GSH bei pH 7,5, einer Proteinmenge von 40 μg (käufliche Schweineleber-GST) über 5 min bei 354 nm. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Die oben gezeigten Tests wurden durchgeführt, um den enzymatischen Umsatz von IDNB mittels der GST zu zeigen, da Clark (1982) keine Aktivität fand. Zur Identifikation des entstehenden IDNB-GSH-Konjugates wurde eine Konjugatreinigung mittels preparativer HPLC nach einer Methode von Schröder *et al.* (1990) durchgeführt. Dabei wurde der Enzymsatz für photometrische Messungen um das 10-fache vergrößert und 30 min bei 25 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurde der Enzymsatz mit 10 μl 20 % TCA terminiert und mit

Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Wasserphase wurde lyophilisiert und anschließend mit 200 µl bidest. Wasser/Acetonitril/Essigsäure aufgenommen. Für die Reinigung mittels HPLC wurden jeweils 50 µl injiziert. Die Trennung erfolgte auf einer LiChroCART RP-18 Säule durch Elution mit einem Gradienten aus bidest. Wasser mit 1 % Essigsäure (Laufmittel A) und Acetonitril mit 1 % Essigsäure (Laufmittel B). Dabei zeigte das Konjugat eine Retentionszeit von 14,2 min, das nichtkonjugierte IDNB eine Retentionszeit von 35,4 min (Abb. 34). Der Konjugatpeak wurde quantitativ aufgefangen und erneut lyophilisiert. Die Identifizierung des GSH-Konjugates wurde durch Co-Chromatographie auf Kieselgelplatten mit dem käuflichen S-(Nitrobenzyl)-GSH-Konjugat als Standard durchgeführt. Beide Konjugate zeigen im Laufmittel LM 4 einen R_f von 0,39.



- 1) S-(Nitrobenzyl)-GSH-Konjugat
- 2) HPLC-gereinigtes IDNB-Konjugat
- 3) Enzymtest IDNB
- 4) IDNB 15mM in EtOH

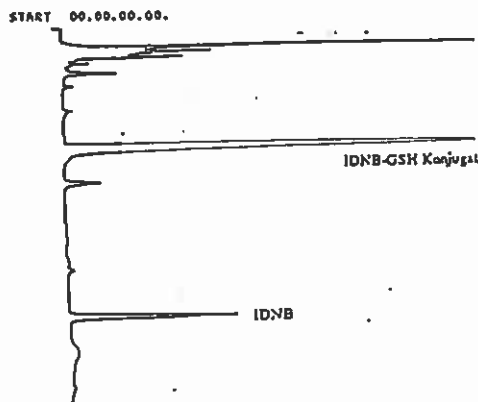


Abb. 34 A) TLC des IDNB-GSH-Konjugates, co-chromatographiert mit einem Enzymtest mit IDNB und dem käuflichen S-(Nitrobenzyl)-GSH-Konjugat im Laufmittelsystem LM 4. Die markierten Stellen geben die Lokalisation der Substanz unter UV-Licht wieder. IDNB hat mit diesem Laufmittel einen R_f von 0,97, das IDNB-Konjugat einen R_f von 0,39 und das Standardkonjugat einen R_f von 0,39. B) HPLC-Chromatogramm der GSH-Konjugat-Reinigung nach einer Methode von Schröder *et al.* (1990). Das Konjugat wird mittels eines Gradienten aus bidest. Wasser mit 1 % HOAc (Laufmittel A) und Acetonitril mit 1 % HOAc (Laufmittel B) eluiert und das Eluat quantitativ aufgefangen.

Mit dem gereinigten Konjugat konnte der molare Extinktionskoeffizient unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet werden.

(Gleichung 11)

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion bei 354 nm

 ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [l/mmol cm]

c = Konzentration IDNB

d = Lichtweg Küvette 1 cm

Dazu wurde das Konjugat in Ethanol in Konzentrationen von 10, 5 und 1 mM gelöst und die Absorption bei 354 nm im Photometer bestimmt.

(Gleichung 12)

$$c = \frac{E_{354\text{nm}}}{\epsilon_{\text{IDNB}}} = 9,2 \pm 0,3 \text{ [l/mmol cm]}$$

Da durch die Konjugation von IDNB mit GSH dasselbe Konjugatmolekül gebildet wird, wie dies bei der Konjugation von CDNB der Fall ist (Halogenatom ist in beiden Fällen das Leavingatom), sollten die molaren Extinktionskoeffizienten übereinstimmen. Der aus der Literatur bekannte molare Extinktionskoeffizient von CDNB beträgt 9,6, der in dieser Arbeit ermittelte molare Extinktionskoeffizient für IDNB beträgt 9,2.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten für die IDNB-Reaktion wurden unterschiedliche Konzentrationen von 0,1–0,8 mM IDNB im Test (1080 μ l Testvolumen, pH 7,5, Temperatur 25 °C, 40 μ g käufliche Schweineleber-GST) eingesetzt. Die Konzentration des Cosubstrates GSH wurde bei allen getesteten IDNB-Konzentrationen bei 2 mM im Test gehalten.

Dabei konnte in der Lineweaver-Burk-Auftragung ein K_m von $1,35 \pm 0,22$ mM bei V_{max} von $120,00 \pm 1,73$ nmol/min mg Protein bestimmt werden.

In den später durchgeführten Tests wurde eine 10-fach höhere Konzentration eingesetzt, so daß man hier davon ausgehen kann, daß die Enzymaktivität in der Regel im V_{max} -Bereich bestimmt wurde.

Neben den oben beschriebenen Modellsubstraten wurde das endogene Substrat Zimtsäure und die beiden exogenen Substrate Atrazin und Fluorodifen zur Aktivitätsbestimmung der GST verwendet. Für die Zimtsäure werden in *Pisum sativum* K_m -Werte von 2,2 mM beschrieben (Diesperger, 1979). Für Atrazin wird ein K_m -Bereich von 0,04–2,4 mM in *Triticum aestivum* angegeben (Lamoureux & Rusness, 1989) und für Fluorodifen ein K_m von 0,04 mM in *Picea abies* (Schröder & Berkau, 1993). Die hier im Test verwendete Konzentration für die verschiedenen Substrate lag bis zu 10-fach höher als der K_m , somit ist auch hier eine Messung im V_{max} -Bereich zu erwarten.

Die entstandenen Herbizidkonjugate wurden exemplarisch für jede Pflanzenabteilung dünn-schichtchromatographisch identifiziert. Dabei wurde als Vergleich das käufliche Glutathionkonjugat S-(p-Nitrobenzyl)glutathion als Standard verwendet und zusätzlich die ermittelten R_F -Werte der jeweiligen Konjugate mit Literaturwerten verglichen (Abb. 35 und Tab. 15, Seite 77). Die Identifizierung des Fluorodifenkonjugates erfolgte unter UV-Licht, die des ^{14}C -markierten Atrazinkonjugates zusätzlich mit Hilfe eines Radiodünn-schichtscanners. Als ein Vergleich zu diesen xenobiotischen Substraten wurde die cGST-Aktivität mit der trans-Zimtsäure als endogenem Substrat der GST bestimmt. Die Aktivitätsverteilung ergab dabei das in Abb. 39 (Seite 82) dargestellte Muster.

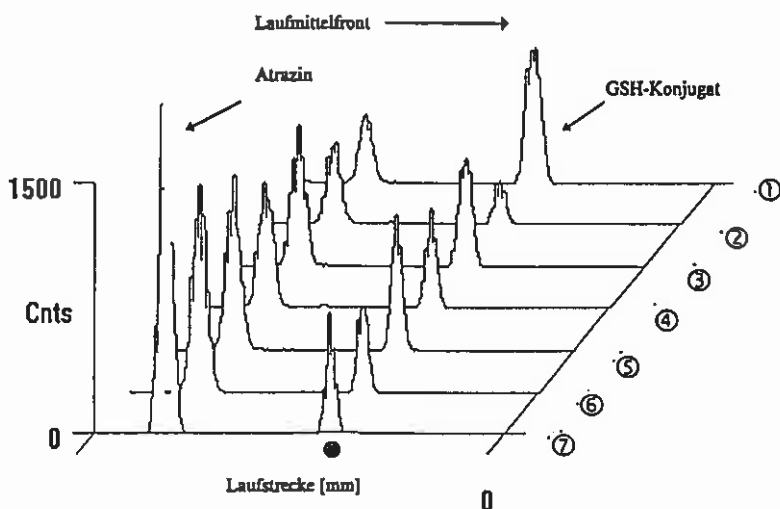


Abb. 35 Radiodünn-schichtchromatogramme der GST-Testansätze mit Atrazin als Substrat in den unterschiedlichen Pflanzenabteilungen. Der ● markiert die Lage des Standardkonjugates S-(p-Nitrobenzyl)GSH unter UV-Licht sowie des Fluorodifen- und des trans-Zimtsäurekonjugates. ① *Glycine max*, ② *Sequoiadendron giganteum*, ③ *Lycopodium annotinum*, ④ *Marchantia polymorpha*, ⑤ *Enteromorpha bulbosa*, ⑥ *Laminaria digitata*, ⑦ *Chondrus crispus*.

Tab. 15 Identifizierung der GSH-Konjugate von Fluorodifen und Atrazin durch Dünnschichtchromatographie in Laufmittel LM 4 und Vergleich mit einem Standardkonjugat sowie mit Literaturstellen. R_f -Werte aus der Literatur ¹⁾ Lamoureux & Rusness (1986), ²⁾ Schröder *et al.* (1990).

Abteilung	R_f Fluorodifen-GSH-Konjugat	Literatur- R_f	R_f Atrazin-GSH-Konjugat	Literatur- R_f
Zellkultursystem	0,42	0,43 ¹⁾ -0,45 ²⁾	0,38	0,38
<i>Glycine max</i>				
Spermatophyta	0,44	0,43-0,45	0,39	0,38
<i>Sequoiadendron giganteum</i>				
Pteridophyta	0,44	0,43-0,45	0,38	0,38
<i>Lycopodium annotinum</i>				
Bryophyta	0,42	0,43-0,45	0,39	0,38
<i>Marchantia polymorpha</i>				
Chlorophyta	0,43	0,43-0,45	0,37	0,38
<i>Enteromorpha bulbosa</i>				
Chromophyta	0,43	0,43-0,45	0,37	0,38
<i>Laminaria digitata</i>				
Rhodophyta	0,44	0,43-0,45	0,38	0,38
<i>Chondrus crispus</i>				

1.2.2 Mikrosomale Glutathion S-Transferase

Die Aktivitätsbestimmung der mGST mit den Modells substraten CDNB, IDNB, DCNB, pNBC und EPNP ergab im Screening folgendes Bild (Abb. 36, Seite 80 und Abb. 37, Seite 81).

Im mikrosomalen System konnte die GST-Aktivität mit CDNB in allen untersuchten Pflanzenspezies nachgewiesen werden. Dabei lagen die Aktivitäten im Bereich von 0,1 bis 42,8 nkat/mg Protein. Das Modellsystem *Glycine max* hatte dabei die höchste mGST-Aktivität für dieses Substrat mit 42,8 nkat/mg Protein. Niedrige Enzymaktivitäten wurden in der Abteilung Pteridophyta gemessen, sie lagen im Schnitt bei 0,1 nkat/mg Protein (*Equisetum arvense*) bis 2,7 nkat/mg Protein (*Lycopodium annotinum*). Ein Maximalwert von 3,8 nkat/mg Protein wurde in *Equisetum hyemale* beobachtet.

Die mGST-Aktivitäten mit dem Substrat IDNB, die um den Faktor 10-20 höher lagen als in den Pteridophyta, wurden in den marinen Algen der Abteilung Chlorophyta bestimmt. Hier wurden Aktivitätsspitzen von 36,3 nkat/mg Protein für *Ulva lactuca* und 92,2 nkat/mg Protein für *Enteromorpha bulbosa* bestimmt. Die Abteilung Chromophyta zeigte zum einen Aktivitäten um 1,7 nkat/mg Protein (*Ascophyllum nodosum*) bis 2,7 nkat/mg Protein (*Laminaria saccharina*) und zum anderen 10-fach höhere mGST-Aktivitäten mit 23,9 nkat/mg Protein für *Laminaria hyperborea* und 29,3 nkat/mg Protein für *Laminaria digitata*. Beide Algen gehören in die Klasse der Laminariales. Die Spezies der Klasse Fucales zeigten sehr geringe mGST-Aktivitäten (unter 1 nkat/mg Protein) für dieses Substrat. Die höchste mGST-Aktivität in der Abteilung der Rhodophyta wurde bei *Cystoclonium purpureum* mit 29,4 nkat/mg Protein gemessen.

Auch mit DCNB als Substrat konnte im mikrosomalen GST-Enzymsystem in sehr vielen Spezies Aktivität bestimmt werden (Abb. 36, Seite 80 und Abb. 37, Seite 81). In der Regel lagen die Aktivitäten aber im Bereich unter 4 nkat/mg Protein. Aktivitätsspitzen für die Messung mit diesem Modells substrat konnten im Modellsystem Zellsuspensionskultur bei *Glycine max* mit 2,9 nkat/mg Protein, im Modellsystem Spermatophyta bei *Sequoiadendron giganteum*, einem Vertreter aus der Klasse der Gymnospermae, mit 2,2 nkat/mg Protein und bei *Lycopodium annotinum* aus der Abteilung der Pteridophyta mit 2,2 nkat/mg Protein bestimmt werden. In der Abteilung der Bryophyta wurden die höchsten Aktivitäten bei *Marchantia polymorpha* (4,2 nkat/mg Protein) und *Conocephalum conicum* (3,4 nkat/mg Protein), beides Spezies aus der Klasse der Hepaticae, gemessen.

Die Verwendung von pNBC als mGST-Substrat zeigte hohe Aktivitäten vor allem im Bereich der Spermatophyta (Abb. 37, Seite 80 und Abb. 38, Seite 81). Hier wurde im Extrakt von *Sequoiadendron giganteum* eine mGST-Aktivität von 6,5 nkat/mg Protein für dieses Modellsubstrat bestimmt.

In der Abteilung der Pteridophyta bei *Azolla filiculoides* (3,3 nkat/mg Protein) bei dem den Cycadatae *Cycas revoluta* (3,5 nkat/mg Protein) konnten vergleichbare Enzymaktivitäten gemessen werden. Bei der Abteilung Bryophyta sind es vor allem die Vertreter der Klasse Hepaticae, nämlich *Marchantia polymorpha* mit 2,2 nkat/mg Protein und *Conocephalum conicum* mit 1,0 nkat/mg Protein, bei denen mit pNBC die mGST-Aktivität bestimmt werden konnte. Das aquatische Moos *Fontinalis antipyretica*, eine Spezies aus der Klasse der Musci, zeigte als einziger Vertreter dieser Klasse der Bryophyten mGST-Aktivität mit diesem Modellsubstrat. Während in allen untersuchten Vertretern der Abteilung Mycobionta keine Enzymaktivität mit pNBC bestimmt werden konnte, zeigten bei den marinen Makroalgen drei Arten der Chlorophyta, *Caulerpa mexicana* mit 6,5 nkat/mg Protein, *Ulva lactuca* mit 2,1 nkat/mg Protein und *Enteromorpha compressa* mit 1,8 nkat/mg Protein, bei den Chromophyta nur zwei Arten, *Laminaria saccharina* mit 0,3 nkat/mg Protein und *Halydris siliquosa* mit 4,1 nkat/mg Protein, und schließlich bei den Rhodophyta drei Spezies, *Chondrus crispus* mit 8,2 nkat/mg Protein, *Plocamium cartilagineum* mit 2,6 nkat/mg Protein und *Porphyra umbilicalis* mit 0,7 nkat/mg Protein, Aktivität für dieses Substrat.

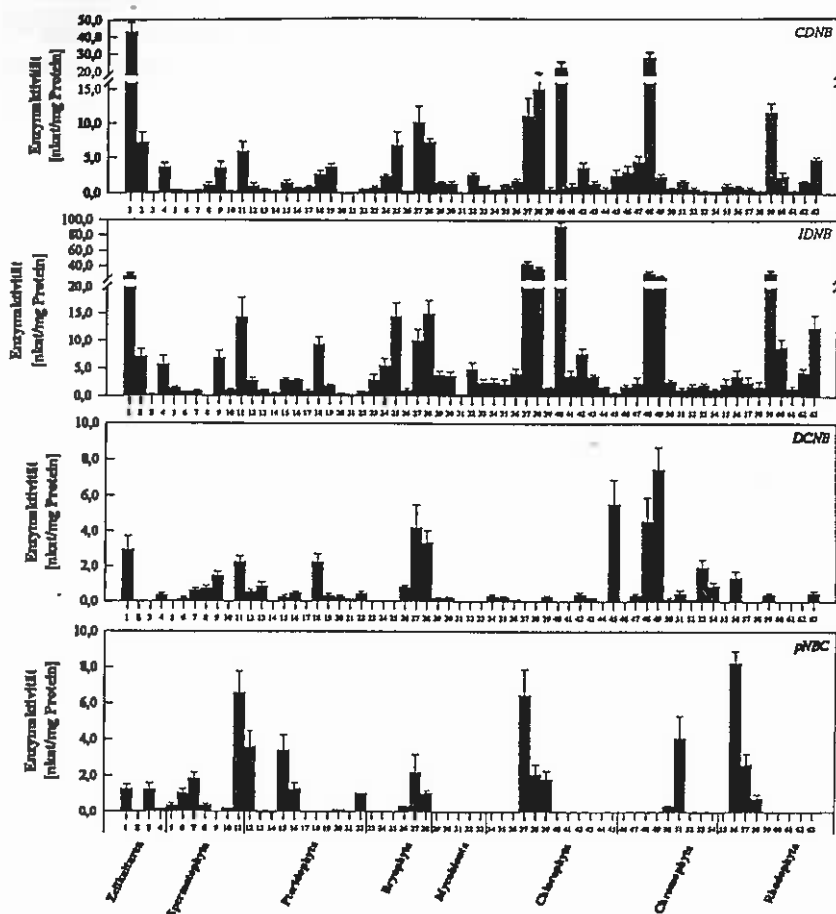


Abb. 36 Aktivitätsverteilung der mGST in der Mikrosomenfraktion der untersuchten Pflanzenspezies mit den Modells substraten CDNB, IDNB und DCNB für die Arylsubstrate und pNBC für die Alkylsubstrate. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$). Die Zahlen der Abszisse stehen für die einzelnen Pflanzenspezies und sind in Tab. 5, Seite 25 aufgelistet. Mit EPNP konnte in keiner der untersuchten Pflanzenspezies in der mikrosomalen Fraktion GST-Aktivität bestimmt werden.

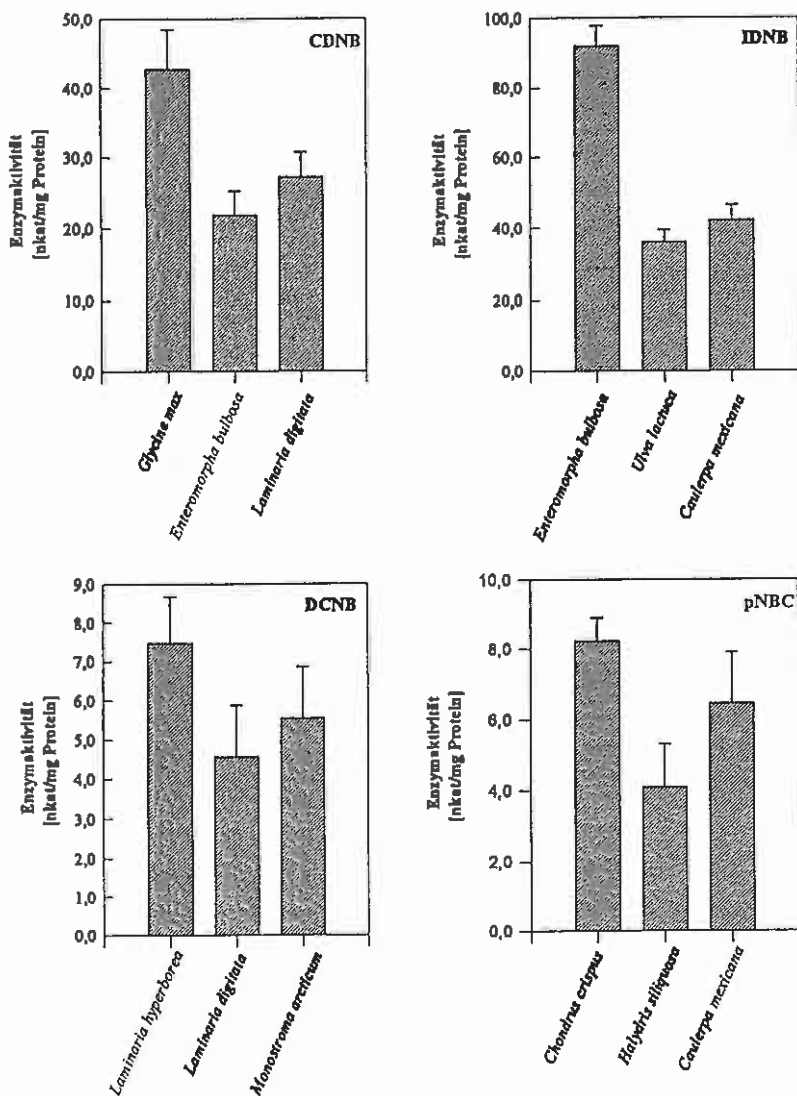


Abb. 37 Maximal gemessene Aktivitäten des mGST-Systems, bestimmt mit den Modellsubstraten CDNB, IDNB, DCNB und pNBC. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Mit dem in diesem Screening verwendeten endogenem Substrat der GST, der trans-Zimtsäure, ergab sich die in Abb. 38 und Abb. 39 dargestellte Aktivitätsverteilung. Da die Mikrosomenfraktion der untersuchten Pflanzenspezies auch für Messungen des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems verwendet wurde, konnten hier keine weiteren xenobiotischen Substrate wie die beiden Herbizide Atrazin und Fluorodifen zur Messung der mGST-Aktivität herangezogen werden.

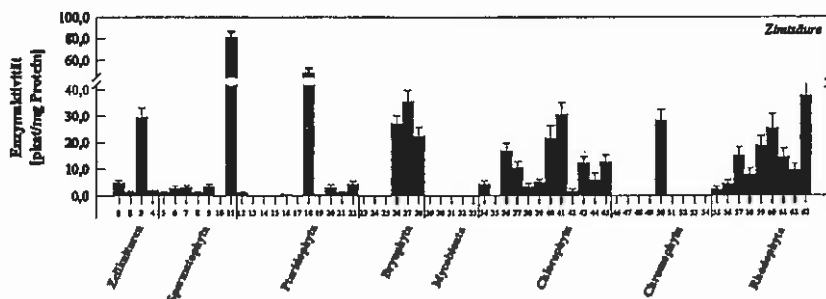


Abb. 38 Aktivitätsverteilung der mGST mit dem endogenen Substrat trans-Zimtsäure nach der Methode von Diesperger & Sandermann (1979) in den Modellsystemen Zellsuspensionskulturen und höhere Pflanzen (Spermatophyta) sowie in den niederen Pflanzen der Abteilungen Pteridophyta, Bryophyta, Mycobionta und den Algen der Abteilungen Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$). Die Zahlen der Abszisse stehen für die einzelnen Pflanzenspezies und sind in Tab. 5, Seite 25 aufgelistet.

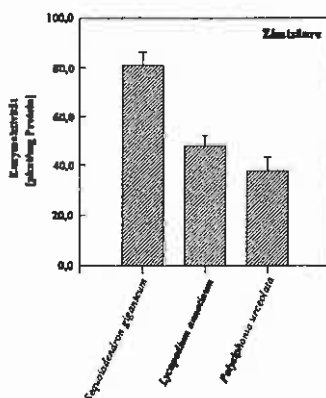


Abb. 39 Maximal gemessene Aktivität des mGST-Systems, bestimmt mit dem endogenen Substrat trans-Zimtsäure. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Die mGST-Aktivität für dieses Substrat war in den als Modellsystem verwendeten Zellsuspensionskulturen und Spermatophyta zu messen. Nur in der Mikrosomenfraktion von *Rhus thyphina* konnte keine GST-Aktivität für die trans-Zimtsäure bestimmt werden. Im System der Zellsuspensionskulturen wurde mit 29,5 pkat/mg Protein die höchste Enzymaktivität gemessen. Die Aktivitäten der anderen Zellkultursysteme liegen um den Faktor 5 (*Glycine max*), bzw. 20 (*Triticum aestivum* und *Picea abies*) niedriger. Die mGST-Aktivitäten in der Abteilung der Spermatophyta liegen im Bereich von 1,2 nkat/mg Protein (*Lemna minor*) bis 3,3 pkat/mg Protein (*Gingko biloba*). Ein 50-80-fach höherer Umsatz konnte in *Sequoiadendron giganteum*, einem Vertreter der Klasse der Gymnospermae, mit 81,2 pkat/mg Protein nachgewiesen werden. In der Abteilung Pteridophyta wurden mGST-Aktivitäten mit trans-Zimtsäure hauptsächlich in der Klasse der Articulatae (Schachtelhalmgewächse) gemessen. Dort wurden Aktivitäten von 0,2 pkat/mg Protein (*Equisetum hyemale*) bis 4,2 pkat/mg Protein (*Equisetum giganteum*) bestimmt. In der Klasse der Filicatae (Farngewächse) konnte nur in *Selaginella lepidophylla* Aktivität mit 0,5 pkat/mg Protein für dieses Substrat gemessen werden. Die höchste mGST-Aktivität der Pteridophyta-Abteilung wurde in dem einzigen Vertreter der Lycopodiatae (Bärlappgewächse) *Lycopodium annotinum* mit 47,8 pkat/mg Protein nachgewiesen. Die untersuchten Spezies der Bryophyta zeigten fast eine exakte Zweiteilung der mGST-Aktivität für die trans-Zimtsäure. Hier konnte in der Klasse der Musci (Laubmoose) nur in dem aquatischen Moos *Fontinalis antipyretica* eine Enzymaktivität mit 27,2 pkat/mg Protein gemessen werden. Alle anderen untersuchten Vertreter der Musci (Laubmoose) konnten die trans-Zimtsäure unter den verwendeten Testbedingungen nicht mit GSH konjugieren. In der Klasse der Hepaticae (Lebermoose) wurde in beiden untersuchten Spezies hohe mGST-Aktivität gefunden. Sie lag bei *Marchantia polymorpha* bei 35,4 pkat/mg Protein und bei *Conocephalum conicum* bei 22,3 pkat/mg Protein.

In der Abteilung Mycobionta war kein Vertreter in der Lage, trans-Zimtsäure als mGST-Substrat zu nutzen. Dagegen nahm die Fähigkeit, die trans-Zimtsäure als endogenes GST-Substrat zu konjugieren, in der Abteilung der Chlorophyta wieder zu. Hier wurden Aktivitäten von 0,1 pkat/mg Protein (*Chlorella fusca*) bis 30,5 pkat/mg Protein (*Cladophora rupestris*) gemessen. Im Gegensatz hierzu konnte in der Abteilung Chromophyta nur in einer einzigen Spezies, *Laminaria saccharina* (28,2 pkat/mg Protein), die trans-Zimtsäure konjugiert werden. *Laminaria saccharina* war der einzige im Labor (AWI, Bremerhaven) angezogene Vertreter der Chromophyta. In der Abteilung der Rhodophyta zeigte sich aber wiederum in allen untersuchten Arten mGST-Aktivität für dieses Substrat. Die erzielten

Aktivitäten lagen dabei im Bereich von 2,3 pkat/mg Protein (*Delesseria sanguinea*) bis 25,2 pkat/mg Protein (*Iridaea cordata*).

In der Mikrosomenfraktion konnte in keiner der im Screening untersuchten Pflanzenarten mEPNP-GST bestimmt werden.

1.2.2.1 Hasse-Diagramm der mGST

Analog zum P-450-System wurden hier die Aktivitäten der mGST in den Pflanzenabteilungen bzw. -klassen mit den Substraten CDNB, DCNB, EPNP und trans-Zimtsäure addiert. Die Klassifizierung der Werte erfolgte nach einer Normalverteilungsanalyse. Das berechnete Hasse-Diagramm ist in Abb. 40 zu sehen.

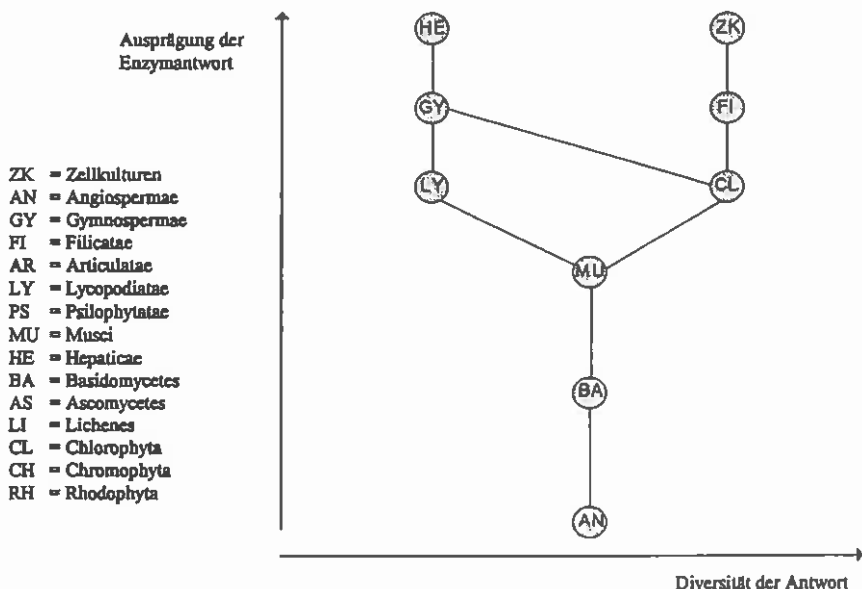


Abb. 40 Hasse-Diagramm der mGST-Aktivität zur Korrelation dieses Enzymsystems mit dem Evolutionsstammbaum der Pflanzen. Eine Linie zwischen zwei Objekten bedeutet, daß diese vergleichbar sind. Objekte, die nicht durch eine Linie miteinander verbunden sind, sind nicht vergleichbar. Äquivalente Objekte sind AN=AR,PS,AS; MU=RH und BA=LI.

Das Hasse-Diagramm der mGST zeigt sechs Objektenebenen. Die Minimale ist durch die Angiospermae (Bedecktsamer), Articulatae (Schachtelhalmgewächse), Psilophytatae (Nacktfarne) und die Ascomycetes (Schlauchpilze) charakterisiert, die Maximalen durch die Hepaticae (Lebermoose) und das Modellsystem der Zellsuspensionskulturen. Ausgehend von den Musci (Laubmoose), die äquivalent zu den Rhodophyta sind, zweigen zum einen die Lycopodiatae (Bärlappe) und zum anderen die Chlorophyta ab. Eine Querverbindung, d.h. eine Vergleichbarkeit beider Äste, wird nur von den Chlorophyta zu den Gymnospermae (Nacktsamer) geschaffen.

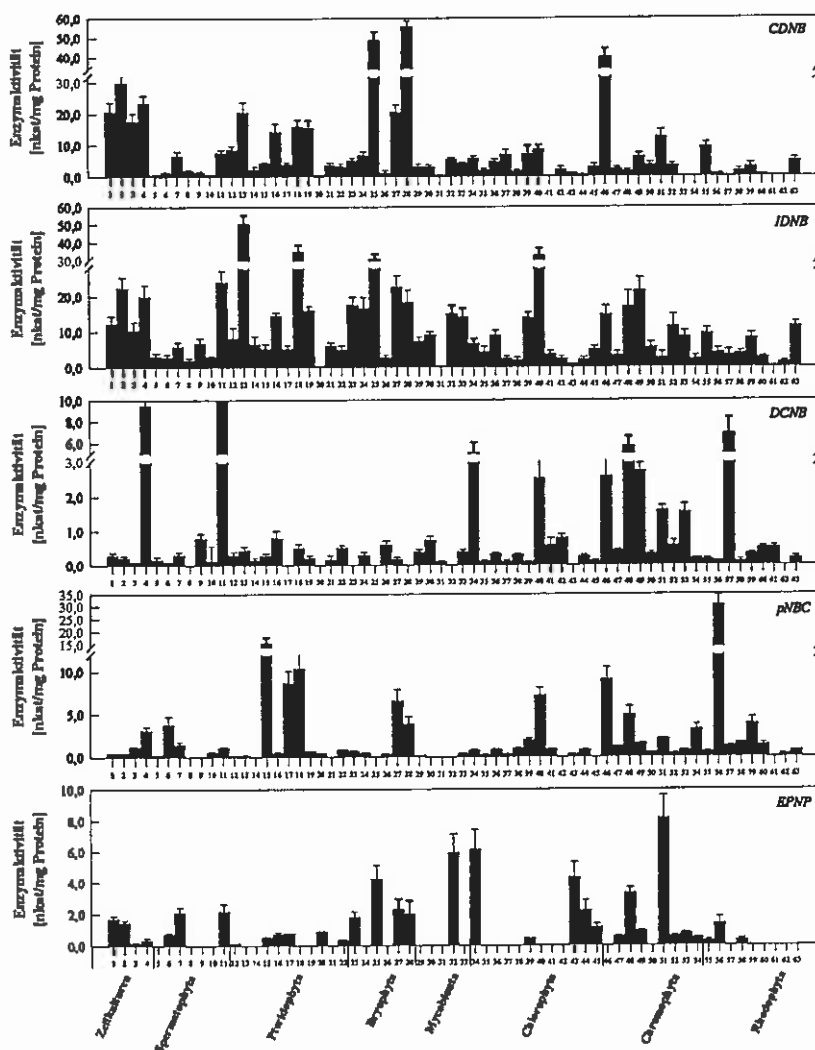
1.2.3 Lösliche Glutathion S-Transferasen

Die Aktivitätsbestimmung der cGST's mit den Modellsubstraten CDNB, IDNB, DCNB, pNBC und EPNP erfolgte nach Methoden von Habig *et al.* (1974) und Fjelstedt *et al.* (1973). Das mit diesen Substraten durchgeführte Screening ergab folgendes Bild (Abb. 42, Seite 87 und Abb. 43, Seite 88).

Die cGST-Aktivität mit CDNB als Modellsubstrat für die Aryle konnte in allen untersuchten Spezies nachgewiesen werden. Die Vertreter der Spermatophyta zeigten im Vergleich zu den Zellkultursystemen eine um den Faktor 10-20 niedrigere cGST-Aktivität. Während bei den Zellkulturen die durchschnittliche Enzymaktivität bei 17,8 nkat/mg Protein (*Zea mays*) bis 29,8 nkat/mg Protein (*Triticum aestivum*) lag, wurde ein Maximalwert bei den Spermatophyta durch *Sequoiadendron giganteum* mit 7,6 nkat/mg Protein erreicht. In der Abteilung der Pteridophyta wurden cGST-Aktivitäten von 0,7 nkat/mg Protein (*Equisetum arvense*) bis 15,9 nkat/mg Protein (*Lycopodium annotinum*) gemessen. Im Vergleich zu den bisher behandelten Abteilungen wurden in einigen Vertretern der Bryophyta sehr hohe cGST-Aktivitäten nachgewiesen. Besonders die Spezies aus der Klasse der Hepaticae (Lebermoose) zeigten eine gegenüber den anderen Vertretern dieser Abteilung 4-10-fach höhere Enzymaktivität mit CDNB als Substrat. Ein Maximum wird durch *Conocephalum conicum* (Hepaticae) mit 55,7 nkat/mg Protein erzielt. In den Mycobionta konnte in allen untersuchten Spezies, auch in den Doppelorganismen (Pilz/Alge) der Flechten, cGST-Aktivität mit CDNB bestimmt werden. Die Aktivität lag hier mit 5,5 nkat/mg Protein (*Alectoria samentosa*) und 4,3 nkat/mg Protein (*Peltigera aphthosa*) auf demselben Aktivitätslevel wie bei den Spezies der Bryophyta. In den Makroalgen war die cGST-Aktivität in den Spezies der Chlorophyta und Chromophyta in etwa gleich. So wurden Enzymaktivitäten von 0,3 nkat/mg Protein (*Cladophora rupestris*, Chlorophyta) bis 6,2 nkat/mg Protein (*Laminaria hyperborea*, Chromophyta) gemessen. Aktivitätsspitzen, die 2-10-fach höher lagen als die restlichen Enzymaktivitäten, wurden bei den Chromophyta und hier bei *Halydris siliquosa* (12,6 nkat/mg Protein) und *Ascophyllum nodosum* (39,8 nkat/mg Protein) nachgewiesen. Die Vertreter der Rhodophyta zeigten bis auf wenige Ausnahmen eine etwa um das 2-fache niedrigere Aktivität im Vergleich zu den Chlorophyta und Chromophyta. Ein Maximalwert in dieser Abteilung wurde von *Delesseria sanguinea* mit 9,4 nkat/mg Protein erzielt.

Das zweite Modellsubstrat IDNB soll wie das CDNB die Gruppe der Aryl-Substanzen repräsentieren. Auch hier zeigte sich in allen Abteilungen ein ähnliches Aktivitätsmuster der

cGST wie bei CDNB (Abb. 41). Im Schnitt konnte eine sehr ähnliche Aktivitätshöhe wie bei IDNB beobachtet werden.



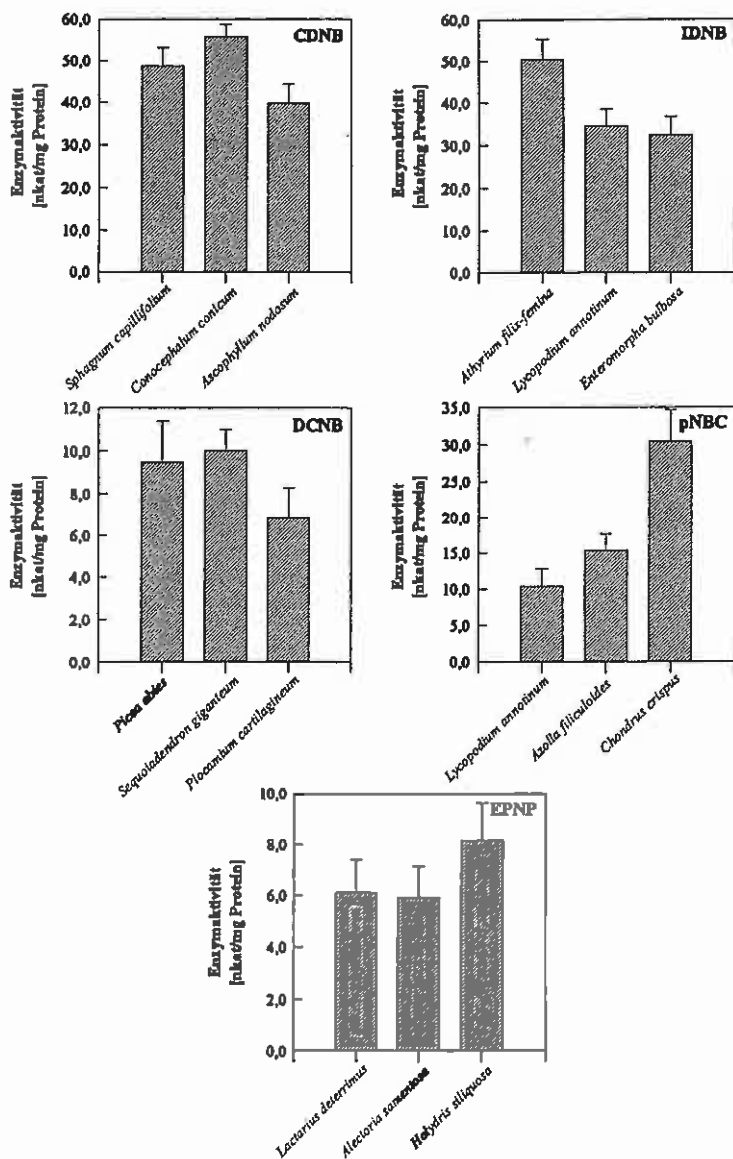


Abb. 42 Maximal gemessene Aktivitäten des cGST-Systems mit den Modellsubstraten CDNB, IDNB, DCNB, pNBC und EPNP. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Aktivitätsspitzen wurden beispielsweise in *Athyrium filix-femina* (Pteridophyta) mit 50,4 nkat/mg Protein, in *Lycopodium annotinum* (Pteridophyta) mit 34,5 nkat/mg Protein und in *Enteromorpha bulbosa* (Chlorophyta) mit 32,4 nkat/mg Protein gefunden.

Nach Habig *et al.* (1974) kann im tierischen System mit dem Modellsubstrat DCNB ein bestimmtes Isoenzym der cGST bestimmt werden. Im Screening konnte mit diesem Substrat bis auf wenige Ausnahmen ebenfalls in allen untersuchten Spezies cGST-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 41, Seite 87). Diese lag aber im Vergleich zu CDNB oder IDNB um den Faktor 10 niedriger. Im Vergleich zu den übrigen Abteilungen zeigten die Spezies der Abteilung Chromophyta die höchsten Enzymaktivitäten für DCNB. In den löslichen Extrakten von *Laminaria digitata* wurde eine cGST-Aktivität von 5,7 nkat/mg Protein und von *Laminaria hyperborea* eine Aktivität von 2,7 nkat/mg Protein gemessen. Von den untersuchten Rhodophyta-Arten zeigte nur *Plocamium cartilagineum* eine cGST-Aktivität von 6,8 nkat/mg Protein.

Mit dem Alkylmodellsubstrat pNBC wurden in den Zellkultursystemen und in den Spermatophyta-Arten nur sehr geringe Konjugationsraten von 0,2 nkat/mg Protein (*Rosa canina*) bis 3,7 nkat/mg Protein (*Helianthus giganteus*) gemessen (Abb. 41, Seite 87). Höhere cGST-Aktivitäten für dieses Substrat wurden in den Pteridophyta, beispielsweise in *Azolla filiculoides* (15,3 nkat/mg Protein), oder in *Lycopodium annotinum* (10,4 nkat/mg Protein), bestimmt. In den Makroalgen wurden Aktivitätsspitzen bei *Ascophyllum nodosum* (Chromophyta) von 9,1 nkat/mg Protein und *Chondrus crispus* (Rhodophyta) von 30,4 nkat/mg Protein ermittelt.

EPNP als Substrat für die cGST zeigte im Screening der einzelnen Abteilungen große Aktivitätslücken unter den gewählten Testbedingungen (Abb. 41, Seite 87). Es konnte zwar in jeder Abteilung EPNP-Aktivität nachgewiesen werden, doch sind es pro Abteilung nur immer wenige Arten, die in der Lage sind, EPNP mit GSH zu konjugieren. Hohe Aktivität zeigten beispielsweise *Sphagnum capillifolium* mit 4,2 nkat/mg Protein, ein Moos aus der Klasse der Musci (Laubmoose), die Flechte *Alectoria samentosa* mit 5,9 nkat/mg Protein, bei den Makroalgen die limnische *Zygnema sp.* mit 6,1 nkat/mg Protein oder *Halydria siliquosa* aus der Abteilung der Chromophyta mit 8,2 nkat/mg Protein.

Als xenobiotische Substrate wurden die Herbizide Fluorodifen und Atrazin ausgewählt. Die Aktivitätsverteilung der cGST mit diesen Substraten ergab folgendes Bild (Abb. 43 und Abb. 44, Seite 91).

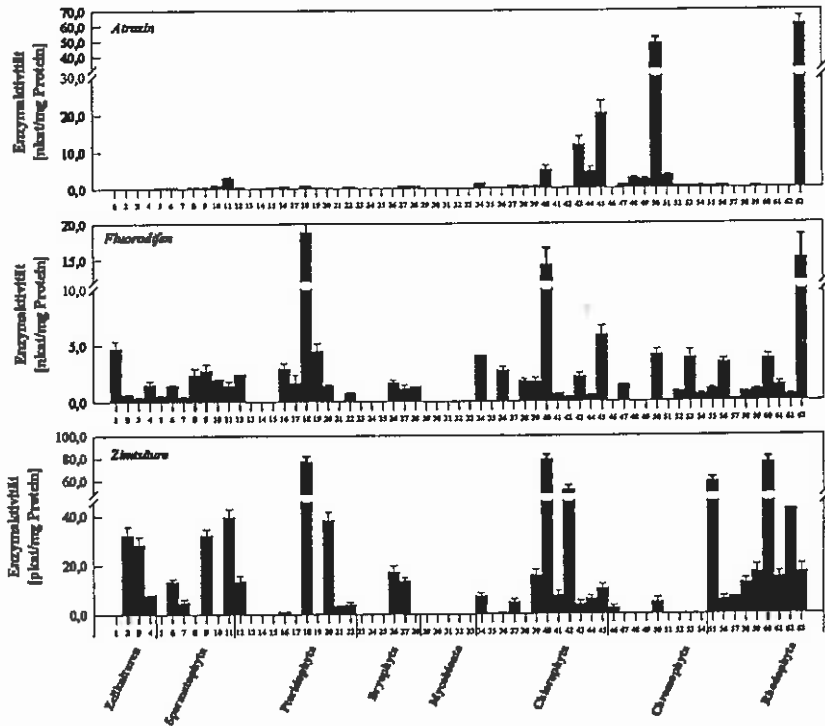


Abb. 43 Aktivitätsverteilung der cGST mit den Herbiziden Fluorodifen und Atrazin und der trans-Zimtsäure als endogenem Substrat. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach den Methoden von Schröder *et al.* (1992) und Jablonkai & Hatzios (1993). Die R_f -Werte für das Konjugat Fluorodifen-GSH lagen bei 0,40 und für das Atrazin-GSH bei 0,38 im Laufmittelsystem LM 4. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Die Enzymaktivität der cGST, gemessen mit dem Herbizid Atrazin, zeigte, daß nur sehr wenige Pflanzenarten in der Lage waren, dieses Herbizid mit GSH zu konjugieren. Auffällig ist aber eine Zunahme der Atrazinkonjugation im Bereich der aquatischen Systeme. Sehr hohe Aktivitäten waren in der Abteilung Chlorophyta bei der arktischen Alge *Monostroma arcticum* mit 20,2 pkat/mg Protein zu finden. In der Abteilung der Chromophyta zeigte *Laminaria saccharina* aus Spitzbergen ein Aktivitätsmaximum mit 47,7 pkat/mg Protein, welches im Vergleich zu anderen Spezies der Chromophyta um das 10-80-fache höher lag.

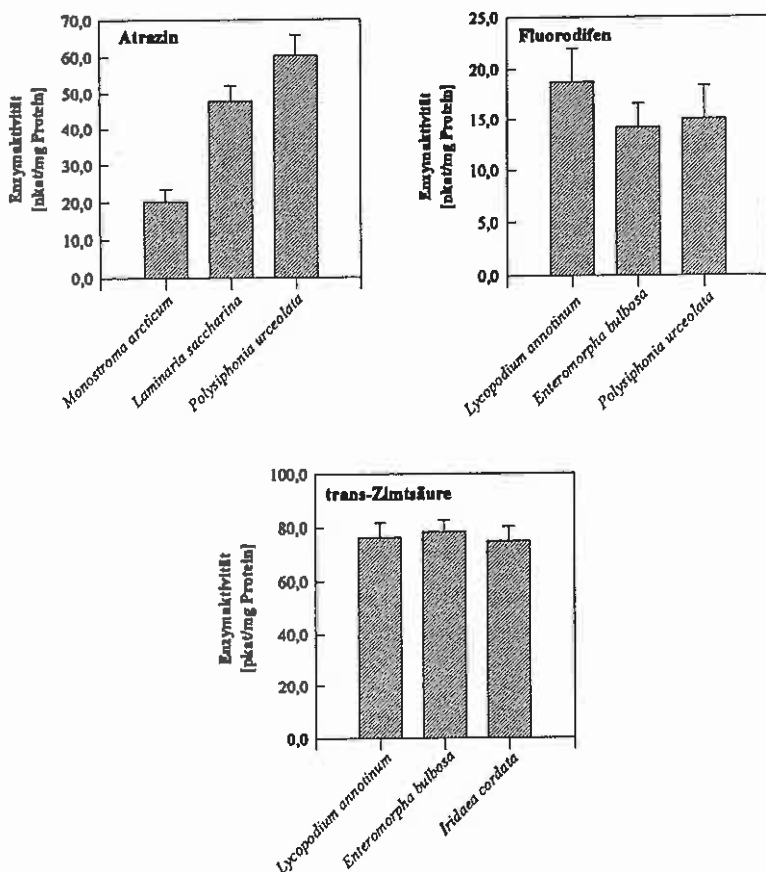


Abb. 44 Maximal gemessene Aktivitäten des cGST-Systems mit den xenobiotischen Substraten Atrazin und Fluorodifen sowie mit dem natürlichen Substrat trans-Zimtsäure. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

In der Abteilung der Rhodophyta konnten cGST-Aktivitäten mit Atrazin nur im Bereich unter 1 pkat/mg Protein gemessen werden. Allerdings zeigte hier *Polysiphonia urceolata* mit 60,5 pkat/mg Protein die höchste GST-Aktivität in allen untersuchten Spezies.

Die Aktivitätsverteilung der cGST mit Fluorodifen, dem zweiten Herbizidsubstrat, zeigt eine gleichmäßig über das Pflanzenreich verteilte Aktivität.

Aktivitätsmaxima wurden bei *Lycopodium annotinum* (Pteridophyta) mit 18,7 pkat/mg Protein und bei den marinen Systemen der Makroalgen bei *Enteromorpha bulbosa* (Chlorophyta) mit 14,1 pkat/mg Protein, bei *Laminaria saccharina* (Chromophyta) mit 4,1 pkat/mg Protein und bei *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) mit 15,0 pkat/mg Protein erreicht. Die einzige Pflanzenabteilung, die keine cGST-Aktivität mit Fluorodifen zeigte, war die Abteilung Mycobionta.

Die Aktivität der cGST, bestimmt mit der trans-Zimtsäure, einem der endogenen Substrate der GST, konnte in fast allen untersuchten Pflanzenabteilungen gezeigt werden (Abb. 44, Seite 90 und Abb. 45, Seite 91). Auch hier ist eine annähernd gleichmäßige Aktivitätsverteilung zu beobachten. Maximalaktivitäten mit diesem Substrat wurden bei *Lycopodium annotinum* (Pteridophyta) mit 47,8 pkat/mg Protein, *Fontinalis antipyretica* (Bryophyta, Musci) mit 27,1 pkat/mg Protein und *Marchantia polymorpha* (Bryophyta, Hepaticae) mit 35,4 pkat/mg Protein gefunden. In der Abteilung Chlorophyta konnten hohe Aktivitäten bei *Enteromorpha bulbosa* mit 21,6 pkat/mg Protein und bei *Cladophora rupestris* mit 30,5 pkat/mg Protein ermittelt werden. Auch in der Abteilung Rhodophyta wurden vergleichbar hohe Aktivitäten bei *Iridaea cordata* mit 25,2 pkat/mg Protein und bei *Polysiphonia urceolata* mit 37,7 pkat/mg Protein bestimmt.

1.2.3.1 Hasse-Diagramm der cGST

Um das Hasse-Diagramm für die cGST zu erstellen, wurde analog wie bei den P450-Aktivitäten vorgegangen. Als Substrate (=Attribute), die für die vergleichende Bewertung herangezogen wurden, wurden CDNB, DCNB, EPNP als Modellsubstrate, Zimtsäure als endogenes Substrat und Atrazin als xenobiotisches Substrat ausgewählt. Auch hier wurde eine Klassifizierung der Werte nach ihrer Normalverteilung durchgeführt.

Das Hasse-Diagramm (Abb. 45, Seite 93) mit der cGST-Aktivität als Attributzuordnung für die einzelnen Pflanzenabteilungen (Objekte) zeigt, daß sieben Objektenebenen gebildet werden. Die Minimale wird durch die Angiospermae (Bedecktsamer), Basidiomycetes (Ständerpilze) und Ascomycetes (Schlauchpilze) definiert. Die maximalen Elemente werden durch die Hepaticae (Lebermoose) und die Chromophyta gebildet.

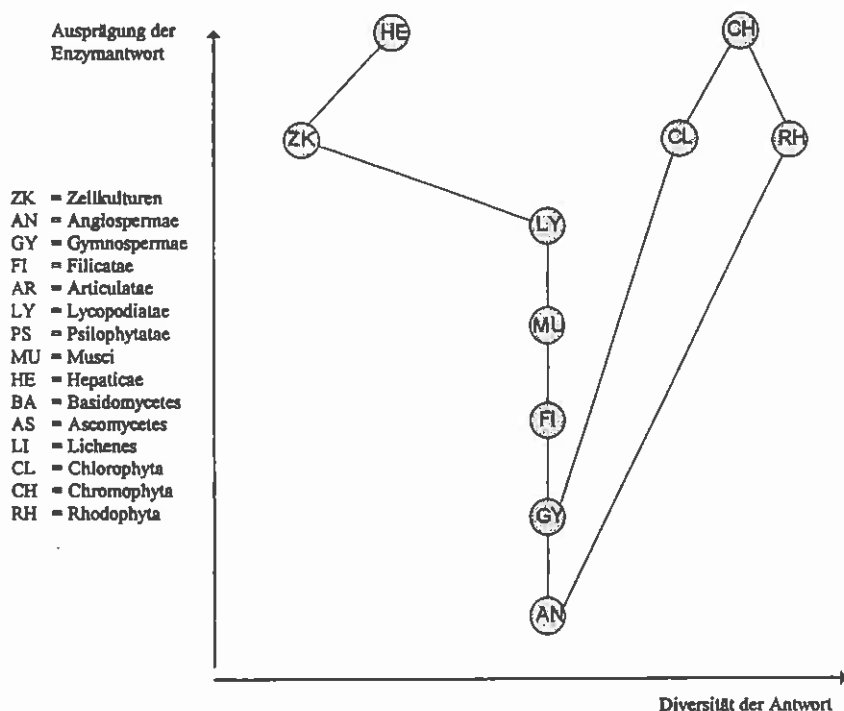


Abb. 45 Hasse-Diagramm der cGST-Aktivität zur Korrelation dieses Enzymsystems mit dem Evolutionsstammbaum der Pflanzen. Eine Linie zwischen zwei Objekten bedeutet, daß diese vergleichbar sind. Objekte, die nicht durch eine Linie verbunden sind, sind nicht vergleichbar. Äquivalente Objekte sind AN=BA=AS, GY=AR=PS=LI.

Die Angiospermae (Bedecktsamer), Gymnospermae (Nacktsamer), Filicatae (Farngewächse), Musci (Laubmoose) und Lycopodiatae (Bärlappe) unterscheiden sich nur durch die Höhe der Enzymaktivität (gerader Linienzug). Die Chlorophyta, Rhodophyta und das Modellsystem der Zellsuspensionskulturen stehen auf der gleichen Enzymaktivitätsebene. Allerdings ist die Verzweigung der Objekte und somit auch die Vergleichbarkeit unterschiedlich. Die Rhodophyta-Arten sind mit den Angiospermae (Bedecktsamer), Basidiomycetes (Ständerpilze) und Ascomycetes (Schlauchpilze) vergleichbar, die Chlorophyta-Arten mit den Gymnospermae (Nacktsamer), Articulatae (Schachtelhalmgewächse), Psilophytatae (Nacktfarne) und Lichenes (Flechten). Dagegen zweigen die Zellkultursysteme und die Hepaticae (Lebermoose) erst zwei Ebenen höher bei den Lycopodiatae (Bärlappe) ab.

Da sich die Hasse-Diagramme der mGST und der cGST auf den ersten Blick nicht gleichen wurden beide Diagramme einem Diagrammvergleich unterzogen. Dabei wurden alle möglichen Vergleichbarkeiten beider Diagramme aufgelistet und die Gleichheit bzw. Ungleichheit der beiden Diagramme mit der folgenden Formel berechnet:

(Gleichung 13)

$$\Gamma = (P-A) / (P+W+A)$$

wobei P = Anzahl der Übereinstimmungen der beiden Diagramme

A = Anzahl der Nichtübereinstimmung der beiden Diagramme

W = Anzahl der Widersprüche der beiden Diagramme

Zur Berechnung von Γ wurde jedes Objekt der beiden Hasse-Diagramme mit allen anderen Objekten in dem jeweiligen Diagramm verglichen und tabellarisch aufgelistet. Am Beispiel des Objekts der Angiospermae soll dies kurz verdeutlicht werden:

Hasse-Diagramm der mGST

AN = AR

AN = PS

AN = AS

AN ≤ BA

AN ≤ MU

AN ≤ LY

AN ≤ GY

AN ≤ HE

AN ≤ CL

AN ≤ FI

AN ≤ ZK

AN ≤ RH

AN ≤ LI

AN ≤ CH

Hasse-Diagramm der cGST

AN = BA

AN = AS

AN ≤ GY

AN ≤ FI

AN ≤ MU

AN ≤ LY

AN ≤ ZK

AN ≤ HE

AN ≤ RH

AN ≤ CL

AN ≤ CH

AN ≤ AR

AN ≤ PS

AN ≤ LI

A

A

P

A

P

P

P

P

P

P

P

P

P

P

Als Widerspruch wäre beispielsweise der Fall $AN \geq MU$ definiert.

Für Γ wurde bei dem Vergleich der beiden Hasse-Diagramme der Faktor 0,61 berechnet. Dieser setzte sich aus 58 Übereinstimmungen (=P), 8 Nichtübereinstimmungen (=A) und 16 Widersprüchen (=W) zusammen. Der Faktor Γ wäre bei einer 100 %-igen Übereinstimmung der beiden Diagramme 1,0.

Der Faktor Γ der beiden Diagramme zeigt, daß hier doch trotz verschiedener Struktur der Objektcharakterisierungen eine relativ große Übereinstimmung existiert.

1.3 Glucosyltransferasen

1.3.1 Testsystem und Produktidentifizierung

Im System der Glucosyltransferasen sind für xenobiotische Substrate bisher nur sehr wenige kinetische Konstanten bestimmt worden. Für das Substrat PCP wurde von Sandermann *et al.* (1991) ein K_m von 30 μM in Extrakten aus Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* angegeben. Für das Substrat DDA wurde ein K_m von 190 μM in gereinigten Enzymextrakten aus *Glycine max* bestimmt (Wetzel & Sandermann, 1994). Da in den in dieser Arbeit verwendeten Enzymtests mit Konzentrationen größer 5-mal K_m gearbeitet wurde, kann in der Regel davon ausgegangen werden, daß hier die Aktivitätsbestimmung im V_{max} -Bereich durchgeführt wurde.

Die Produktidentifizierung wurde mittels TLC-Analyse und Bestimmung der R_f -Werte des Substrates bzw. der entstandenen Metabolite vorgenommen. Die R_f -Werte wurden mit Literaturwerten in gleichen Laufmittelsystemen verglichen (Tab. 16).

Tab. 16 Identifizierung der ^{14}C -markierten Glucosid-Metabolite durch Auftrennung auf TLC in verschiedenen Laufmittel-Systemen und Vergleich der R_f -Werte mit Literaturdaten.

	Laufmittel	R_f -Wert	Literatur R_f	Literaturzitat
$[^{14}C]$ -PCP	LM 1	0,90	0,90	Sandermann <i>et al.</i> (1991)
$[^{14}C]$ -PCP-Glc	LM 1	0,35	0,35	Sandermann <i>et al.</i> (1991)
$[^{14}C]$ -DCA	LM 1	0,80	0,80	Sandermann <i>et al.</i> (1991)
$[^{14}C]$ -DCA-Glc	LM 1	0,05	0,05	Sandermann <i>et al.</i> (1991)
$[^{14}C]$ -UDP-Glc	LM 1	0,22	0,22	Sandermann <i>et al.</i> (1991)
$[^{14}C]$ -2,3,4-TCP-Glc	LM 1	0,42	0,40	Eckey (1987)
$[^{14}C]$ -2,4,5-TCP-Glc	LM 1	0,42	0,40	Eckey (1987)
$[^{14}C]$ -IAA-Glc	LM 1	0,44	0,45	Eckey (1987)
$[^{14}C]$ -DDA	LM 4	0,88	0,88	Wetzel & Sandermann (1994)
$[^{14}C]$ -DDA-Glc	LM 4	0,51	0,50-0,52	Wetzel & Sandermann (1994)
$[^{14}C]$ -3-CA-Glc	LM 1	0,06	0,05	Sandermann <i>et al.</i> (1991)
$[^{14}C]$ -4-CTP-Glc	LM 1	0,74	0,75	Eckey (1987)

Um die entstandenen glucosidierten Produkte vor der Spaltung durch endogene Glucosidasen zu schützen, wurde dem Testansatz Salicin und 4-NPG zugesetzt. Da aber diese Schutzsubstanzen inhibitorische Wirkung auf die zu messenden Enzyme haben können, wurde die Konzentration der beiden Stoffe im Vergleich zur Literatur (Sandermann *et al.*, 1991, Wetzl & Sandermann, 1994) von 2,5 mM auf 1,2 mM gesenkt. Zusätzlich wurden bei Enzymtests mit wenig Protein diese Substanzen weggelassen.

Weitere Identifizierung des S-GT-Metaboliten

Da keine Referenzsubstanz zu Verfügung stand, wurde der entstandene Metabolit mit einer käuflichen β -Glucosidase gespalten. Hierfür wurde die unter 2.3.3.5.1 beschriebene Methode von Wetzl (1993) verwendet. Dann wurden die organischen Extrakte dünnschichtchromatographisch im Laufmittel LM 1 aufgetrennt (Abb. 46).

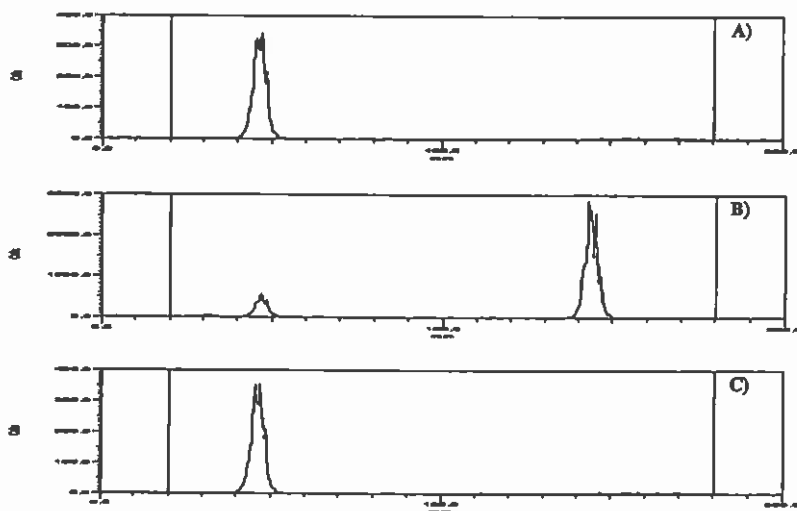


Abb. 46 Dünnschichtchromatogramme der S-Glucosididentifizierung. A) ^{14}C -UDP-Glc B) mit 4-CTP gebildetes Konjugat C) Probe nach Spaltung durch die β -Glucosidase. Es ist nur noch die markierte Glucose zu sehen.

1.3.2 O-Glucosyltransferasen

Die nach der Methode von Sandermann *et al.* (1991) und Wetzl & Sandermann (1994) durchgeführten Messungen der O-Glucosyltransferase in den verschiedenen Pflanzenspezies ergeben folgendes Bild (Abb. 48, Seite 98 und Abb. 49, Seite 99).

PCP kann als Substrat der O-GT nur von den Zellkultursystemen (*Glycine max*, *Triticum aestivum* und *Picea abies*) und von Pflanzen der Abteilungen Spermatophyta (*Helianthus giganteus*, *Rosa canina*, *Ginkgo biloba*, *Cycas revoluta*) und Pteridophyta (*Azolla filiculoides*, *Selaginella lepidophylla*, *Psilotum nudum*, *Lycopodium annotinum*, *Equisetum hyemale*, *Equisetum giganteum*) zum Glucosid umgesetzt werden. Sehr hohe PCP-O-GT-Aktivitäten zeigten sich im Modellsystem der Zellkulturen bei *Glycine max* (7,7 pkat/mg Protein) und bei *Lycopodium annotinum* (11,8 pkat/mg Protein). Sämtliche niederen Pflanzen der Abteilungen Bryophyta, der Pilze Mycobionta und der Algen Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta sind, unter den gewählten Testbedingungen, nicht in der Lage, PCP umzusetzen.

Die O-GT-Aktivitäten mit 2,3,4-TCP und 2,4,5-TCP ähneln sich vom Aktivitätsmuster her und zeigen in fast allen Pflanzenspezies der verschiedenen Pflanzenklassen enzymatische Aktivität. Auffällig ist das völlige Fehlen einer O-GT-Aktivität für diese Substrate bei den Mycobionta. Hohe Enzymaktivitäten für beide Substrate sind in Extrakten einiger Spermatophyta wie beispielsweise bei *Salicornia europaea* (32,4 pkat/mg Protein für 2,3,4-TCP und 45,3 pkat/mg Protein für 2,4,5-TCP), *Lemna minor* (35,1 pkat/mg Protein für 2,3,4-TCP und 65,0 pkat/mg Protein für 2,4,5-TCP) und *Ginkgo biloba* (35,0 pkat/mg Protein für 2,3,4-TCP und 40,9 pkat/mg Protein für 2,4,5-TCP) zu finden.

In den Spezies der Spermatophyta bzw. der Pteridophyta konnte die O-GT mit beiden Substraten in Aktivitäten von 0,4 pkat/mg Protein (2,3,4-TCP, *Lycopodium annotinum*) bis 25,3 pkat/mg Protein (2,3,4-TCP, *Cycas revoluta*) bzw. 1,1 pkat/mg Protein (*Lycopodium annotinum*) bis 39,2 pkat/mg Protein (*Cycas revoluta*) gemessen werden.

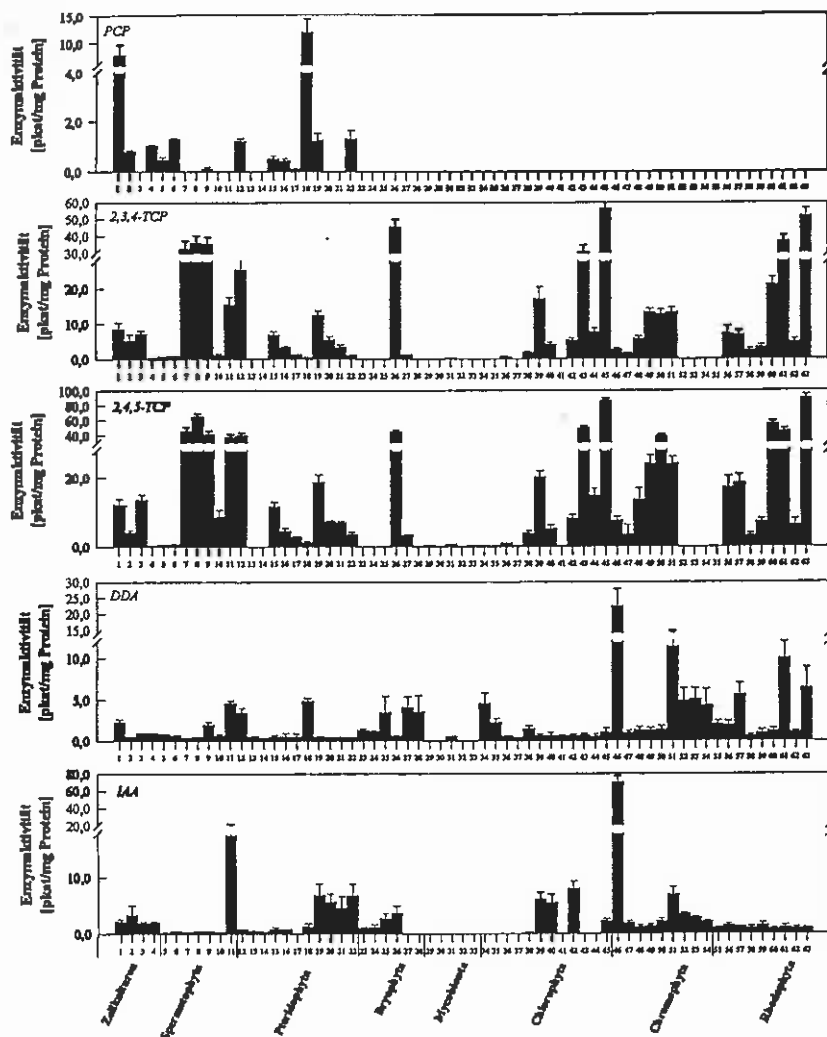


Abb. 47 Screening der O-GT-Aktivität, bestimmt nach den Methoden von Sandermann *et al.* (1991) und Wetzel & Sandermann (1994) in den Modellsystemen Zellsuspensionskulturen und höhere Pflanzen (Spermatophyta) sowie in den niederen Pflanzen der Abteilungen Pteridophyta, Bryophyta, der Pilze Mycobionta und der Algen Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta mit unterschiedlichen xenobiotischen Substraten und IAA als einem der natürlichen Substrate für die O-GT. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$). Die Zahlen der Abszisse stehen für die einzelnen Pflanzenspezies und sind in Tab. 5, Seite 25 aufgelistet.

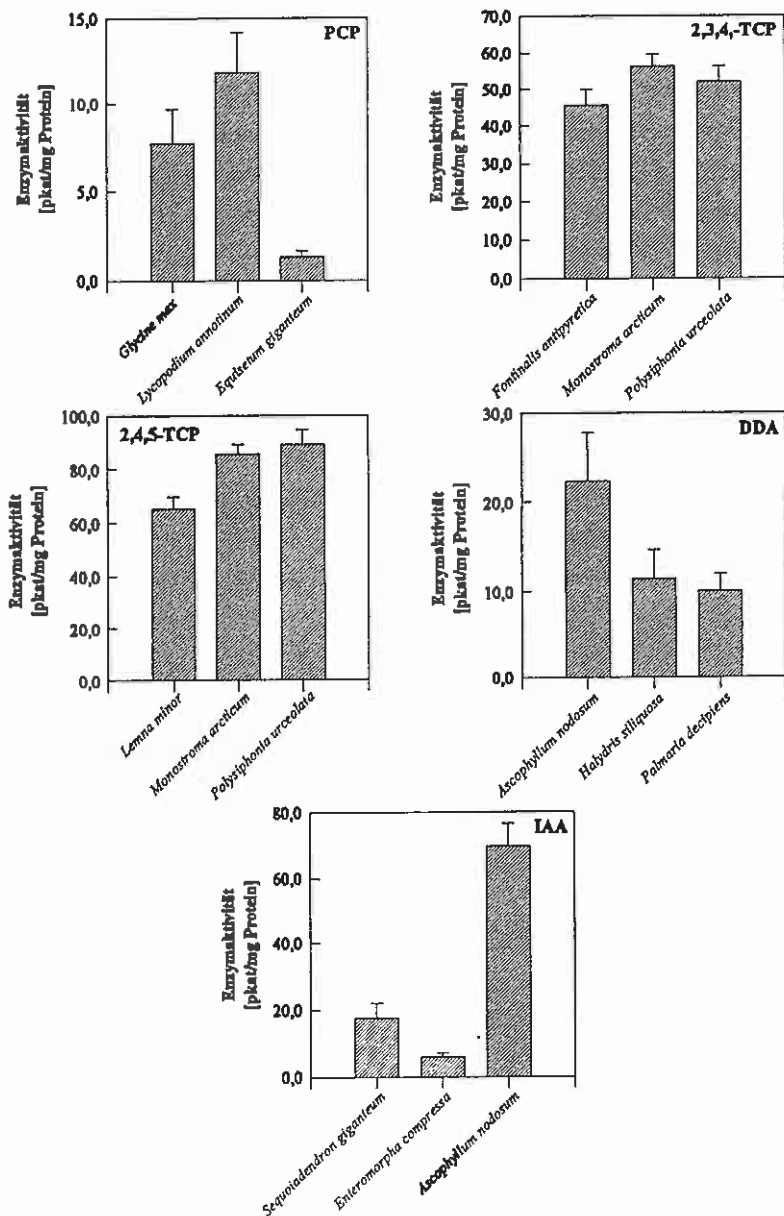


Abb. 48 Maximal gemessene Aktivitäten des O-GT-Systems mit den xenobiotischen Substraten PCP, 2,3,4-TCP, 2,4,5-TCP und DDA sowie mit dem endogenen Substrat IAA. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

In der Abteilung Bryophyta zeigte *Fontinalis antipyretica* als einziges Moos aus der Klasse der Musci (Laubmoose) eine O-GT-Aktivität sowohl mit 2,3,4-TCP (45,5 pkat/mg Protein) als auch mit 2,4,5-TCP (43,9 pkat/mg Protein). Sonst konnte in der Klasse der Musci keine O-GT-Aktivität für diese Substrate nachgewiesen werden. In der Klasse der Hepaticae (Lebermoose) zeigte nur *Marchantia polymorpha* O-GT-Aktivität für beide Substrate in Höhe von 1,2 pkat/mg Protein für 2,3,4-TCP und 3,3 pkat/mg Protein für 2,4,5-TCP. Bei der Abteilung Mycobionta ist nur in Extrakten von *Phanerochaete chrysosporium* O-GT-Aktivität mit den beiden Substraten bestimmbar. Die Enzymaktivitäten liegen mit 0,2 pkat/mg Protein (2,3,4-TCP) und 0,7 pkat/mg Protein (2,4,5-TCP) sehr niedrig im Vergleich zu den bisher untersuchten Pflanzenspezies. Hohe Enzymaktivitäten für beide Substrate sind in einigen Spezies der Chlorophyta zu finden. Maximalwerte wurden bei *Enteromorpha compressa* mit 17,2 pkat/mg Protein für 2,3,4-TCP und 20,0 pkat/mg Protein für 2,4,5-TCP gefunden, sowie bei der antarktischen Alge *Acrosiphonia sonderi* mit 30,2 pkat/mg Protein (2,3,4-TCP) und 49,2 pkat/mg Protein (2,4,5-TCP). Eine im Vergleich zu den Chlorophyta im Durchschnitt um den Faktor 2-3 niedrigere Enzymaktivität mit den Substraten 2,3,4-TCP und 2,4,5-TCP wurde in den Spezies der Abteilung Chromophyta gemessen. Dort liegen die Maximalwerte der O-GT-Aktivität, bestimmt mit 2,3,4-TCP als Substrat, bei 13,4 pkat/mg Protein (*Laminaria hyperborea* und *Halydris siliquosa*) bzw. für 2,4,5-TCP als Substrat bei 37,9 pkat/mg Protein (*Laminaria saccharina*) und 24,0 pkat/mg Protein (*Halydris siliquosa*). In den Spezies der Familie Fucaceae, *Fucus vesiculosus*, *Fucus spiralis* und *Fucus serratus*, konnte mit keinem der beiden Substrate O-GT-Aktivität gemessen werden. In allen untersuchten Vertretern der Abteilung Rhodophyta konnte Enzymaktivität mit den beiden Substraten 2,3,4-TCP und 2,4,5-TCP nachgewiesen werden. Aktivitätsspitzen lagen für das Substrat 2,3,4-TCP bei *Palmaria decipiens* (36,7 pkat/mg Protein) und bei *Polysiphonia urceolata* (51,9 pkat/mg Protein). Für das Substrat 2,4,5-TCP wurden die höchsten Enzymaktivitäten bei *Iridaea cordata* (54,2 pkat/mg Protein) und bei *Polysiphonia urceolata* (89,2 pkat/mg Protein) gemessen.

Wurde DDA, der Metabolit aus dem DDT-Stoffwechsel, als Substrat verwendet, konnte in allen Modellsystemen und in allen Pflanzenklassen O-GT-Aktivität bestimmt werden (Abb. 47, Seite 98 und Abb. 48, Seite 99). Die Aktivitäten, die mit diesem Substrat bestimmt werden konnten, lagen im Durchschnitt bei 0,5-4,5 pkat/mg Protein für die Zellkultursysteme und für die Spermatophyta. Die Vertreter der Pteridophyta, Bryophyta und Mycobionta lagen im

gleichen Aktivitätsbereich, wobei hier ein Maximalwert von 4,8 pkat/mg Protein bei *Lycopodium annotinum* (Pteridophyta) und *Marchantia polymorpha* (Bryophyta) erreicht wurde.

Bei den Makroalgen zeigten die Chlorophyta Enzymaktivitäten, die vergleichbar mit denen der bisher besprochenen Spezies waren. Die Arten der Chromophyta hatten im Durchschnitt die doppelte Enzymaktivität im Vergleich zu den Arten der Chlorophyta. Maximalaktivität konnte in dieser Abteilung in *Ascophyllum nodosum* gemessen werden. In der Abteilung Rhodophyta wurden mit DDA als Substrat für die O-GT durchschnittlich 3-4-fach höhere Enzymaktivitäten als in den Chlorophyta und Chromophyta gefunden. Hohe Enzymaktivität zeigte dabei *Polysiphonia urceolata* (6,4 pkat/mg Protein) und *Palmaria decipiens* (9,9 pkat/mg Protein).

Messungen mit dem natürlichen Substrat IAA zeigten, daß auch mit diesem Substrat in fast allen Pflanzenabteilungen GT-Aktivität erzielt werden kann (Abb. 47, Seite 98 und Abb. 48, Seite 99). Die Enzymaktivität für dieses natürliche Substrat in allen untersuchten Spezies war aber im Vergleich zu den xenobiotischen Substraten wie 2,3,4-T oder 2,4,5-T um den Faktor 4-5 niedriger. Auffällig ist auch das Fehlen der GT-Aktivität für IAA in den Mycobionta. Aktivitätsspitzen zeigten *Sequoiadendron giganteum* (Spermatophyta) mit 17,6 pkat/mg Protein, *Equisetum hyemale* (Pteridophyta) mit 6,7 pkat/mg Protein und *Ascophyllum nodosum* (Chromophyta) mit 69,7 pkat/mg Protein.

1.3.3 N-Glucosyltransferasen

Die Aktivitätsbestimmung der N-GT's wurde nach der Methode von Sandermann *et al.* (1991) durchgeführt. Dabei ergab sich folgende Aktivitätsverteilung in den verschiedenen Pflanzenabteilungen und Modellsystemen (Abb. 49, Seite 102 und Abb. 50, Seite 103).

DCA-Umsatz konnte in allen Modellsystemen in Aktivitäten von 11,6 pkat/mg Protein (*Zea mays*) bis 93,9 pkat/mg Protein (*Glycine max*) nachgewiesen werden, ebenso in allen höheren Pflanzen der Abteilung Spermatophyta. Dabei zeigten sich Maximalwerte von 67,8 pkat/mg Protein bei *Salicornia europaea* sowie bei den Bäumen *Rhus typhina* (29,7 pkat/mg Protein) und *Sequoiadendron giganteum* (44,0 pkat/mg Protein). Drei- bis vierfach höhere Enzymaktivitäten als in den Zellkulturmodellsystemen und in den Spermatophyta waren in

den Pteridophyta zu finden. Maximalwerte wurden bei *Selaginella lepidophylla* (390,0 pkat/mg Protein), *Lycopodium annotinum* (265,0 pkat/mg Protein) und *Equisetum hyemale* (227,0 pkat/mg Protein) gemessen. *Fontinalis antipyretica* und *Marchantia polymorpha* waren die einzigen Vertreter der Bryophyta, die N-GT-Aktivität mit DCA als Substrat zeigten. Die Enzymaktivität lag im Bereich der Spermatophyta mit 39,3 pkat/mg Protein (*Fontinalis antipyretica*) und 40,0 pkat/mg Protein (*Marchantia polymorpha*).

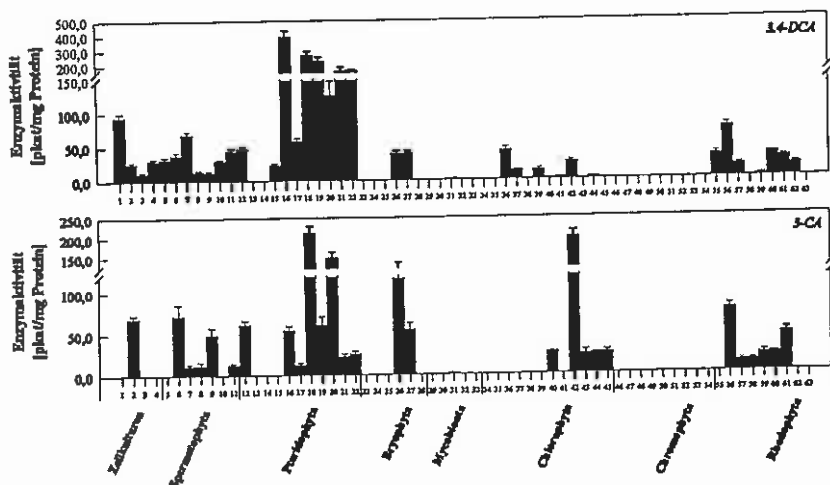


Abb. 49 Screening der N-GT-Aktivität nach der Methode von Sandermann *et al.* (1991) in dem Modellsystem Zellsuspensionskulturen und in den unterschiedlichen Pflanzenabteilungen mit den Substraten DCA und 3-CA. Auffällig ist das Fehlen einer N-GT-Aktivität für beide Substrate bei den Spezies der Abteilung Chromophyta. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$). Die Zahlen der Abszisse stehen für die einzelnen Pflanzenspezies und sind in Tab. 5, Seite 25 aufgelistet.

Bei der Abteilung Mycobionta wurde DCA nur durch *Phanerochaete chrysosporium* zum Glucosid umgesetzt, wobei die Aktivität bei 2,1 pkat/mg Protein lag und somit erheblich niedriger war als in den übrigen Pflanzenabteilungen.

Von den Makroalgen konnten vor allem die Spezies der Abteilung Chlorophyta wie beispielsweise *Chara corallina* (42,8 pkat/mg Protein), als Vertreter der limnischen Makroalgen, DCA umsetzen, sowie *Caulerpa mexicana* (13,1 pkat/mg Protein) und *Halimeda opuntia* (25,6 pkat/mg Protein) als Vertreter der marinen Makroalgen dieser Abteilung.

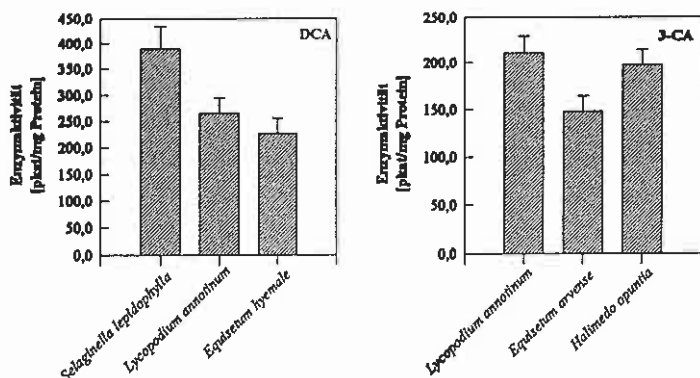


Abb. 50 Maximal gemessene Aktivitäten des N-GT-Systems, bestimmt mit den Substraten DCA und 3-CA. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Auch in der Abteilung Rhodophyta konnte die Glucosidierung von DCA in fast allen untersuchten Spezies nachgewiesen werden. Maximalwerte wurden von *Chondrus crispus* (74,3 pkat/mg Protein), *Delesseria sanguinea* (34,0 pkat/mg Protein) und von *Iridaea cordata* (35,7 pkat/mg Protein) erreicht. In den zwei Spezies *Porphyra umbilicalis* und *Polysiphonia ureolata* konnte kein DCA-Umsatz zum Glucosid gemessen werden. Ebenso wurde in der Abteilung der Chromophyta bei allen untersuchten Spezies keine Glucosidbildung mit DCA beobachtet.

1.3.4 S-Glucosyltransferase

Die Bestimmung der S-GT wurde nach der Methode von Eckey (1987) durchgeführt und ergab folgende Aktivitätsverteilung (Abb. 51 und Abb. 52, Seite 104).

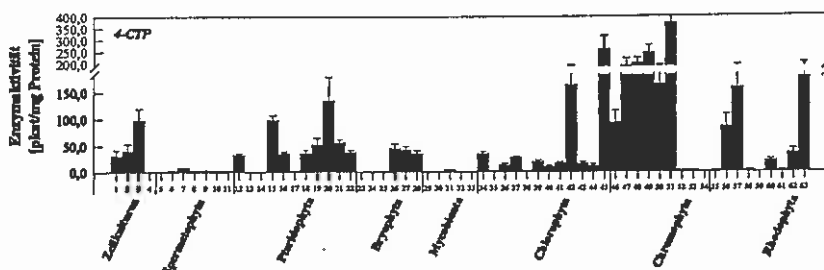


Abb. 51 Screening der S-GT-Aktivität nach der Methode von Eckey (1987) mit 4-CTP als Substrat in den Zellsuspensionskulturen und den Pflanzenabteilungen der Spermatophyta, Pteridophyta, Bryophyta, Mycobionta, Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta. Die höchsten S-GT-Aktivitäten sind bei den Spezies der Chromophyta zu finden. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$). Die Zahlen der Abszisse stehen für die einzelnen Pflanzenspezies und sind in Tab. 5, Seite 25 aufgelistet.

Die Aktivität der S-GT konnte in fast allen untersuchten Spezies nachgewiesen werden. Bei den Modellsystemen zeigte sich dabei eine Aktivität dieses Enzyms von 31,1 pkat/mg Protein (*Glycine max*) bis 97,5 pkat/mg Protein (*Zea mays*). Die Zellsuspensionskultur von *Picea abies* konnte als einziges Modellsystem 4-CTP nicht glucosylieren.

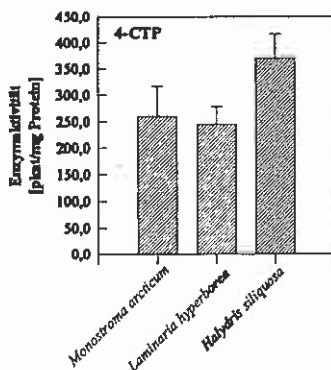


Abb. 52 Maximal gemessene Aktivität des S-GT-Systems, bestimmt mit dem Modells substrat 4-CTP. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

In den höheren Pflanzen der Abteilung *Spermatophyta* war die S-GT-Aktivität durchschnittlich sehr niedrig und schwankte zwischen 1-3 pkat/mg Protein. Ein Maximalwert in dieser Abteilung wurde aber von der halophilen Pflanze *Salicornia europaea* mit 8,4 pkat/mg Protein erzielt. Die Aktivität der S-GT war aber im Vergleich zu den Zellkulturmodellsystemen um das 10-fache niedriger.

Mit den Modellsystemen vergleichbare S-GT-Aktivität konnte in den Spezies der Abteilung *Spermatophyta* gemessen werden. Hier wurden Enzymaktivitäten im Bereich von 32,6 pkat/mg Protein (*Cycas revoluta*) bis 97,5 pkat/mg Protein (*Azolla filiculoides*) erreicht. Durchweg hohe Enzymaktivität wurde in der Klasse der *Articulatae* (Schachtelhalmgewächse) mit einem Maximalwert von 134,0 pkat/mg Protein bei *Equisetum arvense* nachgewiesen. Bei den *Bryophyta* konnte nur in *Fontinalis antipyretica* (45,2 pkat/mg Protein) als einzigem Vertreter der Klasse der *Musci* (Laubmoose) S-GT-Aktivität bestimmt werden. In der Klasse der *Hepaticae* (Lebermoose) zeigten beide untersuchten Spezies, *Marchantia polymorpha* (42,0 pkat/mg Protein) und *Conocephalum conicum* (34,9 pkat/mg Protein), S-GT-Aktivität. In der Abteilung der *Mycobionta* konnte die S-GT nur in *Phanerochaete chrysosporium* (3,4 pkat/mg Protein) nachgewiesen werden. In allen Makroalgen der Abteilungen *Chlorophyta*, *Chromophyta* und *Rhodophyta* konnte S-GT-Aktivität mit dem Substrat 4-CTP bestimmt werden. Die Spezies der limnischen und marinen *Chlorophyta* zeigten dabei die geringsten Enzymaktivitäten mit 1,0 pkat/mg Protein (*Chlorella fusca*) bis 16,4 pkat/mg Protein (*Acrosiphonia sonderi*). Zwei marine Spezies, *Halimeda opuntia* (165,0 pkat/mg Protein), eine Kalkalge aus dem Mittelmeergebiet, und *Monostroma arcticum* (259,8 pkat/mg Protein), eine arktische Alge aus Spitzbergen, zeigten maximale S-GT-Aktivität in dieser Abteilung. Die höchsten S-GT-Aktivitäten traten aber bei einigen Vertretern der *Chromophyta* mit durchschnittlich 10-fach höherer S-GT-Aktivität als in den *Chlorophyta* auf. Maximalwerte wurden in *Laminaria hyperborea* (244,3 pkat/mg Protein) und in *Halydris siliquosa* (370,0 pkat/mg Protein) gemessen. Die Vertreter der Familie *Fucales*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus spiralis* und *Fucus serratus*, hatten im Vergleich zu den anderen untersuchten *Chromophyta*-Spezies sehr geringe S-GT-Aktivität von 1,0 bis 2,5 pkat/mg Protein. In der Abteilung *Rhodophyta* konnte nur in *Cystoclonium purpureum* keine S-GT-Aktivität bestimmt werden. Alle anderen untersuchten Spezies zeigten Enzymaktivitäten von 1,5 pkat/mg Protein (*Palmaria decipiens*) bis 177,9 pkat/mg Protein (*Polysiphonia ureolata*).

1.3.5 Hasse-Diagramm der Glucosyltransferasen

Für die Erstellung des Hasse-Diagramms, wurden die Aktivitäten der O-GT der einzelnen Pflanzenabteilungen bzw. -klassen mit den Substraten PCP, 2,4,5-TCP, DDA und IAA addiert und durch die Anzahl der Spezies pro Abteilung bzw. Klasse geteilt. Gleiches wurde für die N-GT mit dem Substrat DCA und für die S-GT mit 4-CTP durchgeführt. Es wurde eine Einteilung der GT-Aktivitäten in 12 Klassen durchgeführt (Abb. 54).

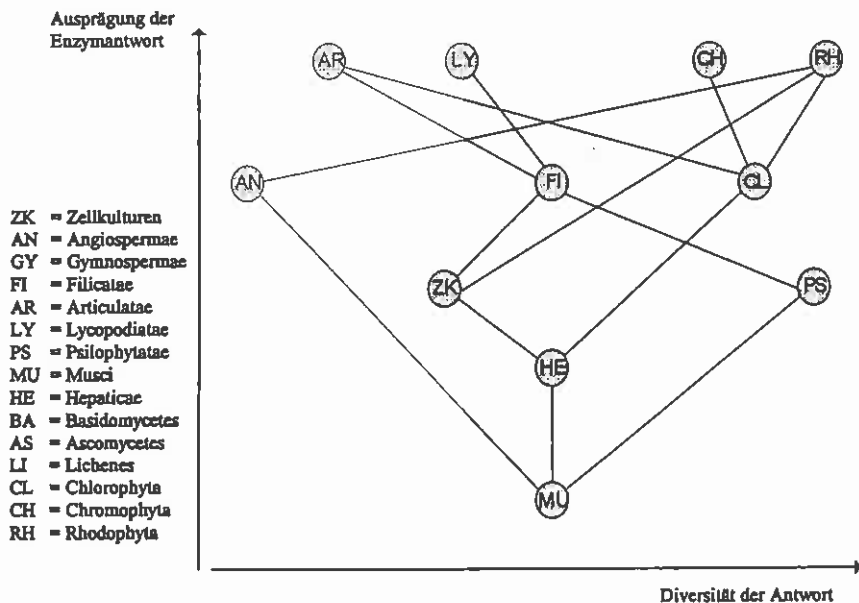


Abb. 54 Hasse-Diagramm der GT-Aktivität zur Korrelation dieser Enzymaktivität mit dem Evolutionsstammbaum der Pflanzen. Eine Linie zwischen zwei Objekten bedeutet, daß diese vergleichbar sind. Objekte, die nicht durch Linien verbunden sind, sind nicht vergleichbar. Äquivalente Objekte sind AN=GY, MU=BA=AS=LI.

Das Hasse-Diagramm mit der GT-Aktivität (Abb. 54) als Attributzuordnung für die einzelnen Objekte, d.h. die Pflanzenabteilungen bzw. -klassen, zeigt, daß fünf Objekteebenen gebildet werden. Das minimale Element (Minimale) wird von den Musci (Laubmoose), Basidiomycetes (Ständerpilze), Ascomycetes (Schlauchpilze) und den Lichenes (Flechten) gebildet. Das maximale Element (Maximale) wird durch die Articulatae (Schachtelhalmgewächse), Lycopodiatae (Bärlappe), Chromophyta und Rhodophyta gekennzeichnet. Da sie in der

obersten Ebene liegen, zeigt dies, daß alle anderen Elemente niedrigere Enzymaktivitäten besitzen. Vergleichbarkeiten (Linien) sind zwischen sehr vielen einzelnen Objekten zu finden. Vergleichbarkeiten bestehen zwischen den einzelnen Klassen der Pteridophyta (AR, FI, PS und LY) und zwischen den Klassen der Abteilung Bryophyta (MU, HE). Die Klasse der Musci (Laubmoose) verhält sich in Bezug auf die GT-Aktivität, gemessen mit den oben genannten sechs Substraten, gleich wie die Abteilung Mycobionta mit ihren Klassen BA, AS, LI. Interessant ist die Abspaltung der Hepaticae (Lebermoose) von den Musci (Laubmoose). Die Hepaticae (Lebermoose) zeigen eine höhere GT-Aktivität und auch eine andere Vergleichbarkeit (ZK, CL). Die Abteilung der Spermatophyta, gekennzeichnet durch die Unterabteilungen Angiospermae (Bedecktsamer) und Gymnospermae (Nacktsamer), steht ebenso wie die Zellkultursysteme getrennt. Auffällig ist, daß hier keine Vergleichbarkeit mehr zwischen diesen beiden Modellsystemen existiert. Bei den Algen sind die Chlorophyta-Arten vergleichbar mit den Rhodophyta und auch mit den Chromophyta, haben allerdings niedrigere GT-Aktivität als diese. Zwischen den Chromophyta und den Rhodophyta ist keine Vergleichbarkeit festzustellen. Im Gegensatz zu den Rhodophyta-Arten, die eine Vergleichbarkeit mit den beiden Modellsystemen der Zellsuspensionskulturen und der Spermatophyta (Angiospermae und Gymnospermae) aufweisen, stehen die Chromophyta-Arten getrennt.

2. Spezialisierung auf marine Makroalgen

Marine Makroalgen sind fast ubiquitär auf der Welt verbreitet. Die Produktion an Biomasse ist im Vergleich zu anderen Pflanzen sehr groß. Beispielsweise beträgt das Frischgewicht der größten Algenarten wie etwa der Spezies der *Laminaria* oder *Macrocystis* 100 t/ha. Aber auch die vielen kleineren und kleinsten Algenarten (Phytoplankton) tragen mit 10-50 kg/ha erheblich zur Biomasseproduktion bei (Weberling & Schwantes, 1987). Algen können folglich aufgrund ihrer großen Biomasse sowohl als Senke für anthropogene Schadstoffe dienen als auch im Rahmen der „Grünen Leber“ an der Entgiftung von Fremdstoffen beteiligt sein. Weiterhin führen Algen einen Turnover ihrer eigenen Chlorverbindungen durch und deshalb war es interessant chlorierte Substanzen als Enzymsubstrate zu testen. Im weiteren wurde eine Spezialisierung auf diese marinen Pflanzen vorgenommen.

2.1 Charakterisierung von Cytochrom P-450 in marinen Algen

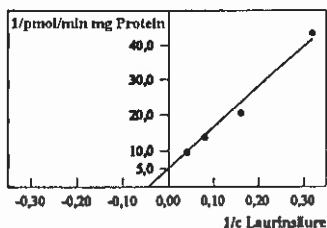
Da über das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System in marinen Makroalgen bis auf die Publikation von Payne (1977) keine Daten vorliegen, wurde von diesem wichtigen Phase I-Enzymsystem eine genauere Charakterisierung vorgenommen. Beispielhaft für das P-450 System wurde die Laurinsäurehydroxylase (LAH) in den Algen näher untersucht.

2.1.1 Enzymatische Daten der Laurinsäurehydroxylase

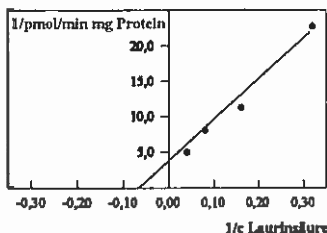
2.1.1.1 Apparente K_m - und V_{max} -Werte

Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden in den Mikrosomenfraktionen von *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) und *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) bestimmt. Hierzu wurde die Konzentration von ^{14}C -Laurinsäure im Bereich von 3,1-25 μM variiert. Alle anderen Testparameter wie Pufferkonzentration, Proteinmenge und Konzentration des regenerierenden Systems wurde konstant gehalten.

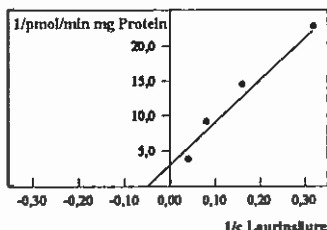
Alle Daten wurden doppelt bestimmt. Die in den einzelnen Abbildungen (Abb. 54, Seite 109) dargestellten Meßpunkte sind algebraische Mittelwerte. Als Nullkontrolle wurde in allen Messungen die Mikrosomenlösung durch Wasser ersetzt.

*Ulva lactuca*

Lineweaver-Burk: K_m 25,8 μM V_{max} 24,6 pmol/min mg Protein
 $= 0,41$ pkat/mg Protein

*Fucus vesiculosus*

Lineweaver-Burk: K_m 34,4 μM V_{max} 16,8 pmol/min mg Protein
 $= 0,28$ pkat/mg Protein

*Polysiphonia urceolata*

Lineweaver-Burk: K_m 21,6 μM V_{max} 20,4 pmol/min mg Protein
 $= 0,34$ pkat/mg Protein

Abb. 54 Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden mit Hilfe des Programms ENZPACK berechnet. Sie liegen mit 21-34 μM im Bereich der von Benveniste *et al.* (1982) für die LAH aus *Helianthus tuberosus* angegebenen Werte. Gezeigt ist der Mittelwert ($n = 2$).

2.1.1.2 Proteinmengenabhängigkeit

Die Abhängigkeit des LAH-Tests in ausgewählten Spezies der marinen Makroalgen wurde im Bereich von 25-150 bzw. 50-250 μg Protein verfolgt. Der LAH-Test wurde nach der im Material- und Methodenteil beschriebenen Prozedur mit unterschiedlichen Mengen an mikrosomalem Protein durchgeführt. Um das Gesamtvolumen des Tests nicht zu verändern, wurde das Mikrosomenvolumen mit dem Puffer 2 ausgeglichen. In Abb. 55 (Seite 110) sind die Proteinmengenabhängigkeiten der LAH in den unterschiedlichen Algenabteilungen zu sehen.

Ulva lactuca, *Fucus vesiculosus* und *Polysiphonia urceolata* zeigen einen weitgehend linearen Verlauf in der Proteinmengenabhängigkeit.

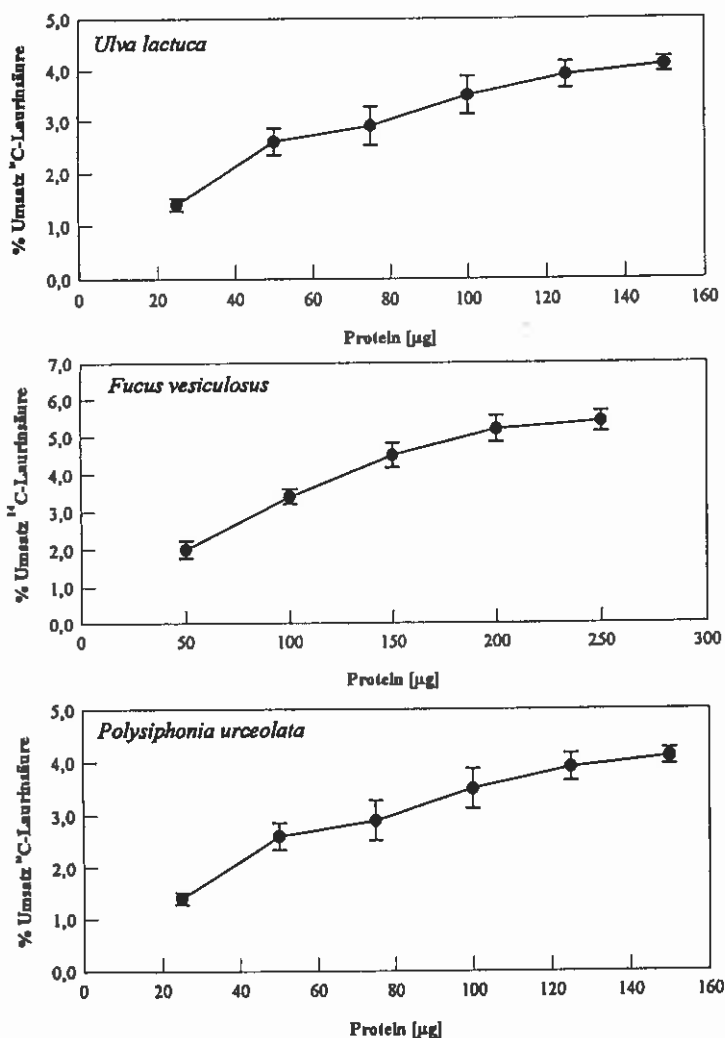


Abb. 55 Proteinmengenabhängigkeit der LAH-Aktivität in marinen Makroalgen der Abteilung Chlorophyta (*Ulva lactuca*), Chromophyta (*Fucus vesiculosus*) und Rhodophyta (*Polysiphonia urceolata*). Die Inkubationen der einzelnen Tests wurde bei 25 °C 60 min lang durchgeführt und der prozentualen Umsatz der 14 C-markierten Laurinsäure über TLC in LM 2 und über Radiodünnschichtscanner bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

2.1.1.3 Zeitabhängigkeit

Der Test wurde unter den Bedingungen durchgeführt, wie sie im Material- und Methodenteil beschrieben wurden. Es wurden Mikrosomen der drei Makroalgen *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) und *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) verwendet. Bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C wurde die Produktbildung in einem Zeitraum von 0-180 min aufgezeichnet (Abb. 56).

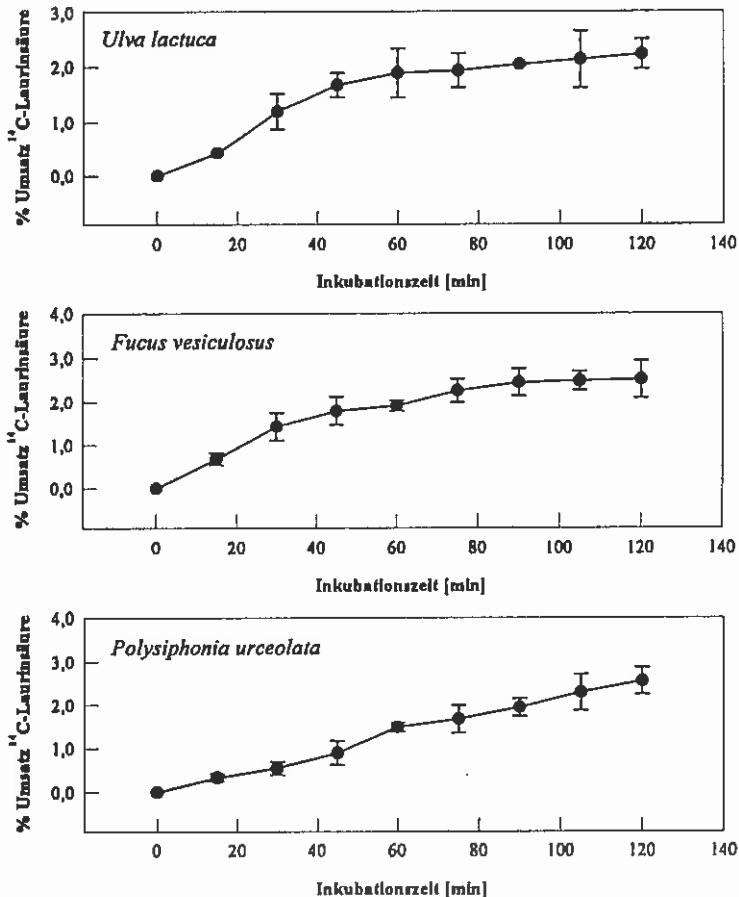


Abb. 56 Zeitabhängigkeit der LAH-Reaktion bei marinen Makroalgen der Abteilung Chlorophyta (*Ulva lactuca*), Chromophyta (*Fucus vesiculosus*) und Rhodophyta (*Polysiphonia urceolata*). Inkubationstemperatur 25 °C. Der prozentuale Umsatz der ¹⁴C-markierten Laurinsäure wurde über TLC in LM 2 und über Radiodünnschichtchromatographie bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA (n = 3).

2.1.1.4 Temperaturabhängigkeit

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurden die Mikrosomen zusammen mit dem vollständigen Testgemisch bei verschiedenen Temperaturen von 0-50 °C für jeweils 60 min inkubiert (Abb. 57). Das Testsystem enthielt 2 mM NADPH. Die Konzentration an NADPH wurde bei der jeweiligen Inkubationstemperatur am Photometer bei 340 nm gemessen.

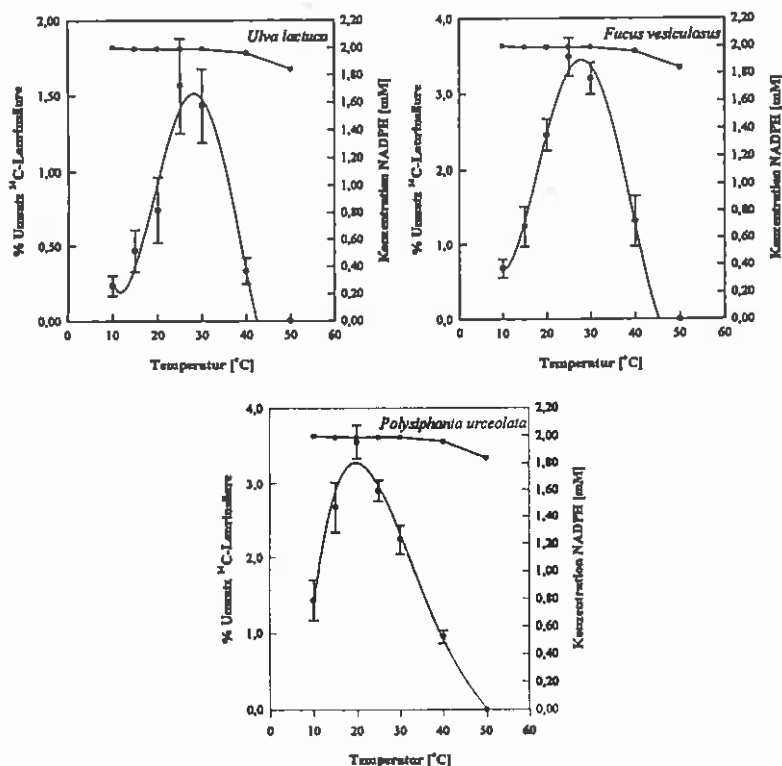


Abb. 57 Abhängigkeit der LAH-Aktivität von der Inkubationstemperatur in den marinen Makroalgen *Ulva lactuca* und *Fucus vesiculosus* aus dem Felswatt von Helgoland und *Polysiphonia urceolata* aus Spitzbergen. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$). Gleichzeitig wurde die Konzentration an NADPH am Photometer bestimmt.

Maximale Enzymaktivität wurde in den beiden Helgoländer Algenarten *Ulva lactuca* (Chlorophyta) und *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) zwischen 25-30 °C erzielt. Das Temperaturoptimum der arktischen Alge *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) ist bei etwa 20 °C angesiedelt.

2.1.1.5 Hemmung der in-chain Laurinsäurehydroxylase-Aktivität

Die Cytochrom P-450-Aktivität kann durch verschiedene Stoffe inhibiert werden. Einer dieser Stoffe ist das ABT. Eine Inhibierung der LAH konnte bereits durch Salaün *et al.* (1988) bei *Vicia sativa* gezeigt werden. ABT wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,5-5,0 mM dem Standardenzymtest beigegeben und die Aktivität der LAH über TLC und Radiodünnschichtscanner bestimmt (Abb. 58).

Durch die aufgenommenen Kurven kann in den untersuchten Algenarten diejenige Konzentration ermittelt werden, bei der halbmaximale Hemmung der Enzymaktivität für ABT (ID_{50} -Wert) auftritt. Dieser lag bei *Ulva lactuca* (Chlorophyta) bei 1,2 mM ABT, bei *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) bei 1,5 mM ABT und bei *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) bei 0,9 mM ABT. Die IC-LAH in der Rotalge *Polysiphonia urceolata* scheint demnach schon bei geringen Konzentrationen an ABT inhibiert zu werden.

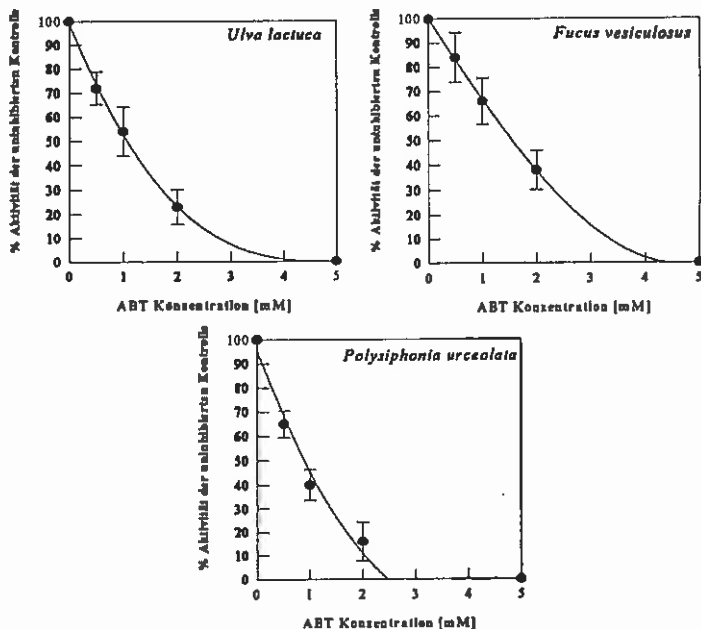


Abb. 58 Inhibitorischer Effekt von ABT auf die LAH-Aktivität in den marinen Makroalgen *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) und *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta). Die halbmaximale Hemmkonzentration ID_{50} liegt bei *Ulva lactuca* bei 1,2 mM ABT, bei *Fucus vesiculosus* bei 1,5 mM ABT und bei *Polysiphonia urceolata* bei 0,9 mM ABT. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

2.1.1.6 Substratspezifität

Durch die Untersuchung, welche Substrate durch das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System der marinen Algen hydroxyliert werden können, sollte die Bandbreite der möglichen Substrate für die marinen Makroalgen ermittelt werden, wurden hier vorallem meeresbiologisch relevante Stoffe wie die PCB's untersucht. Die einzelnen enzymatischen Bestimmungen wurden nach der in 2.3.3.3.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Identifizierung der Metabolite erfolgte durch TLC und anschließendem GC/MS. Als Positivkontrolle wurden Mikrosomen aus Hundeleber nach der im Material- und Methodenteil beschriebenen Methode präpariert. Die Hundeleber wurde freundlicherweise von Dr. K. Maier (Institut für Inhalationsbiologie, GSF, München) zur Verfügung gestellt.

3-Chlorbiphenyl

Im Laufmittel LM 5 ergab sich folgendes Radiodünnschicht-Chromatogramm (Abb. 59). Nach 60 minütiger Inkubation der verschiedenen Mikrosomen konnten für die einzelnen untersuchten Spezies die in Tab. 17 (Seite 115) angegebenen Enzymaktivitäten ermittelt werden. Als Blindwert wurden abgekochte Mikrosomen aus den gleichen Präparationen verwendet.

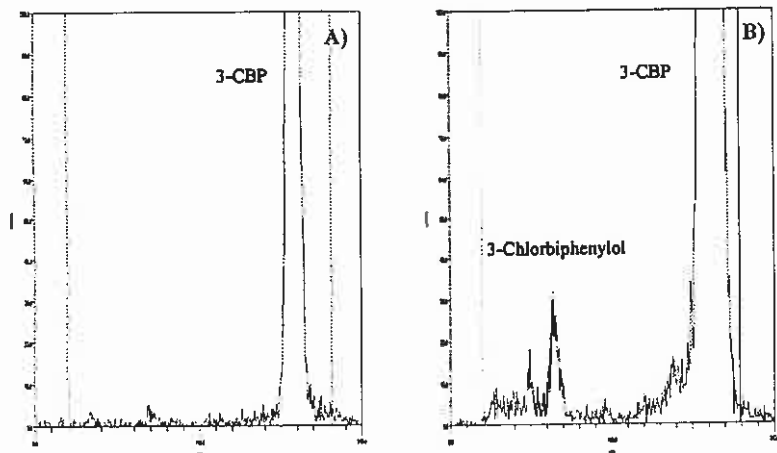


Abb. 59 Radiodünnschichtchromatogramme eines Cytochrom P-450 Enzymtests mit Mikrosomen von *Fucus vesiculosus* und 3-Chlorbiphenyl als Substrat. Für das Substrat wurde ein R_f von 0,87 und für den entstandenen Metaboliten ein R_f von 0,26-0,28 ermittelt. A) zeigt den Blindwert mit abgekochten Mikrosomen (10 min, 100 °C), B) Inkubation mit Mikrosomen von *Fucus vesiculosus*.

Tab. 17 Enzymaktivitäten des P-450 Monooxygenase-Systems in der Hundeleber und in ausgewählten Spezies der marinen Makroalgen aus der Abteilung Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta.

Spezies	Metabolit R _f	Enzymaktivität [pkat/mg Protein]
Hundeleber	0,28	6,30 ± 0,53
<i>Ulva lactuca</i>	0,26	0,72 ± 0,11
<i>Fucus vesiculosus</i>	0,27	1,43 ± 0,15
<i>Polysiphonia urceolata</i>	0,26	1,09 ± 0,10

Die Abbildung 60 zeigt die massenspektroskopische Analyse des 3-CBP und Abbildung 62 die des entstandenen hydroxylierten Metaboliten. Auffällig bei allen folgenden massenspektroskopischen Analysen ist, daß das Isotopenverhältnis des Chloratoms in der Regel nicht mit Literaturangaben übereinstimmt. Dies ist aber gerätetechnisch bedingt (persönl. Mitteilung Frau Lattmann, Institut für Ökologische Chemie, GSF München).

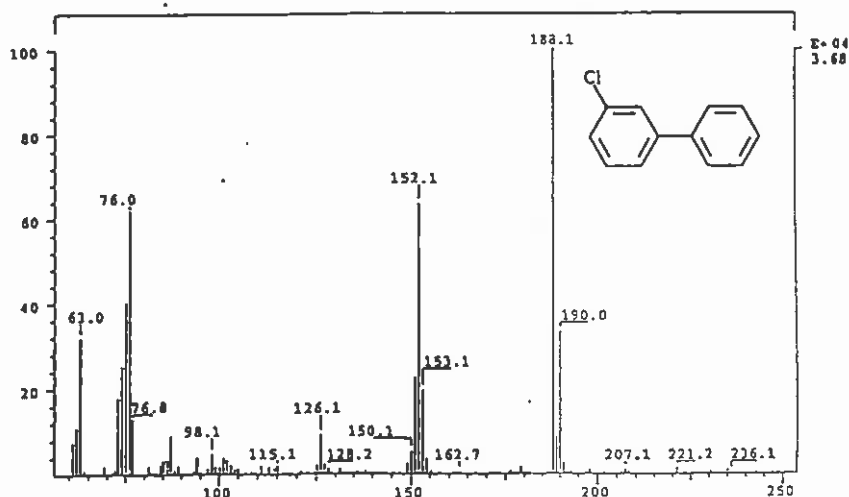


Abb. 60 Massenspektroskopische Analyse der Referenzsubstanz 3-CBP (20 ng in Ethanol). Das 3-CBP besitzt eine Masse von 188,0. Die Strukturformel des 3-CBP ist zur besseren Übersicht im Massenspektrum eingezeichnet.

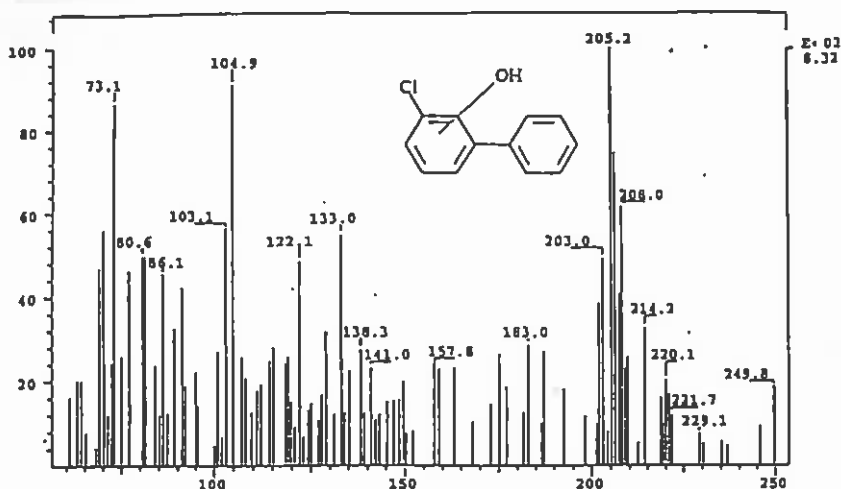


Abb. 61 Massenspektroskopische Analyse des enzymatisch entstandenen 3-CBP-Metaboliten. Der hydroxylierte Metabolit, das 3-Chlorbiphenylol, besitzt eine Masse von 205,1. Die Struktur des 3-Chlorbiphenylols ist zur besseren Übersicht im Massenspektrum eingezeichnet.

In Tabelle 18 ist die massenspektrometrische Charakterisierung sowohl der Referenzsubstanz als auch die des enzymatisch über das P-450 Monooxygenase-System entstandenen Metaboliten zu sehen. Im Spektrum kann bei einer Masse von 220,1 auch ein zweifach hydroxyliertes Produkt detektiert werden, das aber auf TLC mit dem einfach hydroxylierten Metaboliten gleich läuft. Referenzsubstanzen für hydroxylierte PCB's standen nicht zur Verfügung.

Tab. 18 Massenspektrometrische Charakterisierung von 3-Chlorbiphenyl und des hydroxylierten Metaboliten, des 3-Chlorbiphenylol. (Verwendete Abkürzungen: M/z, Masse/Ladungsverhältnis; rel. Int., relative Intensität des Fragments; M+, Molpeak).

Substanz	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
3-Chlorbiphenyl	188,1	100	M+ (Molpeak Cl 35)
	190,0	32	M+ (Molpeak Cl 37)
	153,1	25	M+ - [Cl 35]
	152,1	64	M+ - [HCl 35]
3-Chlorbiphenylol	203,0	49,1	M+ (Molpeak Cl 35)
	205,2	100	M+ (Molpeak Cl 37)
	220,1	20	M+ +[OH]

4-Chlorbiphenyl

Die TLC-Analyse über Radiodünnschichtscanner ergab folgendes Bild (Abb. 62). Nach einer 30minütigen Inkubation bei 25 °C konnten für die untersuchten Spezies die in Tab. 19 angegebenen Enzymaktivitäten gemessen werden. Auch hier wurden abgekochte Mikrosomen aus den gleichen Präparationen für den Blindwert verwendet.

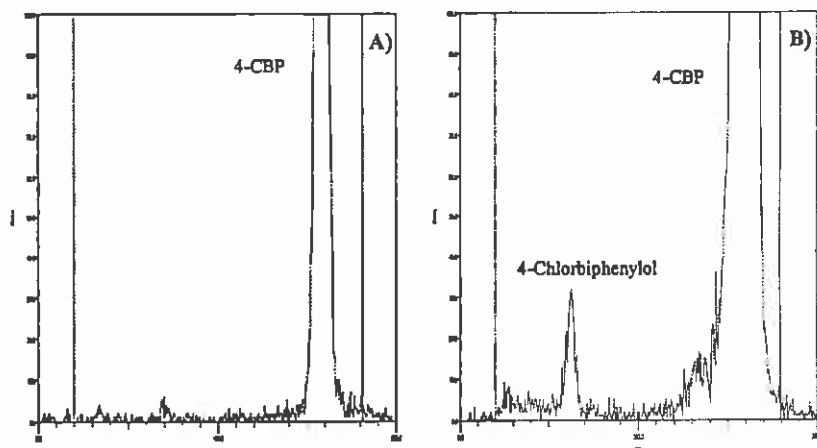


Abb. 62 Radiodünnschichtchromatogramme eines Cytochrom P-450 Enzymtests mit Mikrosomen von *Fucus vesiculosus* und 4-Chlorbiphenyl als Substrat. Für das Substrat wurde ein R_f von 0,85 und für den entstandenen Metaboliten ein R_f von 0,26-0,28 ermittelt. A) zeigt den Blindwert mit abgekochten Mikrosomen (10 min, 100 °C), B) Inkubation mit Mikrosomen von *Fucus vesiculosus*.

Tab. 19 Enzymaktivitäten des P-450 Monooxygenase-Systems in der Hundeleber und in ausgewählten Spezies der marinen Makroalgen aus der Abteilung Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta mit 4-CBP als Substrat.

Spezies	Metabolit R_f	Enzymaktivität [pkat/mg Protein]
Hundeleber	0,27	6,53 ± 0,57
<i>Ulva lactuca</i>	0,27	0,62 ± 0,10
<i>Fucus vesiculosus</i>	0,26	2,80 ± 0,15
<i>Polysiphonia urceolata</i>	0,28	1,23 ± 0,04

Der entstandene Metabolit des 4-Chlorbiphenyls wurde über GC/MS einer Identifizierung unterzogen. Es kann sich hierbei aufgrund der ermittelten Masse nur um ein einfach

hydroxyliertes 4-CBP, das 4-Chlorbiphenylol handeln. Das massenspektroskopische Bild der Referenzsubstanz ist in Abb. 63, das des entstandenen Metaboliten in Abb. 64 zu sehen.

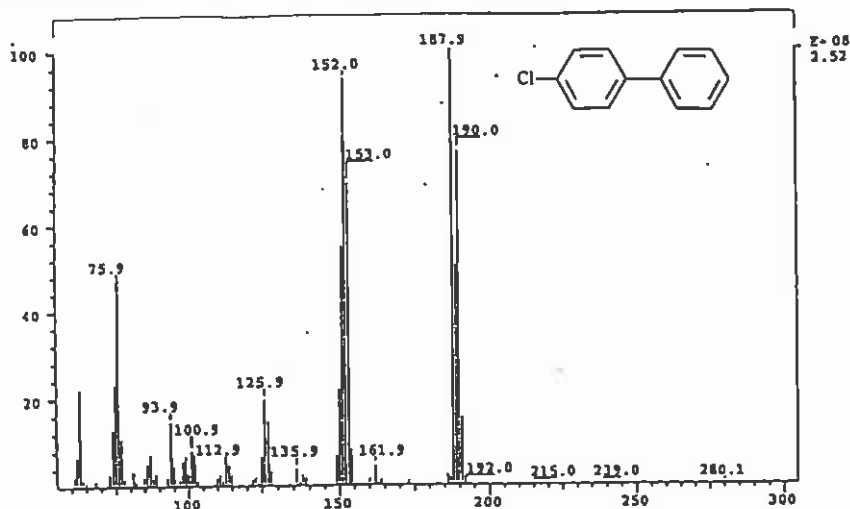


Abb. 63 Massenspektroskopische Analyse der Referenzsubstanz 4-CBP (20 ng in Ethanol). Das 4-CBP besitzt eine Masse von 188,0. Die Strukturformel des 4-CBP ist zur besseren Übersicht im Massenspektrum eingezeichnet.

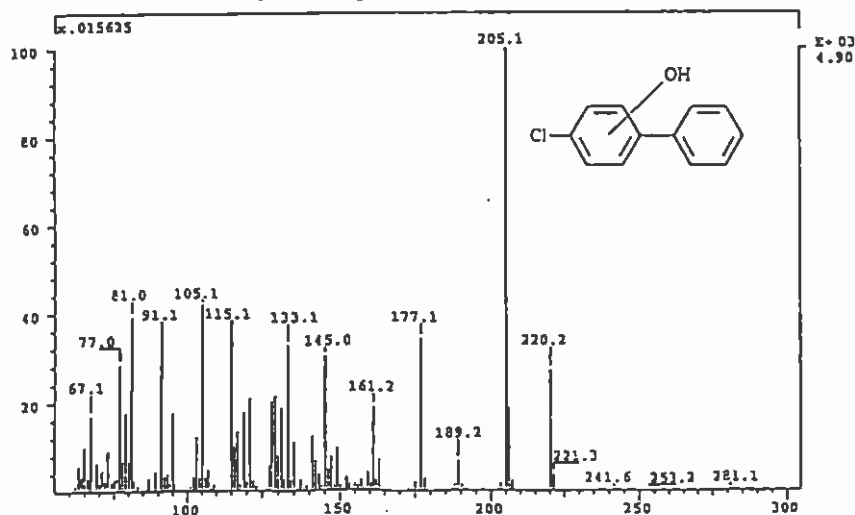


Abb. 64 Massenspektroskopische Analyse des enzymatisch entstandenen 4-CBP-Metaboliten. Der hydroxylierte Metabolit, das 4-Chlorbiphenylol, besitzt eine Masse von 205,1. Die Struktur des 4-Chlorbiphenylols ist zur besseren Übersicht im Massenspektrum eingezeichnet.

In Tabelle 20 ist die massenspektrometrische Charakterisierung sowohl der Referenzsubstanz als auch des enzymatisch über das P-450 Monooxygenase-System entstandenen Metaboliten zu sehen. Auch hier ist im Spektrum (Abb. 64) bei der Masse von 220,2 ein zweifach hydroxylierter Metabolit detektierbar, der auf TLC mit dem einfach hydroxylierten Metaboliten gleich läuft.

Tab. 20 Massenspektrometrische Charakterisierung von 4-Chlorbiphenyl und des hydroxylierten Metaboliten, des 4-Chlorbiphenylol. (Verwendete Abkürzungen: M/z, Masse/Ladungs-Verhältnis; rel. Int., relative Intensität des Fragments; M+, Molpeak).

Substanz	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
4-Chlorbiphenyl	187,9	100	M+ (Molpeak Cl 35)
	190,0	76	M+ (Molpeak Cl 37)
	153,0	68	M+ - [Cl35]
	152,0	93	M+ - [Cl37]
4-Chlorbiphenylol	205,2	100	M+ (Molpeak Cl 35)
	177,1	35	M+ -[CO]
	220,1	20	M+ +[OH]

2,3-Dichlorbiphenyl

Die TLC-Auftrennung und die anschließende Radiodünnschichtanalyse ergab mit diesem Substrat das in Abb. 65 (Seite 120) dargestellte Bild. In Tab. 21 sind die mit diesem Substrat erzielten Enzymaktivitäten in der Hundeleber sowie in den ausgewählten marinen Makroalgen zu sehen. Als Blindwert wurden wieder abgekochte Mikrosomen derselben Präparation verwendet.

Tab. 21 Enzymaktivitäten des P-450 Monooxygenase-Systems in der Hundeleber und in ausgewählten marinen Makroalgen der Abteilungen Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta mit 2,3-DCBP als Substrat.

Species	Metabolit R _f	Enzymaktivität [pkat/mg Protein]
Hundeleber	0,28	28,17 ± 0,81
<i>Ulva lactuca</i>	-	-
<i>Fucus vesiculosus</i>	0,30	4,20 ± 0,80
<i>Polysiphonia urceolata</i>	0,28	2,10 ± 0,11

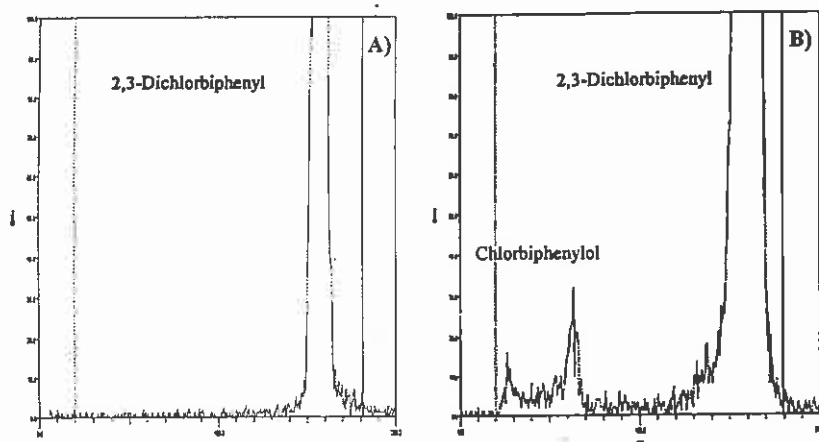


Abb. 65 Radiodünnschichtchromatogramm eines Enzymtests mit Mikrosomen von *Fucus vesiculosus* und 2,3-Dichlorbiphenyl als Substrat. Für 2,3-Dichlorbiphenyl wurde ein R_f von 0,90 und für den entstandenen Metaboliten ein R_f von 0,28 ermittelt. A) zeigt den Blindwert mit abgekochten Mikrosomen (10 min, 100 °C), B) Inkubation mit Mikrosomen von *Fucus vesiculosus*.

Der entstandene Metabolit wurde über GC/MS identifiziert. Die massenspektroskopische Analyse der Ausgangssubstanz und des entstandenen Metaboliten ist in Abb. 66 und Abb. 67 (Seite 121) zu sehen. Die Fragmentierungsdaten und der Massenpeak deuten darauf hin, daß es sich um ein hydroxyliertes Produkt, ein chloriertes Biphenylol, handelt, bei dem ein Chloratom substituiert wurde (Tab. 22).

Tab. 22 Massenspektrometrische Charakterisierung von 2,3-Dichlorbiphenyl und des hydroxylierten Metaboliten, des 2,3-Dichlorbiphenylol. (Verwendete Abkürzungen: M/z, Masse/Ladungsverhältnis; rel. Int., relative Intensität des Fragments; M+, Molpeak).

Substanz	M/z	rel. Int. [%]	Zuordnung der Fragmente
2,3-Dichlorbiphenyl	187,9	100	M+ (Molpeak Cl 35)
	190,0	76	M+ (Molpeak Cl 37)
	153,0	68	M+ - [Cl35]
	152,0	93	M+ - [Cl37]
Chlorbiphenylol	205,2	100	M+ (Molpeak Cl 35)
	177,1	22	M+ - [CO]
	220,2	33	M+ + [OH]

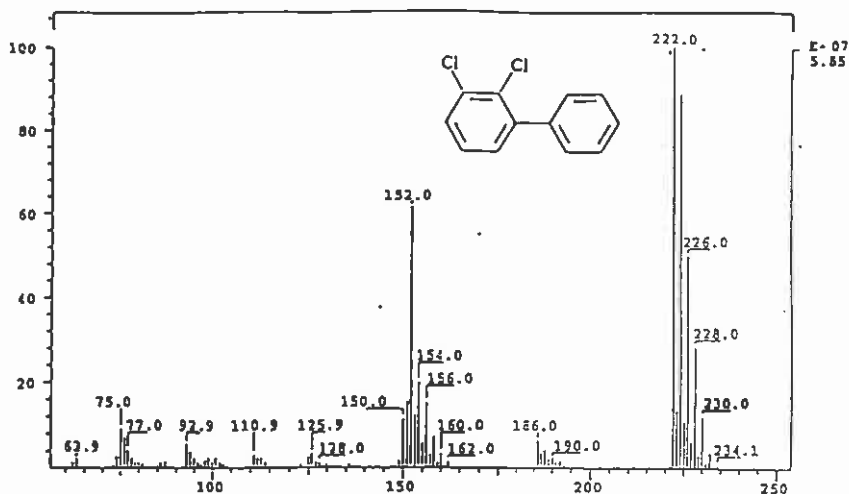


Abb. 66 Massenspektroskopische Analyse der Referenzsubstanz 2,3-Dichlorbiphenyl (20ng in Ethanol). Das 2,3-DCBP besitzt eine Masse von 222,0. Die Strukturformel des 2,3-DCBP ist zur besseren Übersicht im Massenspektrum eingezeichnet.

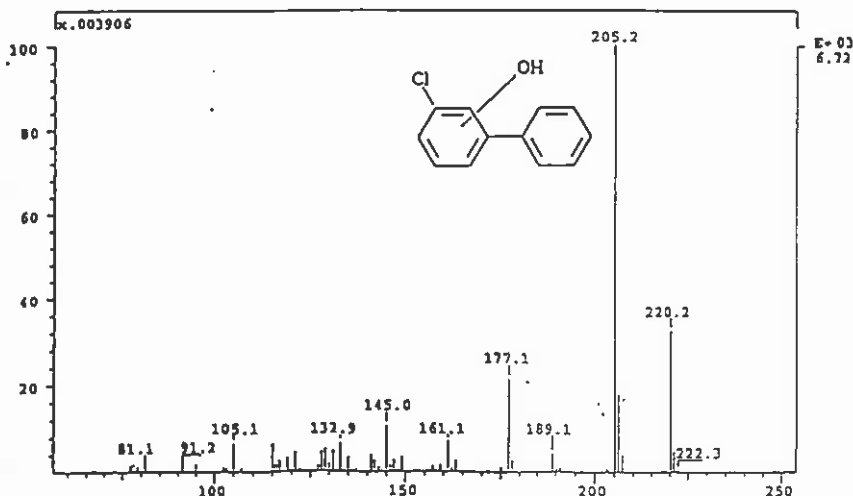


Abb. 67 Massenspektroskopische Analyse des enzymatisch entstandenen Metaboliten des 2,3-DCBP. Der hydroxylierte Metabolit, das Monochlorbiphenylol besitzt eine Masse von 205,1. Aufgrund dieser hier ermittelten Masse muß bei der Hydroxylierung ein Chloratom substituiert worden sein.

2,2'-Dichlorbiphenyl

Mit dieser Substanz als Substrat für das P-450 Monooxygenase-System konnte weder in der Hundeleber noch in den Mikrosomenfraktionen der marinen Makroalgen unter den verwendeten Testbedingungen ein Metabolit detektiert werden.

Mehrfach chlorierte Biphenyle

Eingesetzt wurden das 3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl und das 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl. Beide Substrate konnten weder durch die Mikrosomen des Modellsystems noch durch Mikrosomen der marinen Makroalgen umgesetzt werden.

Benzo(a)pyren

Dieses weltweit verbreitete Xenobiotikum wird im tierischen System durch die Arylhydroxylase (Livingstone, 1984) umgesetzt. Unter den im Material- und Methodenteil beschriebenen Testbedingungen konnte weder in den Hundelebermikrosomen noch in den verschiedenen Algenmikrosomenpräparationen ein Umsatz nachgewiesen werden.

Phenanthren

Auch dieses PAK wurde unter den gewählten Testbedingungen weder von Hundelebermikrosomen noch von den verschiedenen Algenmikrosomen umgesetzt.

DEHP

Diese Substanz ist als Weichmacher bekannt, konnte aber in keinem der untersuchten Systeme mit den angegebenen Testbedingungen als Substrat für das P-450 Monooxygenase-System dienen. Auch in anderen mikrosomalen Systemen scheint diese Substanz kein Substrat für P-450 Enzyme zu sein (persönl. Mitteilung Dr. J.-P. Salaün, Straßburg).

Isoproturon

IPU, ein Phenylharnstoffherbizid, wird als Formulierung beispielsweise unter dem Markennamen Arelon (Hoechst AG) im Getreideanbau verwendet. Der Einsatz erfolgt vornehmlich im Frühjahr gegen Gräser, Kamille und Vogelmiere (Heitefuß, 1987). Frühere Untersuchungen (Cabanne *et al.*, 1987, Bohnenkämper *et al.*, 1994) haben gezeigt, daß die Biotransformation von IPU über das P-450 Monooxygenase-System bewerkstelligt wird.

Die Abb. 68 zeigt die TLC- bzw. die Radiodünnschichtanalyse eines IPU-Enzymtests. Die Metabolitenidentifizierung wurde mittels Referenzsubstanzen (1-OH-IPU und Monodesmethyl-IPU) auf DC durchgeführt.

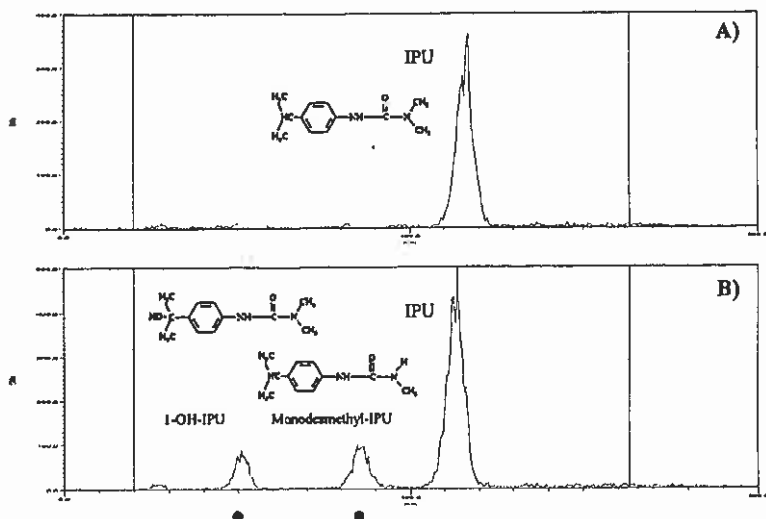


Abb. 68 Radiodünnschichtchromatogramm eines Enzymtests (*Fucus vesiculosus*) mit IPU als Substrat. Für IPU wurde ein R_f von 0,65 und für die entstandenen Metabolite jeweils ein R_f von 0,22 (1-OH-IPU), bzw. ein R_f von 0,46 (Monodesmethyl-IPU) im Laufmittelsystem LM 3 ermittelt. Die ● geben die Lokalisation der Referenzsubstanzen unter UV-Licht an. A) Kontrollansatz mit abgekochten Mikrosomen (10 min, 100 °C), B) *Fucus vesiculosus* Mikrosomen.

In Tab. 23 sind die mit IPU erzielten Enzymaktivitäten der einzelnen untersuchten Testsysteme aufgelistet.

Tab. 23 Aktivität des P-450 Monooxygenase-Systems in den untersuchten Testsystemen Hundeleber, *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) und *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) mit dem Herbizid IPU als Substrat.

Spezies	Metabolit 1 R_f 2-OH-IPU	Metabolit 2 R_f Monodesmethyl-IPU	Enzymaktivität [pkat/mg Protein]
Hundeleber	0,29	0,50	23,21 ± 1,94
<i>Ulva lactuca</i>	0,26	0,46	3,06 ± 0,19
<i>Fucus vesiculosus</i>	0,25	0,47	16,39 ± 0,41
<i>Polysiphonia urceolata</i>	0,22	0,46	2,89 ± 0,42

2.1.1.7 Nachweis von Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 in Algen

In der mikrosomalen Proteinfraction wurden Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 durch UV/VIS-Differenzspektren von oxidierten minus reduzierten Mikrosomen bzw. reduzierten minus reduzierten, mit CO behandelten Mikrosomen bestimmt. Mit diesem Test kann der Gesamtgehalt an Cytochrom P-450 in der Pflanze bestimmt werden. Es wurden Mikrosomenpräparationen von *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) und *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) mit jeweils 200 g Frischmaterial durchgeführt. Als Vergleich wurden Mikrosomen der Zellsuspensionskultur *Glycine max* herangezogen. Die Abb. 69 zeigt die erhaltenen Spektren des Modellsystems *Glycine max*.

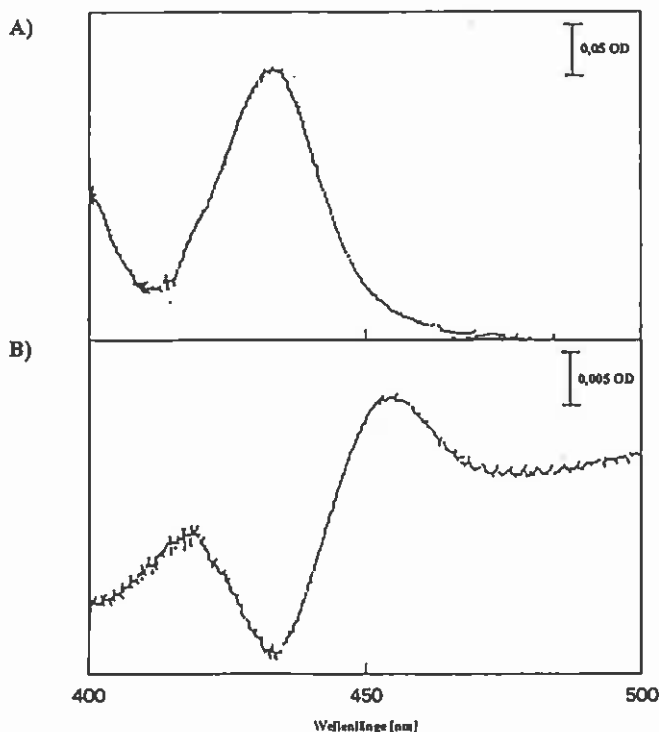


Abb. 69 A) Differenzspektrum von oxidierten minus reduzierten Mikrosomen von *Glycine max*. Das Maximum liegt bei 430 nm.
 B) Differenzspektrum von reduzierten minus reduzierten und CO behandelten Mikrosomen von *Glycine max*. Das Spektrum zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 420 nm und 450 nm. Proteingehalt der verwendeten Mikrosomen: 4,5 mg/ml.

Die Abb. 70 zeigt die mit Mikrosomen aus *Ulva lactuca* (Chlorophyta) erhaltenen Differenzspektren von Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450. Durch die starke Grünfärbung der Mikrosomenfraktion zeigen die Spektren starke Fluktuationen.

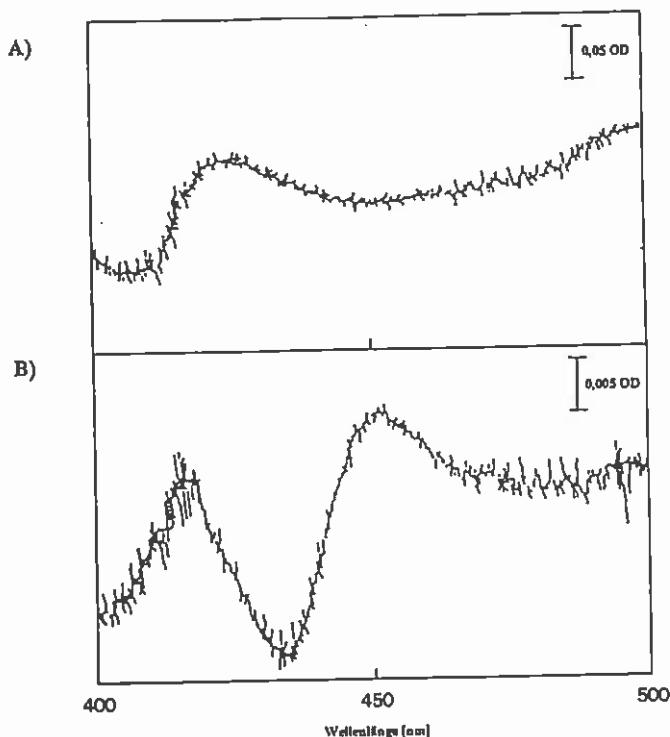


Abb. 70 A) Differenzspektrum von oxidierten minus reduzierten Mikrosomen von *Ulva lactuca*. Das Maximum liegt bei 428 nm.
 B) Differenzspektrum von reduzierten minus reduzierten und CO behandelten Mikrosomen von *Ulva lactuca*. Das Spektrum zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 417 nm und 455 nm. Proteingehalt der verwendeten Mikrosomen: 3,5 mg/ml.

In Abb. 71 (Seite 126) sind die Differenzspektren gezeigt, die mit Mikrosomen der Alge *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) aufgenommen wurden. Die Eigenfärbung dieser Mikrosomen war vernachlässigbar.

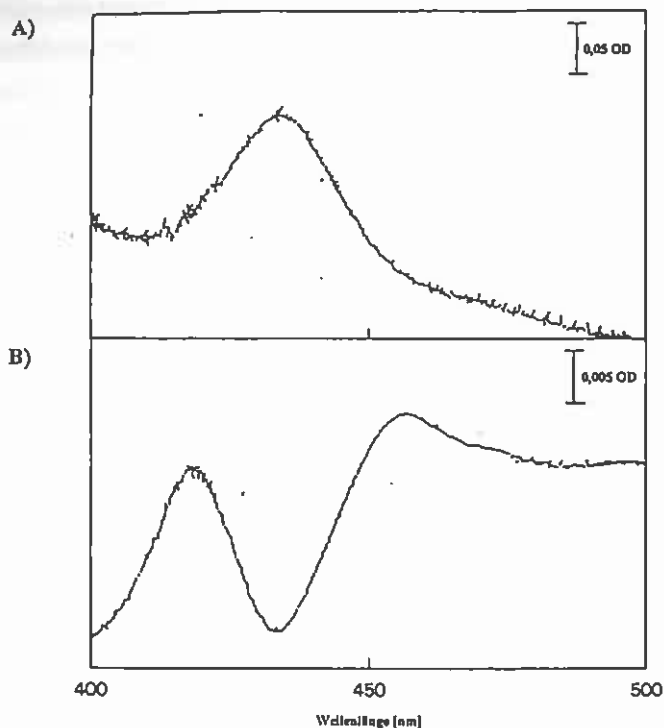


Abb. 71 A) Differenzspektrum von oxidierten minus reduzierten Mikrosomen von *Fucus vesiculosus*. Das Maximum liegt bei 428 nm.

B) Differenzspektrum von reduzierten minus reduzierten und CO behandelten Mikrosomen von *Fucus vesiculosus*. Das Spektrum zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 417 nm und 455 nm.

Proteingehalt der verwendeten Mikrosomen: 4,2 mg/ml.

Abb. 72 (Seite 127) zeigt die Differenzspektren von Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 von Mikrosomen der Alge *Polysiphonia urceolata*. Die mikrosomale Fraktion ist ähnlich wie bei *Ulva lactuca* stark durch algenspezifische Farbstoffe, wie beispielsweise das Phycocyan und das Phycoerythrin (Weberling & Schwantes, 1987), rötlich gefärbt. Allerdings zeigt sich hier eine weniger ausgeprägte Beeinflussung der Spektren als durch die Plastidenfarbstoffe bei *Ulva lactuca*.

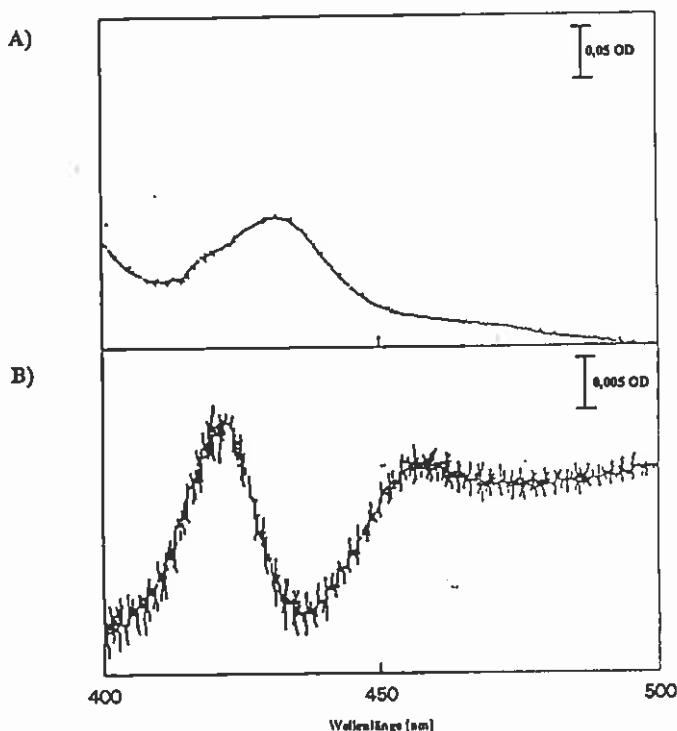


Abb. 72 A) Differenzspektrum von oxidierten minus reduzierten Mikrosomen von *Polysiphonia urceolata*. Das Maximum liegt bei 428 nm.
 B) Differenzspektrum von reduzierten minus reduzierten und CO behandelten Mikrosomen von *Polysiphonia urceolata*. Das Spektrum zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 417 nm und 455 nm.
 Proteingehalt der verwendeten Mikrosomen: 2,8 mg/ml.

Im Differenzspektrum zwischen den oxidierten minus den reduzierten ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) Mikrosomen zeigte sich sowohl im Modellsystem der Zellsuspensionskultur *Glycine max* als auch in den verschiedenen Algenproben ein Maximum zwischen 425–430 nm. Dieses Maximum wird durch das Cytochrom b_5 erzeugt. Dieses Cytochrom gehört wie das Cytochrom P-450 zum sogenannten b-Typ. Im CO-Differenzspektrum ist neben der Absorption von Cytochrom P-450 bei etwa 450 nm ein weiteres Maximum bei etwa 420 nm sichtbar. Dieser Peak läßt sich auf das Cytochrom P-420 zurückführen, das vermutlich durch Denaturierung von Cytochrom P-450 während der Präparation entsteht (Omura & Sato, 1964, Rich & Bendall, 1975).

Durch die Aufnahme von Differenzspektren ist es, wie eingangs erwähnt, möglich, die Konzentration von Cytochrom b_5 bzw. Cytochrom P-450 (Tab. 24) zu berechnen. Hierfür wurden die von Omura & Salo für Lebermikrosomen ermittelten Extinktionskoeffizienten (siehe 2.3.3.3.3) verwendet. In Tabelle 24 sind Mittelwerte aus zwei Messungen der gleichen Mikrosomenpräparation angegeben.

Tab. 24 Konzentration von Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 in Mikrosomenpräparationen aus dem Modellsystem Zellsuspensionskultur *Glycine max* und aus marinen Makroalgen der Abteilungen Chlorophyta (*Ulva lactuca*), Chromophyta (*Fucus vesiculosus*) und Rhodophyta (*Polysiphonia urceolata*).

Pflanzenspezies	Cytochrom b_5 [pmol/mg Protein]	Cytochrom P-450 [pmol/mg Protein]
<i>Glycine max</i>	130	74
<i>Ulva lactuca</i>	78	29
<i>Fucus vesiculosus</i>	85	35
<i>Polysiphonia urceolata</i>	70	33

3. Metabolismusstudien an marinen Makroalgen

Mit den folgenden Versuchen sollte die Fähigkeit mariner Algen untersucht werden, xenobiotische Stoffe zu metabolisieren. Diese Metabolismusstudien geben im Rahmen der „Grünen Leber“ wichtige Hinweise zum Verbleib von Chemikalien in der Umwelt. Solche Tests werden in der Regel an Zellsuspensionskulturen durchgeführt (Komoßa & Sandermann, 1995, Komoßa *et al.*, 1995), um den Metabolismus der untersuchten Substanz unter sterilen Bedingungen zu verfolgen. Arbeitsgruppen aus Finnland (Roy *et al.* 1994) machten ähnliche Versuche bereits mit dem Wassermooß *Fontinalis antipyretica* unter nicht-sterilen Bedingungen. Für diese Versuche von Roy *et al.* (1994) wurden Benzo(a)anthracene und Benzo(a)pyren, zwei bekannte Umweltschadstoffe, ausgewählt.

In Anlehnung an diese Arbeiten wurden Versuche mit BP auch in Meeresalgen durchgeführt. Hierzu wurde *Fucus vesiculosus* ausgewählt, eine Alge der Abteilung Chromophyta, die sehr häufig an den Küsten anzutreffen ist und sich auch in stark belasteten Gewässern (z.B. Hafengebieten) noch ansiedelt.

3.1 Zeitkinetik der Benzo(a)pyren-Aufnahme in *Fucus vesiculosus*

Da es sich bei den Versuchsobjekten um komplette Thalli von *Fucus vesiculosus* handelte, mußte bei diesem Versuch sichergestellt werden, daß der Schadstoff überhaupt in die Alge aufgenommen wird. Dabei muß die Substanz zuerst die der Alge anhaftende Schleimschicht aus sulfathaltigen Polysacchariden, sog. Fucanen, überwinden (Lüning, 1985). Die Zellwände vor allem der älteren Thalluspartien sind durch einen hohen Anteil an Polyguronsäure gekennzeichnet, die dem Thallus Festigkeit verleiht (Lüning, 1985).

Der Versuch wurde wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt und zeigte folgendes Ergebnis (Abb. 73, Seite 130).

Fucus vesiculosus zeigte eine deutlich erkennbare Aufnahme von BP innerhalb von 24 h. Die Verteilung der Radioaktivität und die Gesamtbilanz dieses Versuchs sind in Tab. 25 (Seite 131) zu sehen. Der Verlust an BP durch das Entweichen in die Luft bzw. die Adsorption der Substanz an die Glaswand betrug 3 % der Gesamtradioaktivität. Ein hoher Prozentsatz des ¹⁴C-markierten BP ist in der Schleimschicht zu finden, die anscheinend Rückhaltefunktion erfüllt. In den Algenextrakten konnten insgesamt nur 19 % der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden werden. Dabei waren im Rückstand nach zweimaliger Extraktion 10 % der Radioaktivität zu finden.

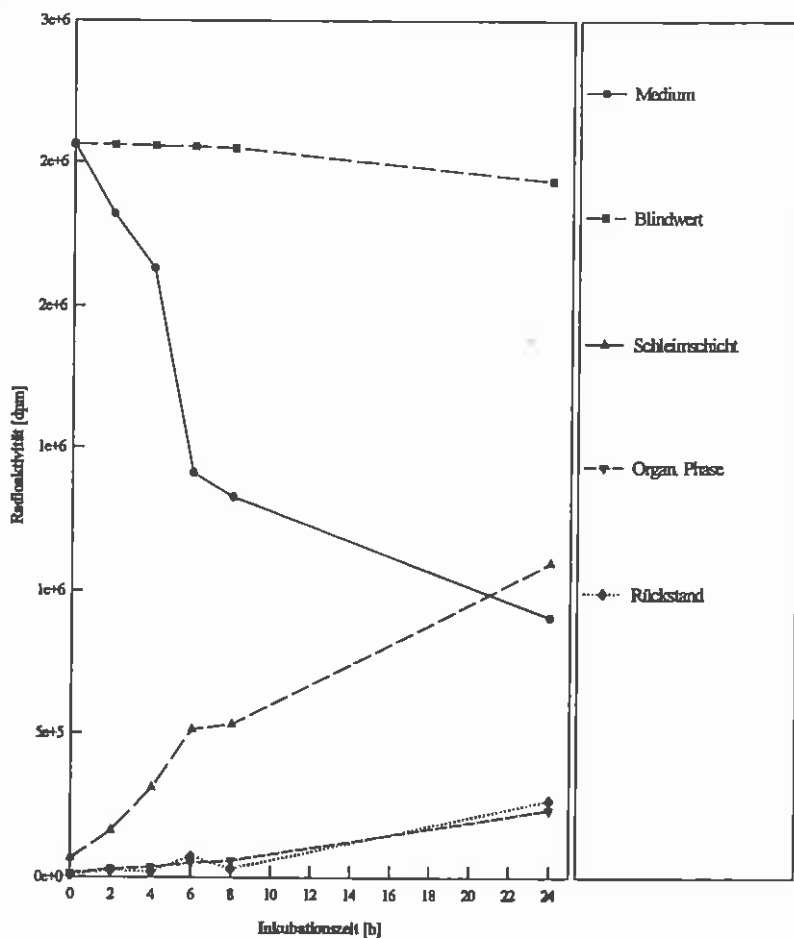


Abb. 73 Aufnahme von ^{14}C -markiertem BP in die Makroalge *Fucus vesiculosus* innerhalb von 24 h. Die Alge wurde zu jedem Probezeitpunkt nach der im Material- und Methodenteil beschriebenen Extraktionsprozedur analysiert. Als Blindwert wurde sterilfiltriertes Meerwasser (Medium) ohne Alge verwendet. Um den Verlust an BP zu minimieren, wurden alle Kolben vorher hitzebehandelt, um die Glasporen zu schließen (persönl. Mitteilung Glasbläsermeister H. Kugelstädter, Garching).

Tab. 25 Gesamtbilanz der Aufnahme von ^{14}C -markiertem BP in die marine Makroalge *Fucus vesiculosus* innerhalb einer Zeitkinetik von 24 h. Die gesamtapplizierte Radioaktivität betrug 2.563.200 dpm.

Fraktion	Radioaktivität [dpm]	% von gesamtapplizierter Radioaktivität
Medium (Meerwasser)	909.300	35
Schleimschicht	1.095.575	42
Organische Phase ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)	233.470	9
gebundener Rückstand	266.046	10
Summe	2.504.391	Summe 96

3.2 Clearance-Versuch von BP in *Fucus vesiculosus*

Um die Abgabe von aufgenommenem BP aus *Fucus vesiculosus* zu untersuchen, wurde der Clearance-Versuch durchgeführt. Der Versuch erfolgte wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Die Expositionsdauer der Alge betrug 24 h, danach wurde sie in frisches Medium (Meerwasser) umgesetzt. Die Abb. 74 zeigt die Zunahme von ^{14}C -markiertem BP im Medium nach Exposition der Alge. bzw. die Abnahme der Radioaktivität in den Thalli von *Fucus vesiculosus*.

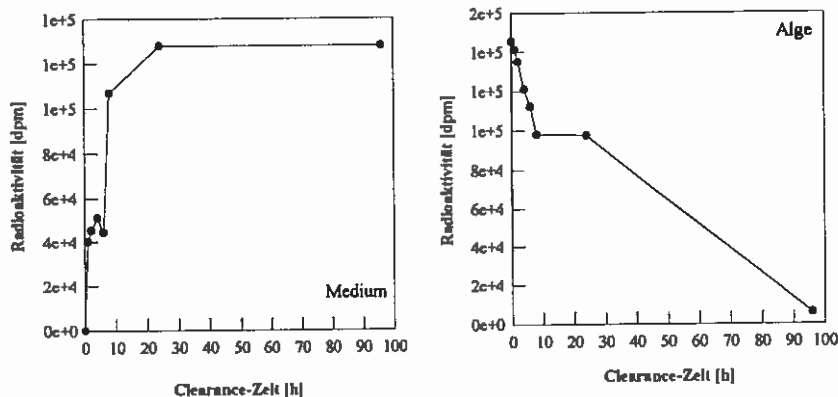


Abb. 74 Abgabe von BP in das Medium und verbleibende Radioaktivität in *Fucus vesiculosus* während des Clearance-Versuchs über 96 h. Die Abgabe von ^{14}C -BP ins Medium folgt einer Sättigungskinetik. Die Abnahme von ^{14}C -BP in der Alge scheint derselben Kinetik zu folgen.

3.3 Aufnahme von Benzo(a)pyren in verschiedenen marinen Makroalgen

Dieser Versuch sollte die Unterschiede oder Gemeinsamkeiten von marinen Makroalgen aus unterschiedlichen Algenabteilungen darstellen. Ausgewählt wurden hierbei neben *Fucus vesiculosus* als Vertreter der Chromophyta *Ulva lactuca* und *Enteromorpha compressa* als Vertreter der Chlorophyta und *Porphyra umbilicalis* sowie *Polysiphonia urceolata* als Vertreter der Rhodophyta. Alle Algenarten wurden nach dem gleichen Extraktionsschema aufgeschlossen und die Radioaktivität des ^{14}C -markierten BP im Medium, in der Schleimschicht und in der Alge bestimmt. In Abb. 75 sind die Verteilungen der Radioaktivität in den unterschiedlichen Algenspezies zu sehen.

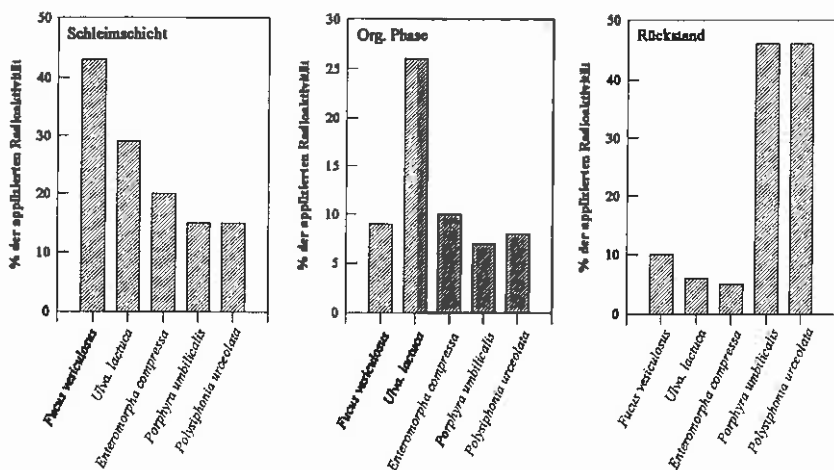


Abb. 75 Radioaktivitätsverteilung von ^{14}C -BP in unterschiedlichen Algenspezies der Abteilungen Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta. Es wurden je Alge 2.563.200 dpm appliziert. Der durchschnittliche Verlust betrug 13 %.

Der Vergleich der BP-Aufnahme in den Algenhallus zeigt, daß bei *Fucus vesiculosus* in der Schleimschicht im Vergleich zu den anderen Algen die höchste Radioaktivität zu finden ist. In der organischen Phase der Algenextrakte konnte in *Ulva lactuca* etwa doppelt soviel Radioaktivität gefunden werden wie in den anderen Algen. Hier scheint die Radioaktivität annähernd gleich verteilt. Die Verbrennung der Rückstände zeigt, daß in den Spezies der Abteilung Rhodophyta 5mal mehr Radioaktivität zu finden ist als in den übrigen Algenabteilungen.

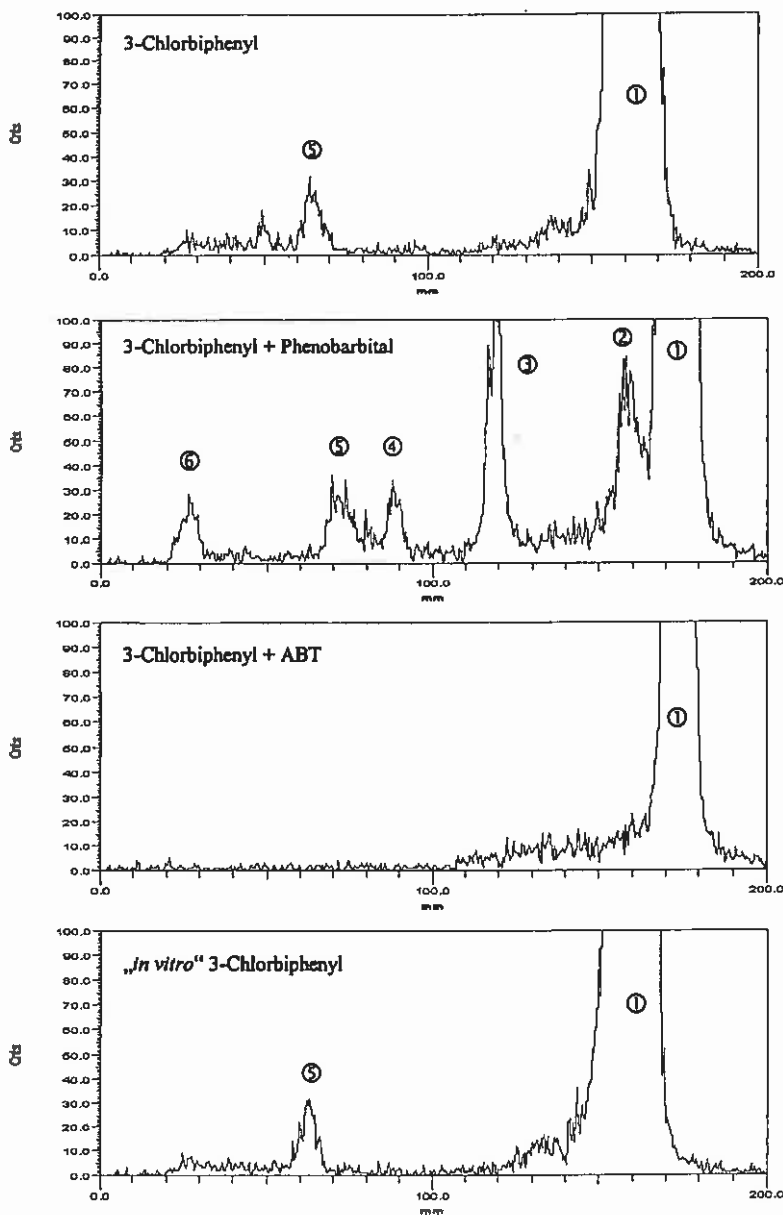
3.4 Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus

Da mit BP keine ausreichend zu charakterisierenden Metabolite entstanden, wurde in Hinblick auf das erfolgte Substratscreening das 3-Chlorbiphenyl ausgewählt. Hier konnte aus den vorher gewonnenen enzymatischen Daten auf eine Beteiligung des Cytochrom P-450 Systems geschlossen werden. Zusätzlich wurde für diese Versuche die Alge *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) eingesetzt, die unter semisterilen Bedingungen am AWI (Dr. C. Wiencke) angezogen wurde (siehe 1.6.3). Die Versuche mit dem Induktor Phenobarbital und dem Inhibitor ABT für das P-450 Monooxygenase-System wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt.

In Abb. 76 (Seite 134) sind die Dünnschichtchromatogramme der organischen Phasen von *Polysiphonia urceolata* nach 24 h Inkubation in den unterschiedlichen Systemen zu sehen. Die Abbildung 76 unten zeigt den *in vitro*-Umsatz durch Mikrosomen von *Polysiphonia urceolata*. Deutlich ist der Metabolitpeak bei R_f 0,27 zu sehen. Wird nun die Alge für 24 h mit 3-CBP inkubiert, entsteht ein Metabolit bei R_f 0,28. Durch Zusatz von Phenobarbital, einem Induktor für das P-450 Monooxygenase-System, kann die Anzahl der Metabolite auf fünf erhöht werden. Dagegen wird nach Zusatz des Inhibitors ABT für das P-450 Monooxygenase-System fast keine Metabolitenbildung mehr beobachtet.

Durch GC/MS-Analyse konnte auch hier der Metabolit 5 als 3-Chlorbiphenylol identifiziert werden.

Abb. 76 TLC-Analyse der Inkubation von *Polysiphonia urceolata* mit 3-CBP, 3-CBP + Phenobarbital und 3-CBP + ABT zur Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus. Zur Identifikation wurde ein *in vitro*-Test mit Mikrosomen aus *Polysiphonia urceolata* durchgeführt. Der dabei entstehende Metabolit 5 mit R_f 0,28 konnte durch GC/MS-Analyse als 3-Chlorbiphenylol mit einer Masse von 205,1 identifiziert werden. Dieser Metabolit entsteht auch bei Inkubation der Alge mit 3-CBP und Phenobarbital. Durch Phenobarbitalgabe wird das Metabolitenspektrum stark vergrößert. Dagegen kann mit ABT der Metabolismus von 3-CBP vollständig gehemmt werden (Seite 134).



In Abb. 77 sind die Verteilungen der Radioaktivität in den unterschiedlichen Fraktionen der Algeninkubationen zu sehen. Die Algen wurden nach der im Material- und Methodenteil beschriebenen Methode extrahiert.

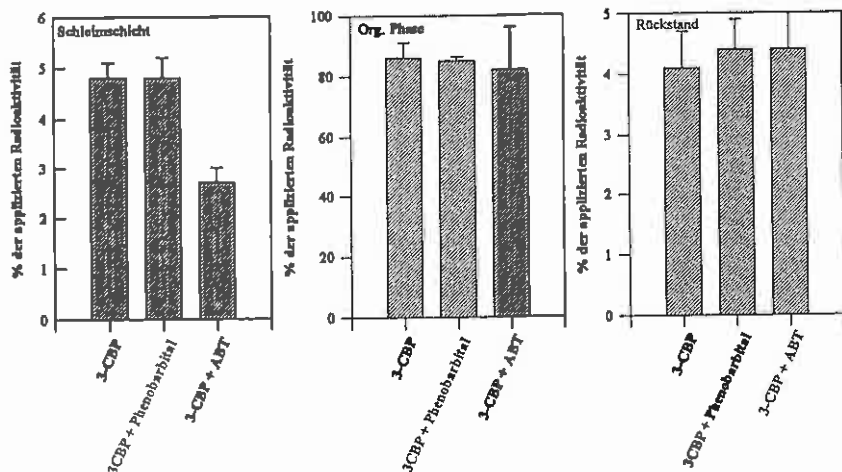


Abb. 77 Radioaktivitätsverteilung von ^{14}C -3-CBP in unterschiedlich behandelten Algenhalli von *Polysiphonia urceolata*. Je Alge wurden 691.633 dpm appliziert. Der durchschnittliche Verlust betrug 8 % der Gesamtradioaktivität. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert aus zwei unabhängigen Inkubationen dar. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Trotz der Unterschiede im Auftreten von 3-CBP-Metaboliten zeigten sich bei der Gesamtanalyse der unterschiedlich behandelten Algen keine signifikanten Unterschiede. Eine Ausnahme bildete die Schleimschicht von *Ulva lactuca*, die zusätzlich zu 3-CBP auch mit ABT behandelt wurde. Hier ist nur die Hälfte der Radioaktivität im Vergleich zu den anderen Inkubationen zu finden. Aber sowohl in der organischen Phase als auch bei der Rückstandsverbrennung konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Inkubationen festgestellt werden.

4. Induktion des Cytochrom P-450- und des GST-Systems in Algen

Aus den Experimenten von Punkt 3.1 konnte die Aufnahmekinetik von Xenobiotika in die Alge gezeigt werden. Anschließend an diese Versuche sollte nun getestet werden, ab welchem Zeitpunkt die für die Alge wichtigen Entgiftungsenzysysteme durch den Einfluß von Xenobiotika induziert werden. Als Versuchsobjekte wurden die Braunalge *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) und die Grünalge *Ulva lactuca* (Chlorophyta) ausgesucht.

4.1 Zeitkinetik der Induktion

4.1.1 P-450 Monooxygenase-System

Dafür wurde wiederum BP als meeresbiologisch relevantes Xenobiotikum eingesetzt. Der zeitliche Verlauf der Induktion am Beispiel der LAH ist in Abb. 78 zu sehen.

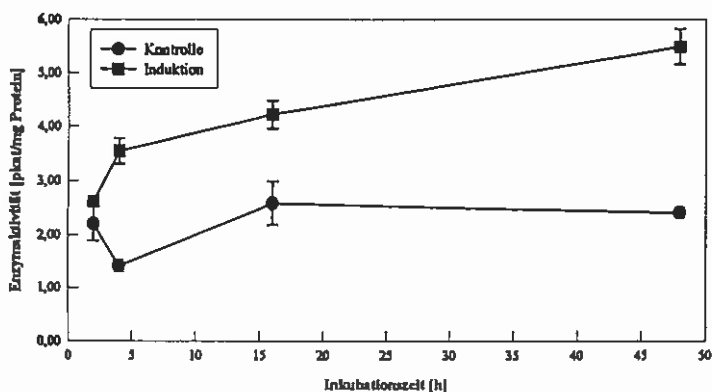


Abb. 78 Zeitlicher Verlauf der Induktion der LAH in *Fucus vesiculosus* durch 48 h Inkubation mit BP. Während die Enzymaktivität in den Kontrollalgen weitgehend konstant bleibt, steigt die LAH-Aktivität beinahe linear an. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Die Abb. 79 (Seite 137) zeigt den zeitlichen Verlauf der Induktion durch BP in *Ulva lactuca* innerhalb von 48 h.

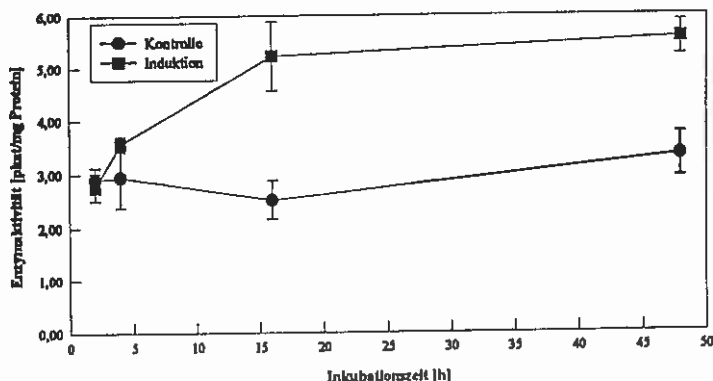


Abb. 79 Zeitlicher Verlauf der Induktion der LAH durch BP in der marinen Makroalge *Ulva lactuca* innerhalb von 48 h. Die Enzymaktivität in den Kontrollalgen ist über diesen Zeitraum weitgehend konstant, wohingegen in den behandelten Pflanzen eine induktive Wirkung des BP bereits nach 4 h Inkubation zu beobachten ist. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

In beiden Algen war es möglich, die LAH als Bestandteil des P-450 Monooxygenase-Systems durch Inkubation der Algen mit BP zu induzieren. Dabei wurden Induktionsraten der LAH von 126 % über der unbehandelten Kontrolle erzielt.

4.1.2 Glutathion S-Transferase-System

In denselben Algen, in denen die LAH gemessen wurde, wurde auch die GST-Aktivität bestimmt. Hierzu wurden die vier Substrate CDNB für die Haupt-GST, DCNB für ein mögliches Isoenzym der GST, EPNP als ein Epoxisubstrat, welches im Screening keine mikrosomale Aktivität hervorrief, und die trans-Zimtsäure als das natürliche Substrat der GST verwendet.

4.1.2.1 mGST

Die induktive Wirkung von BP auf das membrangebundene Enzymsystem der mGST in *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) ist in Abb. 80 zu sehen. Die Aktivitätsbestimmung wurde mit den Modellsubstraten CDNB, DCNB und EPNP in denselben Mikrosomenfraktionen durchgeführt, mit denen unter Punkt 4.1.1 die LAH-Aktivität bestimmt wurde.

In der mikrosomalen Fraktion von *Fucus vesiculosus* zeigte sich eine Induktion der mGST, gemessen mit CDNB als Substrat. In den Mikrosomen konnte dagegen in den mit BP behandelten Proben keine mGST-Aktivität für DCNB als Substrat bestimmt werden. Die Kontrollalgen hingegen zeigten Aktivität mit diesem Substrat. Für EPNP konnte, wie auch schon im Screeningteil festgestellt, keine mGST-Aktivität gemessen werden.

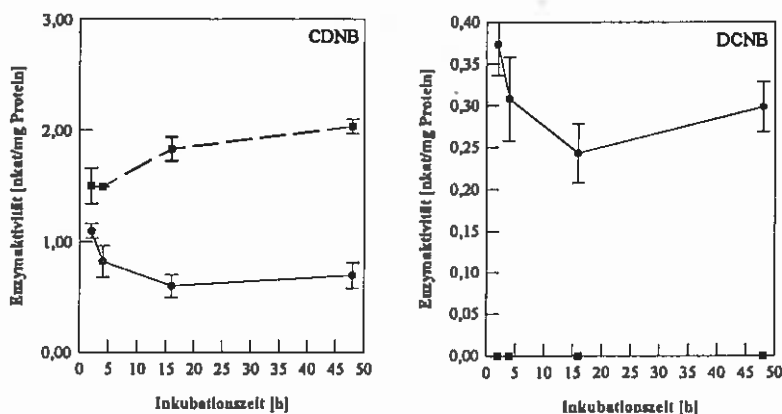


Abb. 80 Zeitlicher Verlauf der Induktionswirkung auf die mGST durch Inkubation mit BP über 48 h in der marinen Makroalge *Fucus vesiculosus*. Die mGST-Aktivität, gemessen mit CDNB, zeigt eine zunehmende Induktion der Enzymaktivität für dieses Modellsubstrat. DCNB als Substrat der mGST zeigt bereits nach 4 h, daß keine Messung der mGST mit diesem Substrat mehr möglich ist. ■=Induktion, ●=Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Der zeitliche Verlauf der Induktion des mGST-Systems in der einjährigen Grünalge *Ulva lactuca* ist in Abb. 81 (Seite 139) zu sehen. Auch hier konnte keine Induktion der mGST für das Modellsubstrat EPNP festgestellt werden.

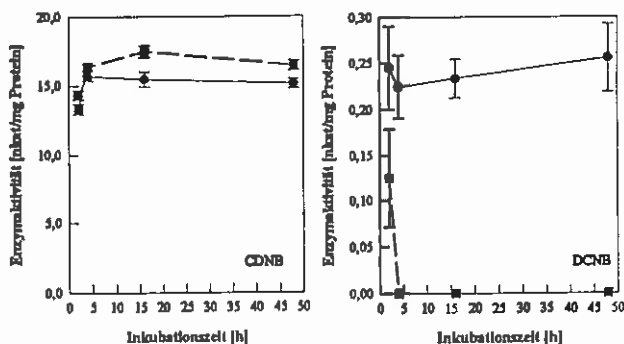


Abb. 81 Zeitlicher Verlauf der Induktionswirkung auf die mGST durch Inkubation mit BP über 48 h in der marinen Makroalge *Ulva lactuca*. Die mGST für CDNB wird nur schwach induziert, während die mGST für DCNB bereits nach 2 h Inkubation keine Aktivität mehr zeigt. ■=Induktion, ●=Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

4.1.2.2 cGST

In Abb. 82 ist der zeitliche Verlauf der cGST-Induktion durch Inkubation von Thalli der Alge *Fucus vesiculosus* mit BP zu sehen.

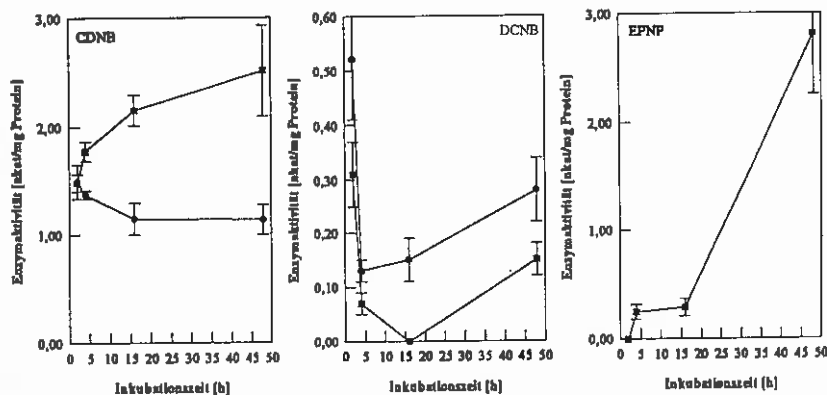


Abb. 82 Induktive Effekte der cGST in der marinen Makroalge *Fucus vesiculosus* nach 48 h Inkubation mit BP. Die DCNB-Aktivität dieses Enzymsystems steigt rasch an. Die DCNB-Aktivität fällt in den ersten Stunden rapide ab, erholt sich dann aber bis zum Versuchsende wieder. Die EPNP-Aktivität konnte in den Kontrollen nicht gemessen werden, in den behandelten Algen steigt die Aktivität der cGST für dieses Substrat linear an. ■=Induktion, ●=Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Auf der Ebene der cGST kann eine rasche Induktion dieses Enzymsystems, gemessen mit dem Modells substrat CDNB, bereits nach 4 h Inkubation mit BP beobachtet werden. Diese Induktion der Haupt-GST scheint auf Kosten des Isoenzym, gemessen mit DCNB, zu gehen. Die Aktivität dieses Enzyms nimmt innerhalb der ersten 4 h rapide ab, erholt sich aber bis zum Inkubationsende wieder. Allerdings bleibt die cGST-Aktivität der behandelten Probe immer unterhalb der cGST-Aktivität der Kontrolle. Mit EPNP als Substrat für die cGST konnte in den Kontrollen zu keinem Zeitpunkt Enzymaktivität bestimmt werden. Allerdings wurde diese GST-Aktivität in den behandelten Proben fast linear gesteigert.

Der zeitliche Verlauf der Induktion innerhalb von 48 h in der Makroalge *Ulva lactuca* aus der Abteilung der Chlorophyta ist in Abb. 83 dargestellt.

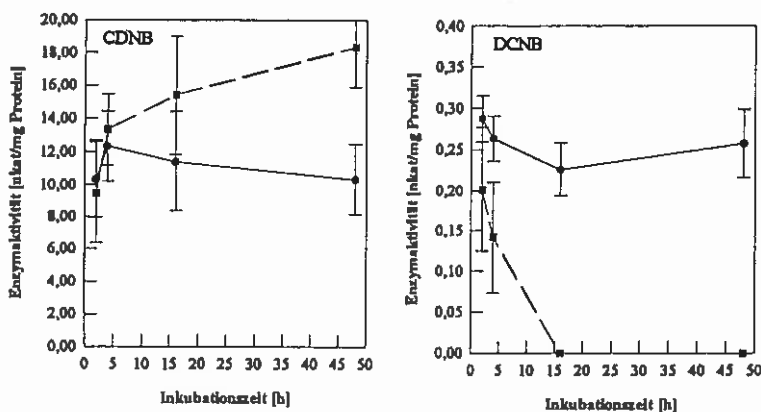


Abb. 83 Zeitlicher Verlauf der BP-Induktion der cGST in der marinen Makroalge *Ulva lactuca* nach 48stündiger Inkubation. Die cGST, gemessen mit dem Modells substrat CDNB, zeigt eine rasche Induktion. Die cGST, gemessen mit DCNB, zeigt im Gegenzug eine rapide Abnahme der Enzymaktivität und kann nach 16 h Inkubation nicht mehr bestimmt werden. ■=Induktion, ●=Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Die cGST in *Ulva lactuca* zeigt bereits nach 4 h Inkubation mit BP eine starke Induktion. Diese ist vergleichbar mit der Reaktion der cGST in der Braunalge *Fucus vesiculosus*. Ebenso wie in *Fucus* wird die Aktivität des Isoenzym der cGST, dessen Aktivität durch das Modells substrat DCNB bestimmt werden kann, reprimiert. Nach 16stündiger Inkubation mit BP ist keine DCNB-cGST mehr zu messen.

4.2 Induktorscreening in marinen Makroalgen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß sowohl das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System als auch das System der m- und cGST durch BP induziert werden kann. Im folgenden sollten nun verschiedene, zum Teil aus der Literatur bekannte Induktoren getestet werden. Für eine Einschätzung des induktiven Effektes verschiedener Substanzen wurden neben den Aktivitäten der detoxifizierenden Enzyme die Standardparameter GSH/GSSG-Gehalt, Chlorophyllgehalt und die Enzymaktivität ausgewählter Markerenzyme wie der G-6-PDH, der Isocitrat-DH und der Glutathionreduktase bestimmt.

Die Induktion des P-450 Monooxygenase-Systems durch die bekannten Induktoren Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, β -Naphthoflavon und Clofibrate, alle in einer Konzentration von 2 mM im Test, zeigte auf der Ebene der LAH hohe Induktionsraten von 200-1000 % über der Kontrollinkubation (Abb. 84, Seite 142). Auch durch xenobiotische Stoffe wie das BP, das Phenanthren und das 3-CBP ließ sich die LAH in *Fucus vesiculosus* induzieren. Als schwächste Induktoren erwiesen sich Phenanthren und 3-CBP mit 80 und 270 % über der Kontrollinkubation. Auch das Dieselöl und das Herbizid Atrazin konnten als Induktoren für die LAH dienen mit Induktionsraten von 480 und 690 % über der Kontrollinkubation. Die Fettsäurehydroxylasen SAH und PAH konnten ebenfalls induziert werden, allerdings lagen hier die Induktionsraten zwischen 40 und 1400 % der Kontrollinkubation. Wurde die Aktivität des P-450 Monooxygenase-Systems in den induzierten Proben mit dem xenobiotischen Substrat 3-CBP bestimmt, konnte ebenfalls eine induktive Wirkung beobachtet werden. Die Induktionsraten lagen bei jedem der untersuchten Induktoren über den Induktionsraten der SAH und PAH.

Messungen der mGST in derselben Mikrosomenfraktion ergaben das in Abb. 85 (Seite 144) dargestellte Bild. Auch bei diesem membrangebundenen Enzymsystem konnte bei den Induktoren Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, β -Naphthoflavon und Clofibrate eine hohe Induktion der mGST, gemessen mit dem Modellsusstrat CDNB, beobachtet werden. Die Induktionsraten lagen dabei im Bereich von 80 bis 1000 % über der Kontrollinkubation. Kaum einen induktiven Effekt auf die mGST zeigten die Substanzen BP, Phenanthren und 3-CBP. Dagegen kann das Dieselöl als PAK-Gemisch und das Herbizid Atrazin wieder eine Induktion von 540 bzw. 390 % über der Kontrollinkubation auslösen. Mit den anderen untersuchten Substraten zur Aktivitätsbestimmung der mGST konnte nur bei Phenobarbital eine DCNB-

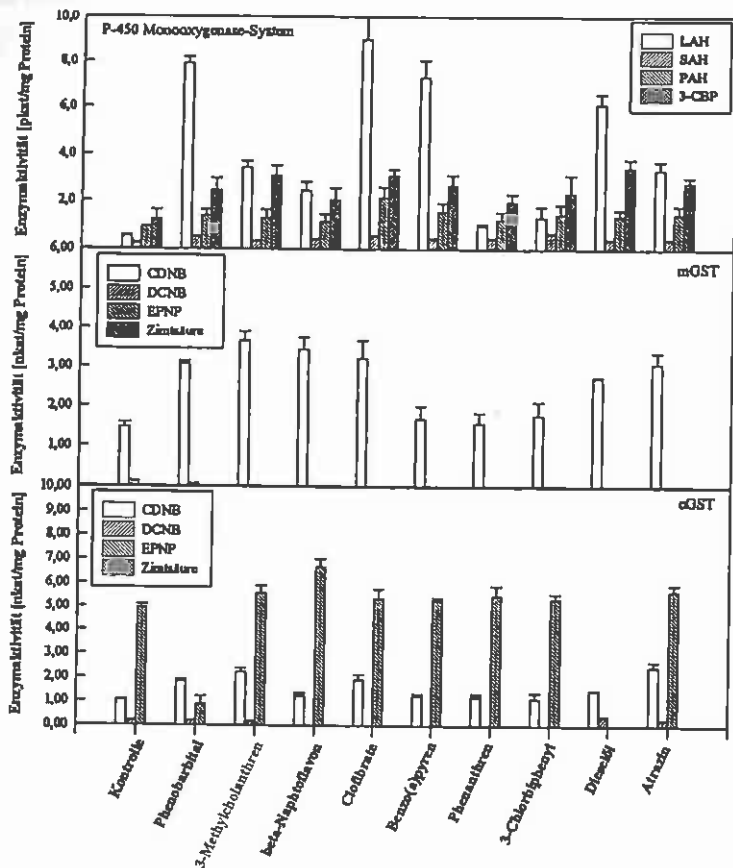


Abb. 84 Induktorscreening in der marinen Makroalge *Fucus vesiculosus* nach 24 h Inkubation durch Aktivitätsbestimmung des Cytochrom P-450-Systems und der m- und cGST mit unterschiedlichen Substraten. Alle Induktoren waren in einer Konzentration von 2 mM in Ethanol gelöst. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Aktivität bestimmt werden. Diese lag aber 4 % unter der Aktivität der Kontrollinkubation. Mit EPNP und dem natürlichen Substrat trans-Zimtsäure konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Die cGST zeigte wie die mGST nur niedrige Induktionsraten von 5 bis 15 % über der Kontrollinkubation, gemessen mit dem Substrat CDNB. Auch bei diesem Enzymsystem gelang die Aktivitätsbestimmung mit dem Substrat DCNB nur in sehr wenigen Inkubationen

(Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, Dieselöl und Atrazin), wobei nur bei der Inkubation der Alge mit Dieselöl eine leichte Induktion der cGST-Aktivität erkennbar war. Die cGST-Aktivität, bestimmt mit dem Substrat EPNP, zeigte ebenfalls nur eine geringe Induktion. Diese war mit 15 % bei β -Naphthoflavon am höchsten.

Zur Absicherung der induktiven Wirkung der verwendeten Induktoren wurden, wie eingangs erwähnt, auch verschiedene Standardparameter in der Alge bestimmt. Diese sind zusammengefaßt in Abb. 85 (Seite 144) zu sehen. Die cytosolischen Markerenzyme G-6-PDH und IDH zeigten nicht signifikante Veränderungen durch die Induktorbehandlung. Die G-6-PDH-Aktivität schwankte in einem Bereich von 30-38 nkat/mg Protein und die IDH in einem Aktivitätsbereich von 1,6-2,2 nkat/mg Protein. Die GR, als Enzym des Glutathionstoffwechsels, war etwas größeren Schwankungen unterworfen. Mit Ausnahme der BP-Induktion nahm ihre Aktivität im Vergleich zur Kontrollinkubation leicht zu. Dabei bleiben die Steigerungsraten im Prozentbereich von 2-5 % im Vergleich zur Kontrollinkubation.

Der GSH/GSSG-Gehalt im Algenhüllus zeigte dagegen einige sehr dramatische Veränderungen. Während in der Kontrollinkubation beide Thiole gut detektierbar waren, konnte in den induktorbehandelten Proben kein GSSG mehr nachgewiesen werden.

Der Pigmentgehalt, ausgedrückt in der Konzentration an Chlorophyll a, zeigte für *Fucus vesiculosus* keine nennenswerten Schwankungen. Die Werte in den Inkubationen mit Clofibrate, BP und 3-CBP sind zwar um etwa 12 % erhöht, scheinen aber keine signifikante Aussage zu haben.

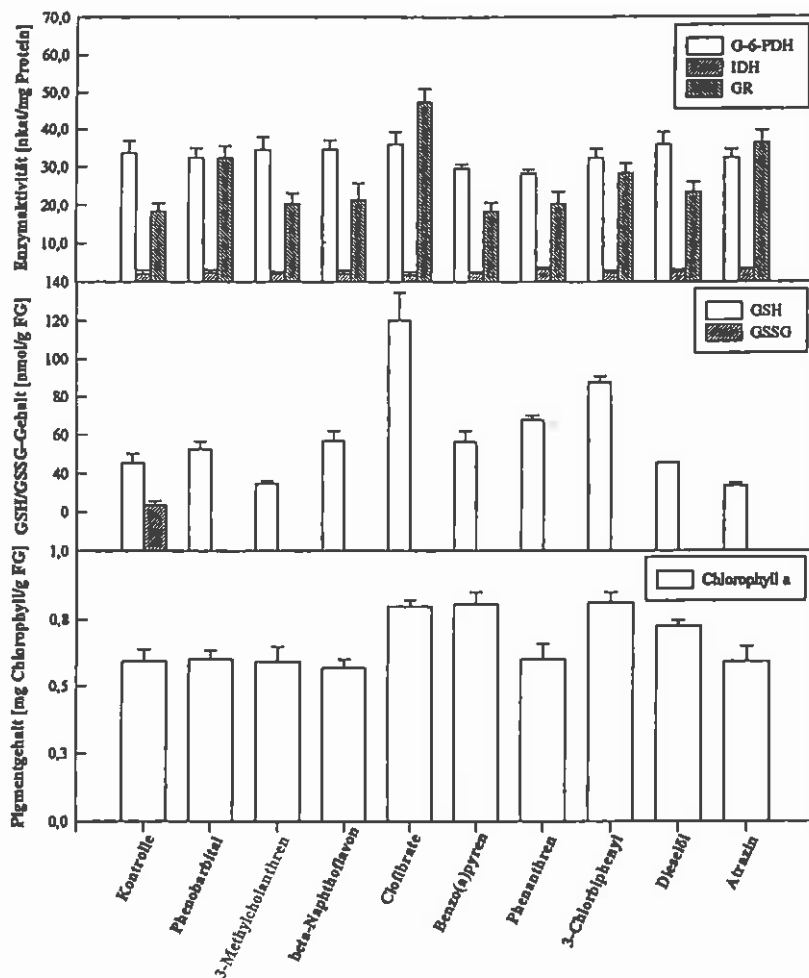


Abb. 85 Vergleich der induktiven Wirkung der verwendeten Induktoren auf die G-6-PDH, IDH und GR sowie auf den GSH/GSSG- und Chlorophyllgehalt in der marinen Makroalge *Fucus vesiculosus*. Die Inkubationsdauer betrug 24 h. Alle Induktoren waren in einer Konzentration von 2 mM in Ethanol gelöst. Bei den enzymatischen Messungen ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$), bei den Pigmentmessungen der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 12$) gezeigt.

Um die Induktion der verschiedenen Substanzen zu vergleichen, wurde dieser Versuch mit der Grünalge *Ulva lactuca* wiederholt. Die dabei gemessenen Enzymaktivitäten sind in Abb. 86 (Seite 146) zu sehen.

Das P-450 Monooxygenase-System wurde wie in der Braunalge *Fucus vesiculosus* stark induziert. Den stärksten induktiven Effekt auf dieses Enzym zeigte Clofibrate, den schwächsten das Phenanthren. Durch die für das P-450-System bekannten Induktoren wie das Phenobarbital, das 3-Methylcholanthren, das β -Naphthoflavon oder das Clofibrate wurden die SAH und die PAH im gleichen Maße induziert. Mit BP, Phenanthren, 3-CBP, Dieselöl und Atrazin wurde die SAH immer etwa stärker induziert als die PAH. Die induktive Wirkung der verwendeten Substanzen auf das P-450, gemessen mit 3-CBP als xenobiotischem Substrat, war sehr groß. Hier schien das BP neben dem Clofibrate der beste Induktor zu sein.

Die mGST, deren Aktivität mit CDNB bestimmt wurde, wurde nur in einem geringen Prozentsatz von 5 bis 16 % über der Kontrollinkubation induziert, wobei die Induktion mit 3-Methylcholanthren mit 16 % und bei β -Naphthoflavon mit 14 % über der Kontrollinkubation am größten war. Während eine Aktivität für die anderen untersuchten Modellssubstrate wie das DCNB kaum und das EPNP überhaupt nicht gemessen werden konnte, wurde die trans-Zimtsäure als natürliches Substrat im hohen Maße induziert umgesetzt.

Ein sehr ähnliches Bild ergab sich für die Aktivitätsbestimmungen mit der cGST. Auch dieses Enzymsystem wurde, gemessen mit CDNB, nur sehr wenig induziert. Das Clofibrate wirkte hier mit 14 % über der Kontrollinkubation als bester Induktor. Die DCNB-Aktivität der cGST konnte nur noch bei der Inkubation mit Clofibrate gemessen werden. Die EPNP-Aktivität wurde durch 3-Methylcholanthren, β -Naphthoflavon, Clofibrate, Dieselöl und durch das Herbizid Atrazin induziert. Die cGST-Aktivität für die trans-Zimtsäure ließ sich nur durch die xenobiotischen Induktoren BP, Phenanthren und besonders 3-CBP induzieren.

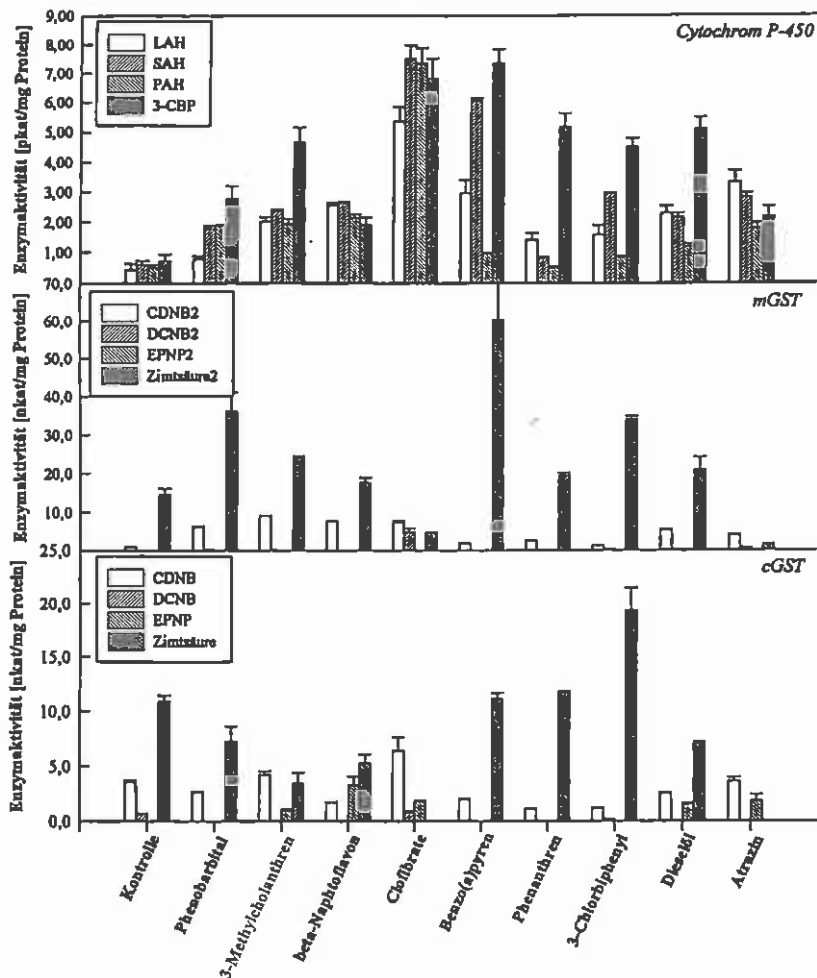


Abb. 86 Induktive Effekte auf die Aktivität des Cytochrom P-450 Systems, der mGST und der cGST in der marinen Makroalge *Ulva lactuca* (Chlorophyta) nach 24 h Inkubation mit verschiedenen bekannten Induktoren, meeresbiologisch relevanten PAK's und dem Herbizid Atrazin. Alle Induktoren waren in einer Konzentration von 2 mM in Ethanol gelöst. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$).

Die zusätzlich in den Algenproben bestimmten Standardparameter sind in Abb. 87 zusammengefaßt.

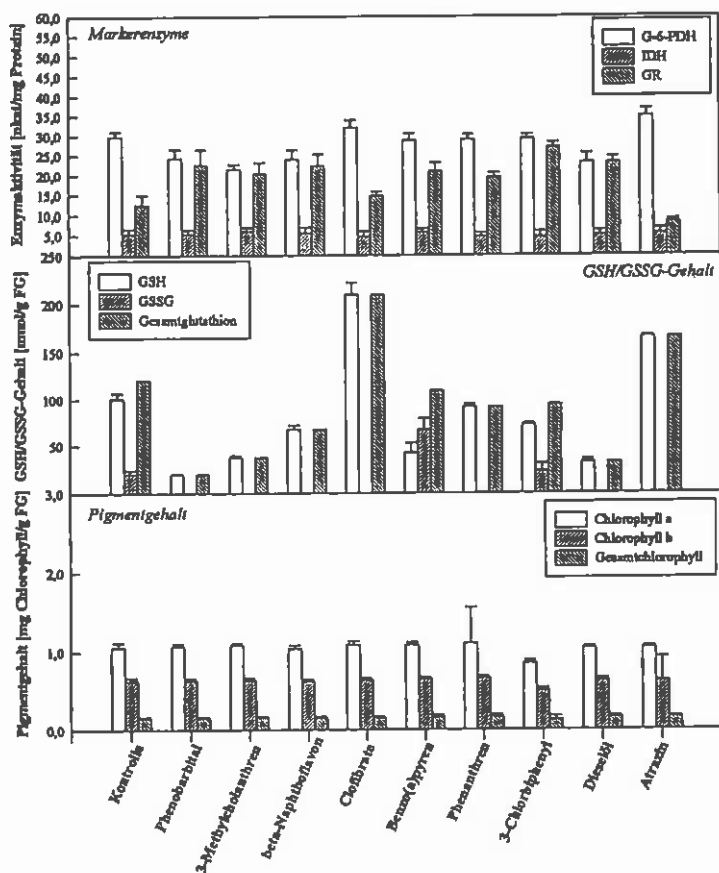


Abb. 87 Vergleich der induktiven Wirkung auf die G-6-PDH, IDH und GR sowie auf den GSH/GSSG- und den Chlorophyllgehalt in der marinen Makroalge *Ulva lactuca*. Die Inkubationsdauer betrug 24 h. Alle Induktoren waren in einer Konzentration von 2 mM in Ethanol gelöst. Bei den enzymatischen Messungen ist der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 3$), bei den Pigmentmessungen der Mittelwert $\pm$ SA ($n = 12$) gezeigt.

Die Markerenzyme G-6-PDH und IDH zeigten durch die Behandlung mit den verschiedenen Induktoren keine Veränderung in der Enzymaktivität. Die Enzymaktivität lag für die G-6-PDH im Bereich von 23-34 nkat/mg Protein und für die IDH im Bereich von 5-7 nkat/mg Protein. Die GR zeigte, wie schon bei den Inkubationen mit *Fucus vesiculosus*, einen leichten Anstieg gegenüber der Kontrollinkubation. Der GSH/GSSG-Gehalt in den Algentalli war wiederum einer großen Veränderung unterworfen. Während in der Kontrollinkubation GSH und GSSG zu messen waren, konnte in den Induktionen wiederum kein GSSG detektiert werden.

Der Pigmentgehalt von Chlorophyll a und b sowie der Gesamtchlorophyllgehalt in *Ulva lactuca* waren trotz der Induktionsbehandlung keinen großen Schwankungen unterworfen.

IV. Diskussion

1. Validierung der Methoden

In dieser Arbeit wurden zu einem großen Teil enzymatische Testmethoden angewendet, die teilweise schon lange aus der Literatur bekannt sind, so beispielsweise die Aktivitätsbestimmung der GST mit dem Modellsubstrat CDNB seit 1974 (Habig *et al.*, 1974). Bei vielen dieser Tests existiert aber nur eine sehr spärliche Datengrundlage in Bezug auf pflanzliche Extrakte.

In dieser Arbeit wurde bei jedem durchgeführten Enzymtest mindestens eine 4-fach höhere Substratkonzentration eingesetzt wurde, als der K_m -Wert für das betreffende Substrat ausmacht, kann bei der Mehrzahl der in dieser Arbeit eingesetzten Pflanzenextrakte davon ausgegangen werden, daß die Aktivitätsmessung für das jeweilige Enzym im V_{max} -Bereich erfolgte.

Auch die Aufarbeitungsmethode zur Herstellung der mikrosomalen und löslichen Extrakte, die in dieser Arbeit optimiert wurde, ist für die allermeisten der bearbeiteten Pflanzen geeignet, da recht hohe Enzymaktivitäten auch in den unterschiedlichen Enzymsystemen detektiert werden konnten.

Auch die Extraktionsmethode spielt bei der Aktivitätsbestimmung bzw. bei der Substratspezifität mancher Enzyme eine entscheidende Rolle. Die hier ermittelten Ergebnisse für die O-GT's beispielsweise lassen den Schluß zu, daß die verwendete Enzymextraktionsmethode einen großen Einfluß auf die später zu messenden O-GT-Enzyme ausübt. So konnten auch Galland & Balke (1995) in ihrer Enzymextraktion aus der Zellsuspensionskultur von *Glycine max* zwar O-GT's messen, die verschiedene hydroxylierte Metabolite des Herbizides Bentazon und auch den Fremdstoff 2,4-Dichlorphenol umsetzten, es war ihnen aber nicht möglich, eine PCP- und eine DDA-O-GT zu beobachten. Auch Meßner (persönl. Mitteilung Dr. B. Meßner, BIOP, GSF München) gelang mit seiner Extraktionsmethode zwar die Bestimmung der 2,4,5-TCP-O-GT, nicht aber die Detektion einer PCP-O-GT in Zellsuspensionskulturen von *Picea abies*.

2. Screening der detoxifizierenden Enzymsysteme

In Untersuchungen detoxifizierender Enzymsysteme in Pflanzen, so etwa des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems, des Glutathion S-Transferase-Systems und des Glucosyltransferase-

Systems, konnten verschiedene Autoren (Salaün *et al.*, 1978, Durst *et al.*, 1992, Lamoureux & Rusness, 1989, Edwards & Owen, 1986, Wetzal & Sandermann, 1994, Pridham, 1964) Aktivitäten einiger dieser Enzyme detektieren. Die Tab. 24 (Seite 151) gibt nur eine kleine Auswahl der bisher untersuchten Pflanzenspezies wieder, wobei hier auch etiiert angezogene Keimlinge, vorinduzierte Wurzelknollen und pflanzliche Zellkulturen einbezogen wurden. Damit wird deutlich, daß die bestehende Datengrundlage auf dem Gebiet der höheren Pflanzen insgesamt gesehen gut, wenn auch sehr heterogen, ist. Auf dem Gebiet der niederen Pflanzen und der marinen Makroalgen fehlen aber Daten hinsichtlich Xenobiotika-abbauenden Enzymsystemen; auch Naturstoffenzyme sind kaum charakterisiert.

Bei den meisten Untersuchungen wurde nur ein einzelnes Enzymsystem betrachtet. Dadurch fehlt ein Überblick über die Verteilung der Enzymaktivität auf die Bandbreite der in einem System vorkommenden detoxifizierenden Enzyme.

In der Regel wurden auch nur pflanzliche Zellkulturen oder Keimlinge als Modellsystem zur Untersuchung herangezogen. Mit Pflanzen wurde vorwiegend im landwirtschaftlichen Bereich gearbeitet (Moreland *et al.*, 1995, Lamoureux & Rusness, 1989, Gallant & Balke, 1995). Die im Rahmen der „Grünen Leber“ getätigten Experimente wurden ebenfalls nur an Zellsuspensionskulturen (Wetzal & Sandermann, 1994, Sandermann *et al.*, 1991), Keimlingen (Diesperger, 1979, v.d. Trenck, 1980) oder an höheren Pflanzen wie beispielsweise den Bäumen (Schröder *et al.*, 1990, Schröder & Rennenberg, 1992) durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Screening detoxifizierender Enzyme in niederen Pflanzen und marinen Makroalgen vorgenommen. Dabei wurden in insgesamt sechs Pflanzenabteilungen, den Pteridophyta (Farngewächsen), den Bryophyta (Moosen), den Mycobionta (Pilzen), den Chlorophyta (Grünalgen), den Chromophyta (Braunalgen) und den Rhodophyta (Rotalgen) die Aktivität ausgewählter Enzymspezies des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems, des Glutathion S-Transferase-Systems und des Glucosyltransferase-Systems sowohl mit endogenen als auch mit exogenen Substraten bestimmt. Als Vergleich zur Enzymaktivität in den niederen Pflanzen und Algen wurden einige Spezies der höheren Pflanzen aus der Abteilung Spermatophyta sowie vier Zellsuspensionskulturen herangezogen.

Tab. 26 Einige der bisher von anderen Arbeitsgruppen untersuchten Pflanzen bzw. pflanzlichen Zellsuspensionskulturen, in denen Enzymsysteme detektiert wurden, die auch im Entgiftungsstoffwechsel eine Rolle spielen.

Pflanze bzw. Zellkultur	Enzymsystem	Literatur
Keimlinge von <i>Glycine max</i>	CA4H (P-450)	Kochs, 1988
ZK <i>Phaseolus sativum</i>	CA4H	v.d. Trenck, 1980
ZK <i>Solanum tuberosum</i>	CA4H	Diaperger, 1979
ZK <i>Chenopodium rubrum</i>	CA4H	v.d. Trenck, 1980
etiolierte Keimlinge von <i>Sorghum vulgare</i>	CA4H	Rowell et al., 1974
<i>Solanum tuberosum</i> Wurzelknolle	CA4H	Rich & Lamb, 1977
<i>Tulipa gesneriana</i> Knolle	CA4H	Rich & Lamb, 1977
<i>Helianthus tuberosus</i> Wurzelknollen	LAH (P-450)	Salaün et al., 1989
etiolierte Keimlinge von <i>Vicia sativa</i>	LAH	Salaün et al., 1988
etiolierte Keimlinge von <i>Phaseolus sativum</i>	LAH	Benveniste et al., 1982
<i>Triticum aestivum</i>	Oxalotoluron N-demethylase (P-450)	Mougin et al., 1992
<i>Persea americana</i> Mesocarp	p-Chlor-N-methylamin-Demethylase	O'Keefe, et al., 1992
<i>Juglans regia</i> Karyotheca	Tryptaminhydroxylase (P-450)	Grasse, et al., 1992
<i>Helianthus tuberosus</i> Wurzelknolle	Biphenylhydroxylase	Borlakoglu & John, 1989
<i>Fucus</i> sp.	Arylhydroxylase (Bp)	Payne, 1977
<i>Ascophyllum</i> sp.	Arylhydroxylase (Bp)	Payne, 1977
etiolierte Keimlinge von <i>Vigna radiata</i>	Benzoxazhydroxylase	Moreland et al., 1993
etiolierte Keimlinge von <i>Vigna radiata</i>	Isoxanthohydroxylase	Moreland et al., 1993
ZK <i>Glycine max</i>	mGST (Zinksture)	Diaperger & Sandermann, 1979
ZK <i>Phaseolus vulgaris</i>	mGST (Zinksture)	Edwards & Dixon, 1991
<i>Arabidopsis thaliana</i>	cGST	Bartling et al., 1993
<i>Zea mays</i>	cGST (Atrazin)	Frear & Swanson, 1970
<i>Sorghum vulgare</i>	cGST (Atrazin)	Frear & Swanson, 1970
<i>Avena sativa</i>	cGST (Atrazin)	Frear & Swanson, 1970
<i>Amaranthus retroflexus</i>	cGST (Atrazin)	Frear & Swanson, 1970
<i>Triticum aestivum</i>	cGST (Atrazin)	Frear & Swanson, 1970
<i>Picea abies</i>	cGST (CDNB)	Schröder et al., 1990
<i>Pinus mugo</i>	cGST (CDNB, DCNB)	Schröder & Remmenberg, 1992
<i>Peunia</i>	cGST (CDNB)	Debus & Schröder, 1991
<i>Phaseolus</i>	cGST (CDNB)	Debus & Schröder, 1991
<i>Taxus baccata</i>	cGST (CDNB, DCNB, pNBC, EFNP)	Götzberger, 1994
<i>Juniperus communis</i>	cGST (CDNB, DCNB, pNBC, EFNP)	Götzberger, 1994
<i>Larix decidua</i>	cGST (CDNB, DCNB, pNBC, EFNP)	Götzberger, 1994
<i>Chlorophyllum comosum</i>	DDA-O-GT, PCP-O-GT	Wetzel, 1993
<i>Picea abies</i>	DDA-O-GT, PCP-O-GT	Wetzel, 1993
ZK <i>Acer pseudoplatanus</i>	DDA-O-GT, PCP-O-GT	Wetzel, 1993
ZK <i>Nicotiana tabacum</i>	DDA-O-GT, PCP-O-GT	Wetzel, 1993
ZK <i>Zea mays</i>	DDA-O-GT, PCP-O-GT	Wetzel, 1993
ZK <i>Phaseolus vulgaris</i>	DDA-O-GT, PCP-O-GT	Wetzel, 1993
<i>Fagus sylvatica</i>	DDA-O-GT, PCP-O-GT	Wetzel, 1993
ZK <i>Petroselinum crispum</i>	DDA-O-GT, PCP-O-GT	Wetzel, 1993
ZK <i>Glycine max</i>	O-GT, N-GT	Sandermann et al., 1991
ZK <i>Glycine max</i>	S-GT	Eckey, 1987
<i>Lemna minor</i>	GT (Resorcinol, Quinol)	Pridham, 1964
<i>Tarbuta rivularis</i>	GT	Dhindsa, 1991
<i>Equisetum arvense</i>	O-GT (Resorcin, Benzohydrochinon)	Pridham, 1964
<i>Sphagnum papillosum</i>	O-GT (Resorcin, Benzohydrochinon)	Pridham, 1964
<i>Marchantia polymorpha</i>	O-GT (Resorcin, Benzohydrochinon)	Pridham, 1964
<i>Ascophyllum nodosum</i>	O-GT (Resorcin, Benzohydrochinon)	Pridham, 1964
<i>Fucus vesiculosus</i>	O-GT (Resorcin, Benzohydrochinon)	Pridham, 1964
<i>Laminaria digitata</i>	O-GT (Resorcin, Benzohydrochinon)	Pridham, 1964
<i>Ulva lactuca</i>	O-GT (Resorcin, Benzohydrochinon)	Pridham, 1964

Anmerkung: ZK = Zellsuspensionskultur

2.1 Cytochrom P-450 Monooxygenase-System

Bei den Untersuchungen im Rahmen dieses Screenings zeigte sich, daß in vielen niederen Pflanzen und Makroalgen die Laurinsäurehydroxylase weit verbreitet ist. Bei der Hydroxylierung der ^{14}C -Laurinsäure entstand in der vorliegenden Arbeit ein Metabolit bei R_f 0,53 im Laufmittelsystem LM 4. Salaün *et al.* (1981) geben für die „in-chain“ hydroxylierten Laurinsäuremetabolite, d.h. die Hydroxylierung findet innerhalb der C-Kette des Moleküls statt, einen R_f von 0,54 im identischen Laufmittel an. Da die hier ermittelten R_f -Werte mit den Literaturangaben sehr gut übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, daß auch in dieser Untersuchung die „in chain“-Laurinsäurehydroxylase (IC-LAH) gemessen wurde.

In diesem Screening konnten Enzymaktivitäten der IC-LAH im Bereich von 0,2-29,0 pkat/mg Protein gemessen werden. Die in der Literatur (Benveniste *et al.*, 1982, Salaün *et al.*, 1988, Mougin *et al.*, 1992) angegebenen LAH-Aktivitäten lagen im Bereich von 0,1 pkat/mg Protein in Mikrosomen von etioliert angezogenen *Pisum sativum*-Keimlingen bis 6,96 pkat/mg Protein in Mikrosomen von etioliert angekeimten *Vicia sativa*-Pflanzen. Die in diesem Screening detektierten IC-LAH-Aktivitäten lagen in den meisten Pflanzen innerhalb des in der Literatur angegebenen Bereichs der Enzymaktivität. Dies gilt vor allem für alle direkt aus der Natur entnommenen Pflanzenspezies. Im Vergleich zu den Landpflanzen zeigten die Makroalgen durchweg die höhere IC-LAH-Aktivität. In den Algenspezies war diese Aktivität wiederum in den Chromophyta und Rhodophyta besonders hoch. Bei den terrestrischen Pflanzen zeigte *Cycas revoluta*, der Palmfarn aus der Abteilung der Pteridophyta, mit 29 pkat/mg Protein als Ausnahme eine sehr hohe Aktivität. Dabei ist zu beachten, daß dieser Palmfarn eine Gewächshauspflanze mit optimalen Wachstumsbedingungen war. Bei den als Modellsystem untersuchten Zellsuspensionskulturen konnte nur in *Glycine max* und in *Triticum aestivum* LAH-Aktivität gemessen werden. Die Mikrosomen von *Glycine max* zeigten eine 5-300-fach höhere IC-LAH-Aktivität als die restlichen untersuchten Zellkulturen. Diese gesteigerte P-450-Aktivität der Zellsuspensionskultur kann möglicherweise ein Effekt des Wachstumshormons 2,4-D sein, welches auf das P-450-System eine induktive Wirkung ausüben kann (Mougin *et al.*, 1991). Gegen diese Annahme sprechen allerdings die geringen LAH-Aktivitäten, die in den übrigen Zellsuspensionskulturen bestimmt werden konnten. Die Hauptaktivität der IC-LAH ist folglich in den marinen Makroalgen zu finden.

Die Hauptaktivität der Stearinsäurehydroxylase (SAH) scheint im Pflanzenreich ebenfalls bei den Makroalgen zu liegen, obwohl das Enzym auch in einigen niederen Pflanzen der Abteilung

Pteridophyta gemessen werden konnte. Hier sind der Gewächshausfarn *Cycas revoluta* und die Schachtelhalme *Equisetum arvense*, *Equisetum telmateia* und *Equisetum giganteum* zu nennen. In den Abteilungen Bryophyta und Mycobionta zeigten sich in diesem Screening unter den im Material- und Methodenteil definierten Testbedingungen keine Cytochrom P-450-Aktivitäten für dieses endogene Fettsäuresubstrat. Drei Algenspezies, *Chara corallina* (Chlorophyta), *Cladophora rupestris* (Chlorophyta) und *Laminara hyperborea* (Chromophyta), zeigten eine 5-6-fach höhere SAH-Aktivität als die übrigen untersuchten Pflanzenspezies. Hierbei handelt es sich bei *Chara corallina* um eine im Gewächshaus kultivierte Alge, die unter optimalen Bedingungen wachsen konnte. Die untersuchten höheren Pflanzen wiesen eine sehr geringe SAH-Aktivität auf. Die Zellsuspensionskulturen zeigten alle, bis auf die von *Triticum aestivum*, SAH-Aktivitäten, die im Bereich der untersuchten Chromophyta-Spezies lagen. Es ergibt sich für die SAH folglich ein ähnliches Bild wie schon bei der IC-LAH, mit einem Aktivitätsschwerpunkt bei den Makroalgen.

Noch restriktiver als die SAH scheint die Palmitinsäurehydroxylase (PAH) auf die Makroalgen fixiert zu sein. In keiner höheren Pflanze und ebenso in keinem Vertreter der Pteridophyta, der Bryophyta und der Mycobionta konnte unter den zur Anwendung gekommenen Testbedingungen eine PAH-Aktivität detektiert werden. Bei dem Modellsystem der Zellsuspensionskulturen konnte nur in der Präparation von *Glycine max* eine PAH-Aktivität gemessen werden. Salaün *et al.* (1981) geben als Aktivität für die PAH in Mikrosomen von *Helianthus tuberosus* 1,5 pkat/mg Protein an. Die in dieser Untersuchung erzielten Aktivitäten der PAH in Algen lagen durchschnittlich 2-10-fach höher als dieser Wert. Der R_f -Wert für den bei der Umsetzung von ^{14}C -Palmitinsäure entstandenen Metaboliten lag in dieser Untersuchung im Laufmittelgemisch LM 4 bei R_f 0,41-0,43. Da auch Salaün *et al.* (1981) im identischen Laufmittelgemisch einen R_f von 0,43 für den entstandenen Metaboliten finden, kann davon ausgegangen werden, daß hier dasselbe Enzym bearbeitet wurde.

Die Aktivität des Cytochrom P-450 Enzyms, welches das xenobiotische Substrat 3-Chlorbiphenyl umsetzt, lieferte einen Metaboliten, der mittels GC/MS-Studien als 3-Chlorbiphenylol identifiziert werden konnte. Dieses Enzym ist folglich eine ähnliche Hydroxylase wie die von Borlakoglu & John (1989) gefundene Biphenylhydroxylase bzw. 2-Chlorbiphenylhydroxylase. Fletcher *et al.* (1987) zeigten in der Zellsuspensionskultur von *Rosa sp. cv. Paul's Scarlet* erstmals den pflanzlichen Metabolismus von 2-Chlorbiphenyl und 2,2',4,4'-Tetrachlorbiphenyl. Während bei Fletcher *et al.* (1987) die Frage der Identifizierung

der entstandenen Metabolite offen blieb, konnte von Borlakoglu & John (1989) mittels GC/MS eine korrekte Identifizierung der durch Umsetzung von 2-Chlorbiphenyl und 2,2',4,4'-Tetrachlorbiphenyl entstandenen Metabolite durchgeführt werden. Für beide Hydroxylasen wurden in nichtinduzierten Rattenlebermikrosomen Enzymaktivitäten im Bereich von 8,3 pkat/mg Protein (Biphenylhydroxylase) und 3,3 pkat/mg Protein (2-Chlorbiphenylhydroxylase) angegeben (Borlakoglu & John, 1989). In den Mikrosomen aus der Wurzelknolle von *Helianthus tuberosus* konnten Borlakoglu & John (1989) keine Enzymaktivität für 2-Chlorbiphenyl als Substrat finden. In der vorliegenden Untersuchung konnte in sehr vielen Pflanzenspezies eine Aktivität der 3-Chlorbiphenylhydroxylase nachgewiesen werden. Die Aktivität dieses P-450 abhängigen Enzyms lag im Bereich von 0,2-15 pkat/mg Protein. Erstaunlich hohe Aktivitäten wurden dabei in den Mikrosomen der marinen Grün-, Braun- und Rotalgen gefunden. Dies könnte damit zusammenhängen, daß der Lebensraum der Algen u. a. mit PCB's kontaminiert ist. Auch im Nordseewasser um Helgoland wurde eine PCB-Konzentration von 1 ng/l gemessen (Mehrtens, 1991). Ob allerdings diese Konzentration im Nordseewasser ausreicht, um in den untersuchten Algen einen induktiven Effekt zu bewirken, kann nur vermutet werden. Borlakoglu & John (1989) lieferten mit ihren Untersuchungen einen Hinweis auf die Richtigkeit dieser Annahme. Sie konnten durch Vorinkubation mit Aroclor 1248 (Gemisch aus 70 verschiedenen PCB's mit einer Masse von 188 bis 394 Da) die Aktivität der Biphenylhydroxylase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 2,6-fach steigern, die Aktivität der 2-Chlorbiphenylhydroxylase sogar um das 20-fache.

Die ermittelten Enzymaktivitäten der 3-Chlorbiphenylhydroxylase in höheren Pflanzen waren im Vergleich zu den Algen sehr gering.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß sämtliche hier untersuchten P-450 Enzyme bei den Makroalgen besonders stark ausgeprägte Aktivitäten zeigten.

2.2 Glutathion S-Transferase-System

Bei den bisher durchgeführten Untersuchungen zum System der Glutathion S-Transferasen in Pflanzen wurde entweder das mikrosomale Enzymsystem (Diesperger & Sandermann, 1979, Edwards & Dixon, 1991) oder das lösliche Enzymsystem (Frear & Swanson, 1970, Lamoureux & Rusness, 1989) betrachtet. Einige Arbeiten haben durch Zusatz von

Detergenzien, wie beispielsweise Triton X-100 oder Nonidet, eine teilweise Solubilisierung des mikrosomalen Enzymsystems herbeigeführt und somit ein Gemisch aus den mikrosomalen und löslichen Glutathion S-Transferasen erhalten (Schröder & Berkau, 1994, Götzberger, 1994). In diesem Screening wurde sowohl eine Trennung der beiden unterschiedlichen Enzymsysteme der GST vorgenommen als auch die Aktivität beider Enzymsysteme innerhalb einer Präparation mit einer Reihe aus unterschiedlichen endogenen und exogenen Substraten bestimmt.

Mit dem Modellsupstrat CDNB war in jeder untersuchten Pflanzenspezies eine Aktivitätsbestimmung der GST sowohl in der mikrosomalen als auch in der löslichen Fraktion möglich. Dabei konnten im mikrosomalen Bereich Aktivitätsspitzen bei den Spezies der Chlorophyta und Chromophyta, im löslichen System bei den Vertretern aus der Abteilung der Bryophyta und hier speziell der Hepaticae (*Marchantia polymorpha* und *Conocephalum conicum*) beobachtet werden.

Das Substrat IDNB wurde ausgewählt, da viele Algen in ihren Zellen einen Mechanismus besitzen, der sie befähigt das Iod des Seewassers zu konzentrieren. Beispielsweise kann *Laminaria* bis zu 0,3 % ihres Frischgewichtes an Iod enthalten, während die Konzentration von Iod im Seewasser nur etwa 0,000005% beträgt (v.d. Hoek, 1993). Somit scheint das Iod eine wichtige Rolle in den Algen zu spielen. Die Konjugation von IDNB folgt demselben Mechanismus der Halogensubstitution durch GSH wie die Konjugation von CDNB. Die Meßergebnisse zeigten im mikrosomalen GST-System eine gute Übereinstimmung mit den CDNB-Messungen. Mit dem neuen Modellsupstrat IDNB fanden sich Aktivitätsspitzen bei den Chlorophyta und Chromophyta. Die Enzymaktivität war aber im Vergleich zum CDNB fast um das Doppelte gesteigert. Im System der löslichen GST's war die Übereinstimmung der beiden Substrate nur in Teilbereichen des Pflanzenreichs zu finden, während die Enzyme dieselbe Aktivitätshöhe mit beiden Substraten zeigten.

Nach Habig *et al.* (1974) kann mit dem Modellsupstrat DCNB zwischen zwei distinkten Isoformen der cGST unterschieden werden. Deshalb wurde dieses dritte Modellsupstrat zur Aktivitätsbestimmung in den unterschiedlichen Pflanzenextrakten herangezogen. Die Gesamtaktivität war hier um den Faktor 10 niedriger als mit CDNB. Auch Habig *et al.* (1974) konnten mit Ratten-GST zeigen, daß DCNB in der löslichen Fraktion um den Faktor 14 schlechter konjugiert wird als das CDNB. Die Aktivitätsverteilung, die durch Messung der GST-Aktivität mit diesem Substrat erzielt wurde, unterscheidet sich stark von den bisher gezeigten Aktivitätsmustern. So gab es bei der mGST große Aktivitätslücken im Bereich der

Mycobionta und der Chlorophyta. Im Vergleich zu den übrigen getesteten Pflanzen zeigten die Spezies der Chromophyta hohe DCNB-mGST-Aktivität. Im System der cGST traten diese Aktivitätslücken nicht auf. Die Aktivitätshöhe war mit der in der mikrosomalen Fraktion erhaltenen Aktivität vergleichbar. Höhere DCNB-cGST-Aktivitäten waren wieder im Bereich der Chromophyta zu finden. Die Zellkultur von *Picea abies* und die Nadeln der Gymnospermae *Sequoiadendron giganteum* zeigten im Vergleich zu den anderen Pflanzenarten fast doppelt so hohe DCNB-cGST-Aktivitäten. Von Götzberger (1994) wurden für die GST in anderen Gymnospermae (*Taxus baccata*, *Juniperus communis* und *Larix decidua*) wesentlich niedrigere DCNB-Aktivitäten - nämlich 0,02-0,2 nkat/mg Protein - angegeben.

Eine weitere Ausdünnung der Aktivitätsverteilung im mikrosomalen GST-System wurde mit dem Modellsusstrat pNBC erreicht. Hier waren nur noch wenige Pflanzenarten in der Lage, dieses Substrat unter den verwendeten Testbedingungen mit GSH zu konjugieren. Die Höhe der Aktivität war aber mit der für DCNB vergleichbar.

Ein großer Unterschied zwischen dem mGST- und dem cGST-System wurde mit dem Epoxysubstrat EPNP erzielt. Während im System der löslichen GST, abgesehen von einigen Spezies der Chlorophyta und Rhodophyta, keine größeren Aktivitätslücken auftraten, konnte im mikrosomalen GST-System in keiner der getesteten Pflanzen EPNP-Aktivität unter den angelegten Testbedingungen gemessen werden. Es scheint folglich so, als könnten nur die löslichen GST's dieses Epoxysubstrat mit GSH konjugieren. Diese Annahme wurde durch Herrn Dr. Morgenstern (Department of Biochemistry, Arrhenius Laboratory, University of Stockholm) bestätigt, der im tierischen System ebenfalls keine mikrosomale EPNP-GST-Aktivität detektieren konnte (pers. Mitteilung GST-Tagung Amsterdam, 1994).

Die oben diskutierten Modellsubstrate zur Aktivitätsbestimmung der GST liefern Anhaltspunkte, aber keine Beweise für die Entgiftungsleistung dieses Enzymsystems in Bezug auf tatsächlich vorkommende Umweltchemikalien oder xenobiotische Stoffe. Es kann anhand der verschiedenen Konjugationsmechanismen nur eine Abschätzung darüber gegeben werden, welche Stoffe über die GST detoxifiziert werden könnten.

Die Tabelle 27 (Seite 157) zeigt einige Fremdstofftests für die GST, es ist aber sicherlich sinnvoll, die Aktivität der GST bzw. ihre Substratspezifität auch mit Modellsubstraten zu bestimmen.

Tab. 27 Fremdstoffsubstrate (Umweltchemikalien und Xenobiotika), die bereits für enzymatische GST-Bestimmungen eingesetzt werden.

Fremdstoff	Testverfahren	Literaturstelle
Atrazin	TLC	Frear & Swanson, 1970
Fluorodifen	Photometer	Schröder <i>et al.</i> , 1992
Propachlor	LSC	Schröder <i>et al.</i> , 1990
Pentachlornitrobenzol	HPLC	Schröder <i>et al.</i> , 1990
Acetochlor	LSC	Ekler <i>et al.</i> , 1993
Benzo(a)pyren 4,5-Oxide	LSC	Morgenstern & DePierre, 1983
Tetrachlorethylen	HPLC	Dekant <i>et al.</i> , 1987
EPTC	TLC	Jablonkai & Hatzios, 1994
Alachlor	LSC	Jablonkai & Hatzios, 1993
Pretilachlor	LSC	Jablonkai & Hatzios, 1993
Metolachlor	TLC	Edwards & Owen, 1986

Aus der Tab. 27 wurden zwei Fremdstoffsubstrate ausgewählt, nämlich die Herbizide Atrazin und Fluorodifen.

Die Aktivitätsbestimmung der GST mit diesen Substraten erfolgte ausschließlich in der löslichen Fraktion. Mit dem Triazin Atrazin als Substrat konnte in sehr wenigen niederen Pflanzen cGST-Aktivität detektiert werden, die oftmals auch noch sehr gering (unter 1 nkat/mg Protein) war. Um so erstaunlicher war die Zunahme der Atrazinkonjugationsleistung im aquatischen System der marinen Makroalgen. Hier konnten in einigen Spezies wie beispielsweise den arktischen Arten *Monostroma arcticum* (Chlorophyta), *Laminaria saccharina* (Chromophyta) und *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) Enzymaktivitäten über 15 nkat/mg Protein gemessen werden. Bei diesen ursprünglich arktischen Algenarten handelt es sich aber um Laborkulturalgen (AWI, Bremerhaven), so daß diese hohen Enzymaktivitäten sicher nicht überbewertet werden dürfen.

Jablonkai & Hatzios (1993) sowie Lamoureux *et al.* (1991) geben für den Atrazinumsatz durch Enzyme aus Maiskeimlingen eine Enzymaktivität von 0,08-0,1 nkat/mg Protein an. Bis auf die oben genannten Ausnahmen liegen somit alle hier untersuchten Pflanzenextrakte in diesem Aktivitätsbereich. Die im Laufmittelsystem LM 4 untersuchten Atrazinkonjugate aus Enzymtests mit unterschiedlichen Extrakten von Pflanzen verschiedener Klassen zeigten denselben R_f -Bereich, wie er auch in der Literatur zu finden ist.

Die Spaltung von Fluorodifen durch GSH konnte in sehr vielen Pflanzenspezies nachgewiesen werden. Auch hier wurden Enzymaktivitäten über 15,0 nkat/mg Protein detektiert, und zwar in den zwei arktischen Algen *Enteromorpha bulbosa* (Chlorophyta) und *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta). Beides waren Laborkulturalgen. Die Basidiomycetes und die Lichenes konnten als Ausnahme dieses Herbizid nicht mit GSH konjugieren.

1979 wurde von Diesperger eine pflanzliche GST entdeckt, die in der Lage war, eines der endogenen Substrate, die trans-Zimtsäure, mit GSH zu konjugieren. Diesperger (1979) zeigte in seinen Untersuchungen die zwei Wege der Zimtsäurekonjugation mit GSH.

In dieser Untersuchung sollten nun in Fortführung der Arbeiten von Diesperger die im Screening untersuchten Pflanzenarten auf ihre Zimtsäureaktivität in der mikrosomalen und löslichen Fraktion getestet werden. In den Mikrosomen der verschiedenen getesteten Pflanzenarten konnte in fast allen Pflanzenabteilungen Zimtsäure-GST gemessen werden. In der Abteilung Mycobionta war unter den verwendeten Testbedingungen jedoch keine Konjugation der Zimtsäure mit GSH zu beobachten. Auch die Abteilung Chromophyta der marinen Makroalgen zeigte bis auf *Laminaria saccharina* keine meßbare Konjugation der Zimtsäure. *Laminaria saccharina* war die einzige Braunalge, die im Labor kultiviert wurde (AWI, Bremerhaven). In der löslichen Fraktion konnte ebenso wie in den Mikrosomen in fast allen untersuchten Pflanzenspezies die Zimtsäure-GST detektiert werden. Wie in den Mikrosomen fehlte sie aber in den Abteilungen Mycobionta und Chromophyta. Bei letzterer konnte nur in *Laminaria saccharina* und in *Ascophyllum nodosum* die Zimtsäure mit GSH konjugiert werden. Die Untersuchungen von Diesperger (1979) zeigten Enzymaktivitäten von 13,8 pkat/mg Protein für die Mikrosomen und 22,6 pkat/mg Protein für die lösliche Fraktion, beides in etiolierten Keimlingen von *Pisum sativum*. In diesem Screening konnte eine durchschnittliche Zimtsäure-GST-Aktivität von 10,0 pkat/mg Protein in den Mikrosomen und 13,4 pkat/mg Protein für die lösliche Fraktion erzielt werden. Wie bei Diesperger (1979) war die Aktivität der cGST für dieses endogene Substrat höher als die der mGST.

Eine zusammenfassende Betrachtung aller GST-Aktivitäten mit allen Substraten ergibt weder für die mGST noch für die cGST ein einheitliches Bild der Aktivitätsverteilung über die verschiedenen Abteilungen des Pflanzenreichs. Generell lassen sich c- und mGST-Aktivitäten in fast allen untersuchten Spezies finden. Ausnahme ist hier nur das Modellsubstrat EPNP, das lediglich im löslichen System konjugiert werden konnte.

2.3 Glucosyltransferasen

Im Gegensatz zu den GST's sind bei den Glucosyltransferasen eine Vielzahl sowohl endogener als auch exogener Substrate bekannt (Heller & Forkmann, 1988, Vellekoop *et al.*, 1993, Baenziger, 1994, Sandermann *et al.*, 1991, Gallant & Balke, 1995). Die Glucosylierung ist im Pflanzenreich eine sehr weit verbreitete Form der Konjugation. Auch für die Detoxifizierung von Fremdstoffen ist die Konjugation mit Glucose für die Pflanze von großer Bedeutung (Lamoureux & Rusness, 1986). Daher wird durch verschiedene Autoren (Pridham, 1960, Leah *et al.*, 1992) den Glucosyltransferasen eine Doppelrolle im Stoffwechselgeschehen zugeschrieben. Zum einen sind sie an der Speicherung endogener Metabolite des Sekundärstoffwechsel beteiligt und zum anderen an der Detoxifizierung von Fremdstoffen. Beispielsweise isolierte Leah *et al.* (1992) eine Glucosyltransferase, die als endogenes Substrat Kämpferol (K_m 0,09 mM) glucosidierte, gleichzeitig aber auch das 6-Hydroxybentazon, einen Metaboliten des Herbizids Bentazon, als exogenes Substrat (K_m 2,45 mM).

Sandermann *et al.* (1991) konnten durch Anreicherung bestimmter GT's zeigen, daß die früher angenommene breite Substratspezifität der Glucosyltransferasen doch teilweise auf das Vorhandensein bestimmter „Isoformen“ der GT zurückzuführen ist. So gelang es Wetzel & Sandermann (1994), eine PCP-O-GT von einer DDA-O-GT zu trennen und letztere 367-fach anzureichern.

In dieser Untersuchung sollte durch die Wahl verschiedener Fremdstoffsubstrate die mögliche Palette der O-, N- und S-Glucosylierungen im Pflanzenreich aufgezeigt werden.

Für die O-GT's wurden die Substrate PCP, 2,3,4-TCP, 2,4,5-TCP, DDA sowie als endogenes Substrat die IAA ausgewählt. Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß die PCP-O-GT unter den gewählten Testbedingungen bei den niederen Pflanzen ausschließlich auf die Abteilung der Pteridophyta beschränkt war. Weder in den Abteilungen der Bryophyta noch der Mycobionta, Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta konnte eine Glucosylierung von PCP beobachtet werden. In den höheren Pflanzen konnte die PCP-O-GT nur in *Rosa canina*, *Helianthus giganteus* und *Ginkgo biloba* gemessen werden. Mit der Zellsuspensionskultur von *Glycine max* wurde dieselbe Kultur untersucht, die auch Sandermann *et al.* (1991) und Wetzel & Sandermann (1994) für ihre Experimente benutzten. Ein Vergleich der in diesen Arbeiten erzielten Aktivitäten für die PCP-O-GT und die DDA-O-GT mit den Aktivitäten dieser vorliegenden Untersuchung zeigt die Tab. 28 (Seite 160).

Tab. 28 Vergleich der PCP-O-GT und DDA-O-GT Aktivitäten in der Zellsuspensionskultur von *Glycine max* unter Berücksichtigung der Arbeiten von Sandermann *et al.* (1991) und Wetzel & Sandermann (1994) (n.b. = nicht bestimmt).

Substrat	Sandermann <i>et al.</i> , 1991	Wetzel & Sandermann, 1994	1995
PCP	1,1 pkat/mg Protein	2,6 pkat/mg Protein	7,7 pkat/mg Protein
DDA	n.b.	5,8 pkat/mg Protein	2,3 pkat/mg Protein

Im Fall der PCP-O-GT kann davon ausgegangen werden, daß mit der in dieser Arbeit optimierten Präparationsmethode ein Maximum an PCP-GT-Aktivität extrahiert wurde, da diese in einem höheren Bereich lag als die Aktivitäten, die von Sandermann *et al.* (1991) und Wetzel & Sandermann (1994) im selben Zellkultursystem gemessen werden konnten. Dagegen betrug die DDA-O-GT-Aktivität in dieser Präparation nur die Hälfte der von Wetzel & Sandermann erzielten Aktivität.

Somit kann davon ausgegangen werden, daß die in dieser Arbeit entwickelte Präparation zur Messung der PCP-O-GT geeignet ist und das Fehlen der Enzymaktivität in den Bryophyta, Mycobionta, Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta auf keinen methodischen Fehler, sondern möglicherweise auf das Fehlen dieses Enzyms zurückzuführen ist.

Auch die Spaltung des entstandenen PCP- β -D-O-Glucosids durch in den verschiedenen Extrakten vorhandenen β -Glucosidasen ist auszuschließen, da deren Aktivität durch Zugabe β -Glucosidase-spezifischer Substrate (Salicin und p-Nitrophenyl- β -D-Glucosid) abgefangen wurde. Auch der pH-Wert des verwendeten Puffers (Puffer 8) von 7,5 für den PCP-O-GT-Test trägt zur Minimierung der β -Glucosidase-Aktivität bei. Hösel (1981) zeigte, daß die meisten β -Glucosidasen ein pH-Optimum im sauren Bereich bei pH 4-5 besitzen. Somit ist im neutral-basischen pH-Bereich die Aktivität dieser Enzyme sehr eingeschränkt.

Die Aktivitätsbestimmung mit den beiden Substraten 2,3,4-TCP und 2,4,5-TCP zeigte ein gänzlich anderes Aktivitätsmuster. In der Abteilung Mycobionta konnte keine 2,3,4-TCP- bzw. nur eine sehr geringe 2,4,5-TCP-O-GT-Aktivität gemessen werden. Eine Ausnahme in dieser Abteilung war der unter optimalen Wachstumsbedingungen im Labor kultivierte Basidiomycet *Phanerochaete chrysosporium*. Im Vergleich zur PCP-Aktivität konnte die GT-Aktivität für 2,3,4-TCP und 2,4,5-TCP auch in anderen Abteilungen der niederen Pflanzen und marinen Makroalgen detektiert werden. Hier waren die gemessenen Enzymaktivitäten zum Teil um den Faktor 4-8 höher als in den untersuchten Zellsuspensionskulturen. Die Aktivitätsmuster von 2,3,4-TCP und 2,4,5-TCP gleichen sich beinahe exakt, so daß hier davon ausgegangen werden

kann, daß es sich um dasselbe GT-Enzym handelt, welches beide Substanzen als Substrate nutzen kann.

Die DDA-O-GT konnte ebenfalls in allen untersuchten Pflanzenspezies und Zellkultursystemen gemessen werden. Die Abteilung Mycobionta bildete unter den verwendeten Testbedingungen die einzige Aktivitätslücke. *Phanerochaete chrysosporium* war auch hier wieder der einzige Pilz, der in der Lage war, DDA zu glucosidieren.

Das endogene Substrat IAA konnte ebenfalls in sehr vielen Pflanzen umgesetzt werden, wobei sich auch hier ein Fehlen der Konjugation bei den Mycobionta zeigte. Wetzel & Sandermann (1994) konnten das Enzym für IAA in ihrer Aufarbeitung von *Glycine max* nicht detektieren, während in der vorliegenden Untersuchung dieses Substrat auch von Zellkulturen umgesetzt wurde.

Mit der verwendeten Präparationsmethode sieht der Überblick über die O-GT folgendermaßen aus: Die Hauptaktivitäten sind im Bereich der höheren Pflanzen, der Pteridophyta und der marinen Algen zu finden.

Die Aktivität von N-GT's konnte in den niederen Pflanzen besonders ausgeprägt nur in der Abteilung Pteridophyta detektiert werden. Zwei Spezies der Bryophyta, *Phanerochaete chrysosporium* als einziger Vertreter der Abteilung Mycobionta und wenige Spezies der Chlorophyta und Rhodophyta zeigten geringe Aktivitäten mit den Substraten DCA und 3-Chloranilin. In den Vertretern der Chromophyta konnte mit beiden Substraten unter den verwendeten Testbedingungen keine N-GT-Aktivität gemessen werden. Die Aktivität der N-GT mit DCA als Substrat lag bei einigen Pflanzen wie den Schachtelhalmen um den Faktor 0,5-2,0 höher als die mit 3-Chloranilin bestimmte N-GT-Aktivität. Dies steht im Widerspruch zu den von Sandermann *et al.* (1991) veröffentlichten Ergebnissen, deren Extrakte aus der Zellsuspensionskultur *Glycine max* das 3-Chloranilin besser glucosidieren konnten als das DCA.

Die S-Glucosyltransferase, die Eckey (1987) beschrieben hat und deren Aktivität mit dem Substrat 4-Chlorthiophenol bestimmt wurde, konnte in allen untersuchten Pflanzenabteilungen gemessen werden. Besonders in den Spezies der Abteilung Chromophyta wurden hohe Enzymaktivitäten im Bereich von 100-350 pkat/mg Protein detektiert. Da für dieses Substratkonjugat keine Referenzsubstanz zur Verfügung stand, konnte eine mögliche

glucosidische Bindung des 4-Chlorthiophenols mit UDP-Glucose nur indirekt durch Behandlung des Konjugates mit einer käuflichen β -Glucosidase nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Aktivitätsverteilung sämtlicher hier bearbeiteten Glucosyltransferasen, wird deutlich, daß Aktivit tsschwerpunkte stets bei den höheren Pflanzen und den Pteridophyta sowie bei den marinen Makroalgen lagen.

2.4 Hasse-Diagramme der detoxifizierenden Enzyme

Mit Hilfe der Hasse-Diagramm-Technik wurde versucht, die Evolution (Abb. 88) der verschiedenen Pflanzenabteilungen bzw. -klassen auf der Ebene der Enzymaktivität und der Substratspezifität darzustellen.  ber alle drei bearbeiteten Enzymfamilien gibt es bereits umfangreiche Evolutionsstudien, die allerdings auf dem Vergleich von Proteinsequenzen beruhen (Degtyarenko & Archakov, 1993, Butler & Eaton, 1992, v.Brederode *et al.*, 1987).

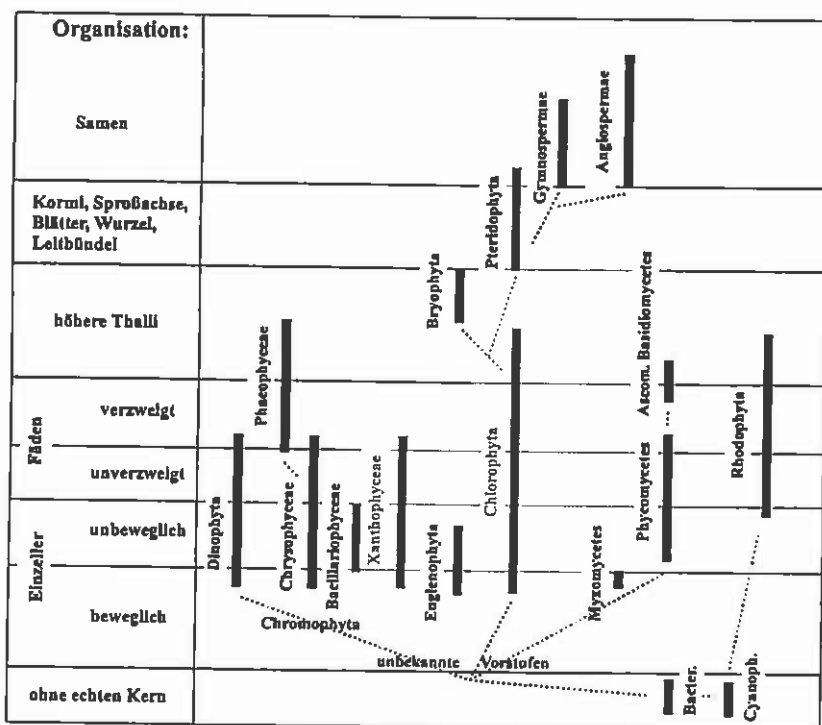


Abb. 88 Stammbaum der Evolution im Pflanzenreich nach Weberling & Schwantes, 1987.

Für das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System wird von Nebert *et al.* (1991) eine Superfamilie von haemhaltigen P-450 Enzymen postuliert. Dabei folgt die Evolution dieser Enzyme nicht der Phylogenie, sondern wird vielmehr durch Genduplikation, Genfusion, horizontalen Gentransfer, Mutation und durch den Verlust von Introns erklärt. Die ausschließlich durch molekulare Daten modellierte Evolution der P-450 Enzyme umfaßt zur Zeit eine Superfamilie mit 36 Genfamilien und 10 Unterfamilien. In dieses Evolutionsmodell sind bisher nur sehr wenige pflanzliche P-450 Enzyme eingeflossen, bei denen zumeist nur das putative Gen isoliert wurde und kein P-450 Enzym.

Durch die Hasse-Diagramme sollte nun versucht werden, den konventionellen Evolutionsansatz durch die Betrachtung von Enzymaktivität bzw. Substratspezifität nachzuvollziehen.

Das Hasse-Diagramm der P-450-Enzyme zeigte sehr deutlich die Verwandtschaftsbeziehung der Angiospermae mit den Gymnospermae, die zusammen die Abteilung der Spermatophyta bilden. Die Bryophyta und Mycobionta scheinen auf der Enzymaktivitäts- und Substratspezifitätsebene vergleichbar mit den Spermatophyta zu sein. Deutlich davon abgetrennt ist die Abteilung der Pteridophyta (Lycopodiatae, Psilophytatae, Filicatae und Articulatae), wobei jede dieser Pflanzenklassen zwar in Beziehung zur anderen steht, aber dennoch eigenständig ist. Die Makroalgen stehen in einer ähnlichen Beziehung zueinander, wie es die Pteridophyta tun. Auch hier findet man keine Äquivalenz.

Das bedeutet folglich, daß sich in Bezug auf P-450 Aktivitäten die Spermatophyta, Bryophyta und Mycobionta auf der Evolutionsleiter sehr nahe stehen, während die Pteridophyta und Makroalgen jeweils eine eigenständige Gruppe bilden. Die Zellsuspensionskulturen zeigen eine Verbindung zu den Spermatophyta, unterscheiden sich aber von diesen durch ihre erhöhte Enzymaktivität.

In dem System der Glutathion S-Transferasen wurde der evolutive Stammbaum dieser Enzyme nicht nur durch Sequenzdaten und Homologievergleiche erstellt. Es wurden auch Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten berücksichtigt (Buetler & Eaton, 1992). Auch im System der GST's ging es aber hauptsächlich darum, die Isoformen der Enzyme miteinander zu vergleichen. Dazu wurden von Mannervik *et al.* (1985) die GST's in fünf Klassen (*mu*, *alpha*, *pi*, *sigma* und *theta*) unterteilt. Buetler & Eaton (1992) verglichen 71 primäre Aminosäuresequenzen miteinander. Es stellte sich heraus, daß die *theta*-Klasse den Archetypus

der GST enthalten muß, da diese im Gegensatz zu den anderen GST-Klassen in vielen unterschiedlichen Spezies von Bakterien, Pflanzen und Insekten bis zu den Säugetieren vertreten war.

Die Hasse-Diagramme der mGST und der cGST zeigen, daß, bezogen auf die pflanzliche Phylogenie, keine systematischen Aussagen gemacht werden können. Dies liegt möglicherweise darin begründet, daß die zur Zeit bekannten löslichen pflanzlichen GST's alle in Bezug auf ihre cDNAs zur *theta*-Klasse gezählt werden und somit die Unterschiede zwischen den GST-Sequenzen in den einzelnen Pflanzenklassen nicht gravierend sind.

Im System der Glucosyltransferasen gibt es bisher nur sehr wenige Untersuchungen, die die Evolution dieses Enzymsystems zum Inhalt haben. Dies liegt sicher zum Teil daran, daß es noch sehr wenige zur Homogenität gereinigte Glucosyltransferasen gibt.

Die Evolution der GT's wurde im Bereich der Flavon-Glucosyltransferasen durch v. Brederode *et al.* (1987) anhand der Substratspezifität dieses Enzyms untersucht. Dort konnten 11 dominante Gene, die über 6 Genloci verteilt sind und die Glucosidierung von Isovitexin kontrollieren, in *Silene pratensis* und *Silene dioica* identifiziert werden. Aus diesen Untersuchungen wurde gefolgert, daß es für die Pflanze in der Evolution effizienter war, ein bestehendes Enzym zu modifizieren, als ein neues Enzym zu entwickeln.

Das aus Ergebnissen dieser Untersuchung erstellte Hasse-Diagramm zeigt wie im Fall der P-450 Enzyme eine Zusammengehörigkeit der Angiospermae und Gymnospermae (Spermatophyta). Die Vertreter der Pteridophyta sind als nicht äquivalent zu betrachten. Ebenso verhalten sich die marinen Algen.

Aus diesen Hasse-Diagrammen wird deutlich, daß Zellkultursysteme nur als Modell für Untersuchungen an Pflanzen dienen können, da sie sich nicht nur in Hinblick auf den physiologischen Zustand der Zellen von den Pflanzen unterscheiden (Mohr & Schopfer, 1994), sondern auch quantitative Unterschiede beispielsweise im Xenobiotika-Metabolismus zeigen (Schneider *et al.*, 1984). Zudem scheint sich die Enzymausstattung bzw. die Enzym- und Substratspezifität im Verlauf der Kultivierung so zu verändern, daß sich die Zellkulturen von den Pflanzen immer weiter entfernen

Faßt man die Ergebnisse der Hasse-Diagramme zusammen, läßt sich folgendes aussagen: Innerhalb der Spermatophyta verhalten sich Gymnospermae und Angiospermae in Bezug auf

die detoxifizierenden Enzymaktivitäten stets vergleichbar oder ähnlich. Bryophyta und Mycobionta zeigen beim P-450-Enzymsystem äquivalente Aktivitäten wie die Spermatophyta. Bei den anderen untersuchten Enzymsystemen ist zumindest immer eine mehr oder weniger enge Beziehung zu den Spermatophyta festzustellen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem natürlichen Stammbaum der Pflanzen, läßt sich die gemeinsame evolutionäre Stufe der Algen und die der Spermatophyta nachvollziehen, während die Pteridophyta, Bryophyta und Mycobionta sich auf der Basis der Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten uneinheitlich verhalten und somit schwer in das Schema der Evolution einzuordnen sind.

Faßt man nun alle Enzymklassen in ein einziges Hasse-Diagramm zusammen (Abb. 89), so zeigt sich, daß es hier keine äquivalenten Objekte mehr existieren.

Ausprägung der
Enzymantwort

ZK = Zellkultur
HE = Hepaticae
FI = Filicatae
CH = Chromophyta
GY = Gymnospermae
CL = Chorophyta
LY = Lycopodiatae
MU = Musci
RH = Rhodophyta
LI = Lichenes
AR = Articulatae
BA = Basidiomycetes
PS = Psilophytatae
AN = Angiospermae
AS = Ascomycetes

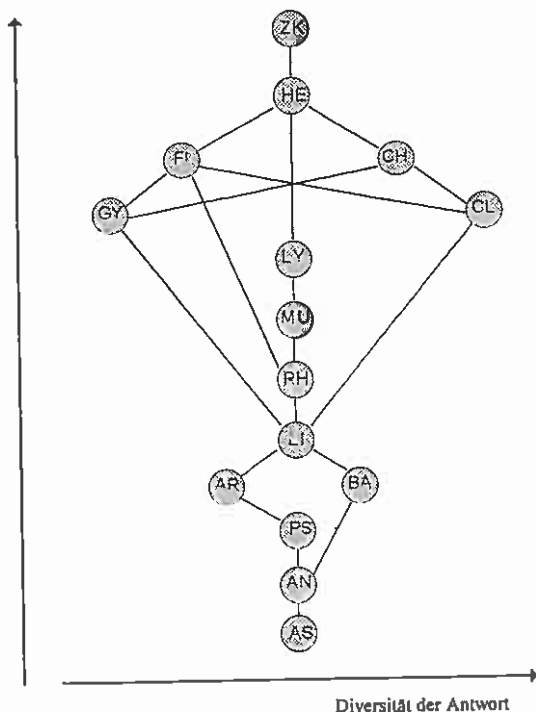


Abb. 89 Hasse-Diagramm aller bearbeiteten Enzymsysteme.

Die Minimale ist durch die untersuchten Ascomyceten gekennzeichnet, die Maximale durch die Zellsuspensionskulturen. Die größte Ausprägung der Enzymantworten findet man bei neben den Zellsuspensionskulturen, bei den Hepaticae, den Filicatae und den Chromophyta. Die untersuchten Zellsuspensionskulturen wachsen wie eingangs erwähnt mit 2,4-D im Medium und dies könnte einen induktiven Effekt auf die in dieser Dissertation bearbeiteten Enzymsysteme haben. Die geringste Ausprägung der Enzymantworten sind bei den Ascomyceten und den Angiospermae zu finden.

Eine klare Aussage zur Evolution der Pflanzen kann aber zur Zeit nicht getroffen werden, da bei vielen Pflanzen die Aufarbeitungsmethode, oder die verwendeten Testbedingungen vielleicht nicht optimal waren.

3. Spezialisierung auf marine Makroalgen

Die Spezialisierung auf marine Makroalgen wurden vorgenommen, um diese bisher in der Literatur (Knöss & Glombitza, 1993, Vilter & Glombitza, 1983, Mehrstens, 1994) kaum behandelten Pflanzen in das Konzept der „Grünen Leber“ einzubinden. Dies ist gerade bei den Algen wichtig, da sie aufgrund ihrer weltweiten Verbreitung, ihrer großen Biomasse und vor allem dem günstigen Verhältnis zwischen Biomasse und Primärproduktion (Lüning, 1985) im globalen Geschehen eine große Rolle spielen. Um die Bedeutung mariner Algen zu verdeutlichen, ist in Tab. 29 die Nettoproduktion an Kohlenstoff von mariner und terrestrischer Vegetation gezeigt.

Tab. 29 Jährliche Nettoproduktion mariner und terrestrischer Vegetation, bezogen auf den Kohlenstoffgehalt in Gramm pro m^2 (Lüning, 1985).

Regionstyp	Vegetationstyp	Nettoprimärproduktion [g C/ m^2 Jahr]
Tropisch	Regenwald	500-1800
	<i>Sargassum</i>	2500
Gemäßigt	terrestrische Wälder	200-1000
	terrestrische Wiesen	100-800
	<i>Laminaria</i>	1200-1900
	<i>Fucus/Ascophyllum</i>	300-600
Arktisch	<i>Laminaria</i>	20

3.1 Enzyme in marinen Makroalgen

Da über die löslichen Enzyme wie die Phenolsulfatase (Knöss & Glombitza, 1993) und die Haloperoxidasen (Vilter & Glombitza, 1983, Mehrrens, 1993) bereits Kenntnisse vorliegen, wurde für diese Untersuchung mit der Laurinsäurehydroxylase ein membrangebundenes Enzym aus der Phase I ausgewählt. Von diesem Cytochrom P-450 Enzym liegen bereits sehr viele Daten aus unterschiedlichen pflanzlichen Systemen wie Wurzelknollen von *Helianthus giganteus* oder auch verschiedenen Zellkulturen vor (Salaün *et al.*, 1978, Benveniste *et al.*, 1982, Salaün *et al.*, 1988, Salaün *et al.*, 1989), während über Meeresalgen bis dato nichts bekannt ist.

Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte für dieses Enzym in unterschiedlichen Algenspezies aus den drei Abteilungen Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta lagen bei 25-34 μM . Diese Werte liegen im selben Konzentrationsbereich der Laurinsäure, wie er von Benveniste *et al.* (1982) angegeben wird (K_m 20 μM in Mikrosomen aus *Pisum sativum*). Sowohl die K_m -Werte von Benveniste *et al.* (1982) als auch die K_m -Werte für Laurinsäure in den drei marinen Makroalgen liegen weit höher als der von Salaün *et al.* (1978) angegebene K_m -Wert von 0,97 μM in Mikrosomen von *Helianthus giganteus*. Der K_m -Wert der Laurinsäurehydroxylase im Tier (Rattenhoden) liegt mit 5 μM zwischen den ermittelten K_m -Werten von *Helianthus giganteus*, *Pisum sativum* und den drei hier untersuchten Makroalgen *Ulva lactuca*, *Fucus vesiculosus* und *Polysiphonia urceolata*.

Die Proteinmengenabhängigkeit sowie die Zeitabhängigkeit der Hydroxylierung der Laurinsäure in den untersuchten marinen Algen zeigten einen linearen Verlauf. Die Temperaturabhängigkeit der Laurinsäurehydroxylasereaktion in den verschiedenen Algen erbrachte übereinstimmende Ergebnisse für die beiden Nordseealgen (Helgoland, Felswatt) *Ulva lactuca* (Chlorophyta) und *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) mit 25-30 °C als Optimum. Die aus Grönland stammende, aber im Labor bei arktischen Temperaturen kultivierte *Polysiphonia urceolata* (Rhodophyta) wies für die Laurinsäurehydroxylierung ein Temperaturoptimum von 20 °C auf. Korreliert man den optimalen Temperaturbereich für Wachstum und Vermehrung der verschiedenen Algen (Tab. 30, Seite 168) mit den oben beschriebenen Enzymtemperaturoptima, so zeigte sich, daß die Laurinsäurehydroxylase aus *Ulva lactuca*, *Fucus vesiculosus* und auch aus der arktischen *Polysiphonia urceolata* immer 10 °C über der optimalen Wachstumstemperatur der Pflanze ihr Temperaturoptimum hat.

Tab. 30 Optimale Temperaturbereiche für Wachstum und Vermehrung der marinen Makroalgen *Ulva lactuca*, *Fucus vesiculosus* und *Polysiphonia urceolata* (Fortes & Luning, 1980).

Algenart	optimale Wachstumstemperatur
<i>Ulva lactuca</i>	15 °C
<i>Fucus vesiculosus</i>	15 °C
<i>Polysiphonia urceolata</i>	10 °C

Viele P-450 Enzyme können durch bestimmte Inhibitoren gehemmt werden. Diese Enzymhemmung kann als Beweis dafür angesehen werden, daß es sich bei der untersuchten Reaktion wirklich um ein P-450 abhängiges Enzym handelt. Als Hemmstoffe sind beispielsweise das 2-Isopropyl-4-pentenamide (Leber-P-450), die 11-Dodecinsäure (*Vicia sativa*), das 3-Phenoxy-1-propyn (*Vicia sativa*) und das 1-Aminobenzotriazol (*Vicia sativa*) bekannt (Salaün *et al.*, 1988). Das für diese Untersuchung verwendete 1-Aminobenzotriazol ist ein starker Inhibitor für die pflanzliche Zimtsäurehydroxylase, aber nur ein schwacher Inhibitor für die pflanzliche Laurinsäurehydroxylase (Reichhart *et al.*, 1979). Eine Bestimmung der ID_{50} -Werte, d.h. der ABT-Konzentrationen, bei denen nur noch halbmaximale Enzymaktivität gemessen wird, zeigte, daß die IC-LAH der Chlorophyta und Chromophyta eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber dem Hemmstoff aufweist, während die IC-LAH der Rhodophyta wesentlich sensibler reagierte. Da in allen untersuchten Algenarten die Hydroxylierung der Laurinsäure durch Zugabe von ABT gehemmt und ab Konzentrationen von 5 mM ABT auch völlig unterbunden werden konnte, ist ein weiterer Beweis dafür geliefert, daß die Hydroxylierung von Laurinsäure in den Algen über das Cytochrom P-450 geschieht.

In den drei untersuchten Algenspezies wurde in der mikrosomalen Fraktion auch die Substratspezifität nicht nur mit endogenen Substraten wie den Fettsäuren, sondern in Hinblick auf das Konzept der „Grünen Leber“ auch mit Fremdstoffsubstraten getestet. Dabei konnte die Hydroxylierung niedrig chlorierter Biphenyle zu Biphenylen nachgewiesen werden. Die Enzymaktivität von *Ulva lactuca* lag dabei immer unter der von *Fucus vesiculosus* und *Polysiphonia urceolata*. Mehrrens (1991) stellte für den Abbau von PCB's in der Fischleber Abbauregeln auf, nach denen die PCB's in drei Gruppen eingeteilt werden: 1) gut abbaubare PCB's, 2) mäßig abbaubare PCB's und 3) schlecht abbaubare PCB's. Zur ersten Gruppe zählen PCB's mit einem freien Phenylring und niedriger Chlorsubstitution (maximal zwei Chloratome) wie beispielsweise das 2-Chlorbiphenyl oder das 2,5-Dichlorbiphenyl. Zur zweiten Gruppe gehören die monosubstituierten Phenylringe oder PCB's mit niedrigem Chlorgehalt und Substitution beider Phenylringe wie beispielsweise bei 2,3,4,5-Tetrachlorbiphenyl und bei 2,2'-

Dichlorbiphenyl. Die dritte Gruppe schließlich enthält PCB's, deren einer Ring mehrfach und deren zweiter Ring nur in ortho-Stellung durch Chlor substituiert ist, wie beispielsweise das 2,2',5-Trichlorbiphenyl. Diese Abbauregeln können auch auf das Cytochrom P-450 System der hier untersuchten marinen Makroalgen angewandt werden. Hydroxyliert wurden das 3-Chlorbiphenyl, das 4-Chlorbiphenyl und das 2,3-Dichlorbiphenyl als PCB-Komponenten der Gruppe 1. Das 2,2'-Dichlorbiphenyl konnte nicht hydroxyliert werden, obwohl es in der Fischleber noch zur Gruppe 2, den mäßig abbaubaren PCB's, gehört. Die getesteten mehrfach substituierten Biphenyle 3,3',4,4',-Tetrachlorbiphenyl und 2,2',4,4',5,5',-Hexachlorbiphenyl als PCB's der Gruppe 3 konnten in den Algen nicht hydroxyliert werden. Anscheinend reagiert das Algen-P-450-System noch empfindlicher auf den Grad der Chlorierung und die Stellung der Chlorsubstituenten, als dies in der Fischleber der Fall ist.

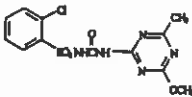
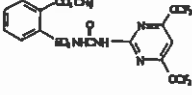
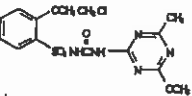
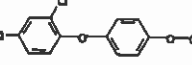
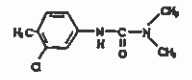
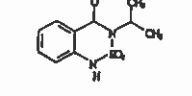
PAK's wie das Benzo(a)pyren und das Phenanthren konnten durch die Algenmikrosomen nicht umgesetzt werden, obwohl aus Tieren eine Arylhydroxylase bekannt ist, die Benzo(a)pyren hydroxyliert (Livingstone *et al.*, 1989, James, 1989).

Ein in der Umwelt weit verbreiteter Fremdstoff ist das DEPH, von welchem 1979 allein in den U.S.A. 300 Millionen Tonnen zur Plastikherstellung produziert wurden, und das nun in Böden und in der Luft zu finden ist (Krell & Sandermann, 1984). Unter den verwendeten Testbedingungen konnte diese Substanz jedoch nicht durch das Algen-P-450 hydroxyliert werden. Auch in anderen pflanzlichen Systemen gelang die Hydroxylierung von DEHP nicht (persönl. Mitteilung Dr. J.-P. Salaün, P-450 Tagung Woods Hole, U.S.A.).

Für viele Herbizide (Tab. 31, Seite 170) wird ein P-450 Mechanismus für die Einleitung der Detoxifizierung gefordert (Mougin *et al.* 1991).

Das Herbizid Isoproturon wurde in erstaunlich hohem Maße von den Algenmikrosomen umgesetzt. Die dabei entstehenden Metaboliten konnten durch Referenzsubstanzen mit TLC als das 1-OH-IPU und das Monodesmethyl-IPU identifiziert werden. Dies läßt den Schluß zu, daß am Abbau dieses Herbizids sowohl eine Hydroxylase als auch eine N-Demethylase beteiligt ist. Für beide Enzyme geben Mougin *et al.* (1991) eine Aktivität von 1,5 pkat/mg Protein an. Die in dieser Untersuchung erzielten Umsätze in den Algen liegen um den Faktor 2-10 höher. Neu ist, daß auch Non-Targetpflanzen für Herbizide wie die marinen Algen in der Lage sind, Herbizide wie das Isoproturon zu detoxifizieren.

Tab. 31 Durch das P-450 Monooxygenase-System hydroxylierte Herbizide (Komoša *et al.*, 1995).

Herbizid	Pflanze (Zellsuspensionskultur)
	Weizen
	Mais
	Weizen
	Weizen
	Weizen/Mais
	Hirse/Mais

Die bei diesem Substratscreening als Positivkontrolle eingesetzten Hundelebermikrosomen zeigten eine den Algen sehr ähnliche Bandbreite an umgesetzten Substanzen. Die Aktivität für den Umsatz der verschiedenen chlorierten Biphenyle und des Herbizides Isoproturon lagen um den Faktor 5-7 höher als in den Pflanzen. Nicht umgesetzt werden konnten auch im tierischen System unter den verwendeten Testbedingungen die höher chlorierten Biphenyle, das Benzo(a)pyren, das Phenanthren sowie das DEHP. Dies läßt für diese Substanzen keine Aussage darüber zu, ob kein Umsatz in Alge oder Leber erfolgte, weil kein entsprechendes Enzym aktiv war, oder ob einfach die gewählten Testbedingungen den Umsatz verhierten bzw. der Umsatz nicht detektiert werden konnte.

Die Aufnahme von P-450-Differenzspektren ermöglichte es erstmals, den Gesamt-P-450-Gehalt in Algen zu berechnen. Ein Vergleich mit Spektren aus Mikrosomen der Zellsuspensionskultur von *Glycine max* zeigte, daß die Algen nur halbsoviel P-450 enthielten wie die Zellkultur und deutlich weniger als tierische Systeme (Tab. 32, Seite 171). Die Tab. 33 (Seite 171) zeigt Cytochrom P-450 Gehalte in verschiedenen Pflanzen.

Tab. 32 Gehalt an Cytochrom P-450 in verschiedenen tierischen Systemen

Spezies	Cytochrom P-450 [pmol/mg Protein]	Literatur
Rattenleber	500 - 800	Riviere & Cabanne, (1987)
Leopardfrosch	400	Walker & Ronis, (1989)
Alligator	300	Walker & Ronis, (1989)
Hausfliege	220	Ronis & Hodgson, (1989)

Tab. 33 Gehalt an Cytochrom P-450 in verschiedenen pflanzlichen Systemen

Spezies	Cytochrom P-450 [pmol/mg Protein]	Literatur
<i>Petroselinum hortense</i>	0,15-0,27	Hagmann, (1983)
<i>Salvia officinalis</i>	28	Funk & Croteau, (1993)
<i>Helianthus tuberosus</i>	500	Gabriel <i>et al.</i> , (1991)

Mit Hilfe der oben geschilderten Ergebnisse konnte das P-450 System in Bezug auf die IC-LAH, die Substratspezifität für Fremdstoffe und den Gehalt an P-450 erstmals in marinen Algen charakterisiert werden.

3.2 Metabolismusstudien an marinen Makroalgen

In Folge der oben schon angesprochenen großen Biomasse mariner Meeresalgen könnten diese eine Senke für die Akkumulation von Fremdstoffen darstellen. Daher ist es wichtig, Informationen über den Verbleib von Fremdstoffen in der Alge zu erhalten. Informationen über den Verbleib von Fremdstoffen in Pflanzen werden in der Regel über Metabolismusstudien an Zellsuspensionskulturen gewonnen (Langebartels & Harms, 1985, Komoßa *et al.*, 1995). Diese wurden mit verschiedenen Agrochemikalien wie Atrazin und Glyphosat, aber auch mit verschiedenen xenobiotischen Stoffen wie dem Benzo(a)pyren u.a. in Weizen- oder Soja-Zellkulturen durchgeführt.

Aufgrund seiner ubiquitären Verbreitung in der Umwelt wurde das Benzo(a)pyren auch für diese Untersuchungen herangezogen. In einer Zeitkinetikstudie konnte gezeigt werden, daß Benzo(a)pyren von *Fucus vesiculosus* aufgenommen wird und innerhalb von 24 h eine

Verteilung in die verschiedenen Fraktionen der Alge (Schleim, lösliche Fraktion, Zellwandfraktion) stattfindet. Ebenso konnte ein Ausscheiden von BP aus der Alge ins Medium innerhalb von 96 h beobachtet werden, wie dies auch Roy *et al.* (1994) in *Fontinalis antipyretica* beobachteten. Die Inkubation verschiedener Spezies von marinen Makroalgen mit ^{14}C -BP zeigte eine verstärkte Akkumulation von BP in der Schleimschicht von *Fucus vesiculosus* und in den Rückständen der beiden Rotalgen *Porphyra umbilicalis* und *Polysiphonia urceolata*. Dabei werden in *Fucus vesiculosus* 10 % nichtlösliche Rückstände gebildet. Dieser Wert ist vergleichbar mit den Metabolismusstudien von Harms & Langebartels (1985), die in Soja 15,6 % und in Weizen 9,0 % BP-Rückstände fanden.

Es konnte mit Benzo(a)pyren zwar die Verteilung bzw. der Einbau in die Alge untersucht werden. In den Extrakten konnten jedoch keine Metabolite detektiert werden.

Da bisher der Metabolismus von Fremdstoffen entweder von der Enzymseite oder von der Metabolitenseite her untersucht wurde, wurde in den Algen der Versuch unternommen, beides zu verbinden. Hierzu wurde das PCB 3-Chlorbiphenyl ausgewählt, da hier *in vitro* bereits ein deutlicher Umsatz zum 3-Chlorbiphenylol gezeigt werden konnte.

Auch *in vivo* konnte das 3-Chlorbiphenylol im organischen Extrakt gefunden werden. Durch Zugabe von Phenobarbital, einem bekannten Induktor des Cytochrom P-450 Monooxygenase-Systems, konnte der Metabolismus des 3-Chlorbiphenyls in der Alge forciert werden, ebenso wie er durch Zugabe des Inhibitors ABT unterbunden werden konnte. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Detoxifizierung von 3-Chlorbiphenyl in der Alge über das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System seinen Anfang nimmt. Ein Vergleich der *in vivo*-Umsatzrate mit 0,031 % / g FG * h mit der *in vitro*-Umsatzrate von 0,056 % / g FG * h, zeigte, daß die Differenz zwischen *in vivo* und *in vitro* Ergebnissen sehr gering ist, d.h. hiermit konnte der Metabolismus von 3-Chlorbiphenyl in der lebenden Alge durch die *in vitro* Ergebnisse gestützt werden.

3.3 Induktionsversuche an marinen Makroalgen

Die Untersuchungen zur Induktion von P-450 Enzymen und des GST-Systems sollten den Einfluß meeresbiologisch relevanter Schadstoffe auf die Enzymaktivität in marinen Algen zeigen.

Die Induktion sowohl der LAH als Phase I-Enzym sowie des m- und cGST-Systems aus Phase II konnte mit der xenobiotischen Substanz BP gezeigt werden. Im System der Glutathion S-Transferasen konnte der zeitliche Verlauf der selektiven Induktion bzw. Inhibition verschiedener Substrate beobachtet werden. Und es scheint so, als würde in beiden Systemen das Enzym, welches DCNB konjugiert, innerhalb von 5-15 h abgeschaltet werden. Während es in der mikrosomalen Fraktion auch über einen längeren Zeitraum hinweg nicht mehr zu detektieren war, konnte die DCNB-GST in der löslichen Fraktion nach 48 h Inkubation wieder gemessen werden. Diese lag allerdings unterhalb des Aktivitätsbereichs der Kontrollinkubation. Möglicherweise tritt in der löslichen Fraktion nach einer gewissen Inkubationszeit mit BP eine Akklimatisierungsphase ein, die das Enzym für die hemmende Wirkung unempfindlicher macht.

Da die marinen Algen im Meer verschiedensten Belastungen durch PAK's, PCB's und auch Herbizidrückstände ausgesetzt sind, wurden in einem Induktorscreening die möglichen Effekte dieser Substanzen auf die Enzymaktivität in den Algen untersucht. Zum Vergleich wurden aus dem tierischen System und teilweise auch aus den Zellkultursystemen bekannte Induktoren wie das Phenobarbital, das Clofibrate, das 3-Methylcholanthren und das β -Naphthoflavon eingesetzt. Um die beobachteten Effekte auf die Zugabe der Induktoren zurückführen zu können, wurden verschiedene Standardtestparameter wie etwa Enzymaktivitäten im Primärstoffwechsel und Pigmentgehalt bestimmt. Zusätzlich wurde ein Teil des Schwefelstoffwechsels durch Messung der Glutathionreduktase und des GSH/GSSG-Gehaltes untersucht.

Während die Standardparameter in beiden untersuchten Algenarten (*Fucus vesiculosus* und *Ulva lactuca*) nur geringfügigen Schwankungen unterworfen waren, konnte eine deutliche Induktion des Cytochrom P-450 Systems gezeigt werden, die sowohl mit den bekannten Induktoren als auch mit den verwendeten xenobiotischen Stoffen erzielt werden konnte. Den größten Effekt zeigten dabei das Clofibrate und das Benzo(a)pyren.

Im System der mGST konnte eine deutliche Induktion der DCNB-GST gezeigt werden, bei gleichzeitiger Reduktion der Substratspezifität. Es werden möglicherweise bestimmte Isoformen zugunsten anderer Isoformen dieses Enzyms abgeschaltet. Über den Mechanismus dieser Abschaltung ist leider noch nichts bekannt.

Im System der cGST ist die Induktion nicht so ausgeprägt wie im mikrosomalen System, ebenso wie die Reduktion der Substratspezifität.

Mit den oben beschriebenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der detoxifizierenden Enzymsysteme (P-450 und GST) in Algen durch Fremdstoffe, die auch in der natürlichen Umgebung vorkommen, modifiziert werden kann.

4. Ausblick

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung zu den detoxifizierenden Enzymsystemen konnte das Konzept der „Grünen Leber“ auf das System der niederen Pflanzen und vor allem der marinen Makroalgen übertragen werden. In Hinblick auf die Meeresalgen ist dies von besonderer Bedeutung, da hier ein großes Potential der Detoxifizierung von Umweltchemikalien und Xenobiotika vorhanden ist und die Verschmutzung der Meere ein akutes Problem darstellt.

Durch die Möglichkeit, marine Meeresalgen im Labor ohne größere Schwierigkeiten zu kultivieren, steht ein weiteres Modellsystem als Instrument sowohl für praxisnahe Metabolismusstudien als auch für Untersuchungen von Entgiftungsenzymen und deren Induzierbarkeit zur Verfügung.

Ein weiterer interessanter Aspekt der hier vorgestellten Methode ist das Biomonitoring der Meeresverschmutzung, insbesondere die Verwendung von induzierten P-450 Gehalten in Algen als Schadstoffanzeiger. Fische, Muscheln, Seehunde etc. werden bereits für diese Untersuchungen herangezogen (Foerlin & Celander, 1993). Der Vorteil eines Biomonitorings mit marinen Algen ist ihre Anheftung an festes Substrat und ihre damit bedingte Standorttreue, die ein genaueres Verschmutzungsbild bestimmter Meeresabschnitte ermöglichen würden.

V. Zusammenfassung

1) In einem Screeningprogramm detoxifizierender Enzymsysteme (Cytochrom P-450 Monooxygenasen, mikrosomale und lösliche Glutathion S-Transferasen, O-, N- und S-Glucosyltransferasen) wurde die Aktivität dieser Enzyme in 63 verschiedenen Pflanzenarten aus den Abteilungen Spermatophyta, Pteridophyta, Bryophyta, Mycobionta, Chlorophyta, Chromophyta und Rhodophyta und in vier Zellsuspensionskulturen (*Glycine max*, *Triticum aestivum*, *Zea mays* und *Picea abies*) untersucht.

2) Die Aktivitäten der einzelnen Enzymsysteme wurden mit Modellsubstraten, mit Naturstoffen und Xenobiotika bestimmt. Das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System wurde zum ersten Mal auch in marinen Makroalgen untersucht. Besonders ausgeprägte Enzymaktivitäten fanden sich bei allen hier bearbeiteten P-450 Enzymen in den Makroalgen. So konnte mit dem xenobiotischen Substrat 3-Chlorbiphenyl in den Makroalgen eine 10-fach höhere Aktivität als in den übrigen Pflanzenarten gemessen werden.

Es wurde eine Trennung der mikrosomalen von der löslichen Glutathion S-Transferase vorgenommen, und die Aktivitäten beider Fraktionen mit unterschiedlichen Substraten waren in fast allen untersuchten Pflanzenspezies detektierbar. Das Modellsubstrat EPNP konnte jedoch in keiner untersuchten Spezies durch die mikrosomale Glutathion S-Transferasen konjugiert werden, während die löslichen Glutathion S-Transferasen in sehr vielen Spezies dazu in der Lage waren. Alle untersuchten Glucosyltransferasen zeigten Aktivitätsschwerpunkte bei den höheren Pflanzen und den Pteridophyta sowie bei den marinen Makroalgen. So konnte die Konjugation von Pentachlorphenol (PCP) durch die O-Glucosyltransferasen nur in den Spermatophyta und einigen Pteridophyta beobachtet werden.

3) Eine mathematische Auswertung der Screening-Ergebnisse in Bezug auf den Evolutionsstammbaum der Pflanzen wurde mittels Hasse-Diagrammen vorgenommen. Hierbei zeigte sich, daß die Untersuchung des Cytochrom P-450- und Glucosyltransferase-Enzymsystems die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der Spermatophyta und Algen verdeutlicht, während die Glutathion S-Transferasen in den Pflanzen ein uneinheitliches Bild ergaben. Die Pteridophyta, Bryophyta und Mycobionta lassen sich auf der Basis der untersuchten Enzymaktivitäten nur schwer in das Evolutionsschema einordnen.

4) Erstmals in marinen Pflanzen erfolgte eine Charakterisierung des P-450 Monooxygenase-Systems am Beispiel der „in chain“-Laurinsäurehydroxylase. Zudem wurden chlorierte Biphenyle, der polyaromatischen Kohlenwasserstoffe und Herbizide als mögliche Substrate getestet.

5) Mit Mikrosomen aus unterschiedlichen Algenarten Differenzspektren aufgenommen und die Gehalt an Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 bestimmt. Dabei wurden Konzentrationen für das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System von 74 pmol/mg Protein (*Glycine max* als Modellsystem) und für Algen von 29-35 pmol/mg Protein ermittelt.

6) Mit der weltweit verbreiteten Umweltchemikalie Benzo(a)pyren wurden Metabolismusstudien zur Aufnahme, Verteilung und Abgabe dieses Stoffes im System Alge/Wasser durchgeführt. In den Chromophyta akkumulierte das Benzo(a)pyren vornehmlich in der Schleimschicht, während in den Rhodophyta vermehrt unlösliche Rückstände gebildet wurden.

7) Die im Screening-Programm ermittelten *in vitro*-Daten zeigten, daß beim Abbau von chlorierten Biphenylen das P-450 Monooxygenase-System maßgeblich beteiligt ist. Um dieses Ergebnis weiter zu verifizieren, wurden Metabolismusstudien an semisteril angezogenen Makroalgen (*Polysiphonia urceolata*, Rhodophyta) durchgeführt. Durch zusätzliche Inkubation mit Aktivatoren (Phenobarbital) bzw. Inhibitoren (ABT) konnte eine Beteiligung des P-450-Systems am Metabolismus der untersuchten Substanz (3-Chlorbiphenyl) gezeigt werden.

8) Induktionsversuche für die detoxifizierenden Enzymsysteme Cytochrom P-450 und mikrosomale und lösliche Glutathion S-Transferasen an den beiden Makroalgen *Ulva lactuca* (Chlorophyta) und *Fucus vesiculosus* (Chromophyta) durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, daß die Aktivität beider Enzymsysteme in den Algen durch verschiedene Induktoren und zum Teil auch durch meeresbiologisch relevante Stoffe (Benzo(a)pyren, Phenanthren, 3-Chlorbiphenyl, Atrazin) in den Algen modifiziert werden kann.

9) Das bisher für höhere Pflanzen belegte Konzept der „Grünen Leber“ konnte durch die hier vorgestellten Untersuchungen auf niedere Pflanzen und marine Makroalgen übertragen werden.

Diese leisten somit wahrscheinlich einen wichtigen Beitrag zum Detoxifizierungspotential der Natur.

VI. Literatur

- AHOKAS J.T., PELKONEN, O. (1984)
Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fish liver cytochrome P450. *Mar. Environ. Res.*, 14, 59-69
- ALTSHULLER, A.P. (1983)
Natural volatile organic substances and their effect on air quality in the United States. *Atmos. Environ.*, 17, 2131-2135
- ANDO, K., HONMA, M., CHIBA, S., TAHARA, S., MIZUTANI, J. (1988)
Glutathione transferase from *Mucor javanicus*. *Agric Biol. Chem.*, 52, 135-139
- ARJMAND, M., SANDERMANN, H., JR. (1985)
Metabolism of DDT and related compounds in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 23, 389-397
- BACCI, E., GAGGI, C. (1987)
Chlorinated hydrocarbons vapours and plant foliage: Kinetics and applications. *Chemosphere*, 16, 2515-2523
- BAENZIGER, J.U. (1994)
Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it!. *FASEB*, 8, 1019-1025
- BARTLING, D., RADZIO, R., STEINER, U., WEILER, E.W. (1993)
A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.*, 216, 579-586
- BENVENISTE, I., SALAÜN, J.-P., SIMON, A., REICHART, D., DURST, F. (1982)
Cytochrome P450-dependent hydroxylation of lauric acid by microsomes from pea-seedlings. *Plant Physiol.*, 70, 122-126
- BERGMEYER, H.U. (1970)
Methoden der enzymatischen Analyse. 3.Auflage, Bd. 1, Verlag Chemie, Weinheim
- BERGMEYER, H.U., GAWEHN, K. (1977)
Grundlagen der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, New York
- BOHNENKÄMPER, O., GLÄSSEN, W.E., HAAS, M., KLIEM, E.D., KOMOSA, D., LEHR, S., MAY, R.G., SANDERMANN, H. JR., SCHEUNERT, I. (1994)
Biodegradation de l'Isoproturon dans les plantes et les sols. Actes du 24. Congrès du Groupe Français des Pesticides, Edition Philippe Soler, Bordeaux, 6
- BOOTH, J., BOYLAND, E., SIMS, P. (1961)
An enzyme from rat liver catalyzing conjugations with glutathione. *Biochem. J.*, 79, 516-524

- BORLAKOGLU, J.T., JOHN, P. (1989)
Cytochrome P-450 dependent metabolism of xenobiotics. A comparative study of rat hepatic and plant microsomal metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94c, 613-617
- BRADFORD, M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- BROWN, H.M., NEIGHBORS, S.M. (1987)
Soybean metabolism of chlorimuron ethyl: physiological basis for soybean selectivity. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 29, 112-116
- BRÜGGEMANN, R., MÜNZER, B., HALFON, E. (1994)
An algebraic/graphical tool to compare ecosystems with respect to their pollution - The german river „Elbe“ as an example -I: Hasse-Diagrams. *Chemosphere*, 28, 863-872
- BRÜGGEMANN, R., KAUNE, A., ZELLES, L., HARTMANN, A., STEINBERG, C. (1995)
Einsatz der Hasse-Diagrammtechnik zur vergleichenden Datenanalyse von Biomarkerantworten und ökologischen Tests. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.*, 7, 265-274
- BRÜGGEMANN, R., HALFON, E. (1995)
Theoretical base of the Program „Hasse“. *GSF-Bericht 20*, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.
- BUETLER, T.M., EATON, D.L. (1992)
Glutathione S-transferases: Amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. *Environ. Carcin. & Ecotox. Revs.*, C10, 181-203
- BURRESON, A.J., MOORE, R.E., ROLLER, P.P. (1976)
Volatile halogen compounds in the algae *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta). *J. Food. Chem.*, 24, 856-861
- CABANNE, F., HUBY, P., GALLARDON, P., SCALLA, R., DURST, F. (1987)
Effect of the cytochrome P-450 inactivator 1-Aminobenzotriazole on the metabolism of chlortoluron and isoproturon in wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 28, 371-380
- CASIDA, J.E., LYKKEN, L. (1969)
Metabolism of organic pesticide chemicals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 20, 607-636
- CHENG, G.W., MALENCIK, D.A., BREEN, P.J. (1994)
UDP-Glucose: Flavonoid O-glucosyltransferase from strawberry fruit. *Phytochem.*, 35, 1435-1439
- CLARK, A.G. (1989)
The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from nonvertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B, 419-446

- CLARK, A.G. (1982)
A direct method for the visualization of glutathione S-transferase activity in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **123**, 147-150
- COLLODI, P., MIRANDA, C.L., ZHAO, X., BUHLER, D.R., BARNES, D.V. (1994)
Induction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) P450 in vivo and in cell culture. *Xenobiotica*, **24**, 487-493
- COUPLAND, D. (1992)
Detoxification of herbicides in plants. In: *Herbicide resistance in crops*. (Eds. Caseley, J.C., Cussons, G.W., Atkin, R.K.), Butterworth, Oxford
- DAHROUG, S., MÜLLER, F. (1990)
Response of susceptible and tolerant plants to diclofop-methyl. *J. Plant Dis. Prot.*, **97**, 154-165
- DATTA, J., DUTTA, T.K., SAMANTA, T.B. (1994)
Microsomal glutathione S-transferase (GST) isozymes in *Aspergillus ochraceus* TS: Induction by 3-methylcholanthrene. *Xenobiotica*, **30**, 1508-1514
- DAVIS, D.G., OLSON, P.A., SWANSON, H.R., FREAR, D.S. (1991)
Metabolism of the herbicide metribuzin by an N-glucosyltransferase from tomato cell cultures. *Plant Sci.*, **74**, 73-80
- DEAN, J.V., GRONWALD, J.W., EBERLEIN, C.V. (1990)
Induction of glutathione S-transferase isozymes in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol.*, **92**, 467-473
- DEGTYARENKO, K.N., ARCHAKOV, A.I. (1993)
Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS*, **332**, 1-8
- DEKANT, W., MARTENS, G., VAMVAKAS, S., METZLER, M., HENSCHLER, D. (1987)
Bioactivation of tetrachloroethylene. Role of glutathione S-transferase-catalyzed conjugation versus cytochrome P-450-dependent phospholipid alkylation. *Drug Metabol. Dispos.*, **15**, 702-709
- DEBUS, R., DITTRICH, B., SCHRÖDER, P., VOLMER, J. (1989)
Biomonitoring organischer Luftschadstoffe. Ecomed-Verlag, Landsberg, München, Zürich
- DEBUS, R., SCHRÖDER, P. (1991)
Responses of *Petunia hybrida* and *Phaseolus vulgaris* to fumigation with difluorochloro-bromo-methane (Halon 1211). *Chemosphere*, **21**, 1499-1505

- DENBESTEN, P.J., LEMAIRE, P., LIVINGSTONE, D.R., WOODIN, B., STEGEMAN, J.J., HERWIG, H.J., SEINEN, W. (1993)
Time-course and dose-response of the apparent induction of the cytochrome P450 monooxygenase system of pyloric caeca microsomes of the female sea star *Asterias rubens* L. by benzo(a)pyrene and polychlorinated biphenyls. *Aquatic Toxicol.*, 26, 23-40
- DIESPEROER, H. (1979)
Zwei Wege der Konjugation von Zimtsäure und Glutathion in Pflanzen. Dissertation Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
- DIESPERGER, H., SANDERMANN, H., JR. (1979)
Soluble and microsomal glutathione S-transferase activities in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 146, 643-648
- DHINDSA, R.S. (1991)
Drought stress enzymes of glutathione metabolism oxidation injury and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.*, 95, 648-651
- DURST, F., BENVENISTE, I., SALAÜN, J.-P., WERCK-REICHART, D. (1992)
Function, mechanism and regulation of cytochrome P-450 enzymes in plants. *Biochem. Soc. Transact.*, 20, 353-357
- ECKEY, H. (1987)
Isolierung und Charakterisierung der PCP-O-Glucosyltransferase einem Enzym des PCP-Metabolismus in Pflanzen. Diplomarbeit Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
- EDWARDS, R., DIXON, R.A. (1991)
Glutathione S-cinnamoyl transferases in plants. *Phytochemistry*, 30, 79-84
- EDWARDS, R., OWEN, W.J. (1986)
Comparison of glutathione S-transferase of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension cultured cells. *Planta*, 169, 208-215
- EKLER, Z., DUTKA, F., STEPHENSON, G.R. (1993)
Safener effects on acetochlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione S-transferase activity in maize. *Weed Res.*, 33, 311-318
- FARRIS, N.W., REED, D.J. (1987)
High performance liquid chromatography of thiols and disulfides: Dinitrophenol derivatives. *Methods of Enzymol.*, 143, 101-109
- FLETCHER, J.S., GROEGER, A., MCCRADY, J., MCFARLANE, J. (1987)
Polychlorobiphenyl (PCB) metabolism by plant cells. *Biotech. Letters*, 9, 817-820
- FJELLSTEDT, T. A., ALLEN, R.H., DUNCAN, B.K., JAKOBY, W.B. (1973)
Enzymatic conjugation of epoxides with glutathione. *J. Biol. Chem.*, 248, 3702-3707

- FOERLIN, L., CELANDER, M. (1993)
Induction of cytochrome P450 1A in teleosts: environmental monitoring in swedish fresh and marine waters. *Aqu. Toxicol.*, 26, 41-56
- FONNÉ-PFISTER, R., GAUDIN, J., KREUZ, K., RAMSTEINER, K., EBERT, E. (1990)
Hydroxylation of primisulfuron by an inducible cytochrome P-450-dependent monooxygenase system from maize. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37, 165-172
- FORTES, M.D., LÖNING, K. (1980)
Growth rates of North sea macroalgae in relation to temperature, irradiance and photoperiod. *Helgol. Meeresunters.*, 34, 15-29
- FREAR, D.S. (1968)
Herbicide metabolism in plants. I. Purification and properties of UDP-glucoside: arylamine N-glucosyl-transferase from soybean. *Phytochemistry*, 7, 381-412
- FREAR, D.S., SWANSON, H.R. (1970)
Biosynthesis of S-(4-Ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry*, 9, 2123-2132
- FREAR, D.S., SWANSON, H.R., MANSAGER, E.R. (1983)
Acifluorfen metabolism in soybean: diphenylether bond cleavage and the formation of homogluthione, cysteine and glucose conjugates. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20, 299-310
- FREAR, D.S., SWANSON, H.R., THALACKER, F.W. (1991)
Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, chloresulfuron and linuron in wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 41, 274-282
- FREED, V.H., MONTGOMERY, M.L. (1963)
The metabolism of herbicides by plants and soils. In: *Residues reviews*. Vol. 3. (Ed. Gunther, F.A.). Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- FRIEDRICH, R., OBERMEIER, A., VOSS, A. (1987)
Pilotstudie „Emissionskataster für flüchtige organische Verbindungen“. KfK-PEF 22
- FRIES, C.R., LEE, R.F. (1984)
Pollutant effects on the mixed function oxygenase (MFO) and reproductive systems of the marine polychaete *Nereis virens*. *Marine Biol.*, 79, 187-193
- FUNK, C., CROTEAU, R. (1993)
Induction and characterization of a cytochrome P-450-dependent camphor hydroxylase in tissue cultures of common sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiol.*, 101, 1231-1237
- FUERST, E.P., IRZYK, G.P., MILLER, K.D. (1993)
Partial characterization of glutathione S-transferase isoenzymes induced by the herbicide safener benoxacor in maize. *Plant Physiol.*, 102, 795-802

- GABRIAC, B., WERCK-REICHART, D., TEUTSCH, H., DURST, F. (1991)
Purification and immunocharacterization of a plant cytochrome P450: The cinnamic acid 4-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 302-309
- GALLANDT, E. R., BALKE, N.E. (1995)
Xenobiotic glucosyltransferase activity from suspension-cultured *Glycine max* cells. *Pestic Sci.*, 43, 31-40
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. (1968)
Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158
- GIBSON, G.G. (1989)
Comparative aspects of the mammalian cytochrome P-450 IV gene family. *Xenobiotica*, 19, 1123-1148
- GIESE, M., BAUER-DORANTH, U., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H., JR. (1995)
Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and soybean (*Glycine max* L.) cell-suspension cultures. *Plant Physiol.*, 104, 1301-1309
- GSCHWEND, P.M., MACFARLANE, J.K., NEWMAN, K.A. (1985)
Volatile halogenated organic compounds released to seawater from temperate marine macroalgae. *Science*, 227, 1033-1035
- GOPALAN, P., TSUJI, K., LEHMANN, K., KIMURA, M., SHINOZUKA, H., SATO, K., LOTLIKAR, P.D. (1993)
Modulation of aflatoxin B1-induced glutathione S-transferase placental form positive hepatic foci by pretreatment of rats with phenobarbital and buthione sulfoximine. *Carcinogenesis*, 14, 1469-1470
- GÖTZBERGER, C. (1994)
Vergleichende Untersuchungen zum Isoenzymmuster der Glutathion S-Transferase in verschiedenen Nadelbäumen. Diplomarbeit, Universität Ulm
- GRAMS, H. (1974)
Makroskopische Meeresalgen. Band Ib. Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart
- GROOTWASSINK, J.W.D., REED, D.W., KOLENOVSKY, A.D. (1994)
Immunopurification and immunocharacterization of the glucosinolate biosynthetic enzyme thioglucosyltransferase. *Plant Physiol.*, 105, 425-433
- GROSSE, W., FÜRTIG, K., GOHR, P., LACHMANN, K.U., MAY, D. (1992)
Localization and regulation of tryptophan and indole metabolites in plants. In: *Advances in Tryptophan Research*, Fujita Health University Press, Toyoake, 109-112
- GUENGERICH, F.P. (1992)
Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacology and Therapeutics*, 54, 17-61

- GUENGERICH, F.P. (1993)
Cytochrome P450 Enzymes. *American Scientist*, **81**, 440-447
- HABIG, W., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. (1974)
Glutathione S-transferase: The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1730-1739
- HAGMANN, M.-L. (1983)
Flavonoid 3'-Hydroxylase und Dimethylallylpyrophosphat: Isoflavon Dimethylallyltransferase. Zwei membrangebundene Enzyme der Flavonoidbiosynthese. Dissertation Albert Ludwigs-Universität, Freiburg
- HAN, S., HATZIOS, K.K. (1991)
Uptake, translocation, and metabolism of [14 C]pretilachlor in fenclorim-safened and unsafened rice seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **39**, 281-292
- HARMS, H., LANGEBAEELS, C. (1986)
Standardized plant cell suspension test systems for an ecotoxicologic evaluation of the metabolic fate of xenobiotics. *Plant Sci.*, **45**, 157-165
- HARVEY, R.G. (1991)
Polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry and carcinogenetiy. Cambridge Monographs on Cancer Research. (Hrsg. Coombs, M.M., Ashby, J., Hicks, R.M., Baxter, H.), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney
- HATZIOS, K.K., PENNER, D. (1988)
Metribuzin. In: *Herbicides, Chemistry, Degradation and Mode of Action*. Vol. 3, (Hrsg. Kearney, P.C., Kaufmann, D.D., Dekker, M.), New York, 191-243
- HEITFUß, F. (1987)
Pflanzenschutz. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- HELLER, W., FORKMANN, G. (1988)
Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne J.B. (Eds.). *The Flavonoids. Advances in research since 1980*. Capman and Hall, London, 399-425
- HOLTUM, J.A.M., MATTHEWS, J.M., HÄUSLER, R.E., LILJEGREN, D.R., POWLES, S.B. (1991)
Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). III. On the mechanism of resistance to diclofop-methyl. *Plant Physiol.*, **97**, 1026-1034
- HÖSEL, W. (1981)
Glycosylation and glycosidases. In: *The biochemistry of plants*. Vol. 7 (Eds. Stumpf, P.K., Conn, E.E.), Academic Press, London, 25-32
- HUTZINGER, O., VEERKAMP, W. (1981)
Xenobiotic chemicals with pollution potential. In: *Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds*. (Leisinger, T., Cook, A.M., Hütter, R., Nüesch, J. Eds.). FEMS Symp. Nr.12, Academic Press, London, 3-45

- INSKEEP, W.P., BLOOM, P.R. (1985)
Extinction coefficient of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.*, 77, 483-485
- ITO, S., YOSHIOKA, K., WATANABE, T., TATENO, C., OKUNO, Y., HOSOKAWA, S., YANAIHARA, N., YOSITAKE, A. (1993)
Immunohistochemical demonstration of c-myc oncogene product and glutathione S-transferase (placental form) in rat hepatic preneoplastic lesions induced by diethylnitrosamine and clofibrate. *Biomed. Res.*, 14, 345-351
- JABLONKAI, I., HATZIOS, K.H. (1993)
In vitro conjugation of chloroacetanilide herbicides and atrazine with thiols and contribution of nonenzymatic conjugation to their glutathione-mediated metabolism in corn. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1736-1742
- JABLONKAI, I., HATZIOS, K.H. (1994)
Microsomal oxidation of the herbicides EPTC and acetochlor and of the safener MG-191 in maize. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 48, 98-109
- JAENIKE, L. (1988)
Einführung in die Praxis des Biochemikers. Praktikumsbuch, Institut für Biochemie, Universität zu Köln
- JAMES, M.O. (1989)
Cytochrome P450 monooxygenases in crustaceans. *Xenobiotica*, 19, 1063-1076
- KAHL, R., KAHL, G.F. (1981)
Entgiftung und Aktivierung von Arzneimitteln und Fremdstoffen: Rolle verschiedener Cytochrome P-450. *Pharmazie heute*, 3, 93-99
- KAUFMANN, D.D., STILL, G.G., PAULSON, G.D., BANDAL, S.K. (1976)
Bound and conjugated pesticides residues, ACS Symp. Ser. Nr. 29, American Chemical Society, Washington
- KETTERER, B. (1986)
Detoxification reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, 16, 957-973
- KIRK, T.K., SCHULTZ, E., CONNORS, W.J., LORENZ, L.F., ZEIKUS, J.G. (1978)
Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, 117, 277-285
- KLOTZ, A.V., STEGEMAN, J.J., WALSH, C. (1984)
Multiple isozymes of hepatic cytochrome P450 form in the marine teleost fish scup (*Stenotomus chrysops*). *Marine Environ. Res.*, 14, 402-404
- KNÖSS, W., GLOMBITZ, K.-W. (1993)
A phenolsulfatase from the marine brown alga *Cystoseira tamaricifolia*. *Phytochemistry*, 32, 119-123

- KOCHS, G. (1988)
Cytochrom P-450 abhängige Enzyme in Sojabohne (*Glycine max* L.). Charakterisierung der Flavon-Synthase II Reinigung und Rekonstitution der Dihydroxypterocarpan 6a-Hydroxylase. Dissertation Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
- KOMOSA, D., SANDERMANN, H. JR. (1992)
Plant metabolism of herbicides with C-P-bonds: Phosphinothricin. Pestic. Biochem. Physiol., 43, 95-102
- KOMOSA, D., GENNITY, I., SANDERMANN, H. JR. (1992)
Plant metabolism of herbicides with C-P-bonds: Glyphosate. Pest. Biochem. Physiol., 43, 85-94
- KOMOSA, D., LANGEBAEDEL, C., SANDERMANN, H. JR. (1995)
Metabolic Processes for Organic Chemicals in Plants. In: Plant Contamination. Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes. (Eds. Trapp, S., McFarlane, J.C.), Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 69-103
- KOMOSA, D., SANDERMANN, H. JR. (1995)
Plant metabolic studies of the growth regulator maleic hydrazide. Journal of Agricul. Food Chem., 43, 2713-2715
- KORNMANN, P., SAHLING, P.H. (1993)
Meeresalgen von Helgoland. Benthische Grün-, Braun- und Rotalgen. Sonderdruck aus: Helgol. wissenschaft. Meeresunters., 29, 1-289
- KRELL, H.-W., SANDERMANN, H. JR. (1984)
Plant biochemistry of xenobiotics: Purification and properties of a wheat esterase hydrolyzing the plasticizer chemical, bis(2-ethylhexyl)phthalate. Eur. J. Biochem., 143, 57-62
- KREMER, B.P., MUHLE, H. (1991)
Flechten, Moose, Farne. Hrsg. Steinbach, G., Mosaik Verlag GmbH, München
- KROATH, H., SUSANI, M., ZÖHNER, A. (1988)
Genetic engineering of resistance to the phenylpyridazine herbicide, pyridate. In: Factors affecting herbicidal activity and selectivity. Proceedings EWRS Symposium, 4-6
- LAMOUREUX, G. L., FREAR, D.S. (1979)
Pesticide metabolism in higher plants: In vitro enzyme studies. In: Xenobiotic metabolism: In vitro methods. (Hrsg.: Paulson, G.D., Frear, D.S., Marks, E.P.), ACS Symposium Series 97, American Chemical Society, Washington D.C.
- LAMOUREUX, G.L., RUSNESS, D.G. (1986)
Tridiphan [2-(3,5-dichlorophenyl)-2-(2,2,2-trichloroethyl)oxirane], an atrazine synergist: enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor. Pestic. Biochem. Physiol., 26, 323-342

- LAMOUREUX, G.L., RUSNESS, D.G. (1987)
EPTC metabolism in corn, cotton, and soybean: Identification of a novel metabolite derived from the metabolism of a glutathione conjugate. *J. Agric. Food chem.*, 35, 1-7
- LAMOUREUX, G.L., RUSNESS, D.G. (1989)
The role of glutathione and glutathione S-transferase in pesticide metabolism, selectivity, and mode of action in plant and insects. In: *Glutathione: chemical, biochemical, and medical aspects*, IIB (Eds. Dolphin, D., Poulson, R., Avramovik, O.), John Wiley, New York
- LAMOUREUX, G.L., RUSNESS, D.G., SCHRÖDER, P., RENNINGER, H. (1991)
Diphenyl ether herbicide metabolism in a spruce cell suspension culture: the identification of two novel metabolites derived from a glutathione conjugate. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 39, 291-301
- LANGE, B.M. (1995)
Struktur und Biosynthese von Streblignin. Pilzlicher Elicitor und 3,4-Dichloranilin als Stressoren. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München
- LANGEBARTELS, C., HARMS, H. (1985)
Analysis for nonextractable (bound) residues of pentachlorophenol in plant cells using a cell wall fractionation procedure. *Ecotox. and Envir. Safety*, 10, 268-279
- LATURNUS, F. (1993)
Bildung und Abgabe kurzkettiger halogener Kohlenwasserstoffe durch Makroalgen in der Polarregion. In: *Berichte zur Polarforschung*, 132, ISSN 0176-5027
- LEBARON, H.M., MCFARLAND, J.E., SIMONEAUX, B.J. (1988)
Metolachlor. In: *Herbicides, Chemistry, Degradation and Mode of Action*, Vol.3, (Eds. Kearney, P.C., Kaufmann, D.D., Dekker, M.), New York
- LEAH, J.M., WORRALL, T.L., COBB, A.H. (1992)
Isolation and characterization of two glucosyltransferases from *Glycine max* associated with bentazone metabolism. *Pestic. Sci.*, 34, 81-87
- LIVINGSTONE, D.R. (1984)
Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo(a)pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L.. *Mar. Envir. Res.*, 14, 414-415
- LIVINGSTONE, D.R., KIRCHIN, M.A., WISEMAN, A. (1989)
Cytochromes P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica*, 19, 1041-1062
- LIVINGSTONE, D.R., MOORE, M.N., LOWE, D.M., NASCI, C., FARRAR, S.V. (1991)
Responses of the cytochrome P450 monooxygenase system to diesel oil in the common mussel *Mytilus edulis* L., and the periwinkle *Littorina littorea* L.. *Aquat. Tox.*, 7, 8-9
- LÖNING, K. (1985)
Meeresbotanik: Verbreitung, Ökophysiologie und Nutzung der marinen Makroalgen. Thieme Verlag, Stuttgart, New York

- MANNÉRIK, B. (1985)
The isozymes of glutathione S-transferase. In: Advances in Enzymology and related areas of molecular biology. (Eds.: Meister, A.), John Wiley and Sons, New York
- MANNÉRIK, B., DANIELSON, U.H. (1988)
Glutathione S-transferases - structure and catalytic activity. CRC Crit. Rev. Biochem., 23, 283-337
- MAUCH, F., DUDLER, R. (1993)
Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and pathogen attack. Plant Physiol., 102, 1193-1201
- MCCONNELL, O., FENICAL, W. (1977)
Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. Phytochemistry, 16, 367-374
- MENN, J.J. (1978)
Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. Environ. Health Perspec., 27, 113-124
- MEHRTENS, G. (1991)
Untersuchungen zur Biotransformation abiotischer Halogenverbindungen in Fischlebern. Dissertation Universität Bremen
- MEHRTENS, G. (1994)
Haloperoxidase activity in arctic macroalgae. Polar Biol., 14, 351-354
- MESSNER, B., BOLL, M. (1994)
Cell suspension cultures of spruce (*Picea abies*): Inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst). Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 34, 69-78
- MILLER, L.P. (1949)
Formation of β -O-chlorophenyl-gentiobioside in gladiolus corms from absorbed o-chlorophenol. Science, 92, 2376-2377
- MOHR, H., SCHOPFER, P. (1992)
Pflanzenphysiologie. 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest
- MOORE, R.E. (1977)
Volatile compounds from marine algae. Accounts of Chem. Res., 10, 40-47
- MORELAND, D.E., CORBIN, F.T. (1991)
Influence of safeners on the in vivo and in vitro metabolism of bentazon and metolachlor by grain sorghum shoots. A preliminary report. Z. Naturforsch., 46c, 906-914
- MORELAND, D.E., CORBIN, F.T., FLEISCHMANN, T.J., MCFARLAND, J.E. (1995)
Partial characterization of microsomes isolated from mung bean cotyledones. Pestic. Biochem. Physiol., 52, 98-108

- MORGENSTERN, R., DEPIERRE, J.W., ERNSTER, L. (1979)
Activation of microsomal glutathione S-transferase activity by sulphydryl reagents.
Biochem. Biophys. Res. Com., 87, 657-663
- MORGENSTERN, R., DEPIERRE, J.W. (1983)
Microsomal glutathione transferase. Purification in unactivated form and further characterization of the activation process, substrate specificity and amino acid composition. *Eur. J. Biochem.*, 134, 591-597
- MORGENSTERN, R., DEPIERRE, J.W., JÖRNVALL, H. (1985)
Microsomal glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.*, 260, 13976-13983
- MOUGIN, C., CABANNE, F., CANNIVENC, M.-C., SCALLA, R. (1990)
Hydroxylation and N-Demethylation of Chlortoluron by wheat microsomal enzymes.
Plant Science, 66, 195-203
- MOUGIN, C., POLGE, N., SCALLA, R., CABANNE, F. (1991)
Interactions of various agrochemicals with cytochrome P450 dependent monooxygenases of wheat cells. *Pestic. Biochem.*, 40, 1-11
- MOUGIN, C., CABANNE, F., SCALLA, R. (1992)
Additional observation on the chlorotoluron hydroxylase and N-demethylase activities in wheat mikrosomes. *Plant Physiol. Biochem.*, 30, 769-778
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962)
A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497
- NAUMANN, K. (1993)
Chlorchemie der Natur. Chemie in unserer Zeit, 27, 33-41
- NEBERT, D.W., NELSON, D.R., FEYEREISEN, R. (1991)
Evolution of the cytochrome P-450 genes. *Xenobiotica*, 19, 1149-1160
- NELSON, D.R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D.J., GUENGERICH, F.P., ESTABROOK, R.W., FEYEREISEN, R., GONZALES, F.J., COON, M.J., GUNSALUS, I.C., GOTOH, O., OKUDA, K., NEBERT, D.W. (1993)
The P450 Superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 12, 1-51
- OMURA, T., SATO, R. (1964)
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378
- O'KEEFE, D.P., BOZAK, K.R., CHRISTOFFERSEN, R.E., TEPPERMAN, J.A., DEAN, C., HARDER, P.A. (1992)
Endogenous and engineered cytochrome P-450 monooxygenases in plants. *Biochem. Soc. Trans.*, 20, 357-361

- ORTIS DE MONTELLANO, R. (1988)
Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry. Plenum Press, London, New York
- OVEREND, W.G. (1972)
Glycosides. In: The Carbohydrates. Chemistry and Biochemistry. (Eds. Pigman, W., Horton, D.), Academic Press, 1A, 14-29
- OWEN, W.J. (1989)
Metabolism of herbicides - detoxification as a basis for selectivity. In: Herbicides and Plant Metabolism. (Ed. Dodge, A.D.), Society for Experimental Biology Seminar Series 38, Cambridge University Press, London, 26-34
- PAYNE, J.F. (1977)
Mixed function oxidases in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. Marine Poll. Bull., 8, 112-116
- PRIDHAM, J.B. (1960)
Phenolics of plants in health and disease. (Eds. Pridham, J.B.), Pergamon Press, Oxford
- PRIDHAM, J.B. (1964)
The phenol glucosylation reaction in the plant kingdom. Phytochemistry, 3, 493-497
- RASMUSSEN, R.A. (1972)
What do hydrocarbons from trees contribute to air pollution. J. Air Pollut. Contr. Assoc., 22, 537-543
- RATTE, M. (1995)
Atlantik, Algen und Alkene. Chemie in Labor und Biotechnik, 46, 262-267
- REED, D.W., DAVIN, L., JAIN, J.C., DELUCA, V., NELSON, L., UNDERHILL, E.W. (1993)
Purification and properties of UDP-Glucose: Thiohydroximate glucosyltransferase from *Brassica napus* L. seedlings. Arch. Biochem. Biophys., 305, 526-532
- REICHART, D., SALAÜN, J.-P., BENVENISTE, I., DURST, F. (1979)
Induction by manganese, ethanol, phenobarbital and herbicides of microsomal cytochrome P450 in higher plant tissues. Arch. Biochem. Biophys., 196, 301-303
- RICH, P.R., LAMB, C.J. (1977)
Biophysical and enzymological studies upon the interaction of trans-cinnamic acid with higher plant microsomal cytochromes P-450. Eur. J. Biochem., 72, 353-360
- RICH, P.R., BENDALL, D.S. (1975)
Cytochrome components of plant microsomes. Eur. J. Biochem., 55, 353-360
- RIVIERE, J.-L., CABANNE, F. (1987)
Animal and plant cytochrome P-450 systems. Biochimie, 69, 743-752

- ROBERTSON, J.G.C., JENSON, H., GUTHENBERG, C., TAHIR, M.K., JERNSTROM, B., MANNERVIK, B. (1985)
Differences in the occurrence of glutathione transferase isoenzymes in rat lung and liver. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 127, 80-86
- RONIS, M.J.J., HODGSON, E. (1989)
Cytochrome P-450 monooxygenase in insects. *Xenobiotica*, 19, 1077-1092
- ROTHMALER, W.
Exkursionsflora für die Gebiete der DDR und der BRD. Band 2. (Hrsg. Schubert, R., Werner, K., Meusel, H.). 14. Auflage, Verlag Volk und Wissen, Volkseigener Verlag, Berlin
- ROWELL, J., POTTS, M., WERKLYCH, R., CONN, E.E. (1974)
The 4-hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 249, 5019-5026
- ROY, S., PELLINEN, J., SEM, C.K., HAENNINEN, O. (1994)
Benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene exposure in the aquatic plant *Fontinalis antipyretica*: Uptake, elimination and responses of biotransformation and antioxidant enzymes. *Chemosphere*, 29, 1301-1311
- SAINI, H.S., ATTIEH, J.M., HANSON, A.D. (1995)
Biosynthesis of halomethanes and methanethiol by higher plants via a novel methyltransferase reaction. *Plant. Cell Environ.*, 18, 1027-1033
- SALAÜN, J.-P., BENVENISTE, I., REICHART, D., DURST, F. (1978)
A microsomal (cytochrome P450)-linked lauric acid monooxygenase from aged jerusalem-artichoke tuber tissues. *Eur. J. Biochem.*, 90, 155-159
- SALAÜN, J.-P., BENVENISTE, I., REICHART, D., DURST, F. (1981)
Induction and specificity of cytochrome P-450 dependent laurate in-chain-hydroxylase from higher plant microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 119, 651-655
- SALAÜN, J.-P., SIMON, A., DURST, F. (1986)
Specific induction of lauric acid hydroxylase by clofibrate, diethylhexylphthalate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in higher plants. *Lipids*, 21, 776-779
- SALAÜN, J.-P., SIMON, A., DURST, F., REICH, N.O., DEMONTELLANO, P.R.O. (1988)
Differential inactivation of plant lauric acid and in-chain-hydroxylase by terminally unsaturated fatty acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 260, 540-545
- SALAÜN, J.-P., WEISSBART, D., DURST, F., PFLIEGER, P., MIOSKOWSKI, C. (1989)
Epoxidation of cis and trans Δ -unsaturated lauric acid by a cytochrome P-450-dependent system from higher plant microsomes. *FEBS Letters*, 1-2, 120-126
- SAKATA, K., IWASE, Y., INA, K., DAISUKE, F. (1991)
Halogenated terpenes isolated from the red alga *Plocamium leptophyllum* as feeding inhibitors for marine herbivores. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 743-746

- SANDERMANN, H. JR., DIESPERGER, H., SCHEEL, D. (1977)
Metabolism of xenobiotics by plant cell cultures. In: Plant tissue culture and its biotechnological application. (Eds. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 178-196
- SANDERMANN, H., JR. (1982)
Metabolism of environmental chemicals: A comparison of plant and liver enzyme systems. In: Environmental mutagenesis, carcinogenesis and plant biology. (Hrsg. Klekowski, E., J., Jr.), Praeger Scientific, New York
- SANDERMANN, H. JR., SCHEEL, D., V.D.TRENCK, T. (1983)
Metabolism of environmental chemicals by plants - copolymerization into lignin. J. Appl. Polym. Sci. Appl. Polym. Symp., 37, 407-415
- SANDERMANN, H., JR. (1987)
Pestizid-Rückstände in Nahrungspflanzen. Die Rolle des pflanzlichen Metabolismus. Naturwissenschaften, 74, 573-578
- SANDERMANN, H., JR. (1992)
Plant metabolism of xenobiotics. TIBS, 17, 82-84
- SANDERMANN, H. JR., SCHMITT, R., ECKEY, H., BAUKNECHT, T. (1991)
Plant biochemistry of xenobiotics: Isolation and properties of soybean O- and N-glucosyl and O- and N-malonyltransferases for chlorinated phenols and anilines. Arch. Biochem. Biophys., 287, 341-350
- SANDERMANN, H. JR. (1994)
Higher plant metabolism of xenobiotics: the „green liver“ concept. Pharmacogenetics, 4, 225-241
- SCHEEL, D., SANDERMANN, H. JR. (1981)
Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Evidence for incorporation into lignin. Planta, 152, 248-252
- SCHEEL, D., SCHÄFER, W., SANDERMANN, H. JR. (1984)
Metabolism of pentachlorophenol in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). General results and isolation of lignin metabolites. J. Agric. Food Chem., 32, 1237-1241
- SCHEUNERT, I., SCHROLL, R., TRAPP, S. (1993)
Prediction of plant uptake of organic xenobiotics by chemical substance and plant properties. In: Chemical Exposure Predictions. (Eds. Calamari, D.) Lewis Publisher, Chelsea, MI
- SCHMIDT, B., RIVERO, C., THIEDE, B. (1995)
3,4-Dichloroaniline N-glucosyl- and N-malonyltransferase activities in cell cultures and plants of soybean and wheat. Phytochemistry, 39, 81-84

- SCHMITT, R., SANDERMANN, H., JR. (1982)
Specific localization of β -D-glucoside conjugates of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soybean vacuoles. *Z. Naturforsch.*, 37c, 772-777
- SCHMITT, R., KAUL, J., V.D.TRENCK, T., SCHALLER, E., SANDERMANN, H. JR. (1985)
 β -D-glucosyl and o-malonyl- β -D-glucosyl conjugates of pentachlorophenol in soybean and wheat: Identification and enzymatic synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 24, 77-85
- SCHNEIDER, B., SCHÖTTE, H.R., TEWES, A. (1984)
Comparative investigations on the metabolism of 2-(2,4-dichlorophenoxy)isobutyric acid in plants and cell suspension cultures of *Lycopersion esculentum*. *Plant. Physiol.*, 76, 989-992
- SCHNITZLER, J.-P., JUNGBLUT, T.P., HELLER, W., KÖFFERLEIN, M., HUTZLER, P., HEINZMANN, U., SCHMELZER, E., ERNST, D., LANGEBAEELS, C., SANDERMANN, H. JR. (1996)
Tissue localization of u.v.-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New. Phytol.*, 132, in press
- SCHRÖDER, P., LAMOUREUX, G.L., RUSNESS, D.G., RENNENBERG, H. (1990)
Glutathione S-transferase activity in spruce needles. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37, 211-218
- SCHRÖDER, P., RENNENBERG, H. (1992)
Characterization of glutathione S-transferase from dwarf pine needles (*Pinus mugo* Turra). *Tree Physiol.*, 11, 151-160
- SCHRÖDER, P., PFLUGMACHER, S., RENNENBERG, H. (1992)
Biomarker für organische Schadstoffe in Fichten (*Picea abies* L.): Dynamik des Entgiftungsenzymes Glutathion S-Transferase. *Angew. Botanik*, 66, 174-179
- SCHRÖDER, P., BERKAU, C. (1993)
Characterization of cytosolic glutathione S-transferase in spruce needles. *Bot. Acta*, 106, 301-306
- SHEEHAN, D., CASEY, J.P. (1993)
Microbial glutathione S-transferases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B, 1, 1-6
- SHIBATA, K., BENSON, A.A., CALVIN, A.M. (1954)
The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms. *BBA*, 15, 461-470
- SHIMABUKURO, R.H., SWANSON, H.R., WALSH, W.C. (1970)
Glutathione conjugation. Atrazine detoxification mechanism in corn. *Plant. Physiol.*, 46, 103-107
- SHIMABUKURO, R.H. (1985)
Detoxification of herbicides. In: *Weed Physiology, 2, Herbicide Physiology*. (Hrsg. Duke, S.O.), CRC Press, Boca Raton, FL

- SHIMABUKURO, R.H., HOFFER, B.L. (1991)
Metabolism of diclofop-methyl in susceptible and resistant biotypes of *Lolium rigidum*.
Pestic. Biochem. Physiol., 39, 251-259
- SHISHIDO, T. (1981)
Glutathione S-transferase from *Escherichia coli*. Agric. Biol. Chem., 45, 2951-2952
- SILLER-CEPEDA, J.H., CHEN, T.H.H., FUCHIGAMI, L.H. (1991)
High performance liquid chromatography analysis of reduced and oxidized glutathione
in woody plant tissues. Plant Cell Physiol., 32, 1179-1185
- SIMS, P., GROVER, P.L., SWAISLAND, A., PAL, K., HEWER, A. (1974)
Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. Nature, 252, 326-328
- STEGEMANN, J.J. (1985)
Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the western north atlantic. Marine Biology, 89, 21-30
- STENERSEN, J., KOBRO, S., BJERKE, M., AREND, U. (1987)
Glutathione S-transferases in aquatic and terrestrial animals of nine phyla. Comp. Biochem. Physiol., 86c, 73-82
- STERLING, T.M., BALKE, N.E. (1988)
Differential bentazon metabolism and retention of bentazon metabolites by plant cell cultures. Pestic. Biochem. Physiol., 34, 39-48
- STORM, D.L., HASSID, W.Z. (1974)
Partial purification and properties of a β -D-glucosyltransferase occurring in germinating *Phaseolus aureus* seeds. Plant Physiol., 54, 840-845
- SUESS, M.J. (1976)
The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. The Science of the Total Environment, 6, 239-250
- SUZUKI, T., UCHIYAMA, M. (1975)
Pathway of nitro reduction of parathion by spinach homogenate. J. Agric. Food Chem., 23, 281-295
- SWEETER, P.B., SCHOW, G.S., HUTCHISON, J.M. (1982)
Metabolism of chlorsulfuron by plants: biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. Pestic Biochem. Physiol., 17, 18-23
- TANAKA, K., SANO, T., ISHIZUKA, K., KITTA, K., KAWAMURA, K. (1994)
Comparison of properties of leaf and root glutathione reductase from spinach. Physiol. Plantarum, 91, 353-358

THOMAS, F.B., FURLONG, N.B. (1976)

A simple radioassay of benzo(a)pyrene activation: Observations on the covalent interactions of benzo(a)pyrene with protein. *Anal. Biochem.*, 72, 546-551

TOUNG, Y.-P.S., HSIEH, T.-S., TU, C.-P.D. (1990)

Drosophila glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione S-transferase III. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 31-35

UOTILA, L., KOIVUSALO, M. (1983)

Formaldehyde dehydrogenase. In: Functions of glutathione: Biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects. (Eds. Larson, A., Orrenius, S., Homgren, A., Mannervik, B.), Raven Press, New York, 175-186

V. BREDERODE, J., KAMPS-HEINSBROEK, R., STEYNS, J. (1987)

Serological and genetical studies on the evolution of substrate specificity of flavone glucosyltransferase genes in *Silene*. *Experientia*, 43, 202-205

V.D.TRENCK, T. (1980)

Metabolismus von Benzo(a)pyren durch pflanzliche Zellsuspensionskulturen und Enzyme. Dissertation Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

V.D.TRECK, T., SANDERMANN, H. JR. (1980)

Oxygenation of benzo(a)pyrene by plant microsomal fractions. *FEBS Letters*, 119, 227-231

V.D.TRENCK, T., SANDERMANN, H. JR. (1981)

Incorporation of benzo(a)pyrene quinones into lignin. *FEBS Letters*, 125, 72-76

VAN DEN HOEK, C., JAHNS, H.M., MANN, D.G. (1993)

Algen. 3. neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

VILLENEUVE, J.P., HOLM, E., CATTINI, C. (1985)

Transfer of chlorinated hydrocarbons in the food chain lichen-reindeer-man. *Chemosphere*, 14, 1651-1658

VILTER, H., GLOMBITZ, K.-W. (1983)

Peroxidases from Phaeophyceae. I. Extraction and detection of the peroxidases. *Bot. Marina*, 26, 331-340

WALKER, C.H., RONIS, M.J.J. (1989)

The monooxygenases of birds, reptiles and amphibians. *Xenobiotica*, 19, 1111-1121

WEBERLING, F., SCHWANTES, H.O. (1987)

Pflanzensystematik. Einführung in die Systematische Botanik, Grundzüge des Pflanzensystems. 5. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

- WETZEL, A. (1993)
Isolierung und Charakterisierung einer pflanzlichen Glucosyltransferase für den DDT-Metaboliten 2,2-Bis-(4-chlorphenyl)essigsäure (DDA). Dissertation Ludwigs-Maximilians-Universität, München
- WETZEL, A., SANDERMANN, H. JR. (1994)
Plant biochemistry of xenobiotics: Isolation and characterization of a soybean O-glucosyltransferase of DDT metabolism. Arch. Biochem. Biophys., 314,
- WIENCKE C. (1990A)
Seasonality of red and green macroalgae from Antarctica - a long term study under fluctuating Antarctic daylengths. Pol. Biol., 10, 601-607
- WIENCKE, C. (1990B)
Seasonality of brown macrolagae from Antartica - a long term study under fluctuating Antarctic daylength. Pol. Biol., 10, 589-600
- WINKLER, R., SANDERMANN, H. JR. (1989)
Plant metabolism of chlorinated anilines: Isolation and identification of N-glucosyl and N-malonyl conjugates. Pesticide Biochem. Physiol., 33, 239-248
- WINKLER, R. (1991)
Metabolisierung von Chloranilinen in Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Soja (*Glycine max* (L.) Merril) und im Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Dissertation, Universität München.
- WOGGEN, W.D. (1988)
Modelle für Cytochrom P-450. Nachr. Chem. Tech. Lab., 36, 4-7
- WOOLARD, F.X., MOORE, R.E., ROLLER, R.P. (1976)
Halogenated acetamides, But-3-en-2-ols, and isopropanols from *Asparagopsis taxiformis* (DeLile) Trev., Tetrahydron, 32, 2843-2846
- WUOSMAA, A.M., HAGER, L.P. (1990)
Methyl Chlorid Transferase: A carbocation route for biosynthesis of halometabolites. Science, 249, 160-162
- YAHAMA, T., CARDINI, C.E. (1960)
The biosynthesis of plant glycosides. I. Monoglucosides. Arch. Biochem. Biophys., 86, 127-137

Zum Schluß all jenen ein herzliches Dankeschön, die bei der Entstehung dieser Dissertation mitgeholfen haben:

Herrn Prof. Dr. H. Sandermann danke ich sehr für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die wertvollen Diskussionen und Anregungen, und besonders dafür, daß ich dieses Thema frei gestalten konnte, seine Unterstützung, Hilfe und Führung aber immer spürbar war.

Den Drs. Werner Heller und Christian Langebartels und danke ich für zahlreiche Tips und Diskussionen. Besonders Herrn Dr. Werner Heller danke ich für seine Hilfe bei der Auswertung und Interpretation meiner Massenspektren.

Herrn Dr. Peter Schröder danke ich in seiner Funktion als Arbeitsgruppenleiter der Gruppe „Xenobiotika-Metabolismus in Pflanzen“.

Herrn Prof. Dr. Buchholz, Frau Dr. Buchholz und Herrn Tadday danke ich für die technische Hilfe, die Genehmigung, im Felswatt von Helgoland Algen zu sammeln, und für die geführten Diskussionen während meines Aufenthalts an der Biologischen Anstalt Helgoland.

Herrn Dr. Sahling danke ich für seine Hilfe bei der korrekten Bestimmung der im Felswatt von Helgoland gesammelten Makroalgen und für seine interessanten Erzählungen zur Geschichte dieser Nordseeinsel.

Herrn Dr. Wiencke danke ich sehr herzlich für die antarktischen und arktischen Makroalgen, die er mir zur Verfügung stellte. Dazu auch ein großes Dankeschön an Christina Langreder, die mich bei meinem Aufenthalt am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung (Bremerhaven) mit Rat und Tat unterstützte.

Herrn Dr. Weber vom AWI (Bremerhaven) danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am AWI sowie für die interessanten Diskussionen.

Herrn Mayer vom Botanischen Garten in München danke ich für die Genehmigung, für meine Arbeit interessante Pflanzen aus den verschiedenen Gewächshäusern zu „entwenden“.

Herrn Dr. Brüggemann (Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin) danke ich sehr für die Einführung in die Hasse-Diagrammtechnik, für seine Unterstützung bei der Bewertung dieser Diagramme, sowie für das zur Verfügung gestellte Hasse-Programm.

Allen Laborkolleginnen und -kollegen, die die Arbeit im Institut angenehm machten, danke ich für ihre gute Zusammenarbeit. Besonders erwähnt seien hier Frau Dr. Martina Giese, Olaf Bohnenkämper, Claudia Götzberger und Dr. Enamul Hoque, denen es immer gelang, eine äußerst angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Meinen Eltern danke ich für die vielfältige Unterstützung, die es mir erst ermöglichte, Wissenschaftler zu werden.

Claudia Bieber danke ich ganz herzlich für ihre Freundschaft, ihre liebe und tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit sowie den unzähligen Aufmunterungen in besonders „streßreichen“ Zeiten.

Ganz besonderen Dank für Ihre Hilfe, Ihr Verständnis und vorallem für Ihre Liebe schulde ich aber meiner Frau Doris.

