

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Ökologischen Landbau und Pflanzenbausysteme

Evaluierung der pflanzlichen Entgiftungskapazität für
Humanarzneimittel in der Phytoremediation am Beispiel der
Wirkstoffe Paracetamol und Diclofenac

Christian Huber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. A. Melzer
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. P. Schröder
	2. Univ.-Prof. Dr. W. Huber (i. R.)
	3. Univ. Prof. Dr. J. Geist

Die Dissertation wurde am 02.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.11.2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Zusammenfassung	VIII
Abstract	X
1 Einleitung	8
1.1 Arzneimittel in der Umwelt	8
1.1.1 Eintrag und Verbleib	8
1.1.2 Umweltrelevante Arzneimittel	13
1.2 Für die Studie ausgewählte Wirkstoffe	14
1.2.1 Paracetamol	14
1.2.2 Diclofenac	15
1.3 3-Phasen-Modell der Entgiftung von Xenobiotika in Pflanzen	17
1.3.1 Phase 1	17
1.3.2 Phase 2	17
1.3.3 Phase 3	19
1.4 HPLC-MS	20
1.5 Phytoremediation	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> L., Kultivar Barke)	26
2.1.2 Meerrettich-Wurzelkultur (<i>Armoracia rusticana</i>)	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 Axenische Anzucht der Pflanzen (<i>H. vulgare</i>)	28
2.2.2 Anzucht von Gerstenpflanzen unter Gewächshausbedingungen	29
2.2.3 Belastung der Pflanzen mit Arzneimitteln	30

2.2.4	Pigmentanalyse	31
2.2.5	Extraktion cytosolischer Enzyme	32
2.2.6	Extraktion mikrosomaler Enzyme	33
2.2.7	Bestimmung der Glycosyltransferase-Aktivität	34
2.2.8	Bestimmung der mikrosomalen P450-Aktivität (EC 1.14.-.-)	34
2.2.9	Photometrische Bestimmung von Enzymaktivitäten	36
2.2.10	Quantifizierung der Proteingehalte	39
2.2.11	Bestimmung der Thiolgehalte	39
2.2.12	Bestimmung der Paracetamol-Konzentration (HPLC)	41
2.2.13	Extraktion von Paracetamol und Paracetamol- Konjugaten aus Pflanzen	43
2.2.14	Extraktion von Diclofenac und Diclofenac- Konjugaten aus Pflanzen	43
2.2.15	Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE)	44
2.2.16	LC-MS-Analyse	44
2.2.17	Enzymatische Hydrolyse der gebildeten Glucopyranoside	46
2.2.18	Aufnahmekinetik mit radioaktiv ¹⁴ C-markiertem Diclofenac	47
2.2.19	Inkubationen von Diclofenac und Peroxidase	48
2.2.20	Charakterisierung des Umsatzes von Diclofenac durch Meerrettich- Peroxidase mit sequentieller stopped-flow-Spektrometrie	48
3	Ergebnisse	51
3.1	Paracetamol	51
3.1.1	Aufnahme von Paracetamol in Wurzelzellen von <i>A. rusticana</i>	51
3.1.2	LC-MS-Analyse von Paracetamol und Paracetamol-Metaboliten	52
3.1.3	Metabolismus von Paracetamol in Wurzelzellen von <i>A. rusticana</i>	59
3.2	Diclofenac	61
3.2.1	Aufnahmekinetik mit radioaktiv ¹⁴ C-markiertem Diclofenac	61
3.2.2	LC-MS-Analyse von Diclofenac und Diclofenac-Metaboliten	65
3.2.3	Metabolismus von Diclofenac in Wurzelzellen von <i>A. rusticana</i>	69
3.2.4	Metabolismus von Diclofenac in <i>H. vulgare</i>	71
3.2.5	Einfluss von Diclofenac auf Pigmentgehalte in <i>H. vulgare</i>	74
3.2.6	Einfluss von Diclofenac auf den Glutathiongehalt in <i>H. vulgare</i>	76
3.2.7	Einfluss von Diclofenac auf die GST-Aktivität in <i>H. vulgare</i>	78

3.2.8	Einfluss von Diclofenac auf Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels in <i>H. vulgare</i>	82
3.2.9	Einfluss von Diclofenac auf die Glycosyltransferase-Aktivität in <i>A.</i> <i>rusticana</i>	87
3.2.10	P450-Aktivität	90
3.2.11	Enzymatischer Umsatz von Diclofenac durch Peroxidasen	92
3.2.12	Stopped-flow-Spektrometrie mit HRP und Diclofenac	95
3.2.13	Massenspektrometrische Charakterisierung	98
3.2.14	Zusammenfassung der postulierten Metaboliten	100
4	Diskussion	101
4.1	Paracetamol	102
4.2	Diclofenac	106
4.2.1	Wirkstoffaufnahme	106
4.2.2	Antioxidativer Stoffwechsel und Glutathion-Gehalte	108
4.2.3	Glutathion S-Transferasen	111
4.2.4	Glycosyltransferasen	112
4.2.5	Metabolismus von Diclofenac	113
4.3	Schlussfolgerungen	117
	Literatur	118
	Danksagung	134
	Eidesstattliche Erklärung	136

Abbildungsverzeichnis

1.1	Bedeutende Eintragspfade für Arzneimittel in die aquatische Umwelt. . . .	12
1.2	Strukturformel Paracetamol (a) und N-Acetyl-p-benzochinonimin (b). . . .	15
1.3	Strukturformel Diclofenac (a) 4'OH-Diclofenac (b).	16
1.4	Schematische Darstellung zur Bildung des Electro-Sprays in der Ionisationskammer (nach NIESSEN 2006).	21
2.1	Anzucht der Gerste im axenischen System.	28
2.2	Schematische Skizze der Pflanzgefäße.	29
2.3	Kultur von Gerste und Meerrettich Wurzelzellen	30
2.4	Formel zur Berechnung der Konzentration der Pigmente	31
2.5	Formel zur Berechnung der erforderlichen Menge an Ammoniumsulfat bei der Enzymextraktion (JAENICKE, 1984).	33
2.6	Sauerstoffverbrauchende Reaktionen unter Beteiligung von P450- Monooxygenasen	35
2.7	Formeln zur Berechnung des Sauerstoffverbrauchs (BD TM -Oxygen-Biosensor).	35
2.8	Schematische Darstellung des BD TM -Oxygen-Biosensor-Systems.	36
2.9	Reaktionsschema der von der Peroxidase katalysierten Reaktion von H ₂ O ₂ mit Guajacol.	38
2.10	Reaktionsschema von Monobrombiman mit Thiolgruppen (nach NEWTON <i>et al.</i> 1981).	39
2.11	Verwendeter Laufmittelgradient zur Bestimmung von GSH nach Derivatisierung mit Monobrombiman.	40
2.12	Eichgerade zur Quantifizierung von Glutathion.	41
2.13	Eichgerade zur Quantifizierung von Paracetamol (HPLC).	42
2.14	Kalibriergerade für Paracetamol (M+H) ⁺ m/z 152 (MS/MS).	46
3.1	Menge an freiem Paracetamol in Wurzelzellen von <i>A. rusticana</i> und im Nährmedium	52
3.2	MS/MS-Spektrum von (M+H) ⁺ m/z 152 (Paracetamol).	53
3.3	MS/MS-Spektrum von (M+H) ⁺ m/z 457 (Paracetamol-Glutathion)	54

3.4	MS/MS-Spektrum von (M+H) ⁺ m/z 271 (Paracetamol-Cystein)	55
3.5	LC-MS-Chromatogramm eines <i>A. rusticana</i> -Zellextrakts nach der Behandlung mit 1 mM Paracetamol	56
3.6	MS/MS-Spektren des Paracetamol-Glucoopyranosids	57
3.7	LC-MS-Chromatogramm von (M+H) ⁺ m/z 314	58
3.8	Relative Mengen von Paracetamol und Metaboliten in <i>A.rusticana</i> Zellen .	60
3.9	Menge des in die Wurzeln aufgenommenen Diclofenacs (10 µM)	61
3.10	Menge des in den Spross aufgenommenen Diclofenacs (10 µM)	62
3.11	Menge des in die Wurzeln aufgenommenen Diclofenacs (100 µM)	63
3.12	Menge des in den Spross aufgenommenen Diclofenacs (100 µM)	64
3.13	MS/MS-Spektrum von (M+H) ⁺ m/z 296 (Diclofenac).	66
3.14	MS/MS-Spektrum von (M+H) ⁺ m/z 312 (4'-OH-Diclofenac).	67
3.15	MS/MS-Spektrum von (M+H) ⁺ m/z 474 (Diclofenac-Glucoopyranosid). . .	68
3.16	LC-MS-Chromatogramm von (M+H) ⁺ m/z 474	69
3.17	Relative Mengen von Diclofenac und Metaboliten in Wurzelzellen von <i>A. rusticana</i>	70
3.18	Relative Menge von Diclofenac und Metaboliten in <i>H. vulgare</i>	72
3.19	Einfluss von Diclofenac auf Pigmentgehalte in <i>H. vulgare</i>	74
3.20	Menge an Glutathion in Wurzeln und Blättern von <i>H. vulgare</i>	77
3.21	Spezifische GST-Aktivität in Wurzeln von <i>H. vulgare</i>	78
3.22	Spezifische GST-Aktivität in Blättern von <i>H.vulgare</i>	81
3.23	Spezifische Enzymaktivitäten (Stressenzyme) in Wurzeln von <i>H. vulgare</i> . .	82
3.24	Spezifische Enzymaktivitäten (Stressenzyme) in Blättern von <i>H. vulgare</i> . .	85
3.25	Spezifische Glycosyltransferase-Aktivitäten in Wurzelzellen von <i>A. rusticana</i>	87
3.26	LC-MS-Chromatogramm eines Tests auf Glycosyltransferase-Aktivität . . .	89
3.27	Spezifische P450-Aktivität in <i>A. rusticana</i> - Wurzelzellen	90
3.28	LC-MS-Chromatogramm: Inkubation von CYP2C9 mit Diclofenac.	91
3.29	Optisches Spektrum des gebildeten Reaktionsprodukts.	92
3.30	Enzymatische Charakterisierung des Reaktionsprodukts	93
3.31	Enzymatischer Umsatz in Abhängigkeit vom pH-Wert	94
3.32	Reduktion von 1 µM HRP-CI durch 50 Moläquivalente Diclofenac	95
3.33	Stopped-Flow-Analyse des Umsatzes von Diclofenac durch HRP	97
3.34	Kinetische Daten der Reduktion von aktiviertem CI mit Diclofenac	98
3.35	LC-MS-Chromatogramm von (M+H) ⁺ m/z 310	99
3.36	MS/MS-Spektrum (M+H) ⁺ m/z 310	100
3.37	Postulierte Diclofenacmetaboliten in Pflanzen.	100

4.1	Postulierter Metabolismus von Paracetamol in verschiedenen Organismen (HUBER <i>et al.</i> , 2009).	104
4.2	Ascorbat-Glutathion-Zyklus (nach FOYER <i>et al.</i> 1994).	109
4.3	Postulierter Metabolismus von Diclofenac in verschiedenen Organismen . .	115

Tabellenverzeichnis

1.1	Jährlicher Verbrauch in Deutschland (Tonnen pro Jahr) verschiedener Wirkstoffe aus der Gruppe der Schmerzmittel und Entzündungshemmer (FENT <i>et al.</i> , 2006).	10
1.2	Liste umweltrelevanter Arzneimittel	14
1.3	3-Phasen-Modell der Entgiftung von Xenobiotika in Pflanzen nach SHIMABUKURO (1976).	20
1.4	[M+H] ⁺ und [M+H] ⁻ Ionen der wichtigsten Konjugate mit ihren charakteristischen Massenübergängen (nach LEVSEN <i>et al.</i> 2005).	23
2.1	Zusammensetzung des Mediums nach MURASHIGE und SKOOG (1962).	27
2.2	Verwendete Substrate für die Messungen von Glutathion S-Transferasen mit den dazugehörigen Messparametern.	37
2.3	Verwendeter Laufmittelgradient zur Bestimmung der Paracetamol-Konzentration (HPLC).	42
2.4	Verwendeter Laufmittelgradient bei der LC-MS-Analyse von Paracetamol und Diclofenac.	45
3.1	Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b sowie Gesamtchlorophyll zu Carotinoiden in Blättern von <i>H. vulgare</i> nach Diclofenacbehandlung.	75
3.2	Gesamt-Glutathiongehalte und Verhältnis von reduziertem zu oxidierten Glutathion in <i>H. vulgare</i> nach Behandlung mit 10 und 100 µM Diclofenac.	76
3.3	Ratenkonstanten 2. Ordnung (k) für die Reduktion von HRP-CI durch Diclofenac im Vergleich mit anderen Substraten.	96

Zusammenfassung

Pharmazeutische Substanzen aus der Human- und Veterinärmedizin bilden zusammen mit den sogenannten *Personal Care Products* eine neue Klasse von ökotoxikologisch relevanten Problemstoffen. In Kläranlagen kommt es oftmals nur zu einer unzureichenden Eliminierung dieser Stoffe und so werden in den Effluenten regelmäßig Wirkstoffkonzentrationen im µg pro Liter-Bereich nachgewiesen. Die Belastung des Abwassers und der Oberflächengewässer mit diesen Substanzen stellt ein schwer abzuschätzendes Risiko für die aquatische Umwelt dar, denn aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften und biologischen Aktivität ist eine Wirkung auf die Biota nicht auszuschließen. Die biologische Abwasserreinigung in Pflanzenkläranlagen kann dabei eine effektive und kostengünstige Alternative zu konventionellen Verfahren darstellen.

In der vorliegenden Pilotstudie wurden Aufnahme, Metabolismus und Auswirkungen auf den Stressstoffwechsel in Pflanzen für die beiden Analgetika Paracetamol und Diclofenac untersucht. Die Experimente dazu wurden zum einen in Gerste (*Hordeum vulgare*) und zum anderen in der axenischen Wurzel-Zellkultur des Meerrettichs (*Armoracia rusticana*) durchgeführt.

Für beide Wirkstoffe wurde die Aufnahme und der Metabolismus in Pflanzen gezeigt. Mittels HPLC-MS-Analyse konnte in einem Kurzzeit-Experiment die Aufnahme von Paracetamol aus dem Nährmedium in die Wurzelzellen des Meerrettichs nachgewiesen werden. In den Zellen kommt es unmittelbar zu einer Metabolisierung des Wirkstoffs, die zur Bildung eines Glutathion- und eines Glucose-Konjugats des Paracetamols führt. Das Auftreten eines Cystein-Konjugats ist auf enzymatisch katalysierte Abbaureaktionen am Glutathionrest zurückzuführen. Von den detektierten Paracetamol-Metaboliten stellt das Glucose-Konjugat mit 64 % das am häufigsten gebildete Stoffwechselprodukt dar, was der Menge des im Säuger gebildeten Paracetamol-Glucuronids (40-67 %) proportional ist. In den Meerrettich-Zellen lagen 17 % als Glutathionyl- und 1 % als Cysteinyl-Konjugat des Paracetamols vor.

In Expositionsexperimenten mit Gerste wurde Diclofenac in Wurzeln und Blättern der Pflanze detektiert. Eine lineare Aufnahme des Wirkstoffs in die Pflanzen konnte mit ¹⁴C-markiertem Diclofenac nachgewiesen werden. Die höchsten Gehalte wurden dabei

in den Wurzeln festgestellt, nur ein geringer Anteil wurde in zwei Tagen in die Blätter transportiert.

Die Identifizierung von gebildeten Metaboliten erfolgte massenspektrometrisch. Dabei konnte die durch P450-Monooxygenasen katalysierte Oxidation von Diclofenac zu 4'OH-Diclofenac, dem Primärmetaboliten im Säugetier gezeigt werden. Eine anschließende Konjugationsreaktion bindet eine Molekül Glucose an die Hydroxylgruppe in 4'-Position. 4'OH-Diclofenac und das Diclofenac-Glucopyranosid wurden sowohl *in vivo* in Gerste und Meerrettich als auch *in vitro* eindeutig nachgewiesen.

Durch Diclofenac ausgelöster pflanzlicher Stress wurde durch die Bestimmung des Gehalts an Glutathion und der photosynthetisch aktiven Pigmente, der Messung von Enzymaktivitäten der Glutathion S-Transferasen sowie Enzymen des oxidativen Stoffwechsels quantifiziert. Die Ergebnisse deuten dabei auf eine von der Diclofenac-Konzentration abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter Beteiligung des Ascorbat-Glutathion-Zyklus hin.

Zum ersten mal konnte ein Umsatz von Diclofenac durch pflanzliche Peroxidasen qualitativ und quantitativ mittels stopped-flow-Spektrometrie nachgewiesen werden. Die massenspektrometrische Untersuchungen des Produkts sprechen für die Bildung des reaktiven und im Säuger hepatotoxisch wirkenden Diclofenac-2,5-Iminochinons.

Erneut konnte in dieser Arbeit das Konzept der grünen Leber bzw. das 3-Phasen Modell der Entgiftung von Xenobiotika in Pflanzen bestätigt werden. Der Metabolismus von Humanpharmaka in Pflanzen offenbart dabei erstaunliche Analogien zum Stoffwechsel im Säugetier.

In Hinblick auf die Phytoremediation kann anhand der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen werden, dass Pflanzen einen Beitrag zur Aufnahme und Degradation von im Abwasser vorhandenen pharmazeutischen Substanzen leisten können. Oxidativer Stress wurde primär bei sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen beobachten, die weit über den tatsächlich im Abwasser vorliegenden Mengen liegen. Die Tatsache, dass für beide Substanzen unterschiedliche Stoffwechselwege in Pflanzen vorhanden sind, deutet klar darauf hin, dass Pflanzen dazu in der Lage sind, Paracetamol und Diclofenac zu tolerieren und zu metabolisieren.

Abstract

Personal care products and pharmaceuticals from human or veterinary medication form a new class of micropollutants - PPCPs. In traditional waste water treatment facilities, elimination of quite a high number of PPCPs is considered to be rather low. Regular determination of effluent-concentrations of pharmaceutical substances revealed amounts for single compounds up to the range of $\mu\text{g/l}$. Contamination of our surface water bodies with these pollutants poses a threat to the aquatic environment. Due to the chemical properties and their bioactivity, an effect on the biota cannot be obviated. Biological waste water treatment with plants in constructed wetlands might act as an effective and rather low-cost alternative to conventional procedures.

In this present pilot study, uptake, metabolism and the effects on plant-stress defense mechanisms of the two analgetics Paracetamol and Diclofenac were evaluated. Experiments were carried with barley (*Hordeum vulgare*) and an axenic horseradish (*Armoracia rusticana*) root cell culture.

For both compounds, uptake and metabolism could be confirmed. With high performance liquid chromatography-mass spectrometry an uptake and translocation of paracetamol from the growth medium into horseradish root cells was observed within a short-time experiment. Metabolism inside the cells starts immediately resulting in the formation of a glutathione- and a glucose conjugate of paracetamol. A cystein-conjugate was detected due to degradation processes at the glutathione residue. Of all paracetamol related metabolites, the glucopyranoside was the most frequent. A fact which correlates to animal metabolism where the paracetamol glucuronide displays the majority of conjugated metabolites with 40-67 %. In root cells of *A. rusticana* 17 % of the paracetamol was conjugated with glutathione and 1 % was detected as a cysteinyl conjugate.

In exposition experiments, Diclofenac was detected in roots and leaves of barley. A linear uptake of the compounds was proven using ^{14}C radiolabeled Diclofenac. Highest contents were observed in the roots and only limited transport was shown into the leaves after two days of exposure. Identification of metabolites formed was carried out with an iontrap massspectrometer. The formation of 4'-OH-Diclofenac due to a P450 monooxygenase catalyzed reaction was observed as well as a conjugation of 4'-OH-Diclofenac with glucose resulting in a Diclofenac-glucopyranoside. The hydroxylated Diclofenac at 4'-position

represents the primary metabolite in human whereas the glucopyranoside was shown for the very first time. Both metabolites were either extracted from plant material or formed within *in vitro* enzyme assays. Plant stress was evaluated by checking the pigment and thiol contents as well as the determination of enzyme activities like Glutathione S-Transferases and other enzymes involved in plant defense towards reactive oxygen species (ROS). The results clearly indicate a dose dependent formation of ROS and their detoxification in the ascorbat-glutathione cycle. Using stopped-flow-spectrometry the conversion of diclofenac by plant peroxidases was qualitatively and quantitatively proven for the first time. HPLC-MS analysis of the product indicates the formation of the highly reactive and hepatotoxic intermediate Diclofenac-2,5-Iminochinone.

Once again the green liver concept with the 3-phase-model for the detoxification of xenobiotics could be confirmed in plants. Plant metabolism towards paracetamol and diclofenac revealed strong similarities to animal metabolism.

In regards of phytoremediation, it can be concluded that plants might effectively contribute to the removal and degradation of pharmaceutical compounds during waste water treatment. Oxidative stress was observed under lab-conditions using concentrations that were higher than real-life concentrations. Lower concentrations lead to an effective plant stress response. The fact that there are different detoxification pathways present indicates the ability of plants to cope with paracetamol and diclofenac and to metabolize them.

1 Einleitung

1.1 Arzneimittel in der Umwelt

1.1.1 Eintrag und Verbleib

Als Xenobiotika bezeichnet man Chemikalien anthropogenen Ursprungs, Fremdstoffe, die natürlicherweise nicht in der Umwelt vorkommen. Viele dieser Substanzen stellen für Organismen sowohl in der terrestrischen, als auch in der aquatischen Umwelt Problemstoffe mit teilweiser toxischer Wirkung dar. Lag das Hauptaugenmerk der Ökotoxikologie in der Vergangenheit auf klassischen Problemstoffen mit akut toxischer Wirkung wie beispielsweise Pestiziden, so ist in der jüngeren Vergangenheit eine völlig neue Stoffklasse in den Blickpunkt der Wissenschaft und auch der Öffentlichkeit gerückt, deren Risikopotential erst bei genauerer Betrachtung deutlich wird – Arzneimittel und Medikamente.

Zwar erkannte man bereits Mitte des letzten Jahrhunderts, dass verschiedenste Medikamente aufgrund ihrer Persistenz in Oberflächengewässer gelangen können, doch beschränkten sich die Untersuchungen zunächst auf Veterinärarzneimittel (DEMOLL, 1954). Dies beruht wohl auf der Tatsache, dass Humanarzneimittel zunächst nicht als potentielle Umweltschadstoffe wahrgenommen wurden. Über deren Verbleib nach der Einnahme und dem Ausscheiden durch den Patienten wurde nur wenig spekuliert. Anstrengungen, dem Verbleib von Humanarzneimitteln in der Umwelt nachzugehen, stießen zudem in den frühen 90er Jahren noch auf massive Limitierungen in der instrumentellen Analytik. Ein selbst heutzutage noch relevantes Problem ist nämlich das Fehlen vieler Pharmazeutika und Personal Care Products (PPCPS) und deren Metaboliten in klassischen massenspektrometrischen Datenbanken. Analytische Standards, vor allem von Metaboliten, sind selten verfügbar und meist kostspielig. In den letzten Jahren wurden die Anstrengungen zur Beantwortung der Fragestellungen zum Verbleib und vor allem auch zu den Wirkungen, die Arzneimittel in der Umwelt haben können, massiv erhöht. Eine Vielzahl an Publikationen zu diesem Thema (HALLING-SØRENSEN *et al.*, 1998; DAUGHTON und TERNES, 1999; CLEUVERS, 2003; POMATI *et al.*, 2008; RADJENOVIC *et al.*, 2009) kommt zu der Schlussfolgerung, dass Humanpharmazeutika und deren Abbauprodukte ein hohes Potential besitzen, in die Umwelt zu gelangen und dort Effekte auf die Bioota hervorzurufen. Offen bleibt, inwieweit die in der Tat niedrigen detektierten Konzentrationen

($\mu\text{g-ng/L}$) einen physiologischen Effekt auf die Biota haben können und wie groß die Menge an Wirkstoffen, die in die Umwelt gelangen, tatsächlich ist. Denn anders als der Eintrag von Pestiziden und anderen Agrochemikalien ist der Verbleib der einzelnen Arzneimittel nur sehr unzureichend und lediglich anhand der Produktionszahlen abzuschätzen.

Pharmazeutika werden vor dem Hintergrund entwickelt, biologisch wirksam zu sein. Hinzukommen meist lipophile Eigenschaften, die es ermöglichen, biologische Membranen zu passieren, sowie ein gewisses Maß an Persistenz, um ihre eigentliche Wirkung im Körper zu entfalten. Beides spricht sowohl für ein Potential zur Bioakkumulation als auch dafür, dass Effekte in den aquatischen und terrestrischen Biota hervorgerufen werden können. Pharmazeutika gelangen weltweit überall dort in die Umwelt, wo der Mensch sich aufhält. Darin unterscheiden sie sich abermals von anderen Stoffklassen wie beispielsweise Pestiziden, deren Einsatz sich in der Regel auf landwirtschaftlich genutzte Areale beschränkt, oder persistente Umweltchemikalien, die an Punktquellen wie Industrieanlagen in die Umwelt gelangen.

Entscheidende Fortschritte und Entwicklungen in der instrumentellen Analytik, wie moderne HPLC-MS (*high performance liquid chromatography mass spectrometry*) ermöglichen es heutzutage, den Verbleib und die potentiellen Risiken von pharmazeutischen Wirkstoffen in der Umwelt genauer und intensiver zu untersuchen. Mit entsprechenden Methoden ist es möglich, noch geringste Mengen an polaren Substanzen aus unterschiedlichen Matrices qualitativ und quantitativ, ohne Derivatisierung zu analysieren (KOLPIN *et al.*, 2002; KÜMMERER, 2004). In den letzten Jahren wurden daher in vielen Ländern und Forschungsgruppen Studien über die Art der in den Gewässern vorhandene Wirkstoffe und deren Mengen durchgeführt. Über die daraus entstehenden Risiken und Effekte auf aquatisch oder terrestrisch lebende Organismen sind zum jetzigen Zeitpunkt jedoch erst wenige Daten und Informationen verfügbar.

Pharmazeutika werden kontinuierlich in großen Mengen konsumiert und in die Umwelt eingebracht. Allein in der Europäischen Union sind ca. 300 verschiedene Präparate in Human- und Veterinärmedizin in Gebrauch. In Deutschland und seinen Nachbarländern beläuft sich der jährliche Verbrauch der am häufigsten verschriebenen Medikamente auf mehrere hundert Tonnen pro Jahr. Tabelle 1.1 fasst die konsumierten Mengen von Schmerzmitteln und Entzündungshemmern in Deutschland, basierend auf den Zahlen der rezeptpflichtigen und rezeptfrei abgegebenen Präparate zusammen.

Der Eintrag pharmazeutischer Substanzen in die Umwelt geschieht zu einem gewissen Anteil während des Produktionsprozesses, zu einem sehr viel größeren Teil jedoch durch die Nutzung dieser Substanzen in der Human- und Veterinärmedizin. Große Mengen an

Tabelle 1.1: *Jährlicher Verbrauch in Deutschland (Tonnen pro Jahr) verschiedener Wirkstoffe aus der Gruppe der Schmerzmittel und Entzündungshemmer (FENT et al., 2006).*

Wirkstoff	1999	2000	2001
Acetylsalicylsäure	902,3	862,6	836,3
Salicylsäure	89,7	77,0	71,7
Paracetamol	654,4	641,9	621,7
Ibuprofen	259,9	300,1	344,9
Diclofenac	81,8	82,2	85,8

Pharmazeutika werden entweder chemisch unverändert oder in Form von Metaboliten aus dem Körper ausgeschieden und gelangen so in das Abwassersystem.

Für die Metabolisierung im Säugerorganismus sind mehrere enzymatisch katalysierte Reaktionen von Bedeutung (HAYES und PULFORD, 1995). Hervorzuheben ist hierbei das System der P450-Monooxygenasen (E.C 1.14.-.-) in den Mikrosomen. Bei den von dieser Enzymklasse katalysierten Modifikationen am eigentlichen Wirkstoffmolekül handelt es sich um Oxidationsreaktionen, welche die Polarität und dadurch die Wasserlöslichkeit des Moleküls erhöhen, wodurch eine Ausscheidung über den Urin ermöglicht wird. Im Anschluss an diese sogenannte Phase 1 oder Aktivierungsreaktion erfolgt in vielen Fällen eine Konjugationsreaktion mit kleineren Biomolekülen wie Glucuronsäure, Zuckern oder Peptiden (Phase 2-Reaktion). Diese Konjugationsreaktionen auf der einen, aber ebenfalls permanent ablaufende Degradations- und Transformationsprozesse auf der anderen Seite, führen zu einer äußerst komplexen Mischung an potentiell bioaktiven Substanzen. Die Umwandlungen des Moleküls können dabei sowohl biotisch als auch abiotisch (physikochemisch, photochemisch) erfolgen.

Äußerlich angewendete und beispielsweise in Crèmes und Salben eingesetzte Wirkstoffe werden in nicht unerheblichen Maß wieder vom Körper abgewaschen. Leider immer noch weit verbreitet ist die unsachgemäße Entsorgung nicht mehr benötigter Medikamente über den Hausmüll bzw. in vielen Fällen auch über das Abwasser.

Kommunales Abwasser setzt sich aus Misch- und Schmutzwasser aus häuslichen, industriellen, gewerblichen und sonstigen Einleitungen sowie Regenwasser zusammen, wobei die Einleitungen aus Haushalten und kleinen Gewerben mit ca. 50 Prozent den größten Teil ausmachen. Das Vorkommen von Arzneimitteln in Grund- und Oberflächengewässern ist eindeutig mit deren Abwasserbeeinflussung korreliert (SACHER *et al.*, 2002; FRIMMEL und ZWIENER, 2004). Substanzen, die in Zu- und Abläufen von Kläranlagen detektierbar sind, lassen sich in der Regel auch in geringer Konzentration in Grund- und Oberflächengewässern nachweisen.

Abwässer von Krankenhäusern, Altenheimen und anderen medizinischen Einrichtungen nehmen im Zusammenhang mit Arzneimittelbelastungen eine gesonderte Position ein. In Europa besteht keine Vorschrift zur speziellen Vorbehandlung der dort anfallenden Abwässer. Zu den hauptsächlich in Krankenhäusern verwendeten Medikamenten gehören vor allem Zytostatika und verschiedene Antibiotika. Problematisch in diesem Zusammenhang kann das Auftreten von antibiotikaresistenten Keimen sein, da in Krankenhäusern vermehrt neue Präparate eingesetzt werden. Gelangen diese zusammen mit Bakterien, die sich in der Initialphase einer Resistenzbildung befinden, ins Abwasser, so ist die Gefahr einer Verringerung der Wirksamkeitsdauer für das jeweilige Antibiotikum gegeben (EICHLER, 2006).

In vielen Kläranlagen kommt es während der biologischen Reinigung für einzelne Substanzen nur zu einer partiellen Eliminierung oder Degradation, so dass der Effluent regelmäßig noch Arzneimittelkonzentrationen von bis zu 10 µg/L enthält.

Allerdings kann Klärschlamm in beträchtlichem Maße Arzneimittel und deren Abbauprodukte enthalten. Im Jahr 2002 fielen allein in Deutschland ca. 3 Mio. Tonnen Klärschlamm an, wovon ca. 44 % in der Landwirtschaft als Dünger und 11 % im Landschaftsbau zur Rekultivierung und Deponiebegrünung ausgebracht wurden (RÖNNEFAHRT *et al.*, 2002). Durch diese Praxis besteht sowohl die Gefahr einer primären Kontamination der terrestrischen Umwelt als auch einer sekundären Kontamination der aquatischen Lebensräumen (Grundwasserinfiltration) durch Arzneimittelrückstände. Bestrebungen liegen vor, das Ausbringen von Klärschlamm in der Landwirtschaft mittelfristig, wie bereits in der Schweiz am 01.05.2003 geschehen, gesetzlich zu verbieten.

Zudem erreicht nicht das gesamte Abwasser tatsächlich die Kläranlage. Untersuchungen ergeben, dass in Deutschland 15-25 % (mehrere 100 Millionen Liter) des städtischen Abwassers über Leckagen im kommunalen Kanalnetz in den Untergrund versickern (ATV, 1998; EISENWIRTH, 2000). Über Sickerwasser von nicht ausreichend gesicherten Deponien besteht eine zusätzliche Gefahr des potentiellen, unkontrollierten Eintrags von Arzneistoffen in die Umwelt (SCHULTE-OEHLMANN *et al.*, 2007). SCHNEIDER *et al.* (2001) zeigte in ihrer Studie zu Arzneimittelrückständen in Sickerwässern von Mülldeponien Konzentrationen für einzelne Wirkstoffe im Bereich von 1-20 µg/L.

Auch die Landwirtschaft ist eine Quelle für Arzneimittel. Extensive Tierhaltung in großen Betrieben erhöht das Risiko von Erkrankungen. Eine Folge davon ist ein erheblicher Einsatz von Arzneimitteln und dabei insbesondere der Einsatz von Antibiotika. Über Gülle (Gemisch aus tierischen Ausscheidungen, Einstreu, Futtermittelresten und Wasser) und Jauche (Flüssigfraktion der Gülle mit höherem Anteil an tierischem Harn) gelangen Pharmazeutika und deren Abbauprodukte auf die Böden landwirtschaftlich genutzter Flächen,

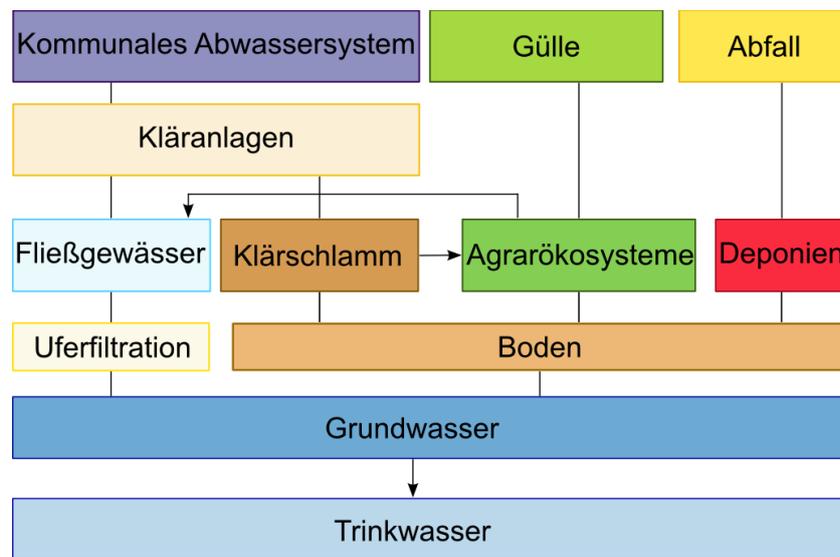


Abbildung 1.1: Bedeutende Eintragspfade für Arzneimittel in die aquatische Umwelt.

wo sie sich je nach Abbauverhalten und Persistenz anreichern oder durch Versickerungs- und Auswaschungsprozesse in das Grundwasser und Oberflächengewässer gelangen können (BURKHARDT *et al.*, 2005).

Eine zusammenfassende Übersicht über potentielle Eintragspfade von Arzneistoffen ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

Aufgrund ihrer geringen Volatilität findet die Verbreitung von Arzneimitteln in der Umwelt primär im aquatischen Milieu oder über die Anreicherung in der Nahrungskette statt. In der Kläranlage sind bei der Elimination von Arzneimittelrückständen vor allem zwei Prozesse von entscheidender Bedeutung: Adsorption an im Abwasser vorhandene Schwebeteilchen und der biologische Abbau. Die Adsorption einer Chemikalie hängt dabei von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen des Stoffs mit den Partikeln und Mikroorganismen ab. Viele der zur Gruppe der nicht-steroidalen Entzündungshemmer (NSAIDs) gehörenden Wirkstoffe reagieren in wässriger Lösung sauer und besitzen einen pK_S -Wert zwischen 4,9 und 3,6. Bei neutralen pH-Werten liegen diese dann negativ geladenen Stoffe als gelöste Ionen in der wässrigen Phase vor, und haben dann nur eine sehr geringen Tendenz zur Adsorption. Generell ist die Adsorption an Teilchen für saure Pharmazeutika während der Abwasserreinigung in Kläranlagen als vergleichsweise gering einzustufen. Die im Klärschlamm und Sedimenten gefundenen Konzentrationen dieser Stoffe sind im Vergleich zu basischen oder als Zwitterionen vorliegenden Substanzen, die

stark an Schlamnteilchen absorbieren können, als niedrig zu erachten (URASE und KIKUTA, 2005).

Für gelöste Stoffe ist Biodegradation in Kläranlagen der wichtigste Prozess der Elimination. Biodegradation von organischen Molekülen findet entweder aerob im Belebtschlamm oder unter anaeroben Bedingungen im Klärschlamm statt. Im allgemeinen funktioniert der Abbau von Xenobiotika besser, je länger die Verweildauer des Abwassers in der Anlage und je höher das Alter des Schlammes bei der Belebtschlammbehandlung ist. Für Diclofenac konnte beispielsweise ein signifikanter Abbau beobachtet werden, sofern die Verweildauer des Stoffes im Belebtschlamm mindestens acht Tage betrug (KREUZINGER *et al.*, 2004); in der Realität beträgt die Verweildauer aber nur vier Tage.

Pharmazeutika werden nach Einnahme in vielen Fällen in konjugierter Form als polare Metaboliten ausgeschieden. In der Kläranlage kann es unter geeigneten Bedingungen oder dem Einfluss von Mikroorganismen zu einer Aufspaltung der Konjugate und dadurch zu einer Freisetzung des ursprünglichen Wirkstoffs kommen. Gezeigt wurden diese Effekte bei den Wirkstoffen Estradiol (PANTER, 1999; TERNES, 1999) und dem Steroidhormon 17 α -Ethinylestradiol (DASCENZO *et al.*, 2003).

1.1.2 Umweltrelevante Arzneimittel

Die Beurteilung inwieweit ein Arzneimittel als umweltrelevant eingestuft werden muss, kann auf mehreren Faktoren beruhen. Kriterien für eine Bewertung sind Verkaufs- und Verbrauchsmengen, der Anwendungs- bzw. Einsatzbereich, die Frequenz mit der Substanzen im Trinkwasser nachgewiesen werden können, sowie physikalisch-chemische (Persistenz, Lipophilie) und (öko-) toxikologische Kenndaten (SCHULTE-OEHLMANN *et al.*, 2007).

Ausgehend von diesem Konzept wurde beispielsweise für das Land Nordrhein-Westfalen durch das Rheinisch-Westfälische Institut für Wasserforschung ein umfassender Bewertungsansatz zum Gefährdungspotential für eine Vielzahl von Arzneimittelwirkstoffen im aquatischen Milieu erstellt. Ziel dabei war es, Leitsubstanzen mit besonders hohem Gefährdungspotential für zukünftige Monitoringprogramme zu bestimmen. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die Ergebnisse dieser Studie, gegliedert in Wirkstoffklassen und deren als umweltrelevant eingestuften Vertreter. Ähnliche Listen existieren auch in anderen Bundesländern wie beispielsweise in dem von HANISCH *et al.* (2004) ausgearbeiteten Katalog für das Land Brandenburg.

Tabelle 1.2: *IWW-Liste (Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung) umweltrelevanter Humanarzneimittelwirkstoffe (SCHULTE-OEHLMANN et al., 2007).*

Wirkstoffklassen	Wirkstoffe
Antibiotika	Ciprofloxacin, Clarithromycin, Erythromycin, Sulfamethoxazol, Trimethoprim
Analgetika/Antiphlogistika	Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Diclofenac, Paracetamol, Phenazon, Propyphenazon, Indometacin
Antiepileptika	Carbamazepin
β-Blocker	Atenolol, Metoprolol, Sotalol
Lipidsenker	Bezafibrat, Fenofibrat
Lipidsenker-Metaboliten	Chlorfibrinsäure
Röntgenkontrastmittel	Diatrizoat, Iopamidol, Iomeprol, Iopromid
Spasmolytika/Vasodilatoren	Theophyllin
Sexualhormone und Analoga	Ethinylöstradiol, 17β-Östradiol,
H ₂ -Blocker (Gastrointestinaltherapeutika)	Ranitidin
Zytostatika	Cyclophosphamid, Ifosfamid

1.2 Für die Studie ausgewählte Wirkstoffe

Ausgehend von den in der Literatur vorliegenden Daten zur Einschätzung der Umweltrelevanz sowie einer bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführten Dissertation zum Thema Arzneimittel in naturnahen Kläranlagen (NEUSTIFTER, 2007) wurden für die vorliegende Arbeit die beiden weltweit verbreiteten Schmerz- und Entzündungshemmer Paracetamol und Diclofenac ausgewählt.

1.2.1 Paracetamol

Acetaminophen oder Paracetamol (Abbildung 1.2) ist ein schmerzstillendes, fiebersenkendes Medikament aus der Gruppe der nichtopioiden Wirkstoffe. Entdeckt wurde die schmerzstillende Wirkung als Metabolit des Acetanilids und Phenacetins Mitte des 20. Jahrhunderts, wobei dessen genaue Wirkungsweise bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Diskutiert wird als Wirkung die Hemmung des Enzymsystems der Cyclooxygenasen (FLOWER und VANE, 1972). Cyclooxygenasen katalysieren die Bildung von Prostaglandinen, die als Schmerzmediatoren an der Schmerzweiterleitung ins Gehirn beteiligt sind (BOUTAUD *et al.*, 2002). Diese Tatsache kann die schmerzlindernden, nicht aber die entzündungshemmenden Eigenschaften des Wirkstoffes erklären. Weitere Wirkmechanismen, die diskutiert werden, sind Wechselwirkungen mit dem Serotoninsystem (PICKERING *et al.*, 2008) sowie mit dem endogenen Cannabinoidsystem (ANDERSON, 2008).

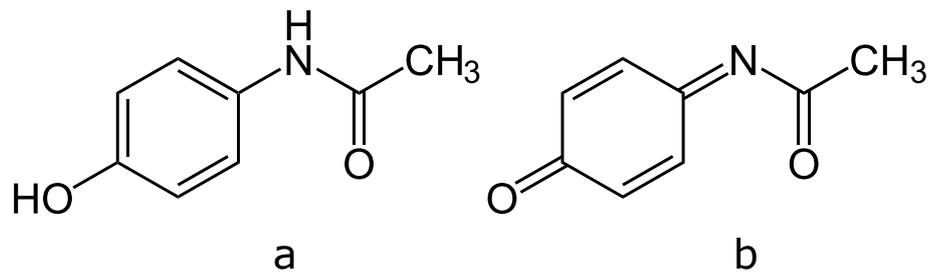


Abbildung 1.2: Strukturformel Paracetamol (a) und N-Acetyl-p-benzochinonimin (b).

Im Säugerorganismus erfolgt die Verstoffwechslung des Acetaminophens hauptsächlich in der Leber. Dabei wird bei normaler Dosierung ein großer Anteil über eine Phase 2-Reaktion mit Sulfat oder Glucuronsäure konjugiert. Die so gebildeten, nicht-toxischen Konjugate werden über die Nieren mit dem Urin ausgeschieden. Eine Überdosierung von Paracetamol kann zu schweren Schädigungen der Leber führen. Dafür verantwortlich ist der intermediäre Metabolit N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI, Abbildung 1.2 b), welcher nach Oxidation durch die Enzyme CYP2E1, CYP1A2 und CYP3 aus der Gruppe der P450-Monooxygenasen entsteht. NAPQI ist im höchsten Maße reaktiv und reagiert spontan mit Proteinen und Nukleinsäuren. Unter Normalbedingungen wird NAPQI sofort mit reduziertem Glutathion konjugiert und dadurch in der Zelle eliminiert (BERTOLINI *et al.*, 2006). Durch Induktion des P450 Enzymsystems, z.B. durch Alkohol- oder Medikamentenkonsum, wird die Bildung von NAPQI gefördert und die toxische Wirkung von Paracetamol erhöht. Paracetamol ist eines der am häufigsten eingesetzten Humanarzneimittel in Deutschland. Allein im Jahr 2001 betrug die bundesweit verbrauchte Menge ca. 600 Tonnen (FENT *et al.*, 2006).

1.2.2 Diclofenac

Ebenso wie Acetaminophen zählt Diclofenac (2-(2-(2,6-Dichloranilino)phenyl)acetat, Abbildung 1.3) zur Gruppe der nichtopioiden Analgetika, welches oral administriert oder in Form von äußerlich angewendeten Crèmes und Gelen bei leichten Schmerzen und Entzündungen eingesetzt wird. Chemisch ist es der Gruppe der Phenylelessigsäuren zuzuordnen. Seine Wirkungsweise beruht auf der nichtselektiven Hemmung von Cyclooxygenasen, wodurch die Produktion von Prostaglandinen in den Magenepithelzellen verringert wird. Daneben werden verschiedene andere Wirkorte für Diclofenac im Säuger diskutiert. LEE (2003) zeigte einen direkten Einfluss von Diclofenac auf Natriumströme in Rückenmarkszellen von Ratten und bringt diese mit den schmerzlindernden Eigenschaften in Verbindung. Des weiteren existiert eine Wirkung auf sogenannte *acid sensing ion channels* (ASIC),

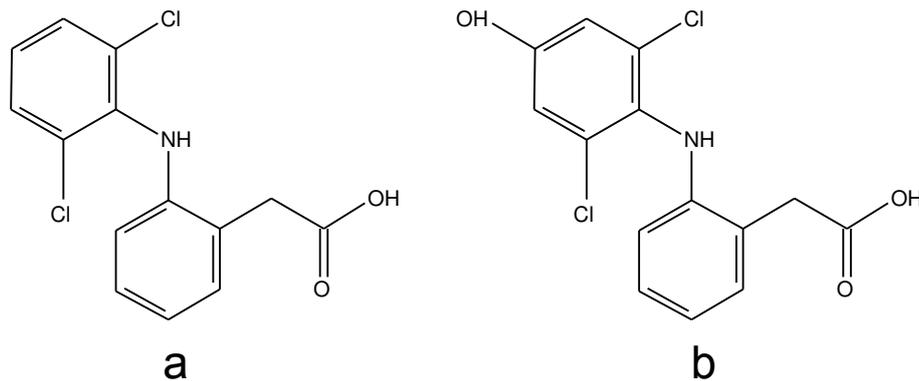


Abbildung 1.3: Strukturformel Diclofenac (a) 4'OH-Diclofenac (b).

die in der aktuellen Schmerztherapieforschung als neues und attraktives Angriffsziel für schmerzhemmende Wirkstoffe diskutiert werden (DOROFEEVA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2008).

Der Metabolismus von Diclofenac im Säugetier ist äußerst komplex und resultiert in einer Vielzahl an auftretenden Metaboliten. Ebenso wie beim Paracetamol kommt es in Phase 1 zu P450-Monooxygenasen katalysierten Oxidationsreaktionen, die zu hydroxylierten Produkten führen. Die Hydroxylierung kann dabei an verschiedenen Positionen am Molekül erfolgen. Die dabei am häufigsten auftretenden Metaboliten sind das 3' bzw. 4'OH-Diclofenac mit der Hydroxygruppe am Dichlorphenylring oder das 5'OH-Diclofenac einer Hydroxylierung am Ring der Phenylelessigsäure. Eine doppelte Hydroxylierung in 5' und 4'-Position tritt ebenfalls auf (DAVIES und ANDERSON, 1997).

In Säugern findet eine Konjugation an der Carboxylgruppe des Diclofenacs statt. Konjugationspartner sind dabei vor allem Glucuronsäure oder Taurin. Eine Sulfatierung wurde an der Hydroxygruppe an 4'-Position beobachtet.

Trauriges Beispiel für die ökotoxikologischen Risiken, die ein Wirkstoff wie Diclofenac in der Umwelt bergen kann, war der 1990 beobachtete dramatische Rückgang der Geierpopulationen in Indien und Pakistan. Die erhöhte Sterblichkeit dieser Tiere konnte erst 2004 auf in der Umwelt vorhandenes Diclofenac zurückgeführt werden (OAKS *et al.*, 2004). Das Ausmaß dieser ökologischen Krise war so enorm, dass der Bestand einer der häufigsten Geierarten Indiens, *Gyps bengalensis* (Bengalgeier), innerhalb kürzester Zeit um 95 Prozent zurück ging. Die adulten und subadulten Tiere starben dabei an Nierenversagen nach Exposition mit Diclofenac. In Vögeln sind Prostaglandine an der Biosynthese der Eischalen beteiligt und eine Behandlung mit COX-Inhibitoren kann in der Folge zu einer Verdünnung der Eischalen führen (LUNDHOLM, 1997). Neben dem Einsatz in der Humanmedizin wird Diclofenac in Indien und Pakistan auch häufig in der Veterinärmedizin eingesetzt, was

eine erhöhte Exposition für die sich von Tierkadavern ernährenden Geier bedeutet. Der Einsatz von Diclofenac in der Tierhaltung in diesen Ländern ist mittlerweile untersagt.

1.3 3-Phasen-Modell der Entgiftung von Xenobiotika in Pflanzen

Pflanzen sind als sessile Organismen in der Lage Xenobiotika aufzunehmen, zu entgiften und dadurch zu einem gewissen Maß zu tolerieren. Dabei greifen sie auf verschiedene im Laufe der Evolution durch Anpassung entwickelte Mechanismen und ihren komplexen Sekundärstoffwechsel zurück. Metabolisierte organische Schadstoffe werden entweder als Chelate komplexiert, mit kleineren Biomolekülen wie reduziertem Glutathion (GSH) oder Glucose konjugiert (SCHRÖDER und COLLINS, 2002) oder in der pflanzlichen Vakuole bzw. der Zellwand deponiert (BURKEN, 2003). Diese Endlagerung erfordert offenbar eine vorausgegangene Konjugation. So kann im Anschluss an die Konjugation mit GSH ein Austransport aus dem Cytosol in die Vakuole erfolgen. Der Transport über die Tonoplastenmembran erfolgt über ATP-abhängige Membranpumpen, sogenannte ABC-Transporter (MARTINOIA *et al.*, 2007; MARRS *et al.*, 1995). Diese Proteine können zum Teil auch Glucoside transportieren. In der Pflanzenphysiologie spricht man im Zusammenhang der Entgiftung organischer Schadstoffe häufig von einem sogenannten 3-Phasen-Modell der Entgiftung, welches erstmals von SHIMABUKURO (1976) beschrieben wurde. Analog zum Metabolismus im Säugetier wird die Reaktionskaskade dabei in drei Phasen unterteilt.

1.3.1 Phase 1

In Phase 1 kommt es im Cytosol zu einer Aktivierung des Xenobiotikums durch Hydrolyse, Oxidations- oder Reduktionsreaktionen. Die hydrolytischen Reaktionen werden von Esterasen (3.1.1.-) oder Amidasen (3.5.1.-) katalysiert. An den Oxidationen des Xenobiotikums sind neben Peroxidasen (E. C. 1.11.1.-) sehr oft Enzyme aus der Klasse der P450 abhängigen Monooxygenasen beteiligt, welche als Häm-Proteine im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert sind (WERCK-REICHART und FEYEREISEN, 2000). Die so durch Abspaltungen oder Addition von funktionellen Gruppen am Molekül durchgeführten Modifikationen führen zu einer höheren Polarität des Moleküls und erhöhen so dessen Reaktivität für die sich anschließende Konjugationsreaktion.

1.3.2 Phase 2

Die eigentliche Detoxifizierung oder Entgiftung in Phase 2 erfolgt durch die Konjugation des Schadstoffs mit kleineren Biomolekülen wie Glutathion oder Glucose im Cytosol unter

der Beteiligung verschiedener Enzyme. Glycosilierungen erfolgen durch Proteine der Enzymklasse der UDP-Glycosyltransferasen (EC 2.4.1.-), wobei eine Vielzahl an glycosilierten Verbindungen entstehen kann. Neben der Entgiftung von Xenobiotika (MESSNER *et al.*, 2003) besitzen Glycosyltransferasen die Fähigkeit ein breites Spektrum an Substraten wie Phytohormone (HOU *et al.*, 2004) oder endogen gebildete Metaboliten (RICHTMAN *et al.*, 2005) umzusetzen. Mit Ihren vielfältigen Funktionen und dem breiten Substratspektrum erfüllen Glycosyltransferasen wichtige Aufgaben im pflanzlichen Sekundär- und Entgiftungsstoffwechsel, insbesondere bei der Bewältigung von Situationen, in denen die Pflanze sowohl biotischem als auch abiotischem Stress ausgesetzt ist (BOWLES *et al.*, 2005).

Enzyme der Klasse der Glutathion S-Transferasen (GSTs, EC 2.5.1.18) katalysieren die Konjugation mit dem Tripeptid Glutathion und nehmen bei der Entgiftung und Sequestrierung von Xenobiotika in Pflanzen eine herausragende Position ein. Bei der Konjugationsreaktion übertragen GSTs ein Molekül GSH, welches dabei als Elektronendonator agiert, auf das elektrophile Zentrum des Konjugationspartners. GSTs kommen ubiquitär in allen aerob lebenden Organismen vor (FROVA, 2003) und wurden zu Beginn der 60er Jahre erstmalig im Menschen beschrieben (BOOTH *et al.*, 1961). Die Entdeckung und Charakterisierung der ersten pflanzlichen GSTs erfolgte etwa zehn Jahre später anhand eines Atrazin-Glutathion-Metaboliten in Mais (FREAR, 1970).

Bei GSTs handelt es sich um multifunktionale Enzyme mit einer dimeren Struktur und einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa pro Monomer (THOM *et al.*, 2002). Die Dimere im Cytosol können dabei sowohl als Homo- als auch als Heterodimere vorliegen, mit einer daraus resultierenden großen Anzahl einzelner Isoenzyme mit multiplen Bindungseigenschaften. Jedes Monomer trägt nach an der N-terminalen Domäne eine hydrophile Bindungsstelle für Glutathion oder Homoglutathion (G-Region) und an der C-terminalen Domäne eine hydrophobe Bindungsstelle für ein elektrophiles Substrat (H-Region).

Die von GSTs katalysierten Konjugationsreaktionen von Glutathion mit verschiedenen Xenobiotika sind gut untersucht und für eine Vielzahl von Pflanzen beschrieben.

Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass bis heute neben der Vielzahl an artifiziellen Substraten nur sehr wenig endogene Substrate bekannt sind. So konnten bislang lediglich Zimtsäure, Medicarpin, Isoliquiritigenin, Ferulasäure, Ethacrynsäure und Caftarsäure zweifelsfrei als natürlich auftretende Substrate von GSTs identifiziert werden (EDWARDS, 2000).

Neueste Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung von GSTs in verschiedenen Bereichen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus. Die Schwierigkeit in der genaueren Charakterisierung einer Beteiligung von GSTs in den komplexen Reaktionskaskaden einzelner Sekundärstoffwechselwege liegt darin, dass nur in sehr wenigen Fällen Glutathionkonjugate

von endogenen Substraten nachgewiesen werden konnten. Mögliche Gründe dafür werden von DIXON *et al.* (2010) in einer aktuellen Studie diskutiert.

Natürliche Reaktionsprodukte von GSTs können sehr instabil sein, und die Glutathionisierung dieser Substrate ist in vielen Fällen ein reversibler Prozess. Ein weiterer in diesem Zusammenhang bedeutender Aspekt ist die unmittelbare Prozessierung der gebildeten Produkte in weiteren Reaktionskaskaden unter der Beteiligung anderer Enzyme wie C-S Lyasen (EC 4.4.-.-), N-Glycosyltransferasen und N-Malonyltransferasen (EC 2.3.1.-). Glutathion S-Transferasen katalysieren nicht zwingend die Konjugation mit Glutathion, es ist vielmehr auch denkbar, dass Glutathion lediglich als Co-Faktor dient. Zuletzt wird die Möglichkeit diskutiert, dass GSTs neben ihren katalytischen Funktionen als Transporterproteine für Sekundärmetaboliten und deren instabilen Intermediärprodukten agieren.

Die Frage, die dabei offen bleibt ist, inwieweit sich die beschriebene Beteiligung von GSTs an Prozessen im Sekundärstoffwechsel mit der ubiquitären Verbreitung der Enzymklasse in solch großer Anzahl korrelieren läßt.

1.3.3 Phase 3

In Phase 3 der Entgiftungskaskade kommt es zu Abbau und Sequestrierung der gebildeten Xenobiotikakonjugate und so zu einer Eliminierung der reaktiven Wirkstoffe aus dem Cytosol (SCHRÖDER, 2006). In den Vakuolen kann es zu einer weiteren Degradation von Glutathion-Konjugaten kommen. Die Abspaltung des Glycin- oder Glutamylrests und die daraus resultierende Entstehung eines Cysteinylkonjugats unter Beteiligung der Enzyme Carboxypeptidase (EC 3.4.16 - 3.4.18) und γ -Glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2) ist in der Literatur beschrieben (DAVIN und LEWIS, 1992; MARRS *et al.*, 1995; WOLF *et al.*, 1996). Aminosäuren werden auf diesem Wege „recycled“ und stehen der Pflanze wieder zur Verfügung. Zusammenfassend entstehen in Phase 3 demnach niedermolekulare, wasserlösliche Intermediate, gebundene Rückstände in der Zellwand oder aber zu einem geringeren Anteil Wurzelexudate, die an die Rhizosphäre abgegeben werden können (SCHRÖDER, 2001; SCHEER *et al.*, 2007). Sequestrierung findet also zum einem durch die Einlagerung in die pflanzlichen Vakuole statt oder durch Konjugationsreaktionen mit Makromolekülen, zum Beispiel mit den Strukturen des Lignins in der Zellwand, in Form sogenannter gebundener Rückstände, *bound residues* (LANGEBARTELS und HARMS, 1985).

Zu erwähnen bleibt, dass Glycoside für gewöhnlich in der Phase 3 weiter mit Zuckern konjugiert oder malonyliert werden können. Im Gegensatz zum Glutathion-Konjugat

Tabelle 1.3: 3-Phasen-Modell der Entgiftung von Xenobiotika in Pflanzen nach SHIMABUKURO (1976).

Phase	Funktion	Reaktion
Phase 1	Aktivierung	Oxidation, Reduktion, Hydrolyse
Phase 2	Konjugation	Konjugation mit Glutathion, Zuckern oder Aminosäuren
Phase 3	Metabolisierung, Ausscheidung	Transport, Degradation und Formation gebundener Rückstände

erfolgt hier also ein Aufbau komplexerer und größerer Moleküle, die häufig in der Zellwand abgelagert werden.

1.4 HPLC-MS

Die Vielzahl der bei der Entgiftung entstehenden Metaboliten erfordert eine kohärente und leistungsfähige Analytik, ohne die es nicht möglich ist, Stoffwechselwege zu erforschen.

Unter dem Begriff HPLC-MS versteht man die Kopplung einer HPLC mit einem massenspektrometrischen Detektor. Diese moderne Analysetechnik gewinnt in der Umweltanalytik eine immer größere Bedeutung. Ein Problem in der Vergangenheit war die Schnittstelle zwischen den beiden Systemen HPLC und Massendetektor. Aus einer Vielzahl von Entwicklungen in der Vergangenheit haben sich bis heute zwei Systeme etabliert und bilden den Standard an verfügbaren LC-MS-Interfaces. Zum einen die sogenannte *Electro-Spray* (ESI)- und zum anderen die *Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation* (APCI)-Quelle.

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an einer Ionenfalle mit einer ESI-Quelle durchgeführt, weshalb im Folgenden ein kurzer Überblick über die Funktionsweise eines solchen Systems gegeben werden soll. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Arbeiten von DOLE *et al.* (1968), der mit seinen Experimenten den Grundstein für eine effektive Ionisierung von Analyten aus der Flüssigphase gelegt hat. Generell versteht man unter Elektrosprayionisation eine Technik zur Erzeugung von Ionen unter atmosphärischen Druck, die im Massendetektor detektiert werden können. Die Analytlösung wird dabei durch eine Metallkapillare geleitet, an die eine Spannung angelegt wird. Dabei kommt es zur Bildung eines elektrischen Felds zwischen Kapillare und Gegenelektrode. Die in der Analytlösung befindlichen Ionen bewegen sich im elektrischen Feld in Richtung der Gegenelektrode. An der Spitze der Kapillare kommt es so zu einer Akkumulation gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und so zur Bildung eines sogenannten Taylor-Kegels führen. Bei einer kritischen Feldstärke wird der Taylor-Kegel instabil, zerfällt und emittiert dabei einen Strahl aus feinsten (10 µm) unipolar geladenen Tropfen (Abbildung 1.4). Oft wird die Bildung feinsten

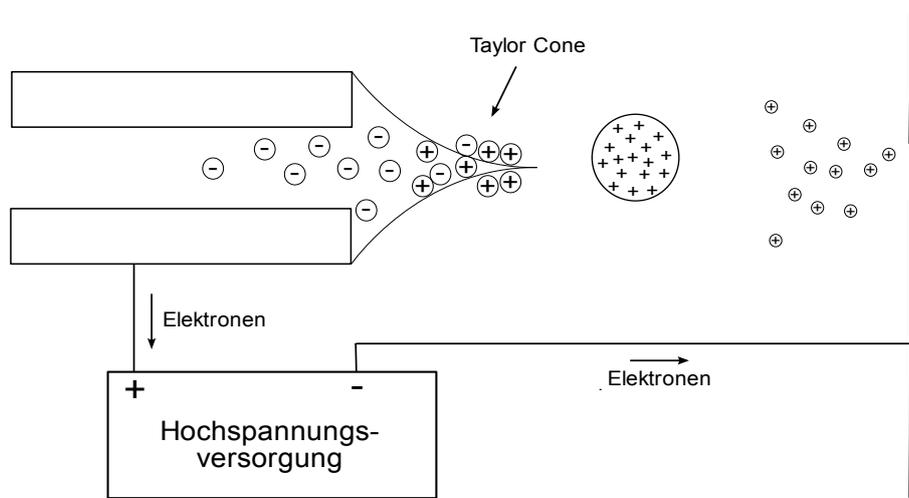


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung zur Bildung des Electro-Sprays in der Ionisationskammer (nach NIESSEN 2006).

Tropfen und die Verdampfung des Laufmittels durch ein dem Spray entgegen strömendes neutrales Trägergas (häufig Stickstoff) unterstützt. Durch Verdampfen des Lösungsmittels verringert sich die Tropfengröße bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Ladungsdichte auf der Tropfenoberfläche. Unterschreitet der Radius der Tropfen einen kritischen Wert (*Raleigh Limit*), zerfällt der Tropfen aufgrund der Abstoßung gleichartiger Ladungen in eine Vielzahl kleinerer Tropfen (Coulomb Explosion).

Für die endgültige Entstehung einzelner Ionen existieren im wesentlichen zwei Erklärungsansätze. Das *Charge Residue Model* (CRM, Modell des geladenen Rückstands) geht davon aus, dass letztendlich Tröpfchen der Größe eines Nanometers übrigbleiben, die nur noch ein ionisiertes Analytmolekül beinhalten. Das *Ion Evaporation Model* (IEM, Ionenemissionsmodell) setzt voraus, dass bereits aus größeren, geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert werden.

Die Electrospray-Ionisierung stellt eine sanfte Form der Ionisierung dar, die es erlaubt, auch empfindliche Moleküle und nicht kovalente Aggregate zu ionisieren und zu detektieren. Typischerweise werden Quasimolekülionen $[M+H]^+$ bei positiver und $[M+H]^-$ bei negativer Spannung detektiert. Ein häufig beobachtetes Phänomen bei der ESI ist zudem die Bildung sogenannter Adduktionen mit im Eluenten, Analyten oder der Matrix vorhandenen Ionen. Beispiele für häufig bei positiver Spannung detektierte Adduktionen sind $[M+Na]^+$ oder $[M+NH_4]^+$.

In Massenspektrometern vom Typ einer Ionenfalle ist es möglich, Ionen in einem Magnetfeld gefangen zu halten. Je nach Art der einwirkenden Felder können auf diese

Weise sämtliche Ionen oder aber auch einzelne Ionen mit einer bestimmten Masse in der Falle gehalten oder aus ihr entlassen werden.

Ein großer Vorteil dieser Technologie ist es sogenannte Mehrfach-Stoßexperimente durchführen zu können. Bei dieser Art von Experimenten wird zunächst ein bestimmtes sogenanntes *precursor ion* in der Ionenfalle gehalten, welches dann durch Kollisionen mit Heliumkernen in kleinere Produktionen zerfällt. Diese wiederum können in den Detektor entlassen oder aber für weitere Kollisionen gehalten werden. Der große Vorteil dieser sogenannten MS/MS bzw. MSⁿ Experimente ist die Erhöhung des Signal-Rauschverhältnisses mit der damit einhergehenden Erhöhung der Empfindlichkeit (NIESSEN, 2006).

Für Untersuchungen des Metabolismus von Xenobiotika bzw. Arzneimittelwirkstoffen in biologischen Systemen ist die LC-MS-Technik von herausragender Bedeutung und stellt ein wichtiges Werkzeug in der Wirkstoffforschung und der Identifizierung von Metaboliten dar (TOZUKA *et al.*, 2003). Viele der bereits beschriebenen Biotransformationen wie Oxidationen bzw. Reduktionen, Hydroxylierungen oder Hydrolysen können aufgrund des Wissens um das Molekülgewicht des entstehenden Metaboliten detektiert werden. Die Bestätigung von Molekülstrukturen oder die Strukturaufklärung unbekannter Komponenten ist durch die Durchführung gezielter MS/MS-Experimente möglich. Die Untersuchung des Metabolismus einer Substanz erfolgt dabei sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Studien.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Studien zur Verstoffwechslung von Humanarzneimitteln beide Strategien verfolgt. Für *in vitro*-Studien wurden jeweils Enzympräparationen unterschiedlicher Pflanzenteile (Wurzel, Spross, Blatt) bzw. unterschiedlicher Kompartimente (cytosolische, mikrosomale Enzympräparationen) untersucht. Für die Untersuchungen zur Bildung von Xenobiotikametaboliten in Pflanzen *in vivo* wurden Wurzel- und Blattextrakte massenspektrometrisch analysiert.

1.4.0.1 LC-MS: Identifizierung von Xenobiotikametaboliten

Wie bereits beschrieben, durchläuft ein chemischer Fremdstoff sowohl im tierischen Organismus als auch in einer Pflanze verschiedene metabolische Veränderungen am Molekül (Phase 1-3 Reaktionen). Ein großer Vorteil der massenspektrometrischen Analyse dieser Art von Analyten ist die Möglichkeit, diese Modifizierungen am Wirkstoff in Form von charakteristischen Massenübergängen zu detektieren und somit die entstehenden Metaboliten zu identifizieren. Spezifische Massenübergänge macht man sich auch im Falle von Phase 2-Metaboliten ebenfalls bei der Fragmentierung in MS/MS-Experimenten zunutze, da bei der CID in vielen Fällen wieder das *parent-compound*, also der eigentliche Wirkstoff bzw. der Phase 1- Metabolit entsteht. Wichtige metabolische Veränderungen am Molekül mit Ihren jeweils charakteristischen Massenübergängen sind in Tabelle 1.4 dargestellt.

Tabelle 1.4: $[M+H]^+$ und $[M+H]^-$ Ionen der wichtigsten Konjugate mit ihren charakteristischen Massenübergängen (nach LEVSEN et al. 2005).

Konjugations- reaktion/ Konjugation mit	Substituent	Massen- übergang	Neutral loss	Massenverlust von $[M+H]^+$	Massenverlust von $[M+H]^-$
Methylierung	CH ₃	14	Methylradikal	15	
Sulfatierung	SO ₃ H	80	SO ₂ SO ₃	64 80	64 80
Cystein	Cysteinyll	119	Cystein	121	121
N-Acetylcysteine	Acetylcysteinyll	161	NACys	163	163
Glucose	Glucosid	162	AnhydroGlc Glucose	162 180	
Malonyl-Glc	Malonylglucosid	248	Anhydromalonyl- Glucose CO ₂ MalonylGlc	248 44 266	
Glutathion	Glutathionyl	305	GSH Glutathion Glutamin Glycin	307 307 146 75	306

1.5 Phytoremediation

Die stets steigenden Belastungen des Abwassers mit Schadstoffen und die, trotz modernster Behandlungsmaßnahmen sinkende Effizienz der Abwasserreinigung in Europa, hat zu einem Umdenken in der Anwendung der verschiedenen Technologien geführt. Phytoremediation beschreibt ein Verfahren zur Beseitigung von Schadstoffen aus verschiedenen Umweltkompartimenten mit der Hilfe von Pflanzen. Die Schadstoffe können dabei entweder organischer (Herbizide, Pestizide, Sprengstoffe, usw.) oder anorganischer (Schwermetalle) Natur sein. Die Beteiligung der Pflanzen an der Reinigung ist dabei entweder direkt, d. h. Schadstoffe werden von der Pflanze tatsächlich aufgenommen und so der Umwelt entzogen, oder aber die Pflanze leistet einen indirekten Beitrag zur Verringerung der Schadstoffkonzentration in Boden oder Wasser. Ein Beispiel für eine indirekte Beteiligung wäre eine Veränderung des Bodenmilieus (pH-Wert, Sauerstoffgehalt) durch von Pflanzenwurzeln abgegebene Substanzen. Solche Veränderungen beeinflussen die Rhizosphäre in ihrer mikrobiellen Zusammensetzung oder erhöhen die Bioverfügbarkeit einer Substanz bzw. schaffen Bedingungen, die einen mikrobiellen Abbau des Schadstoffes fördern können.

Abhängig von der Belastungssituation kommen dabei verschiedene Verfahren zum Einsatz, die im Folgenden stichpunktartig erläutert werden sollen:

Phytoextraktion Die Aufnahme des Schadstoffs erfolgt über die Wurzel. Transport und Akkumulation in der Pflanze.

Rhizofiltration Sorption bzw. Kondensation von Schadstoffen an den Wurzeln. Eventuelle Aufnahme und Akkumulation in den Wurzeln.

Rhizostabilisierung Kein eigentliches Sanierungsverfahren, sondern vielmehr eine Sicherung des Bodens durch Pflanzen. Schutz vor Erosion durch Pflanzenbewuchs. Immobilisierung von Schadstoffen im Boden durch ein bestimmtes, von Pflanzen geschaffenes Milieu.

Rhizodegradation Abbau oder chemische Inaktivierung von Schadstoffen durch die Pflanze durch in der Rhizosphäre vorhandene Mikroorganismen. Stimulierung des mikrobiellen Abbaus durch die Pflanze (bessere Sauerstoffversorgung im Wurzelraum, Wurzelexsudation).

Phytodegradation Abbau des Schadstoffs durch pflanzliche Enzyme. Findet meist in der Pflanze statt, führt zu gebundenen Rückständen.

Phytovolatilisation Aufnahme von Schadstoffen über die pflanzliche Wurzel. Ausscheidung des Stoffes oder seiner Metaboliten über oberirdische Organe in Form von flüchtigen Verbindungen.

Phytoremediation stellt im Vergleich zu herkömmlichen Sanierungsverfahren eine vor allem weitaus kostengünstigere und umweltschonende Alternative dar. Für ein besseres Verständnis der bei solchen Remediationsprozessen ablaufenden Vorgänge müssen vor allem die Interaktionen zwischen Mikroben und Pflanzen, aber auch die pflanzlichen Stoffwechselwege für die jeweiligen Substanzen genauer untersucht werden.

In Pflanzenkläranlagen oder *constructed wetlands* werden die Verfahren der Phytoremediation effektiv in der biologischen Abwasserreinigung eingesetzt. Auch hier sorgen Arten wie *Phragmites australis* oder *Typha latifolia* mit ihrem weit ausladenden Rhizomen für eine gute Belüftung des Sediments, wodurch sie einen verbesserten Lebensraum für eine Vielzahl an Abbauprozessen beteiligten Mikroorganismen schaffen. Durch ihr Wachstum und dem resultierenden Zuwachs an Biomasse entziehen sie dem Abwasser Nährstoffe und wirken so einer Eutrophierung von Oberflächengewässern entgegen. Daneben können die Pflanzen in solchen Anlagen aber auch ganz gezielt an der Eliminierung von organischen Schadstoffen wie z. B. im Abwasser enthaltener Pharmazeutika beteiligt sein (NEUSTIFTER, 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit stellt eine Pilotstudie dar, in der zum ersten Mal der Metabolismus zweier weltweit verbreiteter und in großen Mengen verwendeter, umweltrelevanter Analgetika in Pflanzen untersucht werden soll.

Die für die Studie verwendeten Wirkstoffe waren Acetaminophen (Paracetamol) und Diclofenac in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 μM . Die verwendeten Modellorganismen waren Gerste (*H. vulgare*) sowie eine sterile Wurzelzellkultur des Meerrettichs (*A. rusticana*).

Zielsetzungen der Arbeit waren:

- Etablierung von geeigneten Versuchssystemen für die Durchführung von Metabolismusstudien mit Humanpharmazeutika (Paracetamol, Diclofenac) für *H. vulgare* und eine axenische Zellkultur von *A. rusticana*.
- Untersuchung der Aufnahme der beiden Substanzen in pflanzliche Gewebe.
- Etablierung geeigneter analytischer Verfahren zur Quantifizierung von Paracetamol und Diclofenac in pflanzlichen Geweben. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Methodenentwicklung für die LC-MS-Analytik sowie der Identifizierung neuer, nicht beschriebener pflanzlicher Metaboliten von Humanarzneimitteln.
- Bestätigung des Konzepts der grünen Leber für die genannten Wirkstoffe in Pflanzen. Vergleich zum Stoffwechsel im Säugetier.
- Untersuchung des Einflusses der beiden Wirkstoffe auf den antioxidativen Stoffwechsel in Pflanzen im Hinblick auf die dabei beteiligten Enzymsysteme.
- Bewertung der Ergebnisse vor dem Hintergrund des Einsatzes von Pflanzen in der Phytoremediation von Arzneimitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gerste (*Hordeum vulgare* L., Kultivar Barke)

Gerste, (*Hordeum vulgare* L.) spielt als eine der bedeutendsten Getreide- und Nutzpflanzen eine herausragende Rolle in der Landwirtschaft. Daraus resultiert ihre Bedeutung für die pflanzenphysiologische Forschung. Dort eignet sie sich, als unter Laborbedingungen einfach zu kultivierende Pflanze, als Modellsystem stellvertretend für viele monokotyledone Pflanzen. Die für die Arbeit herangezogene Sorte Barke stellt einen aktuellen Vertreter einer Sommerbraugerste mit guten Resistenzeigenschaften gegenüber verschiedenen Pilzerkrankungen sowie hervorragenden Braueigenschaften dar. Mit einem weltweit, unter dem Zusammenschluss verschiedener Forschungseinrichtungen in Australien, Japan, Finnland, Deutschland, England und den USA, angelegten Projekt zur Sequenzierung des Gerstengenoms, steht zudem eine große Anzahl an genetischen Informationen zur Beantwortung biochemischer und molekularbiologischer Fragestellungen zur Verfügung.

Bezogen wurde das Gerstensaatgut von der Firma Saatzucht Josef Breun GdB in Herzogenaurach und wurde über die Dauer von drei Jahren im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.1.2 Meerrettich-Wurzelkultur (*Armoracia rusticana*)

Im Vergleich zur Arbeit mit einer kompletten Pflanze hat die Arbeit mit einer Zellkultur, bei all ihren Limitierungen, auch eine Reihe von Vorteilen. Bei der für die vorliegende Dissertation verwendeten Zellkultur handelt es sich um eine sogenannte *hairy roots* Kultur des Meerrettichs, die mit *Agrobacterium rhizogenes* Stamm A4 transformiert worden war (NEPOVIM *et al.*, 2004). Zusammengefasst dargestellt, lässt man bei dieser Methode der Transformation sterilisierte Meerrettichsamen unter axenischen Bedingungen keimen und auf hormonfreiem Murashige und Skoog Medium (MURASHIGE und SKOOG (1962), siehe Tabelle 2.1) bei 27 °C und einer Lichtperiode von 18 Stunden bis zur Ausbildung des zweiten Blattpaares wachsen. In diesem Stadium werden die Wurzeln dann in kleinere Stücke geschnitten und für 24 Stunden mit *A. rhizogenes* (10^7 Zellen/ml) inokuliert. Die

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Mediums nach MURASHIGE und SKOOG (1962).

Makronährelement	Konzentration	Mikronährelement	Konzentration
CaCl ₂	2,99 mM	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,11 µM
KH ₂ PO ₄	1,25 mM	CuSO ₄ * H ₂ O	0,10 µM
KNO ₃	18,79 mM	FeNaEDTA	0,10 mM
MgSO ₄	1,50 mM	H ₃ BO ₃	0,10 mM
NH ₄ NO ₃	20,61 mM	KI	5,0 µM
		MnSO ₄ * 4 H ₂ O	0,10 mM
		Na ₂ MoO ₄ * H ₂ O	1,03 µM
		ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	29,91 µM

Wurzeln beginnen daraufhin, Kalluszellen und transformierte Wurzeln zu bilden. Die frisch gebildeten Wurzeln werden separiert und in MS-Medium mit den Phytohormonen 1-Naphthyllessigsäure (0,6 µM), 6-Benzylaminopurin (4,4 µM) und Ticarcilin (500 mg/l) überführt und für eine Wachstumsperiode unter den genannten Bedingungen kultiviert. Die Zugabe des Ticarcilins zum Medium wird danach für weitere 2 Wachstumsperioden fortgesetzt.

Nach der Transformierung werden die Wurzeln alle 10-12 Tage in kleinere Stücke geteilt und in frisches MS-Medium überführt. Dem Medium werden zusätzlich der Zucker Inositol und Thiamin (Vitamin B1) zugegeben. Die Kultivierung der für die Experimente verwendeten Zellen erfolgte in 250 ml Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Nährlösung im Dunkeln auf einem Schüttler (Abbildung 2.3b).

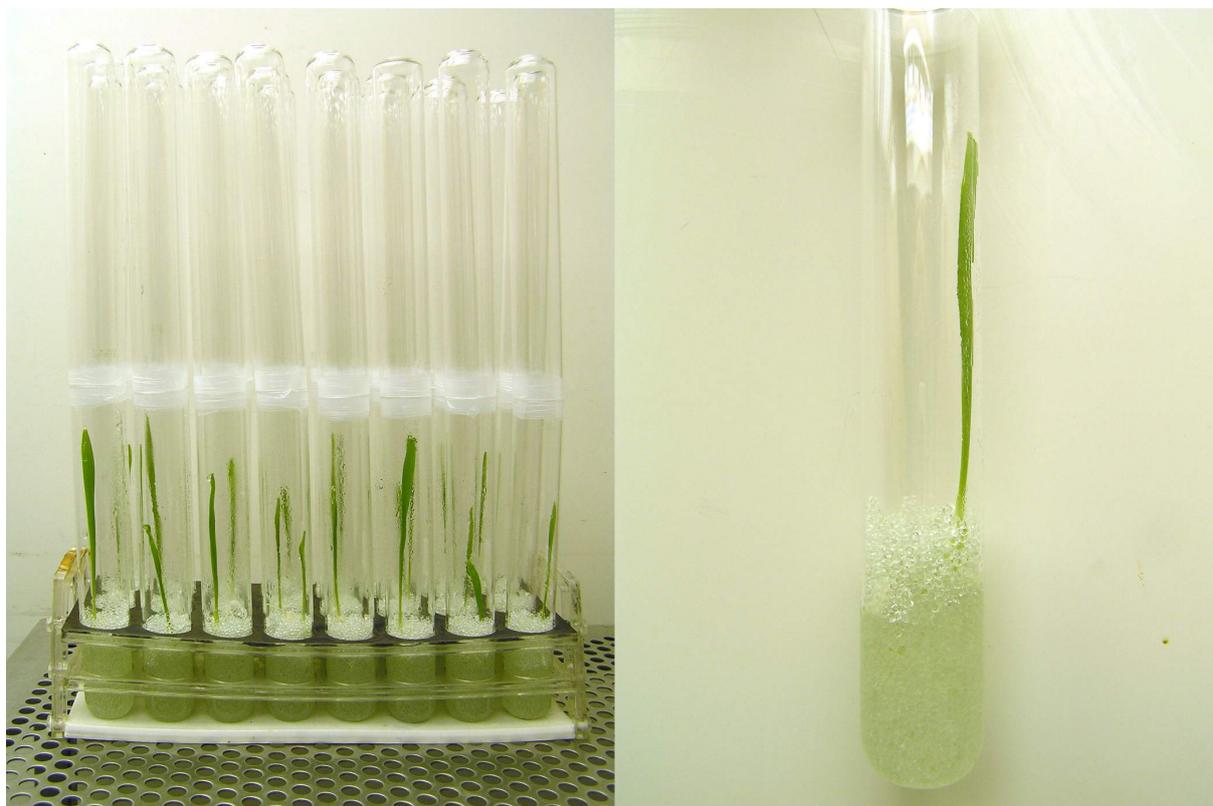


Abbildung 2.1: Anzucht der Gerste im axenischen System.

2.2 Methoden

2.2.1 Axenische Anzucht der Pflanzen (*H. vulgare*)

Für die Anzucht steriler Pflanzen in einem geschlossenem System (Abbildung 2.1) wurden die Gerstenkörner zunächst oberflächensterilisiert. Dazu wurden die Körner für zwei Minuten in einer 1 %igen (v/v) Tween 20-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) unter leichtem Rühren inkubiert. Die Tween Lösung wurde daraufhin durch ein gleiches Volumen an 70 % EtOH (v/v) ersetzt und für weitere fünf Minuten rührend inkubiert. Im Anschluss wurden die Körner dreimal mit H₂O gewaschen und für 20 Minuten mit ca. 40 ml NaClO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) inkubiert. Die anschließende vierstündige Inkubation mit sterilem H₂O dient dabei zur Lockerung der Deckspelze und zum Vorquellen der Samenkörner. In einem letzten Arbeitsschritt wurden die Körner erneut für 10 Minuten mit NaClO behandelt und danach zwei- bis dreimal in H₂O gewaschen. Für alle beschriebenen Arbeitsschritte wurde steriles, destilliertes Wasser aus einer MilliQ-Anlage verwendet. Die auf diese Art oberflächensterilisierten Samen wurden zu etwa je 10 Stück auf NB-Agar-Platten (8 g/L Nährbouillon, Merck, Darmstadt) ausplattiert und bei 20°C in lichtdichten Gefäßen zur Keimung gebracht. Nach drei Tagen wurden die Körner auf ihre Keimung

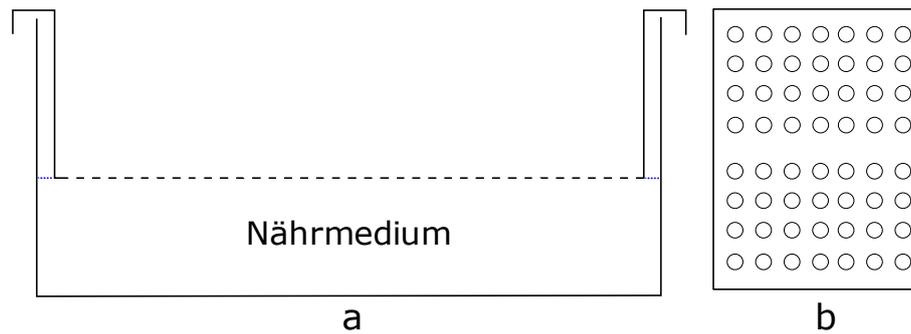


Abbildung 2.2: Schematische Skizze der Pflanzgefäße für die Aufzucht der Gerstenpflanzen im hydroponischen System in der Seitenansicht (a) und in der Draufsicht (b).

und sichtbare Kontaminationen hin überprüft und unter sterilen Bedingungen in die Anzuchtgefäße überführt. Zur Kultivierung der Pflanzen wurde das von GÖTZ (2008) etablierte System verwendet. Die Pflanzen wurden dabei in mit je 50 Gramm Glasperlen (\varnothing 1,7-2 mm; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gefüllte Duran-Reagenzgläser (Schott, Mainz) mit 30 mm Öffnung überführt. Ein zweites Reagenzglas wurde von oben aufgesetzt und mit Parafilm befestigt, so dass das System geschlossen war. Die Glasgefäße wurden zusammen mit dem Nährmedium und den Glasperlen vor der Verwendung autoklaviert. Das MS-Medium wurde von der Firma Duchefa Biochemie BV (Niederlande) bezogen und enthielt die in Tabelle 2.1 angegebene Nährstoffzusammensetzung.

2.2.2 Anzucht von Gerstenpflanzen unter Gewächshausbedingungen

Für die Experimente im Gewächshaus des Helmholtz Zentrums München wurden Gerstenkörner für 72 Stunden zwischen mehreren Lagen angefeuchtetem Filterpapier vorgekeimt, bis sich etwa 1-2 cm lange Wurzeln ausgebildet hatten. In diesem Stadium wurden die Keimlinge dann, mit den Wurzeln zuerst, in eigens angefertigte Kunststoffgefäße (siehe Abbildung 2.2) für die hydroponische Anzucht platziert. Das Volumen an Nährmedium betrug 2 Liter pro Gefäß. In diesen Gefäßen war es möglich, ca. 40 Gerstenpflanzen bis zu einem Alter von etwa 21 Tagen unter optimalen Wachstumsbedingungen zu kultivieren (Abbildung 2.3a).

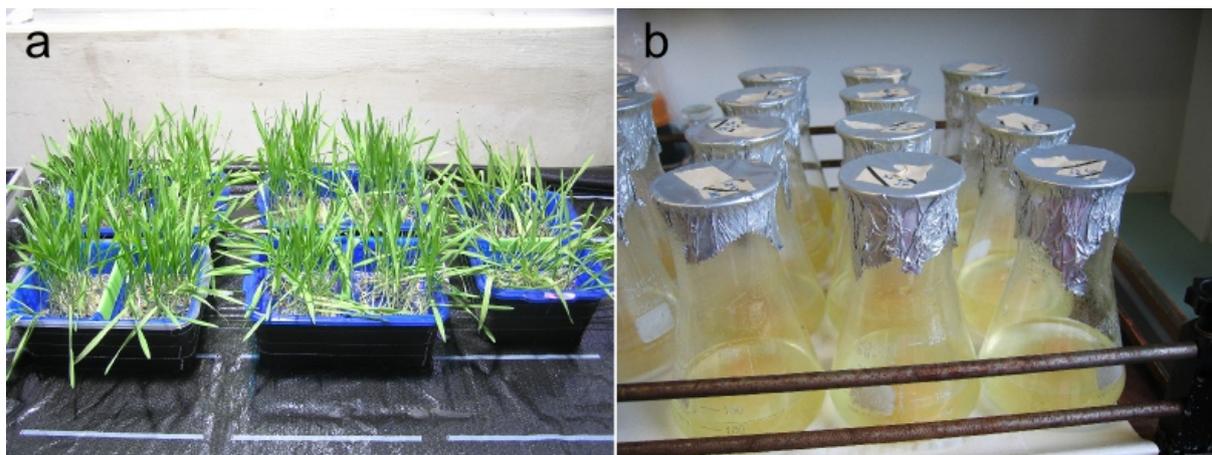


Abbildung 2.3: Gerstenpflanzen im hydroponischen System im Helmholtz Zentrum München (a) *Armoracia rusticana* Zellkultur (b).

2.2.3 Belastung der Pflanzen mit Arzneimitteln

2.2.3.1 *Armoracia rusticana*

Paracetamolbelastung Meerrettich-Wurzelzellen wurden wie unter 2.1.2 beschrieben in 100 ml Erlenmeyerkolben unter Schütteln im Dunkeln kultiviert. Für die Belastungsversuche mit Paracetamol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde eine Konzentration von 1 mM in 100 ml Nährmedium mit einer 100 mM Paracetamolstammlösung (in Ethanol) eingestellt. Den Kontrollansätzen ohne Paracetamol wurde die entsprechende Menge an Ethanol zugegeben, um mögliche durch das Lösungsmittel hervorgerufene Effekte zu erfassen. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurden die Wurzelzellen zunächst mit Leitungswasser und dann mit destilliertem Wasser gewaschen, um außen anhaftendes Paracetamol zu entfernen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in wirkstofffreies Medium überführt und dort für die angegebene Dauer weiter kultiviert. Zum Ernten wurden die Zellen mit einer langen Pinzette aus den Kolben entnommen, erneut in destilliertem Wasser gewaschen und gründlich zwischen mehreren Lagen Papiertüchern getrocknet. Die Wurzelzellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Diclofenacbelastung Die Belastung der Wurzelzellen mit dem Natriumsalz des Diclofenacs (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) erfolgte in der gleichen Art und Weise wie oben für das Paracetamol beschrieben. Eingesetzte Konzentrationen waren dabei 10, 100 und 1000 μM Diclofenac in 100 ml Nährlösung. Mit den belasteten Zellen wurde entweder genauso verfahren wie oben beschrieben, d. h. nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurden die Zellen in frisches Medium überführt und zu unterschiedlichen Zeiten geerntet, oder

$$\begin{aligned}
 c_a &= 12,25 * A_{663,2} - 2,79 * A_{646,8} \\
 c_b &= 21,50 * A_{646,8} - 5,10 * A_{663,2}, \\
 c_{a+b} &= 7,15 * A_{663,2} - 18,71 * A_{646,8} \\
 c_{x+c} &= \frac{1000 * A_{470} - 1,82 * c_a - 85,02 * c_b}{198}
 \end{aligned}$$

Abbildung 2.4: Formel zur Berechnung der Konzentration der Pigmente Chlorophyll a (c_a), Chlorophyll b (c_b), Gesamtchlorophyll (c_{a+b}) und Gesamt Carotinoide in mit Aceton 80 % (v/v) hergestellten Blattextrakten (LICHTENTHALER, 1987).

aber sie wurden für die gesamte Versuchsdauer in dem wirkstoffhaltigen Medium belassen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet.

2.2.3.2 *Hordeum vulgare*

Für die Belastungsexperimente von Gerste mit dem Wirkstoff Diclofenac wurden mit einer Stammlösung die angegebenen Konzentrationen von 10, 100 und 1000 μM in 2 Liter Nährlösung eingestellt. Kontrollpflanzen, deren Nährmedium nicht mit Wirkstoff beaufschlagt war, wurden gleiche Volumina des für die Herstellung der Stammlösung verwendeten Lösungsmittels (Ethanol) zugegeben.

2.2.4 Pigmentanalyse

Eine Analyse der pflanzlichen Pigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b sowie der Carotinoide wurde nach der von LICHTENTHALER (1987) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden 1,5 g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver zermahlen und mit 15 ml 80 % kalter, wässriger Acetonlösung (v/v) für 2 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Pflanzenmaterial ein weiteres Mal für 2 Stunden mit 15 ml des Solvents extrahiert. Die beiden Überstände wurden im Anschluss vereinigt, das Volumen bestimmt und unmittelbar für die photometrischen Messungen eingesetzt. Gemessen wurden die Absorptionsmaxima der Extrakte bei $\lambda_{max} = 663,2$ nm (Chlorophyll a), $\lambda_{max} = 646,8$ nm (Chlorophyll b) und $\lambda_{max} = 470$ nm (Carotinoide). Die Menge der einzelnen mit Aceton 80% (v/v) extrahierten Pigmente berechnet sich nach den in Abbildung 2.4 dargestellten Formeln.

2.2.5 Extraktion cytosolischer Enzyme

2.2.5.1 Glutathion S-Transferasen (GSTs, EC 2.5.1.18), Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels

Die Extraktion verschiedener Enzyme aus pflanzlichem Material erfolgte nach einer in Teilen modifizierten Methode nach SCHRÖDER *et al.* (2008). Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Beckman Coulter Zentrifuge vom Typ JA 25 durchgeführt. Maximal 3,5 g Pflanzenmaterial wurden dazu unter flüssigem Stickstoff in vorgekühlten Mörsern zu einem sehr feinen Pulver zermahlen, sofort mit 10 ml Extraktionspuffer pro Gramm Pflanzenmaterial versetzt und für 30 Minuten auf Eis gerührt. Der Extraktionspuffer bestand aus 0,1 M Tris/HCl pH 7,8, 5 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 1 % PVP K90 (Polyvinylpyrrolidon, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 1 % Nonidet (Fluka, Steinheim) und 5 mM DTE (Dithioerythritol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Es wurde dabei darauf geachtet, dass DTE und PVP dem Puffer immer erst unmittelbar vor der Extraktion zugesetzt wurden. Der Ansatz wurde dann für 30 Minuten bei 20000 U/min und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch eine Lage Miracloth (Porengröße: 22-25 µm, Calbiochem, Merck, Darmstadt) filtriert, um noch teilweise vorhandene, nicht pelletierte Partikel zu entfernen. Auf Eis rührend, wurde dem Extrakt Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 40 % zugegeben. Mit zunehmender Salzkonzentration im Extrakt wird den enthaltenen Proteinen deren Hydrathülle entzogen und sie fallen aus. Die gefällten Proteine wurden bei 20000 U/min und 4 °C abzentrifugiert und das entstandene Pellet verworfen. Erneut wurde dem Rohextrakt schrittweise und in kleinen Portionen Ammoniumsulfat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bis zu einer Sättigung von 80 % zugegeben. Die Menge an benötigtem Ammoniumsulfat wurde für jede Probe nach der in Abbildung 2.5 dargestellten Formel ermittelt.

Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (20000 U/min, 4 °C) wurden die ausgefällten Proteine pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in 2,5 ml 25 mM Tris/HCl pH 7,8 resuspendiert und anschließend mittels PD10-Säulen (GE Healthcare, Freiburg) entsalzt und in 3,5 ml 25 mM Tris/HCl pH 7,8 gelöst. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 Glycosyltransferasen (GTs, EC 2.4.--)

Die Extraktion einer glycosyltransferasehaltigen Enzymfraktion erfolgte nach einer modifizierten Methode nach PFLUGMACHER und SANDERMANN (1998b) Dazu wurden 20-30 g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen

$$\text{Ammoniumsulfatmenge [g]} = \frac{V * 1,77 * (S - s)}{3,5 - S}$$

S: gewünschte Menge an Ammoniumsulfat (als Dezimalbruchteil von 1)

s: vorgelegte Menge an Ammoniumsulfat (als Dezimalbruchteil von 1)

Abbildung 2.5: *Formel zur Berechnung der erforderlichen Menge an Ammoniumsulfat bei der Enzymextraktion (JAENICKE, 1984).*

und mit 0,1 M Natriumphosphat Puffer pH 6,5, 10 mM DTE, 2mM MgCl₂ (Sigma, Aldrich, Taufkirchen), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Phenylmethansulfonyl Fluorid, Fluka, Steinheim) und 1 % PVP K90 (w/v) unter ständigem Rühren auf Eis extrahiert. Die Suspension wurde danach durch eine Lage Miracloth Gewebe filtriert und 30 Minuten bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert. In einem ersten Fällungsschritt wurde dem Überstand Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 40 % zugegeben. Die Menge an benötigtem Ammoniumsulfat wurde dafür mit der in Abbildung 2.5 angegebenen Formel bestimmt. Die ausgefällten Proteine wurden unter den genannten Bedingungen abzentrifugiert und verworfen. Es folgte eine weitere Fällung der noch im Überstand enthaltenen Enzyme durch Zugabe von Ammoniumsulfat (75 % Sättigung). Nach Zentrifugation (30 Minuten bei 4 °C und 15000 x g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 ml 200 mM Tris/HCl pH 7,3, 1 mM DTE, 2 mM MgCl₂ resuspendiert. Die Entsalzung der Proteinextrakte erfolgte wie bei der Extraktion der cytosolischen Fraktion für die GST-Extraktion mit PD10-Säulen. Elution erfolgte mit 3,5 ml 200 mM Tris/HCl pH 7,3, 1 mM DTE, 2 mM MgCl₂. Die Extrakte wurden aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.6 Extraktion mikrosomaler Enzyme

Für die Präparation einer mikrosomalen Fraktion wurden bis zu 30 g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen und mit 300 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 250 mM Saccharose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 1 mM EDTA, 40 mM Ascorbinsäure (Fluka, Steinheim), 1 mM PMSF und 10 mM DTE für 15 Minuten unter ständigem Rühren auf Eis extrahiert. Das Homogenat wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt für weitere 15 Minuten bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Lage Miracloth Gewebe filtriert, bevor die Probe in Ultrazentrifugengefäße überführt wurden. Die Ultrazentrifugation (Discovery 90SE, Sorvall) der Proben wurde für eine Stunde bei 100000 x g durchgeführt. Die Pellets wurden in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1,4 mM DTE, 20 % Glycerol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) (v/v) resuspendiert und mit einem Glaspotter homogenisiert. Alle Arbeitsschritte wurden

bei 4 °C durchgeführt. Der Verwendung der mikrosomalen Fraktion erfolgte möglichst zeitnah nach der Präparation. Eine Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.7 Bestimmung der Glycosyltransferase-Aktivität

Die GT-Aktivität für verschiedene Substrate in Enzympräparationen wurde nach einer Methode nach MESSNER *et al.* (2003) bestimmt. Der Reaktionsansatz für diesen Test bestand dabei aus 0,1 mM des entsprechenden Substrats, welches mit 2 mM Uridin-Diphosphat-Glucose (UDPG, Fluka Steinheim), 1,25 mM 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (Fluka, Steinheim), 1,25 mM Salicin (Fluka, Steinheim) inkubiert wurde. Die beiden letzten Substanzen wurden den Ansätzen zugesetzt, um einem Abbau des im Testansatz entstehenden Glucosekonjugats durch in der Probe vorhandene Glucosidasen entgegenzuwirken. Substrate waren Quercetin und Kaempferol (beide Fluka, Steinheim), 2,3,5-Trichlorphenol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) sowie 4'OH-Diclofenac (Merck, Darmstadt) und Diclofenac. Der verwendete Puffer bestand aus 200 mM Tris/HCl pH 7,3, 2 mM MgCl₂. Es wurden folgende Mengen pipettiert: 10 μ l Substrat (2 mM), 20 μ l UDPG (20 mM), 10 μ l 4-NPG (25 mM), 10 μ l Salicin (25 mM) sowie 50 μ l Puffer.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l Enzymextrakt aus 2.2.5.2 gestartet. Das Volumen des Tests betrug 200 μ l. Die Reaktionsdauer betrug zwischen 30 und 60 Minuten. Alle Inkubationen wurden bei 30 °C im Wasserbad durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l konzentrierter Phosphorsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) abgestoppt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für die HPLC bzw. LC-MS-Messungen eingesetzt.

2.2.8 Bestimmung der mikrosomalen P450-Aktivität (EC 1.14.-.-)

Die Bestimmung der P450-Aktivitäten erfolgte in Mikrotiterplatten an einem Fluoreszenzphotometer (SPEKTRAmix Gemini EM, Molecular Devices, Ismaning) in Anlehnung an eine Methode von OLRBY *et al.* (2007)

P450-Monooxygenasen katalysieren die Oxidation eines Substrats (S) unter dem Verbrauch atmosphärischen Sauerstoffs (Abbildung 2.6a). Neben diesen hochspezifisch und substratabhängigen Reaktionen laufen zusätzliche, unspezifische und sauerstoffverbrauchende Reaktionen unter der Bildung von H₂O₂ bzw. H₂O (Abbildung 2.6b, c)

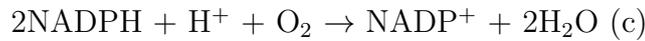
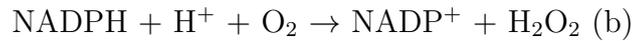
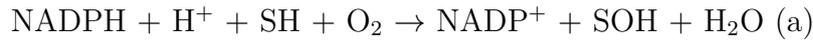


Abbildung 2.6: Sauerstoffverbrauchende Reaktionen unter Beteiligung von P450-Monooxygenasen (a) sowie unspezifisch, ohne direkten Einfluss von P450 ablaufende Reaktionen (b, c).

Der für Messungen in pflanzlichen Systemen bisher selten beschriebene Test wird in einem 96-Well-Fluoreszenzphotometer durchgeführt. Die Vertiefungen in der Mikrotiterplatte sind dabei mit einem sauerstoffsensitiven Farbstoff (Tris (4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin) beschichtet, welcher unter Sauerstoffverbrauch nach Anregung mit 480 nm ein Fluoreszenzsignal bei 620 nm emittiert (siehe Abbildung 2.8). Der Farbstoff ist dabei mit einer für Sauerstoff permeablen, für Flüssigkeiten jedoch undurchlässigen Silikonschicht bedeckt. Wird also im Reaktionsraum über dem Farbstoff Sauerstoff durch sauerstoffzehrende Prozesse verbraucht, kann dies am Photometer anhand einer Fluoreszenzzunahme verfolgt werden.

Die Reaktionsbedingungen im Ansatz waren dabei die folgenden: 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 20 % Glycerol (v/v), 0,1 mM NADPH (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 3 mM Glucose-6-Phosphat (Fluka, Steinheim), 0,4 U Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) sowie 50 bzw. 100 μM des jeweiligen Substrats wurden zu einem Reaktionsmix zusammengefasst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl einer Mikrosomenpräparation (siehe Abschnitt 2.2.6) gestartet. Die Fluoreszenz wurde für die Dauer von 2 Stunden alle 30 Sekunden gemessen. Proben ohne NADPH oder entsprechendes Substrat dienten bei dieser Methode als Kontrollen, um den P450-unabhängigen Sauerstoffverbrauch zu quantifizieren. Die Enzymaktivität wurde anhand der Menge an verbrauchtem Sauerstoff berechnet. Dazu wurde zunächst anhand der in Abbildung 2.7 dargestellten Formeln die gemessene Änderung der Fluoreszenz in die Menge an verbrauchtem Sauerstoff umgerechnet.

$$[\text{O}_2] = (\text{DR}/\text{NRV} - 1)/K_{SV} \text{ (1)}$$

$$K_{SV} = (\text{DR} - 1)/[\text{O}_2]_A \text{ (2)}$$

$$p * V = n * R_m * T \text{ (3)}$$

Abbildung 2.7: Formeln zur Berechnung des Sauerstoffverbrauchs (BD^{TM} -Oxygen-Biosensor).

Die normalisierte relative Fluoreszenz NRF ($\text{NRF} = I/I_A$) beschreibt das Verhältnis der Fluoreszenz der Probe zur Fluoreszenz bei einem atmosphärischem Partialdruck des Sauerstoffs von 0,209 atm.

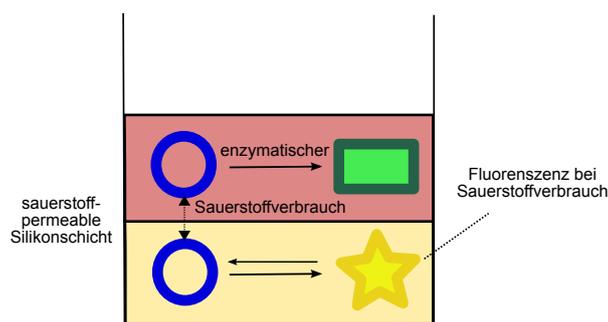


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des BD^{TM} -Oxygen-Biosensor-Systems.

Das stärkste Fluoreszenzsignal tritt bei einer Sauerstoffkonzentration von Null auf. DR (Dynamic Range) gibt das Verhältnis der Fluoreszenz bei einem Sauerstoffgehalt von Null zum Signal bei atmosphärischem Sauerstoffgehalt an ($DR = I_0/I_A$). K_{SV} bezeichnet die Stern-Volmer-Konstante. Für detailliertere Informationen siehe Datenblatt des Herstellers (BD Biosciences – Discovery Labware).

Die Menge an verbrauchtem Sauerstoff wird gegen die Zeit aufgetragen und anhand der Steigung im linearen Bereich der Messung wird die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs bestimmt (atm/s). Die Umrechnung in das verbrauchte Volumen pro Stoffmenge erfolgt über die allgemeine Zustandsgleichung für Gase (Abbildung 2.7, Gleichung 3). Die pro Zeit umgesetzte Menge an Sauerstoff wird auf den Proteingehalt der Probe bezogen und die spezifische Enzymaktivität in nkat/mg Protein angegeben.

2.2.9 Photometrische Bestimmung von Enzymaktivitäten

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Bestimmungen von Enzymaktivitäten in Mikrotiterplatten in einem 96-Well-Spektrophotometer SPECTRAmax Plus 384 (Molecular Devices, Ismaning) durchgeführt und mit der dazugehörigen Analysesoftware Softmax Pro 4.6 ausgewertet. Gemessen wurde der enzymatische Umsatz für die Dauer von 5 Minuten bei einer konstanten Temperatur von 25 °C in einem Intervall von 15 Sekunden. Pro Reaktionsansatz waren 5 % (v/v) Proteinlösung enthalten. Für Messungen im UV-Bereich, d. h. bei Wellenlängen <300 nm wurden geeignete Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen) verwendet, für alle anderen Bestimmungen kamen Standard-Platten der Marke Nunc (Brand, Wertheim) zum Einsatz. Der nichtenzymatisch katalysierte Umsatz wurde mit Proben in denen das Enzym durch Puffer ersetzt wurde, erfasst und von der enzymatischen Reaktion abgezogen. Enzymaktivitäten wurden in μkat ($\mu\text{mol/s}$) ausgedrückt.

Tabelle 2.2: Verwendete Substrate für die Messungen von Glutathion S-Transferasen mit den dazugehörigen Messparametern.

Substrat	Abkürzung	Wellenlänge [nm]	ϵ [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	CDNB	340	9,6
1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	DCNB	345	8,5
4-Nitro-Benzylchlorid	NBC	310	1,8
4-Nitro-Benzoylchlorid	NBoC	310	1,9

2.2.9.1 Glutathion S-Transferasen, GST (EC 2.5.1.18)

Zur Erfassung der verschiedenen Isoformen der GSTs und der damit verbundenen Information über die unterschiedlichen Reaktionstypen, wurde der Transfer von Glutathion auf mehrere Modellsubstrate erfasst. Die in der Arbeit verwendeten Substrate mit dem dazugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ (in $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ angegeben) und der für die Messung des Produkts verwendeten Wellenlänge sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Die Bestimmung der GST-Aktivität wurde für alle Substrate in 0,1 M Tris/HCl pH 6,4 durchgeführt. Die Ausnahme bildete der Test mit 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB) welcher bei pH 7,5 durchgeführt wurde. Die Glutathionkonzentration im Ansatz betrug 1 mM, ebenso die der Substrate 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) und DCNB. Die Substratkonzentration von 4-Nitro-Benzylchlorid (NBC) und 4-Nitro-Benzoylchlorid (NBoC) lag im Assay bei 0,5 mM.

2.2.9.2 Peroxidase, POX (EC 1.11.-.-)

Die Messung der Peroxidaseaktivität in den Enzymextrakten folgte einer Methode nach DROTAR *et al.* (1985). Als Substrat dient bei dieser Methode Guajacol (2-Methoxyphenol, Fluka, Steinheim). Die dabei ablaufende Reaktion ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Der verwendete Puffer war 50 mM Tris/HCl pH 6,0. Im Reaktionsansatz enthalten waren 190 μM H_2O_2 , 68 μM Guajacol. Das Testvolumen betrug 200 μl (190 μl Reaktionsmix + 10 μl Probe). Photometrisch verfolgt wurde die Bildung von Tetraguajacol ($\epsilon=26,6 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 420 nm. Die Reaktionszeit betrug 5 Minuten.

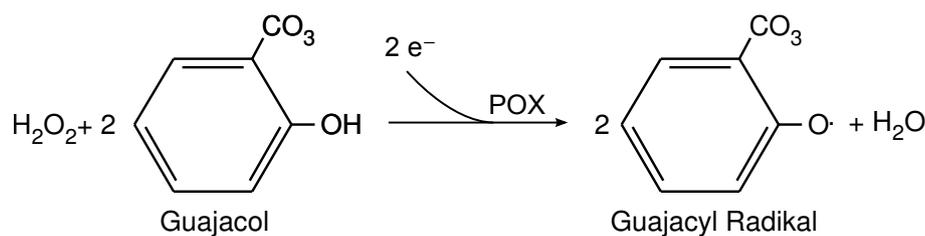


Abbildung 2.9: Reaktionsschema der von der Peroxidase katalysierten Reaktion von H_2O_2 mit Guajacol.

2.2.9.3 Ascorbat-Peroxidase, APOX (EC 1.11.1.11)

Bestimmung der Ascorbat-Peroxidase-Aktivität erfolgte nach VANACKER *et al.* (1998). Die Oxidation von Ascorbat wurde dabei bei pH 7,0 (Kaliumphosphatpuffer) im Photometer bei 290 nm bestimmt ($\epsilon=2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die eingesetzten Substratkonzentrationen im Ansatz betragen 1 mM H_2O_2 und 250 μM Ascorbat. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 200 μl , davon waren 20 μl Probe.

2.2.9.4 Glutathion-Reduktase, GR (EC 1.6.4.2)

Aktivitätsbestimmung der Glutathion-Reduktase erfolgte nach einer modifizierten Methode von ZHANG und KIRKHAM (1996). Das Enzym Glutathionreduktase (GR) reduziert dabei oxidiertes Glutathion (GSSG, Fluka, Steinheim) unter Verbrauch von NADPH (Fluka, Steinheim) in seine reduzierte Form (GSH). Die Abnahme des NADPH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt ($\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Der Reaktionsansatz enthielt die folgenden Komponenten: 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 1 mM GSSG, 2 mM NADPH. Um eine lineare Extinktionsabnahme zu erreichen, wurde der zugesetzte Enzymextrakt ggf. verdünnt. Das Reaktionsvolumen von 200 μl setzte sich aus 190 μl Reaktionsmix und 10 μl Probe zusammen.

2.2.9.5 Katalase (EC 1.11.1.6)

Die Bestimmung der Katalase-Aktivität erfolgte nach der Methode von VERMA und DUBEY (2003). Dabei wird die Konzentrationsabnahme von H_2O_2 bei einer Wellenlänge von 240 nm detektiert. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt $0,0036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Der verwendete Reaktionsansatz setzte sich aus 100 mM KH_2PO_4 Puffer pH 7,0 und 57 mM H_2O_2 zusammen. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 150 μl , davon waren 10 μl Probe.

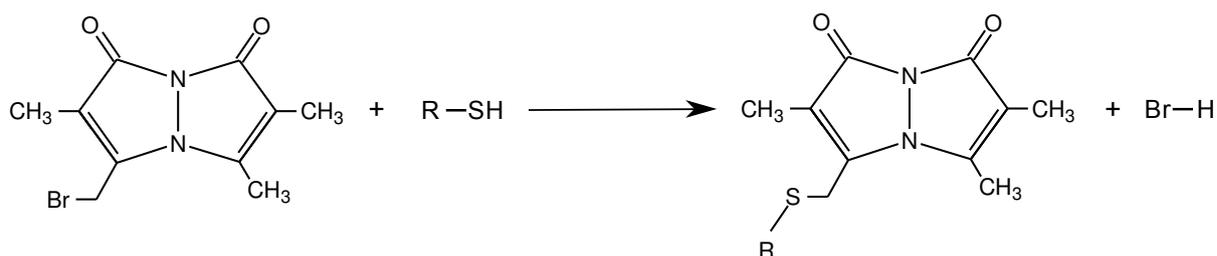


Abbildung 2.10: Reaktionsschema von Monobrombiman mit Thiolgruppen (nach NEWTON et al. 1981).

2.2.10 Quantifizierung der Proteingehalte

Die Bestimmung der Proteingehalte in allen verwendeten Proteinextrakten erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976). Der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (Fluka, Steinheim) ändert bei Anlagerung von Proteinen sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Messung wurde zuvor mit Rinder-Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) als Referenz kalibriert. Coomassie Brilliant Blue wurde im Assay in einer zehnfachen Verdünnung verwendet. Zu 200 µl der Bradford Arbeitslösung wurden 10 µl der Probe pipettiert. Die Messung im Photometer erfolgte nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Die Proteingehalte wurden in mg/ml Probe angegeben.

2.2.11 Bestimmung der Thiolgehalte

2.2.11.1 HPLC-Bedingungen

Die Glutathionbestimmung in Blatt- und Wurzelproben erfolgte nach einer modifizierten Methode von NEWTON *et al.* (1981) mittels RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography). Das verwendete System bestand aus einem HPLC-System (ProStar Modell 215, Varian, Darmstadt), das mit einem Fluoreszenzdetektor (RF-10 AXL, Shimadzu) gekoppelt war. Das Prinzip der Methode basiert auf einer Derivatisierung der in der Probe vorhandenen Thiole mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman (Fluka, Steinheim, siehe Abbildung 2.10). Der Farbstoff reagiert dabei mit der reduzierten Thiolgruppe des in der Probe enthaltenen Glutathions und kann nach einer Anregung bei 385 nm im Fluoreszenzdetektor bei 280 nm detektiert werden.

Als mobile Phase diente bei der verwendeten HPLC-Methode ein mit 2,5 % (v/v) Essigsäure (Merck, Darmstadt) angesäuertes Gemisch aus Methanol und Wasser (MilliQ). Trennung der Thiol-Biman-Derivate erfolgte unter *reversed phase* Bedingungen mit einem linearen Laufmittelgradienten (Abbildung 2.11) und einem Laufmittelfluss von 1 ml/min. Laufmittel A war Methanol 10 % (v/v), Essigsäure 2,5 % (v/v); Laufmittel B war Methanol

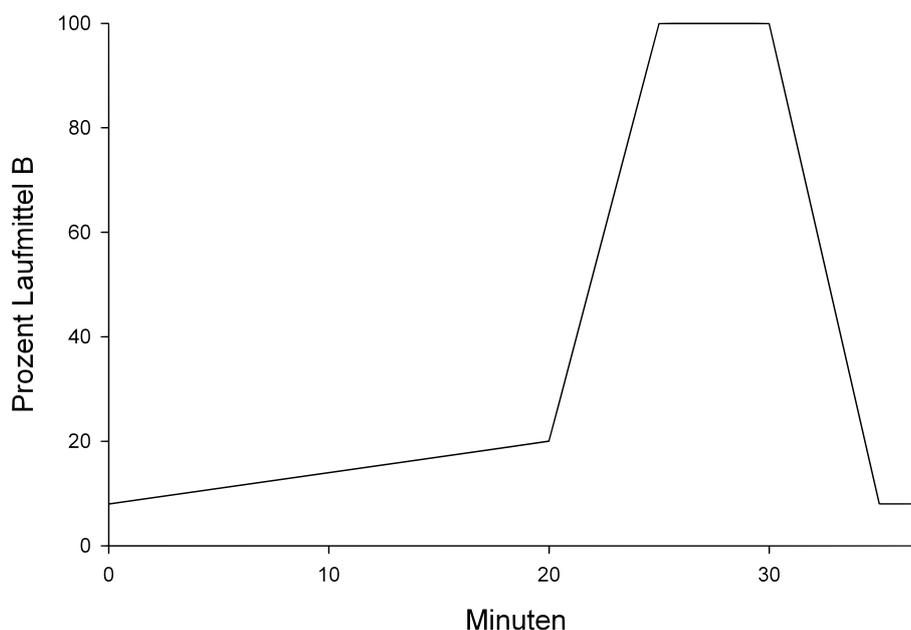


Abbildung 2.11: Verwendeter Laufmittelgradient zur Bestimmung von GSH nach Derivatisierung mit Monobrombiman.

90 % (v/v), Essigsäure 2,5 % (v/v). Alle Laufmittel wurden vor Verwendung filtriert (0,22 μm , Millipore) und im Ultraschallbad für 15 Minuten entgast. Die Identifizierung des Glutathionderivates im Chromatogramm sowie dessen Quantifizierung erfolgte nach Derivatisierung der Reinsubstanz mit einer Kalibriergeraden über den Konzentrationsbereich 12,25- 500 μM GSH (Abbildung 2.12).

2.2.11.2 Probenvorbereitung

Ca. 0,1 g frisches oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagertes Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem sehr feinen Pulver zerrieben und mit 2 ml 0,1 M HCl (Merck, Darmstadt), 1 mM EDTA extrahiert. Nach Homogenisierung wurde für 5 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 12000 U/min zentrifugiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Überstand in zwei Fraktionen zu je 400 μl aufgeteilt. Zu beiden Teilen wurden zunächst 600 μl 0,2 M CHES (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), pH 9,6 pipettiert. Eine Fraktion wurde nun mit 5 μl einer 5 mM NEM-Lösung (N-Ethylmaleimid, Sigma Aldrich, Taufkirchen) für 10 Minuten inkubiert. NEM bindet an die reduzierte Schwefelgruppe des Glutathions, wodurch diese für die spätere Derivatisierung mit Monobrombiman maskiert wird. Der NEM-freien Probe werden, um die Volumenverhältnisse nicht zu verändern, zusätzlich 5 μl der CHES-Lösung zugegeben. Ab diesem Zeitpunkt wird mit beiden Ansätzen wieder identisch verfahren. Zur Reduktion des oxidierten Glutathions wurden 100 μl einer 3 mM DTT-Stammlösung (Dithiothreitol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zugegeben und für mindestens eine Stunde

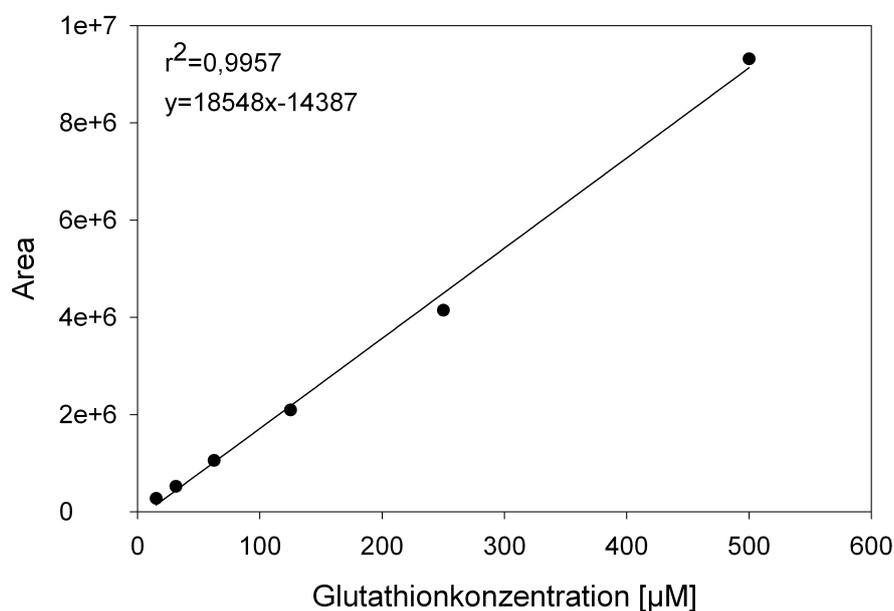


Abbildung 2.12: Eichgerade zur Quantifizierung von Glutathion.

bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 400 µl des vorbereiteten Ansatzes mit 15 µl einer 15 mM Stammlösung von Monobrombiman (gelöst in Methanol, Fluka, Steinheim) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde mit 300 µl 5 % (v/v) Essigsäure abgestoppt.

Die derivatisierten Proben wurden für die HPLC-Analyse durch Spritzenfilter (0,22 µm Carl Roth GmbH, Karlsruhe) filtriert, um eine Belastung des HPLC-Systems durch feinste Partikel zu minimieren. Monobrombiman-Glutathion-Konjugate sind instabil unter Licht und wurden aus diesem Grund in braune HPLC-Vials überführt. Per Autosampler (Modell 410, Varian, Darmstadt) wurden 40 µl der filtrierten Probe injiziert. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der zur HPLC gehörenden Analysensoftware (Varian Star Version 6.6).

2.2.12 Bestimmung der Paracetamol-Konzentration (HPLC)

Die Bestimmung der Menge an freiem Paracetamol im Nährmedium erfolgte mittels HPLC (Pro-Star Modell 215, Varian, Darmstadt) unter *reversed phase*-Bedingungen.

Verwendete Säule war eine C18 Phase vom Typ Prontosil Spheribond (Bischoff, Leonberg) mit den Abmessungen 4.6 x 25 mm und einem Partikeldurchmesser von 5 µm. Injektionsvolumen waren 40 µl einer zuvor filtrierten Probe (0,45 µM, Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Auftrennung auf der Säule erfolgte unter Verwendung eines linearen Laufmit-

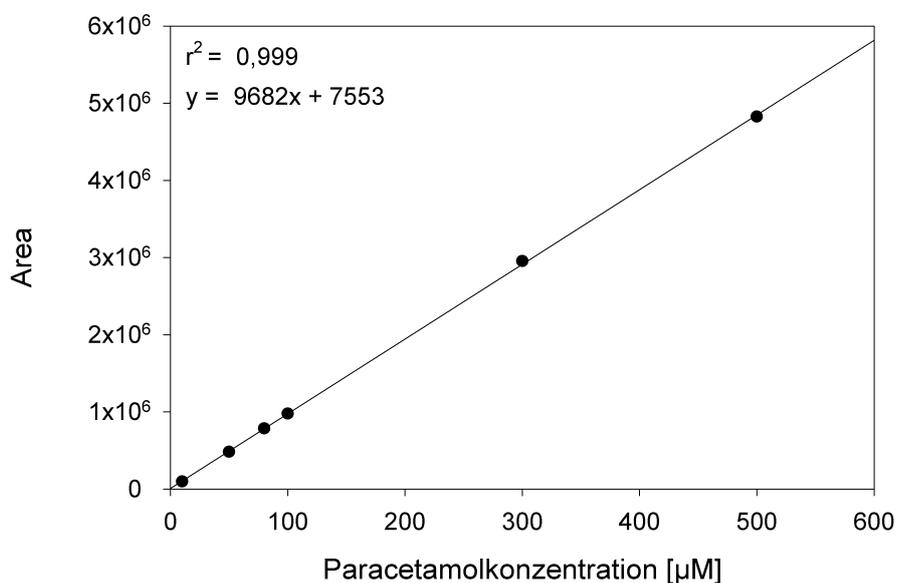


Abbildung 2.13: Eichgerade zur Quantifizierung von Paracetamol (HPLC).

telgradienten (Tabelle 2.3) mit dem folgenden Laufmittelsystem: Laufmittel A war Wasser (MilliQ), Laufmittel B war Acetonitril (Fluka, Steinheim). Beide Laufmittel wurden mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) angesäuert (ca. pH 3), filtriert (0,45 µm, Millipore) und für 20 Minuten im Ultraschallbad entgast. Das Injektionsvolumen betrug 40 µl Probe und wurde per Autosampler injiziert. Die Detektion des Paracetamols erfolgte im Diode-Array-Detektor (ProStar 335, Varian, Darmstadt) bei einer Wellenlänge von 250 nm.

Tabelle 2.3: Verwendeter Laufmittelgradient zur Bestimmung der Paracetamol-Konzentration (HPLC).

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0 - 5	95	5
5 - 15	0	100
15 - 18	0	100
18 - 21	95	5

2.2.13 Extraktion von Paracetamol und Paracetamol-Konjugaten aus Pflanzen

2.2.13.1 Für die LC-MS-Analyse

Die Extraktion von Paracetamol und dessen Metaboliten erfolgte im salzsauren Milieu. 0,5 g Pflanzenmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 1 ml 0,1 M HCl, 1 mM EDTA extrahiert. Zu diesem Zeitpunkt der Extraktion wurde den Proben 10 µl einer 10 mM Acetanilid-Stammlösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) als interner Standard zugegeben (entspricht einer effektiven Konzentration von 100 µM).

2.2.13.2 Für den Verdau mit β -D-Glucosidase (EC 3.2.1.21)

Im Falle des Paracetamols erfolgte die Isolierung des *in vivo* gebildeten Glucose-Konjugats bereits im selben Puffer, in dem später der enzymatische Verdau durchgeführt wurde. Verwendeter Puffer war ein 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,0, was dem pH-Optimum des Enzyms β -D-Glucosidase entspricht.

In beiden Fällen wurden die Proben für 15 Minuten bei 18 000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurden dann 500 µl für die Festphasenextraktion eingesetzt.

2.2.14 Extraktion von Diclofenac und Diclofenac-Konjugaten aus Pflanzen

2.2.14.1 Für die LC-MS-Analyse

Aufgrund der geringeren Wasserlöslichkeit von Diclofenac wurde die Extraktion von Diclofenac und dessen Metaboliten mit 0,1 M HCl/Acetonitril (50/50, v/v) durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt der Extraktion wurde den Extrakten als interner Standard 5-(p-Methylphenyl)-5-phenylhydantoin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Konzentration von 10 mg/l (20 µl einer 100 mg/l Stammlösung) zugegeben. Die Ansätze wurden für 15 Minuten bei 4 °C und 10000 U/min zentrifugiert. Für die anschließende Festphasenextraktion wurden 500 µl des Überstands eingesetzt. Die am Ende bis zur Trockene eingedampfte Probe wurde unmittelbar vor der Analyse in 200 µl 0,1 % (v/v) Ameisensäure aufgenommen.

2.2.14.2 Für den Verdau mit β -D-Glucosidase

Für den Verdau mit β -D-Glucosidase mussten die Proben aus 2.2.14.1 zunächst umgepuffert werden. Dazu wurden diese in der SpeedVac bis zur Trockene eingedampft und daraufhin in 400 µl 50 mM Natrium-Phosphat Puffer pH 5,0 resuspendiert.

2.2.15 Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE)

Die LC-MS-Analyse von pflanzlichen Extrakten und verschiedenen *in vitro*-Tests setzt eine geeignete Form der Probenvorbereitung voraus. Proteinpräzipitation und vor allem die Festphasenextraktion (SPE) sind dabei wesentliche Bestandteile des sogenannten *Clean Ups*. Ziel der Probenvorbereitung ist es, Verunreinigungen bzw. Bestandteile der Matrix, welche die Ionisierung der Analyten im Massendetektor beeinflussen können, zu entfernen. Die für die Analyse der Arzneimittel und deren Metaboliten verwendete Festphase war Strata-XTMgepackt mit 300 mg Säulenmaterial der Firma Phenomenex (Aschaffenburg).

Die gesamte Festphasenextraktion wurde mit den genannten SPE-Kartuschen und einer Vakuumbbox (Phenomenex, Aschaffenburg) durchgeführt. In einem ersten Waschschrift wurden die Säulen mit 1 ml Methanol beschickt. Die Konditionierung erfolgte im Anschluss mit 1 ml H₂O (MilliQ). Auf die so konditionierte Säule wurde die eigentliche Probe (Probenvolumen: 500 - 1000 µl) aufgetragen. In einem Waschschrift mit 1 ml 5 % MeOH (v/v) wurden wasserlösliche und schwach lipophile Probenbestandteile entfernt. Danach würden die Säulchen für 30 Sekunden im Vakuum vollständig getrocknet. Die Elution der Analyten erfolgte mit einem Gemisch aus Acetonitril und Methanol (50/50, v/v). Das Elutionsvolumen war 1 ml.

Um eine maximale Bindung der Analyten an die Säulenmatrix zu gewährleisten, ist vor allem beim Auftragen der Probe sicherzustellen, dass eine Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min nicht überschritten wird. Im Normalfall war bei allen Schritten der Durchfluss unter Einwirkung der Schwerkraft ausreichend. Lediglich in wenigen Fällen (bei einzelnen Säulen oder hohem Partikelanteil in der Probe) musste der Durchfluss durch Anlegen eines Vakuums induziert werden. Auch hierbei war die Stärke des angelegten Vakuums so zu wählen, dass die oben genannte Flussrate nicht überschritten wurde.

Die so extrahierte Proben wurden nun entweder für die Analyse weiter verdünnt oder unter Vakuum bis zur Trockene in der SpeedVac eingedampft. Auf diese Art konnten Proben bei -20 °C gelagert werden. Erst unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben wieder in 200 µl 0,1 % (v/v) Ameisensäure aufgenommen.

2.2.16 LC-MS-Analyse

Alle LC-MS-Messungen wurden an einem 500-MS Gerät der Firma Varian (Darmstadt) durchgeführt. Bei dem Gerät handelt es sich um eine sogenannte Ionenfalle mit pneumatisch unterstützter ESI-Ionisierung. Das HPLC-System bestand aus zwei Pumpen (ProStar 210, Varian, Darmstadt). Die verwendete Säule war eine LC-MS-Säule vom Typ Synergy-Hydro-RP (Phenomenex, Aschaffenburg) mit einem für polare Analyten optimierten

Tabelle 2.4: Verwendeter Laufmittelgradient bei der LC-MS-Analyse von Paracetamol und Diclofenac.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0 - 2,0	97	3
2,0 - 10,0	5	95
10,0 - 12,5	5	95
12,5 - 14,5	97	3
14,5 - 17,0	97	3

Endcapping. Säulenabmessungen waren 50 mm × 2 mm (ID) bei einer Partikelgröße von 4 µm. Verwendete Laufmittel waren A: 0,1 % (v/v) Ameisensäure und B: Acetonitril 0,1 % (v/v) Ameisensäure (beide waren LC-MS-Grade, Carl Roth GmbH, Karlsruhe).

2.2.16.1 Paracetamol und Metaboliten

Paracetamol und seine Stoffwechselprodukte wurden durch Anwendung eines linearen Laufmittelgradienten aufgetrennt (Tabelle 2.4).

Das Massenspektrometer wurde für die Paracetamolanalytik im Modus für die positive Ionisierung betrieben. Die Einstellung der folgenden Parameter am Gerät wurde in Vorversuchen ermittelt. Ziel dabei ist es, durch Optimierung der Messparameter die höchstmögliche Empfindlichkeit für die einzelnen Analyten zu erreichen. Im Einzelnen wurden die Messungen mit den folgenden Einstellungen am Massenspektrometer durchgeführt. Kapillar-Spannung: 40 V; Nadel-Spannung: 4000 V; Sprayshield-Spannung: 600 V; Druck des Zerstäubergases: 50 psi (3,45 bar); Druck des Trocknungsgases: 30 psi (2,1 bar); Temperatur des Trocknungsgases: 300 °C; MS/MS-Experimente wurden durch CID (*collision induced dissociation*) mit Helium als Kollisionsgas durchgeführt.

Für die Quantifizierung der gebildeten Metaboliten wurden die folgenden Massenübergänge detektiert. Angegeben ist immer das *precursor ion* und das bei der Fragmentierung entstehende Produkt-Ion mit der höchsten Abundanz, dessen Peakfläche im Chromatogramm integriert wird. 136→94 (Acetanilid, interner Standard), 152→110 (Paracetamol), 457→328 (Paracetamol-Glutathion), 328→182 (Paracetamol-Cystein) und 314→152→110 (Paracetamol-Glucopyranosid). Quantifizierung des freien Paracetamols erfolgte über eine Kalibriergeraden mit dem Reinstoff unter identischen Analysebedingungen.

2.2.16.2 Diclofenac

Für die Auftrennung des Diclofenac und dessen Metaboliten wurde der gleiche lineare Laufmittelgradient wie für die Paracetamolanalytik verwendet. Die Detektion der Metabo-

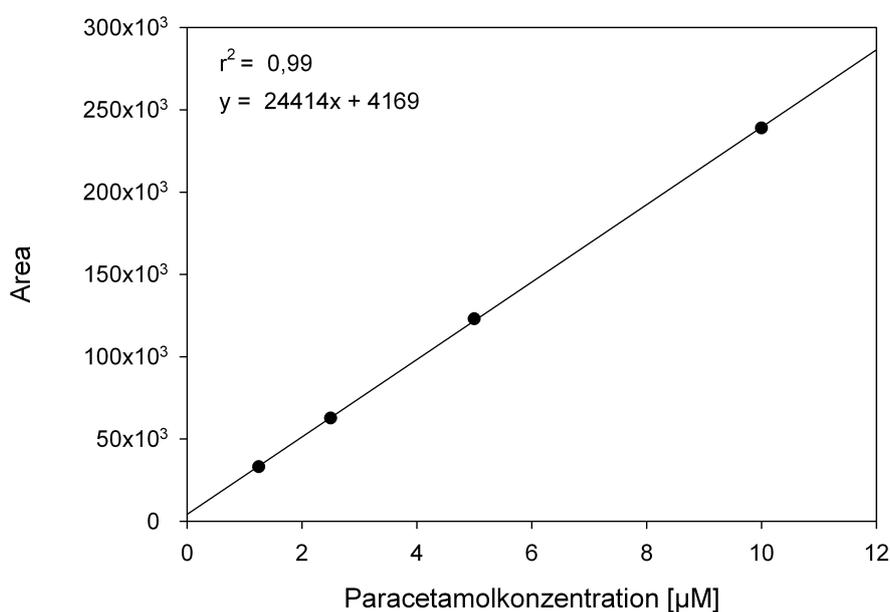


Abbildung 2.14: Kalibriergerade für Paracetamol ($M+H$)⁺ m/z 152 (MS/MS).

liten erfolgte bei positiver und bei negativer Ionisierung. Die Bedingungen entsprachen den oben genannten. Es wurden die folgenden Massenübergänge analysiert und quantifiziert: 296→250 (Diclofenac); 312→294 (4'-OH-Diclofenac); 474→312 (Diclofenac-Glucopyranosid); 267→196 (interner Standard) 310→292 (Diclofenac-2,5-Iminoquinon).

2.2.17 Enzymatische Hydrolyse der gebildeten Glucopyranoside

Die Bestätigung der Bildung von Arzneimittel O-Glucosiden erfolgte neben den massenspektrometrischen Untersuchungen zusätzlich über den enzymatischen Verdau mit β -D-Glucosidase, welche enzymatisch die O-glycosidische Bindung zwischen Xenobiotikum und dem Zuckerrest spaltet. Im Chromatogramm ist nach dem enzymatischen Verdau des Glycosids folglich eine Abnahme des Glycosidsignals bei gleichzeitiger Zunahme des Signals für das Aglycon zu beobachten. 400 µl eines wie oben beschrieben hergestellten Extrakts wurden mit 100 U β -D-Glucosidase für eine Stunde bei 36 °C im Wasserbad inkubiert.

2.2.18 Aufnahmekinetik mit radioaktiv ^{14}C -markiertem Diclofenac

Um die Aufnahme von Diclofenac in Gerstenpflanzen zu quantifizieren, wurden Expositions-Experimente mit ^{14}C markiertem Diclofenac durchgeführt. Die ^{14}C Markierung befand sich bei dem verwendeten Präparat an der Carboxylgruppe des Diclofenac-Moleküls.

Für die Experimente wurden die unter Abschnitt 2.1 beschriebenen axenisch angezogenen Gerstenpflanzen verwendet. Die Pflanzen wuchsen ohne sichtbare Kontamination durch Pathogene in 50 Gramm Glasperlen und 12 ml MS-Medium. Das Alter der Pflanzen betrug zum Zeitpunkt der Belastung 10 Tage. Die Belastung der Pflanzen erfolgte mit zwei Diclofenac-Konzentrationen: 10 und 100 μM . Hierzu wurden zunächst entsprechende Stammlösungen (1,3 mM und 130 μM) mit der nicht radioaktiven Trägersubstanz hergestellt. Das radioaktive Präparat wurde zu Beginn quantitativ aus dem Vial pipettiert und auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt, dessen Radioaktivität vor dem eigentlichen Experiment bestimmt wurde. Die tatsächlich gemessene Menge an ursprünglich vorhandener Radioaktivität bildete die Grundlage für die Menge mit der jede einzelne Pflanze beaufschlagt werden konnte und entsprach einer Radioaktivität von 0,9 μCi pro Pflanze. Das radioaktive Präparat wurde dann den beiden Stammlösungen mit der Trägersubstanz zugegeben. Für beide verwendeten Konzentrationen wurde ein ausreichend großes Volumen für eine Szintillationsmessung aliquotiert. Die Applikation des Wirkstoffes erfolgte mit Hilfe von sterilen 5 ml Einwegspritzen und 10 cm langen Kanülen über den seitlichen Einlass der Glasröhren, welcher mit einem Silikonseptum verschlossen war. Hierzu wurde zunächst das Septum mit der Kanüle der Spritze durchstoßen und die Kanüle ca. 1 cm tief in den Glasperlen platziert. Exakt 1 ml der Stammlösung wurde dann mit der Pipette in die geöffnete Spritze pipettiert und langsam in die Nährlösung injiziert. Im Anschluss wurde die Spritze noch 2 mal komplett gefüllt und wieder entleert, um eine gleichmäßige Distribution des radioaktiven Präparats in den Glasperlen und der Nährlösung zu gewährleisten.

Die Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen ohne künstliche Beleuchtung mit einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Erntezeitpunkte waren 8, 12, 24 und 48 Stunden nach der Applikation des Diclofenacs.

Zur Bestimmung der aufgenommenen Wirkstoffmenge wurden die Pflanzen vorsichtig mit einer Pinzette aus den Glasröhrchen entnommen und in Wurzel, Primär- und Fahnenblatt separiert. Die Wurzeln wurden zunächst mit 5 ml Acetonitril und ein weiteres Mal mit 5 ml H_2O (bidest.) gewaschen. Von allen Pflanzenteilen wurde sofort das Frischgewicht bestimmt. Für jeden Zeitpunkt und für jede Konzentration wurden zwei Pflanzen als unabhängige Replikate verwendet.

Für die Extraktion wurden die einzelnen Pflanzenteile separat unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 5 ml 50 % Acetonitril (v/v) für 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Für die Szintillationsmessungen wurden sowohl die auf diese Weise hergestellten Extrakte als auch Aliquots der zum Waschen der Wurzeln verwendeten Lösungen sowie Proben der Nährlösung eingesetzt. Zu 5 ml Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden 100 µl des Nährmediums sowie jeweils 1 ml der Pflanzextrakte und der Waschlösungen pipettiert. Von den verwendeten Stammlösungen wurden 10 µl zu ebenfalls 5 ml Szintillationscocktail pipettiert. Die Proben wurden in Zweifach-Bestimmungen für je 5 Minuten in einem LS 6500 Szintillations-Zählgerät (Beckman, USA) gemessen.

2.2.19 Inkubationen von Diclofenac und Peroxidase

Um den Umsatz von Diclofenac durch pflanzliche Peroxidasen in Anwesenheit von H_2O_2 zu charakterisieren, wurden Inkubations-Experimente durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurden diese mit Tris/HCl Puffern bei den genannten pH-Werten durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 0,05 M Tris/HCl, H_2O_2 , Diclofenac in der jeweils angegebenen Konzentration (eingestellt mit einer 10 mM Stammlösung), 0,4 U Meerrettich-Peroxidase (20 µl einer 20 U/ml Stammlösung, Sigma Aldrich, Steinheim) bzw. 50 µl eines Enzymextrakts von Gerste bzw. Meerrettich (siehe Abschnitt 3.12). Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes war 1 ml. Die Inkubation wurde bei 30 °C im Wasserbad durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 10 Minuten.

Die Aufnahme eines optischen Spektrums über einen Wellenlängenbereich von 250-800 nm sowie die Extinktionsänderung bei 450 nm über die Zeit wurden in einem Spektrophotometer (DU 800, Beckman Coulter) in 1 ml Kunststoff-Einmalküvetten gemessen.

2.2.20 Charakterisierung des Umsatzes von Diclofenac durch Meerrettich-Peroxidase mit sequentieller stopped-flow-Spektrometrie

Die stopped-flow-Methode ermöglicht eine Messung der Geschwindigkeit und die Untersuchung der Kinetik schnell ablaufender chemischer Reaktionen. Hierbei werden die Substanzen, die miteinander reagieren sollen zunächst getrennt voneinander vorgelegt und mit einem geeigneten Verfahren gemischt. Nach der Durchmischung werden spektrometrisch die Konzentrationen der entstandenen Produkte und Intermediate über einen zeitlichen Verlauf bestimmt. Mit der Methode können chemische Reaktionen im Zeitbereich von wenigen Millisekunden spektrometrisch erfasst werden. Die Durchmischung der Substanzen erfolgt über zwei Spritzen mit der die Reaktionspartner sehr schnell in eine optische Zelle gepresst werden. Die Vorgänge, die beim Mischen und beim Transport der Lösungen in die Reaktionszelle ablaufen, können nicht erfasst werden. Der nicht erfassbare

Zeitbereich einer Reaktion wird in diesem Zusammenhang als Totzeit bezeichnet und ist eine gerätespezifische Konstante, die meist im Bereich weniger Millisekunden liegt.

Die Charakterisierung der Reaktion von Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit Diclofenac erfolgte mittels stopped-flow Spektrometrie. Dazu wurden die Konzentrationen der folgenden Lösungen spektrometrisch bestimmt. Meerrettich-Peroxidase (HRP) hatte einen Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon=102 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 402 nm (DUNFORD und STILLMAN, 1976) und H_2O_2 ein $\varepsilon=39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 240 nm (MARQUEZ und DUNFORD, 1995). Die Reinheit der verwendeten Peroxidase wurde durch Bestimmung des Reinheitszahl ($\text{RZ}=\text{A}_{\lambda=403\text{nm}} / \text{A}_{\lambda=280\text{nm}}$) bestätigt. Der RZ-Wert betrug 2,8. Pre-steady state kinetische Daten wurden an einem stopped-flow Spektrometer (SX.18MV-R, Applied Photophysics, Leatherhead, Großbritannien) erhoben. Alle Reaktionen wurden bei 23,5 °C und pH 5,5 in einem McIlvaine-Puffersystem aus 0,1 M Citrat- / 0,2 M Phosphatpuffer (MCILVAINE, 1921; DAWSON *et al.*, 1986), wie es standardmäßig zur Bestimmung von Peroxidase-Aktivität verwendet wird, durchgeführt (SCIANCELEPORE *et al.*, 1985; BESTWICK, 1998; MAKKAR *et al.*, 2006). Die Isolation der Enzymintermediate erfolgte mit Hilfe eines Dualspritzen-Systems durch das Mischen gleicher Mengen der beiden Reaktionspartner. Peroxidase HRP-Compound I (HRP-CI) wurde durch Mischen äquimolarer Mengen der HRP-Peroxidase und H_2O_2 erzeugt. HRP-CI bildete sich nach 0,7 s und war für 3 s stabil. Die Reaktion von HRP-CI mit Diclofenac (gelöst in McIlvaine Puffer, 1 % DMSO (v/v)) wurde mit einer sequentiellen stopped-flow spektrometrischen (mit 4 Spritzen) Methode verfolgt. Die Spritzen wurden dabei mit Druckluft (8 bar) bewegt und die Lösung so in eine optische Zelle mit einem Volumen von 20 μl und einer Schichtdicke von 10 mm transferiert. Die Totzeit betrug 0,00128 s. Veränderungen in den Spektren wurde mit einem Diodenarray-Detektor als 3D-Daten (Wellenlänge/Absorption/Zeit) detektiert und mit der Acorn Pro K Global Analysis Software (Applied Photophysics Ltd., Leatherhead, Großbritannien) und der Specfit/32 Global Analysis System (Spectrum Software Associates, Marlborough, MA, USA) Analysensoftware ausgewertet.

Die Anzahl und Identität der Peroxidase-Intermediate wurde mit Singulärwertzerlegung (*singular value decomposition* - SVD) und Faktorenanalyse (*evolving factor analysis* - EFA) bestimmt. Ein kinetisches Modell wurde den Daten angepasst und die Reaktionsgleichung wurde nach der nichtlinearen Kleinstquadrat-Methode mithilfe numerischer Integration (der Levenberg Marquardt Algorithmus findet ein Parameter-Set, das in einem minimalen quadratischen Summenwert resultiert) gelöst.

Ratenkonstanten pseudo 1. Ordnung (k_{obs}), die aus der Modellierung stammten, wurden gegen die Diclofenac-Konzentration aufgetragen. Ratenkonstanten zweiter Ordnung (k)

ergaben sich aus der Steigung der linearen Regression, die auf die Daten angewendet wurde (Daten aus fünf Messungen)¹.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse für die Bestimmung der Enzymaktivitäten von GSTs und den Enzymen des Stress-Stoffwechsels erfolgte mit der Software MS Excel (Microsoft, USA). Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau p wurde bei 0,05 festgelegt.

¹In Kooperation mit Dr. Martina Preiss im Labor von Prof. Patricia J. Harvey, School of Science, University of Greenwich, Großbritannien

3 Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil gliedert sich in die mit den beiden Wirkstoffen Paracetamol und Diclofenac durchgeführten Experimente. Die hier dargestellten Ergebnisse für die Paracetamolexperimente basieren auf den bereits im Rahmen der vorliegenden Dissertation veröffentlichten Daten (HUBER *et al.*, 2009). Alle Experimente mit Paracetamol wurden mit der axenischen Wurzelkultur von *A. rusticana* durchgeführt. Für diese Studien wurden Meerrettich-Wurzelzellen über das Nährmedium mit 1 mM Paracetamol belastet. Das Hauptaugenmerk dieser ersten Pilotstudie lag auf der Etablierung einer leistungsfähigen LC-MS-Analytik zur Identifizierung von pflanzlich gebildeten Paracetamol-Metaboliten.

Im zweiten Teil der Arbeit, der sich intensiv mit dem Metabolismus und der Wirkung von Diclofenac in Pflanzen auseinandersetzt, wurden zusätzlich zur Zellkultur auch Experimente mit Gerste (*H. vulgare*) durchgeführt, um den Metabolismus der Substanz sowohl in den Wurzeln, als auch in Spross und Blättern aufdecken zu können.

3.1 Paracetamol

3.1.1 Aufnahme von Paracetamol in Wurzelzellen von *A. rusticana*

Da in der Literatur nur sehr wenige Ergebnisse zur Aufnahme von Pharmazeutika in Pflanzen vorliegen, wurde ein Kurzzeitexperiment zur Aufnahme von Paracetamol aus der Nährlösung und in die Wurzelzellen von *A. rusticana* durchgeführt. Dazu wurden Proben sowohl der Nährlösung als auch der Zellen nach 0, 1, 2, und 3 Stunden nach Zugabe des Pharmazeutikums genommen und auf ihren Gehalt an freien Paracetamol mittels HPLC-DAD untersucht. Vor der Analyse wurden die Wurzelzellen 2 mal mit Wasser gewaschen um adhärentes Paracetamol abzuwaschen.

Die Analyse der Proben deutet auf die stärkste Aufnahme während der ersten zwei Stunden des Experiments hin. Wie Abbildung 3.1 zeigt, erreichte der Gehalt an Paracetamol bereits dann sein Maximum und stieg in der letzten Stunde des Inkubationszeitraums kaum weiter an. In der Nährlösung konnte über die drei Stunden eine Paracetamol Abnahme um nahezu 30 Prozent ermittelt werden. Wie auch bei den Gehalten in den Zellen kam es nach den ersten 2 Stunden zu keiner weiteren signifikanten Veränderung in der Konzentration.

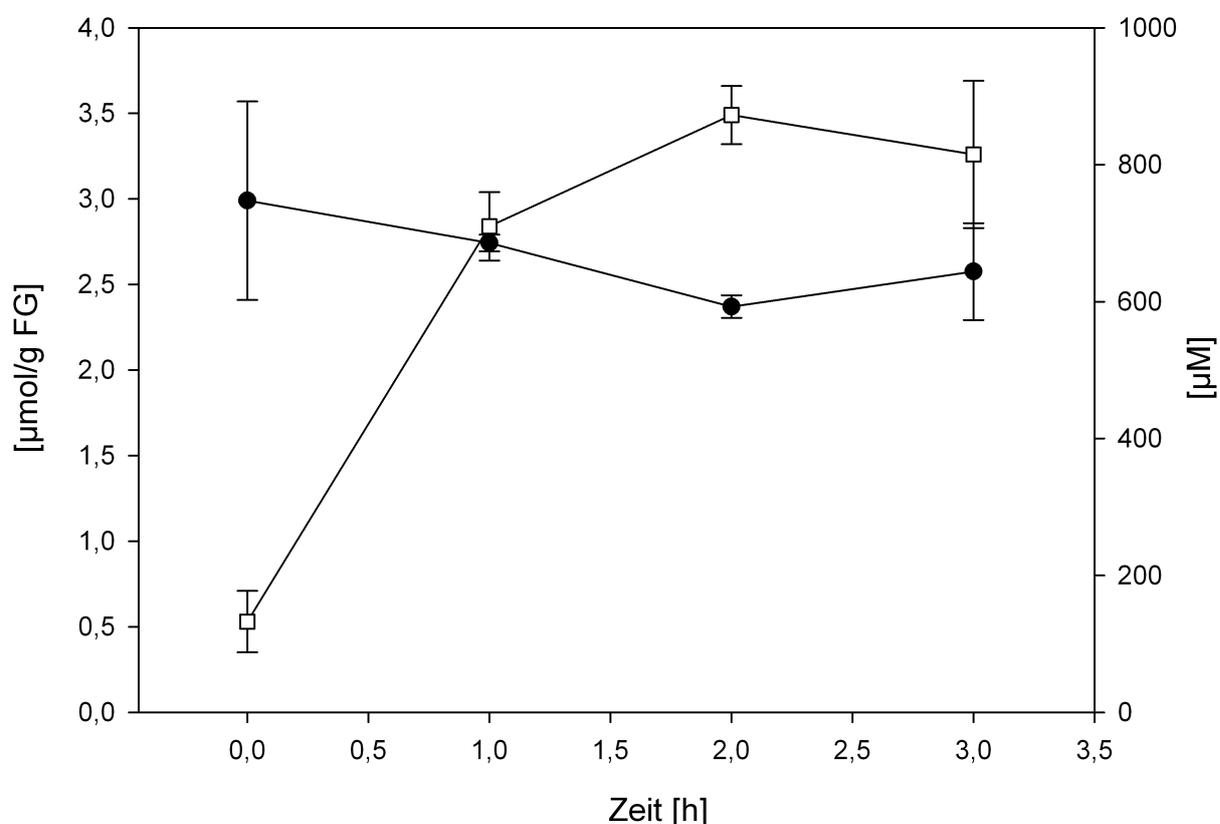


Abbildung 3.1: Menge an freiem Paracetamol in Wurzelzellen von *A. rusticana* (□, primäre Y-Achse links) und im Kulturmedium (●, sekundäre Y-Achse rechts) nach drei Stunden Inkubation mit 1 mM Paracetamol. Datenpunkte sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung. Mengen beziehen sich auf 1 g frische Zellen bzw. die Konzentration [μM] im Medium.

3.1.2 LC-MS-Analyse von Paracetamol und Paracetamol-Metaboliten

3.1.2.1 Glutathionabhängige Detoxifizierung

In den ersten Belastungsexperimenten mit *A. rusticana*-Wurzelzellen stand die Identifizierung und die Charakterisierung der in Pflanzen entstehenden Stoffwechselprodukte im Vordergrund. Zu Beginn wurde der Reinstoff Paracetamol analytisch charakterisiert. Dazu wurde zunächst das Massenspektrum des Analyten sowohl im positiven als auch im negativen Modus in einem *Full Scan* über einen ausreichende großen Massenbereich aufgezeichnet. Die Entscheidung über die Art der Ionisierung ist abhängig von der Signalstärke des Analyten. Alle massenspektrometrischen Untersuchungen an Paracetamol und seinen Stoffwechselprodukten wurden aufgrund des schwächeren Signals im *Negativ-Modus* bei

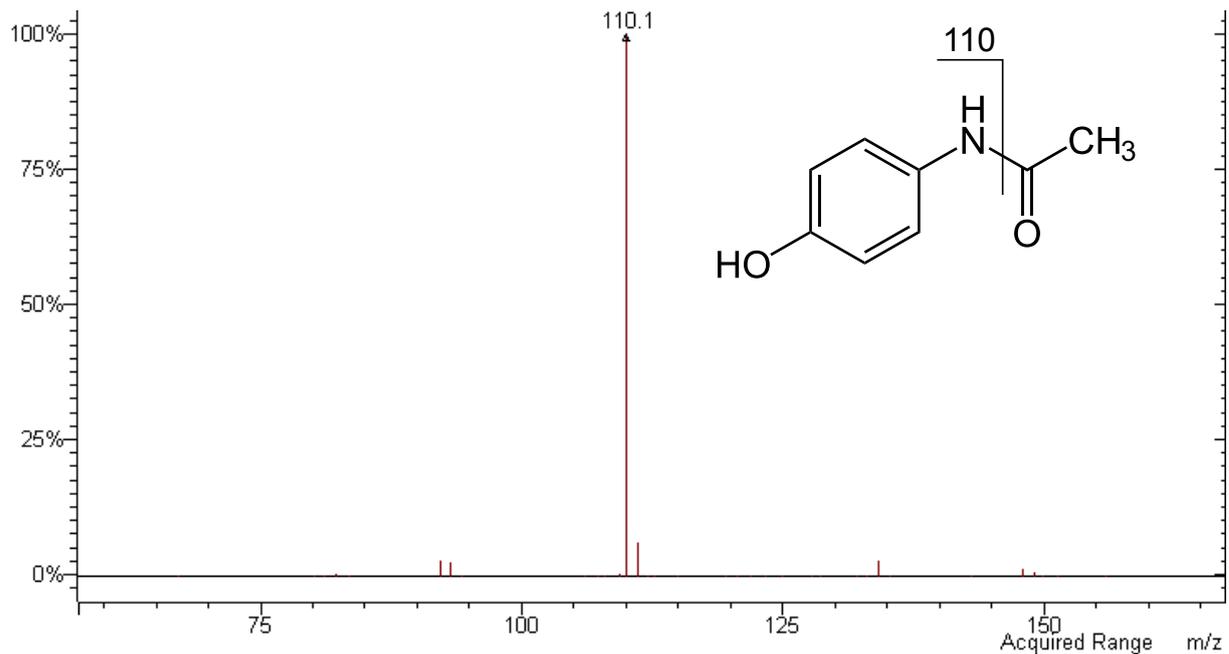


Abbildung 3.2: MS/MS-Spektrum von $(M+H)^+$ m/z 152 (Paracetamol).

positiver Ionisierung durchgeführt. Neben dem Massenspektrum des Analyten wird im aufgenommenen Chromatogramm die Retentionszeit registriert.

Fragmentierungsexperimente mit dem analytischen Standard erlauben es, Aussagen über die dabei entstehenden Fragmente unter den jeweiligen analytischen Bedingungen zu treffen. Zudem verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis und damit die Sensitivität und Selektivität der Methode in MS/MS-Experimenten dramatisch. Für die Quantifizierung von Analyten bei MS/MS-Messungen zieht man die Menge des bei der Fragmentierung entstehenden Leittons, d. h. des am häufigsten auftretenden Ions, heran. Paracetamol zerfällt bei der Kollision mit Helium-Kernen bei positiver Ionisierung in ein Fragment mit m/z 110 (Abbildung 3.2).

Dieses Fragment entsteht durch einen Bruch am Stickstoffatom im Paracetamolmolekül unter Anlagerung von zwei Protonen und entspricht dem in der Literatur beschriebenen Produktion $(NH_3-C_6H_4-OH)^+$, das durch Abspaltung von $CO=CH_2$ entsteht (MUTLIB *et al.*, 2000). Das bei MS/MS-Experimenten mit Paracetamol (m/z 152) entstehende Massenspektrum ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Ein im Säugerorganismus zentraler Schritt bei der Entgiftung von Paracetamol ist die Konjugation des aktivierten Paracetamols mit reduziertem Glutathion. Die Konjugation eines Xenobiotikums mit Glutathion, durch GSTs katalysiert oder spontan ablaufend, ist in Pflanzen ebenfalls weit verbreitet und von großer Bedeutung. Bis zu diesem Zeitpunkt jedoch war in Pflanzen kein Glutathion-Konjugat von Paracetamol beschrieben.

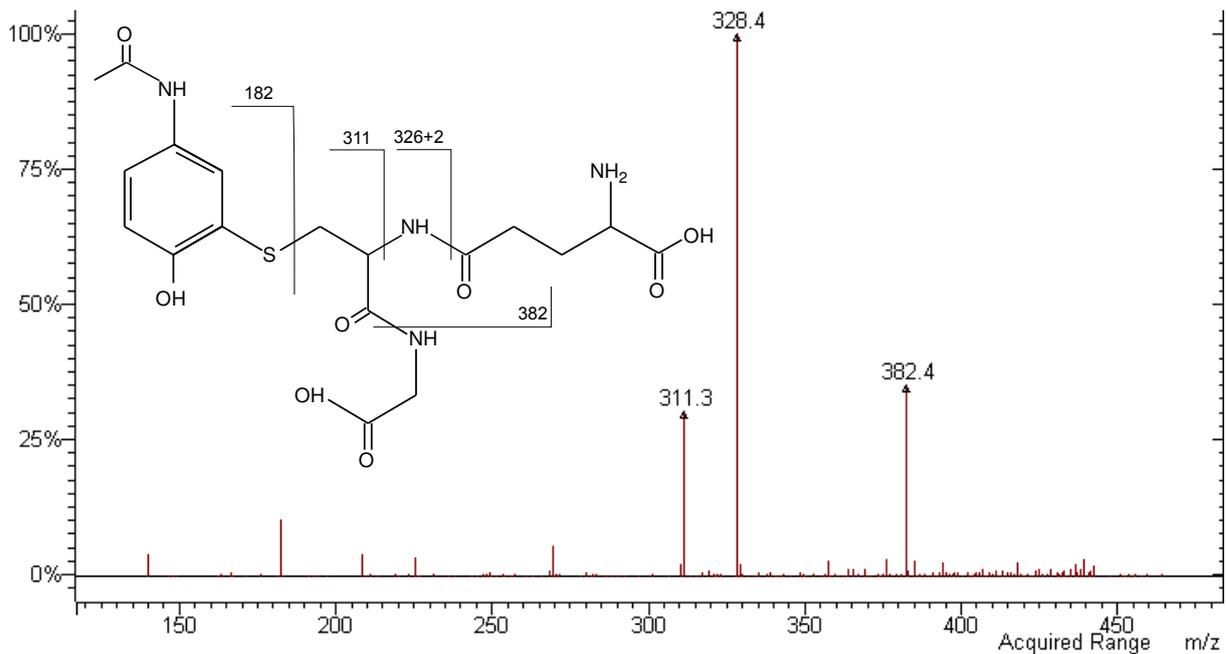


Abbildung 3.3: MS/MS-Massenspektrum von $(M+H)^+$ m/z 457 (Paracetamol-Glutathion) einer mit 1 mM Paracetamol behandelten *A. rusticana* Probe (positive Ionisierung).

Ein Paracetamol-Glutathion-Konjugat zeigt bei positiver Ionisierung im Massenspektrometer ein pseudomolekulares Ion von m/z 457. Das verwendete Massenspektrometer mit der dazugehörigen Analyse-Software erlaubte eine Auflösung der einzelnen Ionenspurten und deren Darstellung im Chromatogramm. In den Proben von mit Paracetamol behandelten Zellen konnte bei einer Retentionszeit von 3,75 Minuten ein Signal mit m/z 457 detektiert werden, welches in den Proben der unbehandelten Kontrollen fehlte, was einen deutlichen Hinweis auf einen Paracetamol-abhängigen Metaboliten gab. Für die nachfolgenden Analysen wurde der entsprechende Extrakt für MS/MS-Experimente für die Substanz mit m/z 457 weiterverwendet.

Glutathion-Konjugate zeigen in MS/MS-Experimenten sehr häufig einen Massendefekt von 129 Da, der aus der Abspaltung des Glutamyl-Rests vom Glutathion resultiert und als Indikator für entstandene Glutathionkonjugate betrachtet werden kann. Abbildung 3.3 zeigt das bei der Fragmentierung von m/z 457 entstandene Massenspektrum sowie den vorgeschlagenen Weg der Fragmentierung am Molekül. Neben der erwähnten Abspaltung des Glutamyl-Rests, die für das am häufigsten auftretende Fragment von m/z 328 verantwortlich ist, entstanden bei der Fragmentierung drei weitere Fragmente mit m/z 382, 311 und 182. Bis auf m/z 182, welches durch ein Aufbrechen der Bindung zwischen dem Kohlenstoff und dem Schwefelatom entsteht, resultieren diese Fragmente aus Abspaltungen an der Glutathionstruktur des Konjugats.

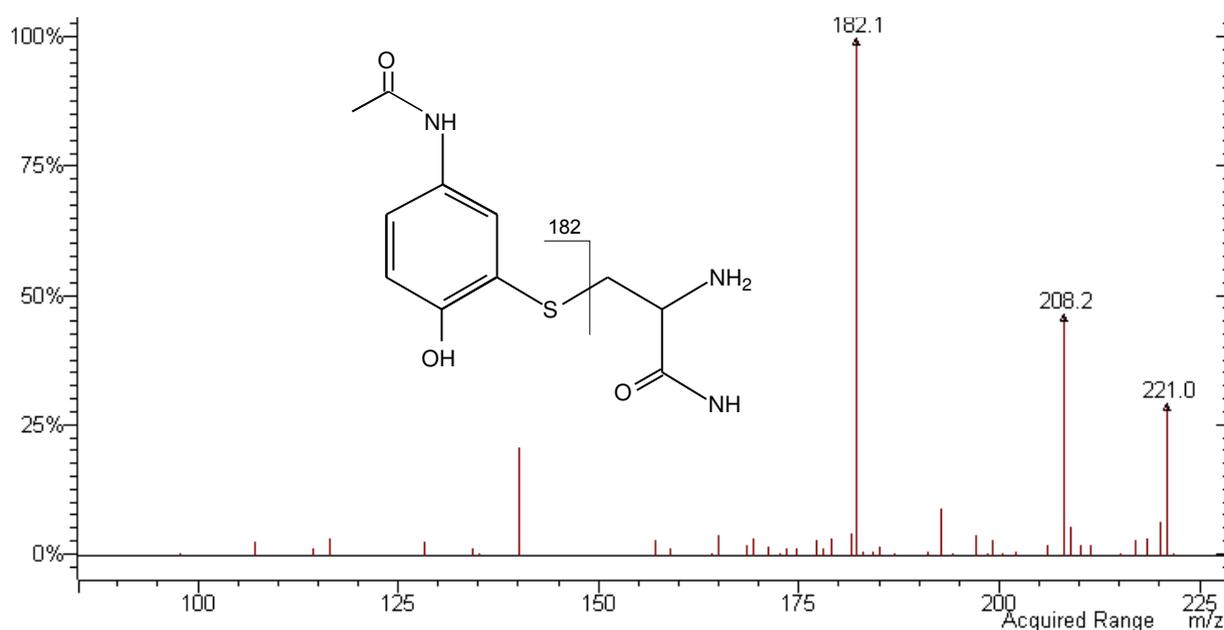


Abbildung 3.4: MS/MS-Massenspektrum von $(M+H)^+$ m/z 271 (Paracetamol-Cystein) in einer mit 1 mM Paracetamol behandelten *A. rusticana* Probe (positive Ionisierung).

Für eine Quantifizierung des entstandenen Paracetamol-Glutathion-Konjugats wurde im weiteren Verlauf die Menge des bei der Fragmentierung entstandenen Fragments m/z 328 quantifiziert.

Glutathion-Konjugate stellen im Normalfall nicht den Endpunkt der Detoxifizierungskaskade dar. Es folgen weitere enzymatisch katalysierte Degradationsreaktionen am Glutathionmolekül. So konnte auch im vorliegenden Fall in den Zellextrakten, welche das Glutathion-Konjugat enthielten, bei einer Retentionszeit von drei Minuten ein weiteres Signal mit m/z 271 nachgewiesen werden, welches eindeutig dem Entgiftungsstoffwechsel des Paracetamols zugeordnet werden konnte. Ein Massen-Ladungsverhältnis von 271 entspricht $[M + H]^+$ eines Paracetamol-Cysteinyl-Konjugats. Im MS/MS-Experiment zeigte der Analyt das in Abbildung 3.4 dargestellte Fragmentierungsmuster. Leition ist dabei m/z 182, welches durch die Aufspaltung der Kohlenstoff-Schwefelbindung zwischen Paracetamol und dem Cystein entsteht.

Dass es sich bei dem Signal nicht um ein bei der Fragmentierung des Glutathionkonjugats entstehendes Artefakt handelte, wurde durch die erheblich frühere Retentionszeit deutlich.

Abbildung 3.5 stellt ein repräsentatives Chromatogramm einer solchen für drei Tage mit 1 mM Paracetamol behandelten Probe von *A. rusticana* dar. Alle drei Substanzen, das heißt die zwei genannten Metaboliten sowie der Wirkstoff selbst, waren auf der Basislinie getrennt und zeigten bei der MS/MS- Analyse eine symmetrische Peakform mit einem sehr guten Signal-Rauschverhältnis.

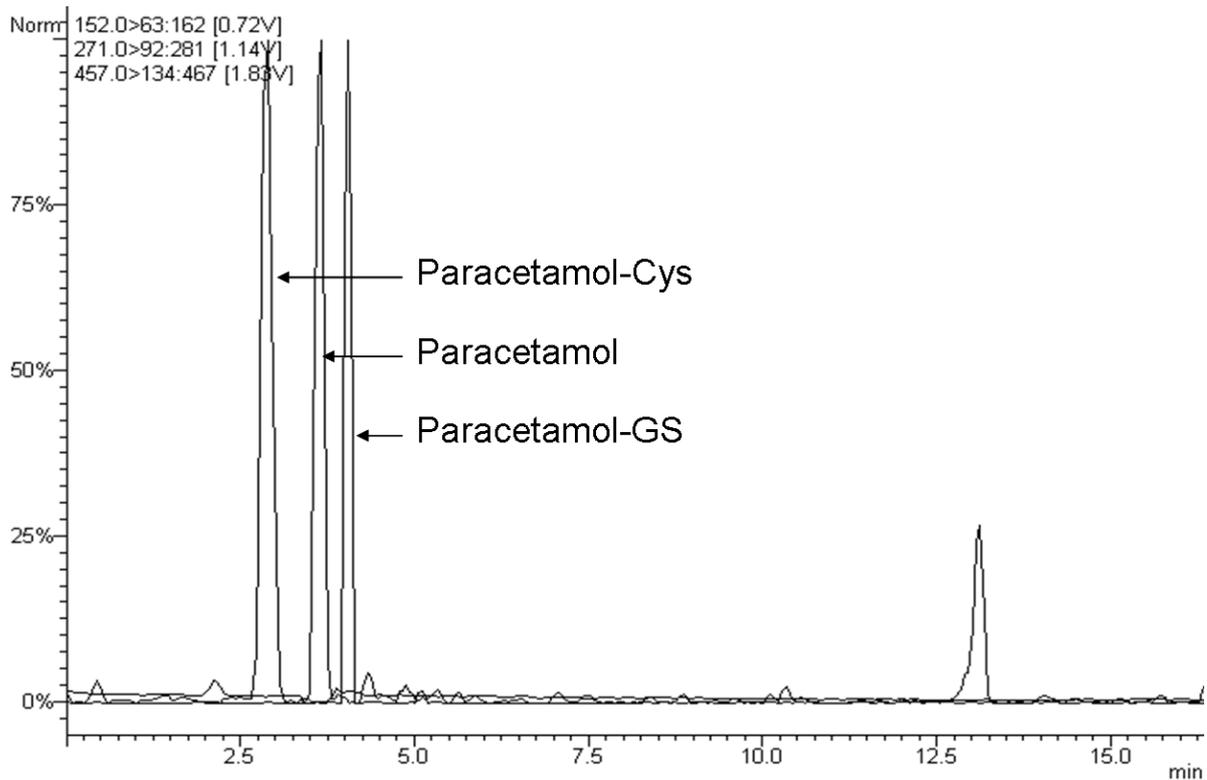


Abbildung 3.5: Repräsentatives LC-MS-Chromatogramm eines *A. rusticana*-Zellextrakts nach der Behandlung mit 1 mM Paracetamol für die chromatographische Trennung von Paracetamol und der glutathionabhängigen Metaboliten. Zur besseren Darstellung wurden die Peakhöhen normiert und entsprechen nicht den tatsächlich vorliegenden Konzentrationen im Extrakt.

3.1.2.2 Bildung eines Paracetamol-Glucose-Konjugats

Neben der in Pflanzen weit verbreiteten Konjugation mit Glutathion findet die Entgiftung des Wirkstoffes im Säugetier noch über einen weiteren Stoffwechselweg, nämlich die Konjugation mit Glucuronsäure, statt. Weitere MS/MS-Experimente belegten in den *A. rusticana*-Proben einen weiteren Metaboliten des Paracetamols. Die Substanz wies dabei eine Retentionszeit von zwei Minuten auf und eluierte somit sogar noch vor dem Paracetamol-Cystein-Konjugat. Der Peak zeigte in Full-Scan-Messungen ein Pseudomolekülion $(M+H)^+$ von m/z 314 bzw. m/z 336 was auf ein Natriumaddukt $(M+Na)^+$ schließen ließ. In MS/MS-Experimenten zeigten sowohl $(M+H)^+$ als auch $(M+Na)^+$ einen Massendefekt von 162 Da, was als die Abspaltung eines Glucose-Moleküls gewertet wurde.

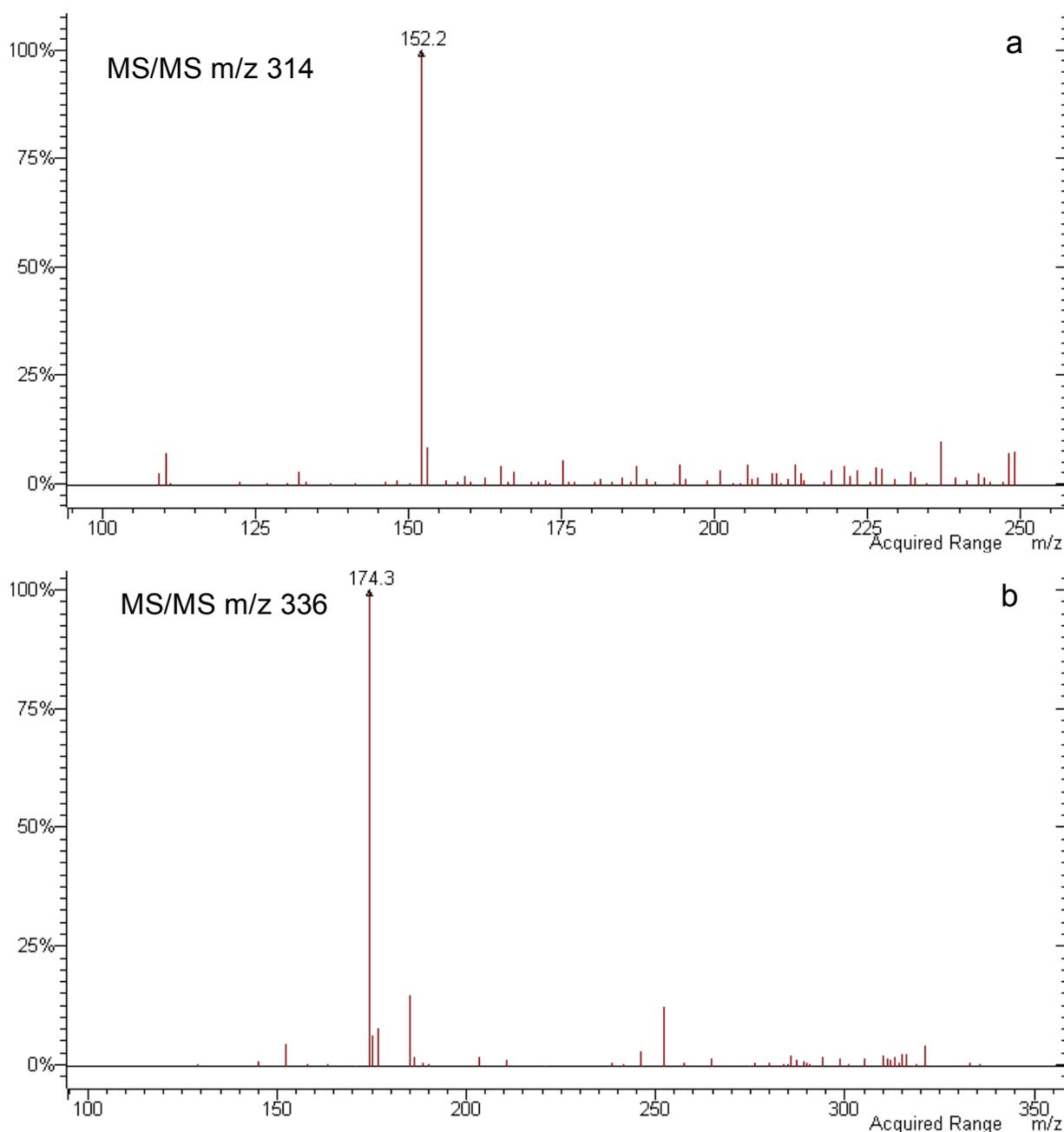


Abbildung 3.6: MS/MS-Spektren des Paracetamol-Glucopyranosids $(M+H)^+$ m/z 314 (a) und $(M+Na)^+$ m/z 336 (b). Beides bei positiver Ionisierung.

Die Abspaltung eines Rests Glucose wird im Massenspektrum als Signal des Aglycons sichtbar. Im Falle von $(M+H)^+$ m/z 314 wurde in MS/MS-Experimenten ein Signal von m/z 152 gefunden (entspricht dem Massen-Ladungsverhältnis des Paracetamols). Die Fragmentierung des Natriumadduktions $(M+Na)^+$ m/z 336 resultierte im Massenspektrum im Signal des entsprechenden Produktions mit m/z 174 (Abbildung 3.6).

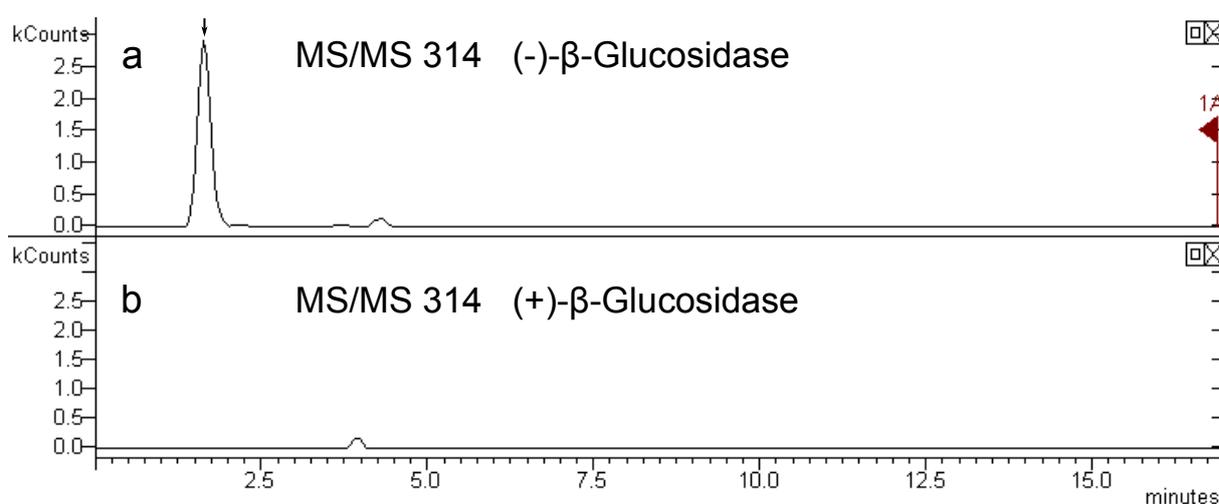


Abbildung 3.7: LC-MS-Chromatogramm von $(M+H)^+$ m/z 314. (a) Inkubation ohne Glucosidase; (b) Inkubation mit Glucosidase.

Da dieser Metabolit ebenfalls noch nicht für Pflanzen beschrieben ist, wurde das postulierte Paracetamol-Glycosid im Massendetektor in einem zusätzliche Fragmentationsschritt (MS^3) weiter fragmentiert. Folgende Massenübergänge wurden dabei detektiert: $314 \rightarrow 152 \rightarrow 110$. Zunächst kommt es zu einer Abspaltung des Zuckers und unkonjugiertes Paracetamol bleibt für eine weitere Fragmentierung in der Ionenfalle. Die zweite Fragmentierung resultiert in einem Produktion mit m/z 110, also exakt dem gleichen Signal wie es in MS/MS -Experimenten des reinen Paracetamols entsteht.

Neben der massenspektrometrischen Untersuchung der Substanz konnte die Existenz eines gebildeten Paracetamol Glycosids durch einen enzymatischen Verdau bestätigt werden. Das Enzym β -D-Glucosidase spaltet spezifisch 1,4-glycosidische Bindungen zwischen zwei Molekülen Glucose oder Glucose und einem Aglycon. Extrakte, die das Paracetamol-Glycosid in großen Mengen enthielten, wurden mit 100 U des Enzyms bei 30°C für eine Stunde bei pH 5,5 inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt und die Ansätze für die SPE eingesetzt. Nach Elution von den SPE-Kartuschen wurden die Eluate in einer SpeedVac bis zur Trockene eingedampft und unmittelbar vor der Analyse in $200\ \mu\text{l}$ Solvent (0,1 % (v/v) Ameisensäure) aufgenommen und unter den gleichen Chromatographie- und MS -Bedingungen analysiert. Die dabei aufgenommenen Chromatogramme sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Chromatogramm (a) zeigt deutlich einen Peak für das Signal mit m/z 314 bei einer Retentionszeit von 1,75 Minuten mit einer Intensität von ca. 2,5 kcounts, welcher das im Extrakt enthaltene Paracetamol-Glycosid repräsentiert. Vergleichend dazu ist unter (b) das Chromatogramm eines Extrakts, der zuvor mit dem Enzym mit β -D-Glucosidase inkubiert wurde, dargestellt. Das Signal für m/z 314 konnte in dieser Probe nicht mehr detektiert werden. Es kam zu einem enzymatisch katalysierten, quantitativen Umsatz des

Paracetamol-Glycosids. Ein weiterer Beleg für den Umsatz ist die gleichzeitige Zunahme des Paracetamol-Signals, welches nach Spaltung der glycosidischen Bindung während der Inkubation wieder freigesetzt wurde und zur Retentionszeit des Paracetamols detektiert werden konnte (Chromatogramm nicht abgebildet).

3.1.3 Metabolismus von Paracetamol in Wurzelzellen von *A. rusticana*

Um die ersten Schritte des Metabolismus in den Wurzeln zu erfassen, wurden unmittelbar nach dem Umsetzen in paracetamolfreies Medium bzw. 2, 4 und 6 Stunden danach Wurzelzellen auf ihren Gehalt an Paracetamol bzw. Konjugaten des Paracetamols hin untersucht. Aufgrund der für die Konjugate nicht vorhandenen analytischen Standards wurden alle ermittelten Werte relativ zueinander als das Verhältnis der Peakflächen von Analyt und internem Standard angegeben. Innerhalb der ersten 2 Stunden im wirkstofffreien Medium sinkt die Menge an freiem, unkonjugierten Paracetamol stark ab und erreicht nur noch etwa ein Viertel der zu Beginn der Messungen vorhandenen Menge. Über die weitere Dauer des Versuchs kommt es weiterhin zu einer leichten Abnahme der Menge des freien Wirkstoffs (siehe Abbildung 3.8, ●).

Dazu gegensätzlich verlaufen die Kurven für die beiden gebildeten Paracetamol-Konjugate (Abbildung 3.8, (▼) Paracetamol-Glycosid und (○) Paracetamol-Glutathion). Beide Konjugate sind unmittelbar nach dem Umsetzen in das unbeaufschlagte Medium bereits vorhanden, wobei das Glycosid den mengenmäßig größeren Anteil einnimmt. Über die Zeit kommt es dann bei beiden Konjugaten zu einem Mengenzuwachs bei der schon erwähnten Abnahme des freien und unkonjugierten Wirkstoffs über die gesamte Beprobungsdauer von 6 Stunden.

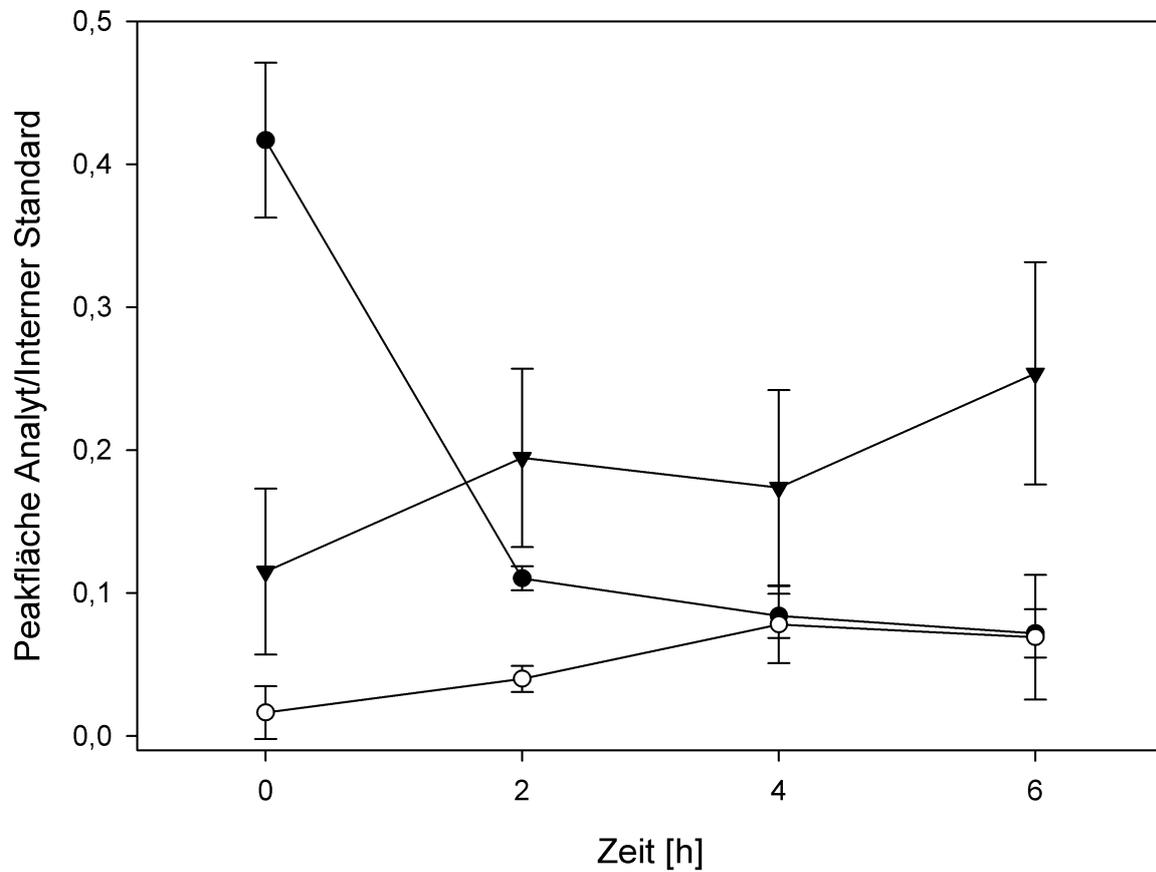


Abbildung 3.8: Relative Mengen von Paracetamol(●), Paracetamol-Glutathion (○), und Paracetamol-Glucopyranosid(▼) in Wurzelzellen von *A.rusticana* nach 3 stündiger Inkubation mit 1 mM Paracetamol. Konzentration des internen Standards (Acetanilid) war 100 μ M. Datenpunkte sind Mittelwerte von 3 biologischen Replikaten \pm Standardabweichung.

3.2 Diclofenac

3.2.1 Aufnahmekinetik mit radioaktiv ^{14}C -markiertem Diclofenac

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse repräsentieren Daten, die aus den Aufnahmestudien mit ^{14}C radioaktiv-markiertem Diclofenac mit 2 Wochen alten Gerstenkeimlingen im axenischen System gewonnen wurden. Die Keimlinge wurden mit den Diclofenac-Konzentrationen von $10\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{M}$ belastet und die gesamten Pflanzen (Wurzel und Spross) wurden nach 8, 12, 24 und 48 Stunden geerntet und aufgearbeitet.

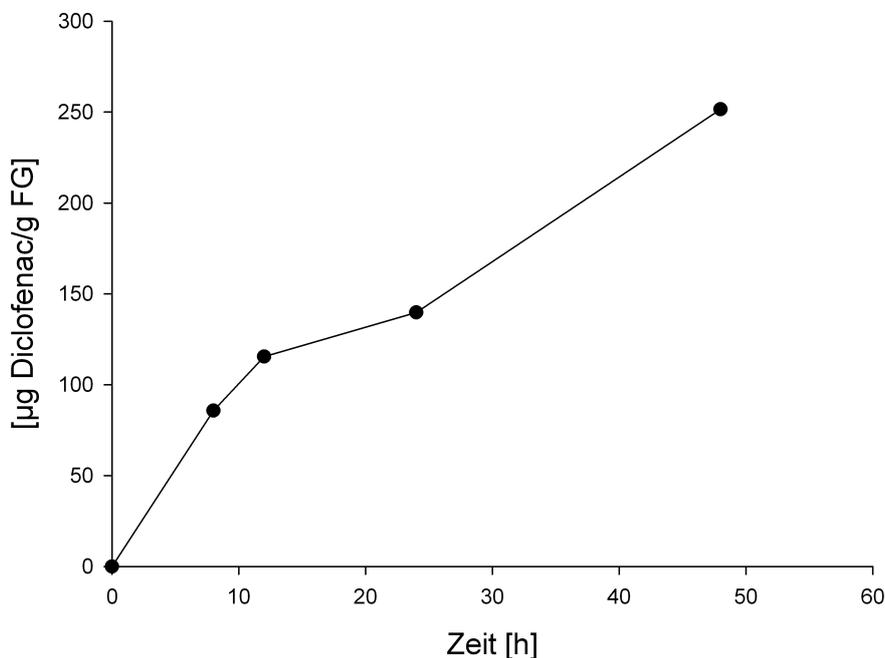


Abbildung 3.9: Menge des in die Wurzeln aufgenommenen Diclofenacs ($10\ \mu\text{M}$). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte zweier biologischer Replikate.

Abbildung 3.9 zeigt die Aufnahme von Diclofenac in die Wurzel bei einer Wirkstoffkonzentration von $10\ \mu\text{M}$. Bereits zum ersten analysierten Zeitpunkt, 8 Stunden nach der Applikation des Wirkstoffes, war eine Menge von $85\ \mu\text{g}$ Diclofenac pro g Frischgewicht in die Wurzeln aufgenommen worden. Über die Dauer des Experiments zeigte sich ein annähernd linearer Verlauf der Aufnahme. In den letzten 24 Stunden erhöht sich die Wirkstoffmenge in den Wurzeln von $140\ \mu\text{g/g}$ FG auf einen Wert von $250\ \mu\text{g/g}$ FG. Daraus ergibt sich eine lineare Aufnahmerate von $4,6\ \mu\text{g}$ pro Stunde für diesen Zeitraum.

Die Menge an in den Spross aufgenommenem Diclofenac ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Detektion des radioaktiven Signals in den Blättern setzt einen aktiven Transport des

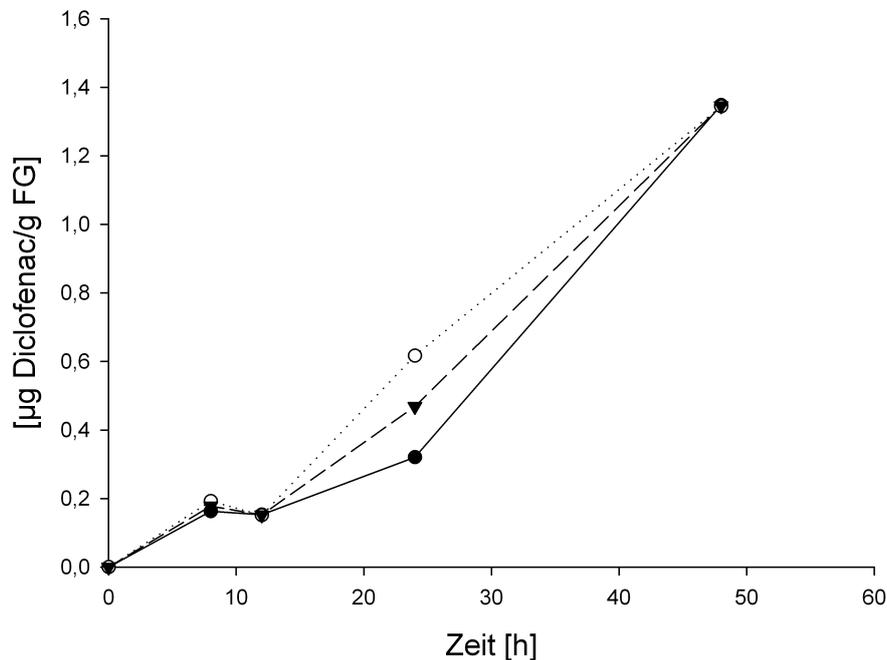


Abbildung 3.10: Menge des in den Spross aufgenommenen Diclofenacs ($10 \mu\text{M}$). Primärblatt (●), Sekundärblatt (○) und gesamter Spross (▼). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte zweier biologischer Replikate.

Wirkstoffs aus den Wurzeln in den Spross und die Blätter voraus, da die oberirdischen Pflanzenteile zu keinem Zeitpunkt des Experiments mit der radioaktiv markierten Substanz in Kontakt gerieten. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme deckt sich mit einer gewissen Verzögerung mit den in den Wurzeln nachgewiesenen Aufnahmeraten. So blieb die Menge an Diclofenac im Spross zunächst auf einem konstant niedrigen Level, um dann nach zwölf bzw. 48 Stunden deutlich auf Werte von ca. $1,4 \mu\text{g/g FG}$ anzusteigen. Generell lagen die in den oberirdischen Pflanzteilen nachgewiesenen Diclofenacmengen mindestens eine Zehnerpotenz unter den in den Wurzeln gemessenen Gehalten. Zwischen den beiden getrennt behandelten Blättern konnten, mit Ausnahme des Messpunktes $t=24 \text{ h}$, an dem die Wirkstoffmenge im Sekundärblatt höher war, bei einer Diclofenacbelastung mit $10 \mu\text{M}$ keine nennenswerten Unterschiede in der aufgenommenen Wirkstoffmenge detektiert werden. Die durchschnittliche Aufnahmerate in den Spross in den letzten 24 Stunden des Experiments betrug $0,03 \mu\text{g}$ pro Stunde.

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der Aufnahmestudien mit einer $100 \mu\text{M}$ Diclofenac-Konzentration im Nährmedium eingegangen. Die eingesetzte Menge an radioaktiv markiertem Diclofenac ist identisch mit der im $10 \mu\text{M}$ Diclofenac-Experiment eingesetzten Menge. Lediglich der Anteil an nicht-markiertem Diclofenac wurde entsprechend angepasst.

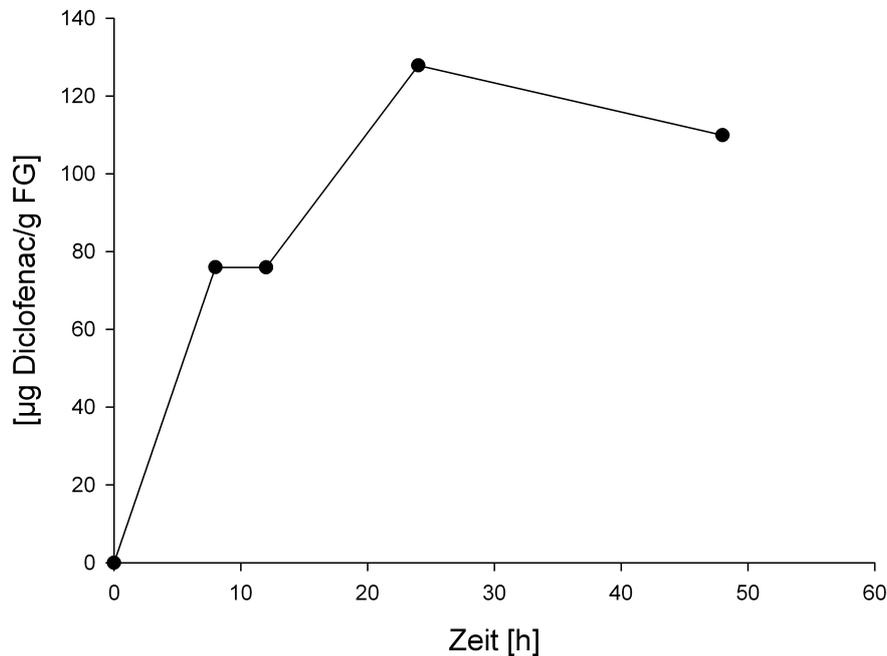


Abbildung 3.11: Menge des in die Wurzeln aufgenommenen Diclofenacs ($100 \mu\text{M}$). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte zweier biologischer Replikate.

Für beide Experimente konnte aufgrund der geringen Menge an eingesetzter Radioaktivität die Stoffmenge an radioaktiv markiertem Diclofenac im Vergleich zur unmarkierten Substanz als zu gering und vernachlässigbar betrachtet werden (1,2 bzw. 0,12 ‰ der insgesamt eingesetzten Menge an Wirkstoff).

Wie bereits bei dem Belastungsexperiment mit $10 \mu\text{M}$ Diclofenac deutlich wurde, kam es zu einer Aufnahme des Wirkstoffs in die Gerstenpflanzen. Dabei konnte jedoch keine konzentrationsabhängige Steigerung in der Wirkstoffaufnahme beobachtet werden. Vielmehr scheint es bei höherer Wirkstoffkonzentration zu einer Hemmung der Aufnahme zu kommen. So lagen die gemessenen Diclofenac-Konzentrationen in den Wurzeln zu jedem Zeitpunkt des Experiments unter den Gehalten, die bei einer $10 \mu\text{M}$ Diclofenac-Konzentration detektiert wurden. Nach 48 Stunden lag die aufgenommene Menge an Wirkstoff bei durchschnittlich $120 \mu\text{g/g FW}$ (siehe Abbildung 3.11). Betrug die Aufnahme innerhalb der ersten zwölf Stunden noch $6,25 \mu\text{g}$ pro Stunde, so kam es im weiteren Verlauf des Experiments mit Aufnahmeraten von ca. $1 \mu\text{g}$ pro Stunde zu einem deutlichen Einbruch.

Ein ähnlicher Zusammenhang wird bei der Betrachtung der für die Blätter ermittelten Wirkstoffmengen deutlich. Bis zum Zeitpunkt $t=12$ Stunden kam es zu einer zeitlichen Verzögerung der Aufnahme. Die Gehalte nach 12 Stunden lagen etwas unterhalb der nach

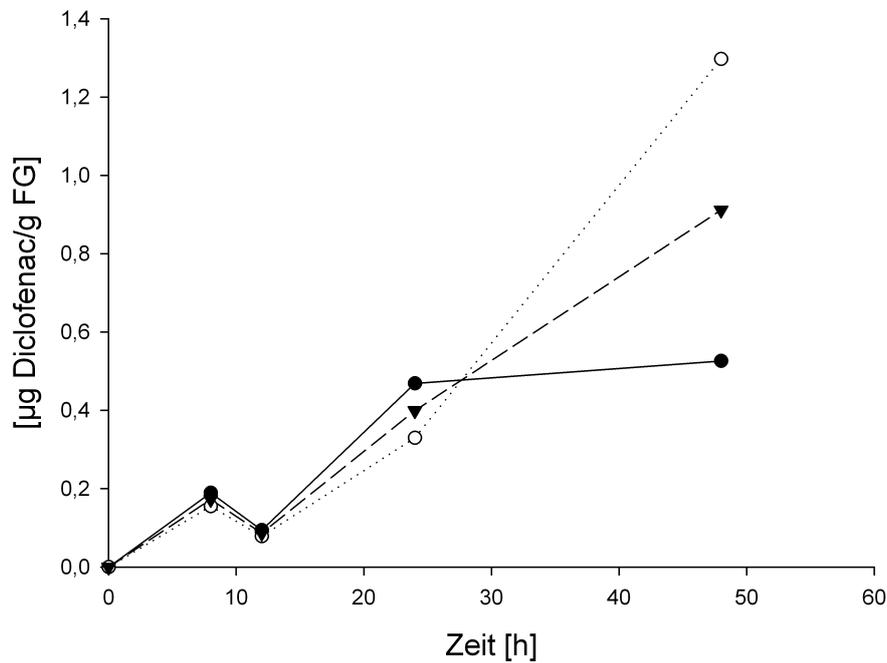


Abbildung 3.12: Menge des in den Spross aufgenommenen Diclofenacs ($100 \mu\text{M}$). Primärblatt (\bullet), Sekundärblatt (\circ) und gesamter Spross (\blacktriangledown). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte zweier biologischer Replikate.

acht Stunden ermittelten Gehalten. Erst nach 24 Stunden war wieder ein Anstieg in der aufgenommenen Diclofenacmenge in die Blätter der Gerstenpflanzen zu beobachten. Nach 48 Stunden hat sich die Aufnahme in den gesamten Spross im Vergleich zur Anfangskonzentration in etwa verdreifacht und erreichte Werte von $0,5 \mu\text{g/g}$ FW im Primär- bzw $1,3 \mu\text{g/g}$ FW im Sekundärblatt (Abbildung 3.12).

Vergleicht man die in den Spross aufgenommenen Wirkstoffmengen zwischen den beiden Experimenten so fällt auf, dass die aufgenommene Menge bei einer Diclofenac-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ sogar über den bei einer höheren Belastungsstufe gemessenen Gehalten lag. Die Wirkstoffgehalte in den beiden Blättern unterschieden sich in den ersten 24 Stunden des Experiments kaum merklich. Nach 48 Stunden konnten jedoch im Sekundärblatt im Vergleich zum älteren Blatt annähernd doppelt so hohe Mengen an Diclofenac nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Aufnahmerate im Spross betrug zwischen 24 und 48 Stunden ca. $0,02 \mu\text{g/h}$.

3.2.2 LC-MS-Analyse von Diclofenac und Diclofenac-Metaboliten

Ebenso wie für das Acetaminophen ist der Metabolismus von Diclofenac im Säugetier detailliert untersucht. Im Zusammenhang mit biologischer Abwasserreinigung liegen ebenfalls Informationen über den Abbau und den Metabolismus von Diclofenac in Bakterien vor. Die nach der Aufnahme des Wirkstoffs in Pflanzen ablaufenden Vorgänge dagegen sind zu diesem Zeitpunkt noch gänzlich unerforscht. Eine Limitierung erfahren diese Art von Studien durch ein Fehlen kommerziell erhältlicher analytischer Standards einzelner Metaboliten. Hinzu kommt ein Mangel an Literatur zur Analyse von Pharmazeutika aus pflanzlichen Matrices. Der Einsatz von LC-MS-Technik erlaubt hier sowohl eine Auftrennung einzelner Stoffwechselprodukte als auch die Identifizierung und relative Quantifizierung der gebildeten Metaboliten.

Im folgenden wird die Analyse und Identifizierung pflanzlicher Diclofenac-Metaboliten mittels LC-MS- bzw. MS/MS-Methoden erläutert. Der reine Wirkstoff Diclofenac lässt sich im Massenspektrometer als $(M+H)^+$ m/z 296 bzw. als $(M-H)^-$ m/z 294 detektieren. Beide Arten der Ionisierung lieferten unter den genannten Bedingungen ein eindeutiges Signal, wobei die Detektion bei positiver Ionisierung in einem intensiveren Signal resultierte. Unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen eluiert die Reinsubstanz mit einer Retentionszeit von 10,2 Minuten von der Säule. Aufgrund des im Vergleich zur klassischen Messung deutlich verbesserten Signal-Rausch-Verhältnisses und der dadurch erhöhten Empfindlichkeit erfolgte die Analyse von Diclofenac in pflanzlichen Matrices, wie auch schon beim Paracetamol, unter MS/MS-Bedingungen.

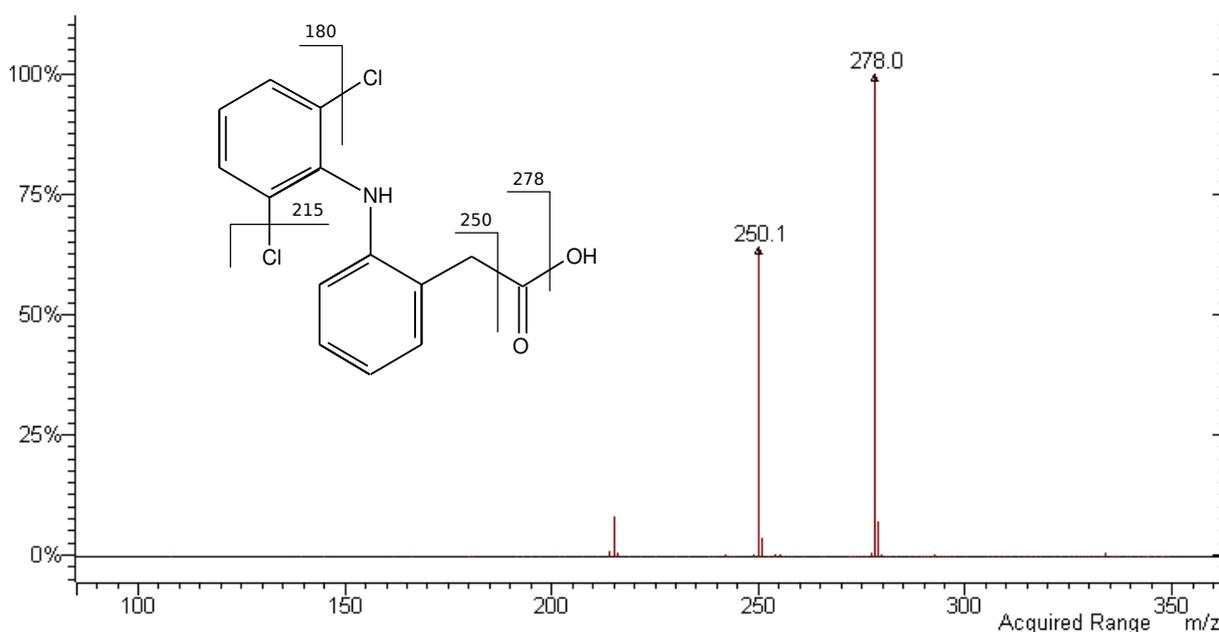


Abbildung 3.13: MS/MS-Spektrum von $(M+H)^+$ m/z 296 (Diclofenac).

Bei positiver Ionisierung zeigt Diclofenac das in Abbildung 3.13 dargestellte Massenspektrum mit zwei dominierenden Fragmenten m/z 278 und m/z 250, welche aus dem Verlust von H_2O bzw. CO resultieren. Weitere Fragmente im Massenspektrum sind m/z 215 und 180, die durch Abspaltung jeweils eines Chloratoms entstehen.

4'-OH-Diclofenac ist der Primärmetabolit im tierischen Organismus und lag in Kleinstmengen als analytischer Standard für die Methodenentwicklung und für die Identifizierung pflanzlich gebildeter Metaboliten vor. Auch für diese Substanz lieferte eine positive Ionisierung die höchste Empfindlichkeit. Die zusätzliche Hydroxygruppe erhöht die Hydrophilie des Moleküls und führt zu einer kürzeren Verweildauer auf der Säule und einer Retentionszeit von 7,8 Minuten. Im *Full Scan* liegt 4'-OH-Diclofenac als $(M+H)^+$ m/z 312 bei positiver und als $(M-H)^-$ m/z 310 bei negativer Ionisierung vor.

MS/MS-Fragmentierung führt zu dem in Abbildung 3.14 dargestellten Massenspektrum. Die Fragmente entstehen durch Bruch an den gleichen Bindungsstellen wie bereits beim Diclofenac beschrieben und werden im Massenspektrum als m/z 294 bzw. m/z 266 detektiert.

Experimente zur Aufnahme und zum Umsatz von Diclofenac wurden sowohl in der Meerrettich-Wurzelkultur als auch in ganzen Gerstenpflanzen im hydroponischen System durchgeführt. Ziel war es, die Art der gebildeten Stoffwechselprodukte und auch deren über die Versuchsdauer gebildeten Mengen zu identifizieren und zu analysieren. Beim Vergleich der aus Pflanzenproben extrahierten Metaboliten und dem analytischen Standard von 4'-OH-Diclofenac wurde klar, dass exakt dieser im Säugetierorganismus so zentrale Phase

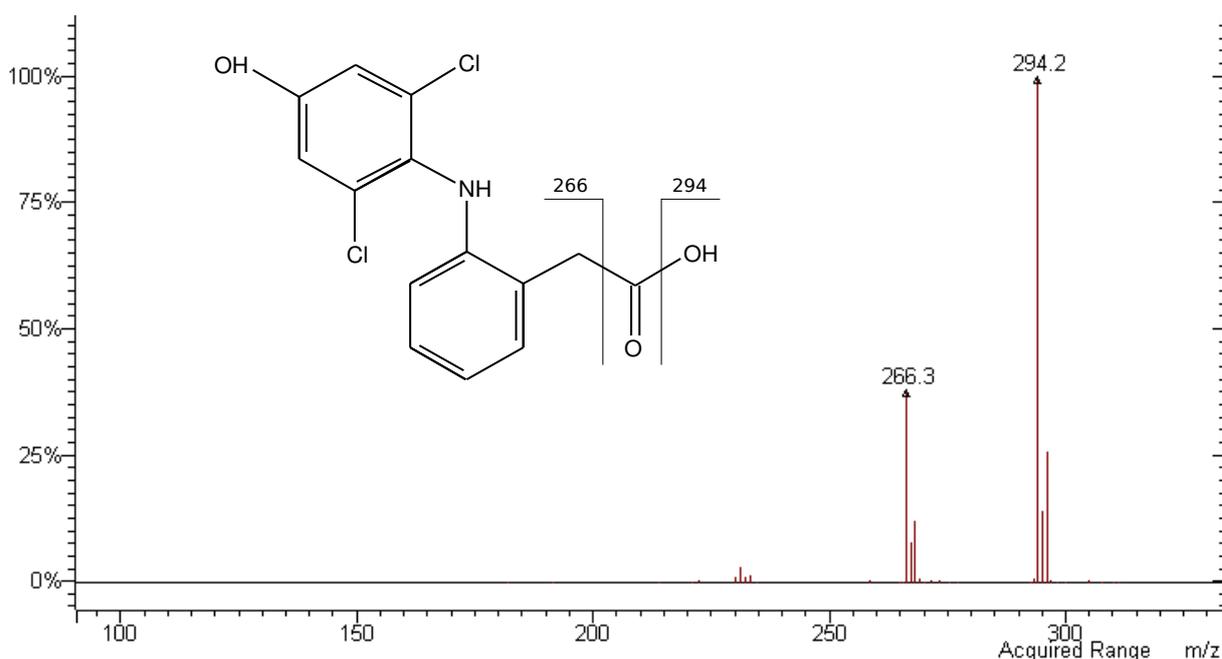


Abbildung 3.14: MS/MS-Spektrum von $(M+H)^+$ m/z 312 (4'-OH-Diclofenac).

1-Metabolit auch in pflanzlichen Zellen gebildet wird. Dies belegte zum einen die exakt identische Retentionszeit für den aus Pflanzen isolierten Metaboliten sowie ein im Vergleich zum Standard identisches Muster der Fragmentierung in MS/MS-Experimenten (Spektrum und Chromatogramm nicht abgebildet).

In allen untersuchten Systemen und Pflanzenteilen konnte zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experiments ein Signal mit $(M+H)^+$ m/z 474 bzw. $(M+H)^-$ m/z 472 detektiert werden. Diese Substanz mit dem angegebenen Massen-Ladungsverhältnis eluierte deutlich früher von der Säule (Retentionszeit von 5,5 Minuten), was auf einen deutlich hydrophileren und polarerer Charakter des Moleküls schließen ließ. Potentielle Konjugationsreaktionen wären sowohl eine Glutathionisierung, wie sie häufig im Säugetierorganismus anzutreffen ist, als auch eine Glycosilierung über die am Dichlorphenylring eingefügten Hydroxygruppe. Die im Säuger beschriebene Reaktion mit Glutathion konnte in den durchgeführten Experimenten in pflanzlichen Geweben für Diclofenac trotz intensiven Studiums der Massenspektren jedoch nicht beobachtet werden. Ein Signal mit m/z 474 entspricht rechnerisch $312+162$, das heißt einem potentiellen Massenzuwachs, wie er durch Anlagerung von einem Molekül Glucose entstanden sein könnte. Die Durchführung von MS/MS-Experimenten mit der in den Proben nachgewiesenen Substanz mit m/z 474 resultierte in dem in Abbildung 3.15 dargestellten Massenspektrum.

Die Fragmentierung des unbekanntes Signals m/z 474 führte zur Bildung eines ausgeprägten Produktions mit m/z 312, was dem Signal von 4'-OH-Diclofenac entspricht.

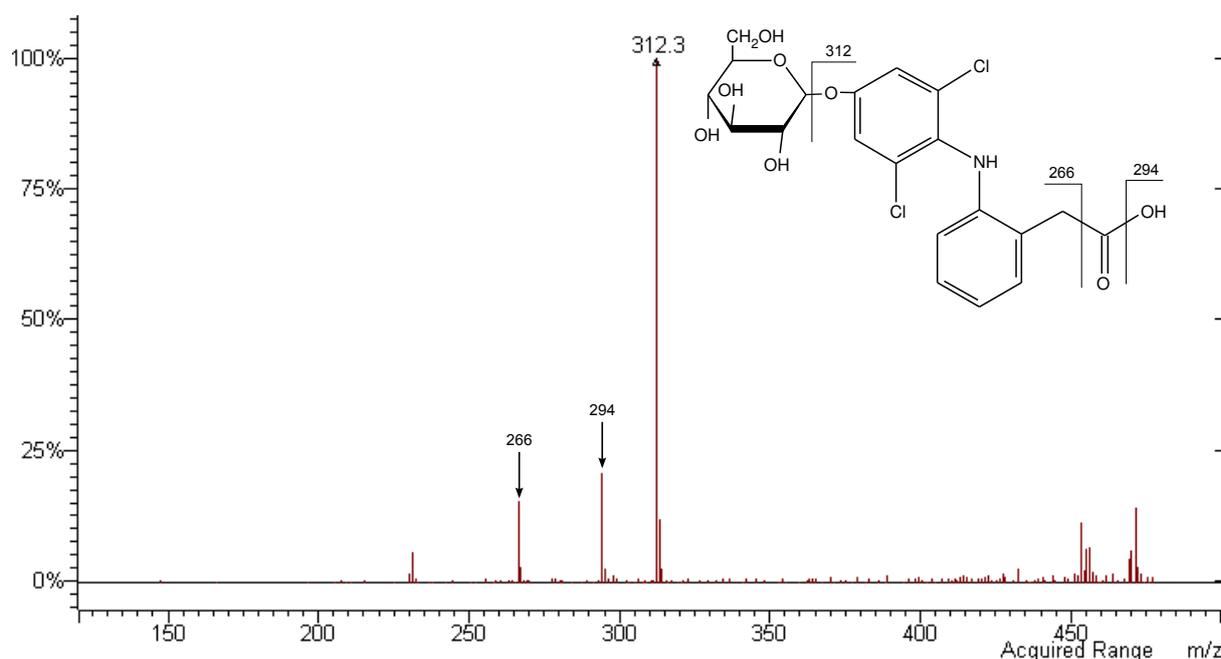


Abbildung 3.15: MS/MS-Spektrum von $(M+H)^+$ m/z 474 (Diclofenac-Glucopyranosid).

Weniger stark ausgeprägt, aber im Spektrum vorhanden, sind die in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichneten Fragmente mit m/z 294 und 266, welche charakteristisch für die hydroxylierte Form von Diclofenac sind und einen weiteren Hinweis auf dessen Bildung gaben. In einem anschließenden MS³ Experiment wurden zusätzlich die Massenübergänge $474 \rightarrow 312 \rightarrow 294$ untersucht, was in einem dem MS/MS-Spektrum 4'OH-Diclofenac entsprechenden Massenspektrum resultierte. Damit war mit den vorhandenen massenspektrometrischen Methoden eindeutig gezeigt, dass es sich bei dem vorliegenden Metaboliten um ein Konjugat des hydroxylierten Diclofenacs handelt. Dieser Metabolit wurde sowohl in Blättern und Wurzeln von *H. vulgare* als auch in den Wurzelzellen von *A. rusticana* in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen.

Wie bereits beim Nachweis eines Paracetamol-Glucose-Konjugats, sollten Inkubationsexperimente mit dem Enzym β -D-Glucosidase, welches spezifisch die β -D-glycosidische Bindung zwischen Aglycon und dem Molekül einen Glucose spaltet, einen weiteren Beleg für die Bildung eines glycosilierten Diclofenac-Metaboliten in Pflanzen erbringen. Die Inkubation des Metaboliten mit dem Enzym führte zu einem vollständigen Verschwinden des Signals mit m/z 474 im Chromatogramm (Abbildung 3.16b) was einen quantitativen Umsatz des im analysierten Extrakt enthaltenen 4'OH-Diclofenac-Glucopyranosids bedeutete (Abbildung 3.16a, mit Pfeil gekennzeichnet).

Dies ist der erste Befund über die Bildung eines glycosilierten Diclofenac-Metaboliten in Pflanzen.

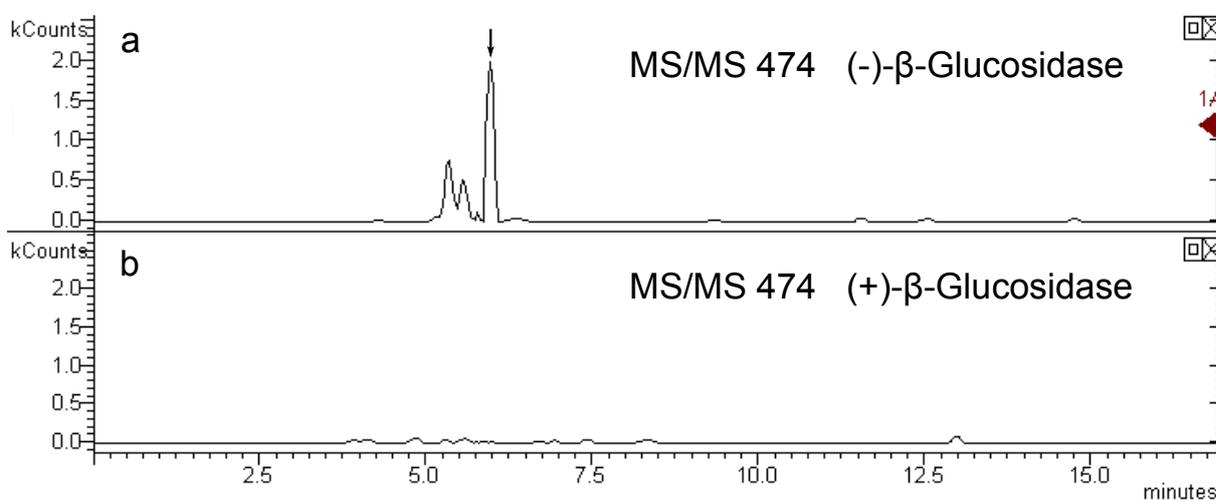


Abbildung 3.16: LC-MS-Chromatogramm von $(M+H)^+$ m/z 474. (a) Inkubation ohne Glucosidase. (b) Inkubation mit Glucosidase.

3.2.3 Metabolismus von Diclofenac in Wurzelzellen von *A. rusticana*

Basierend auf den unter 3.2.2 beschriebenen Ergebnissen sollte die Bildung der neu identifizierten Metaboliten in pflanzlichen Zellen genauer untersucht werden.

Nachfolgend sind die Ergebnisse einer Metabolismusstudie von Diclofenac in *hairy roots* Zellen von *A. rusticana* dargestellt. Die Wurzelzellen wurden dazu für die Dauer von drei Stunden mit 10 μ M Diclofenac inkubiert und daraufhin in wirkstofffreies Medium überführt. Zellen wurden nach 6, 24, 72 und 168 Stunden geerntet und auf Ihren Gehalt an Diclofenac, 4'OH-Diclofenac und 4'OH-Diclofenac-Glucopyranosid hin untersucht. Zu jedem Zeitpunkt wurden drei Erlenmeyerkolben mit je einer Wurzel geerntet, diese wurden einzeln aufgearbeitet und analysiert.

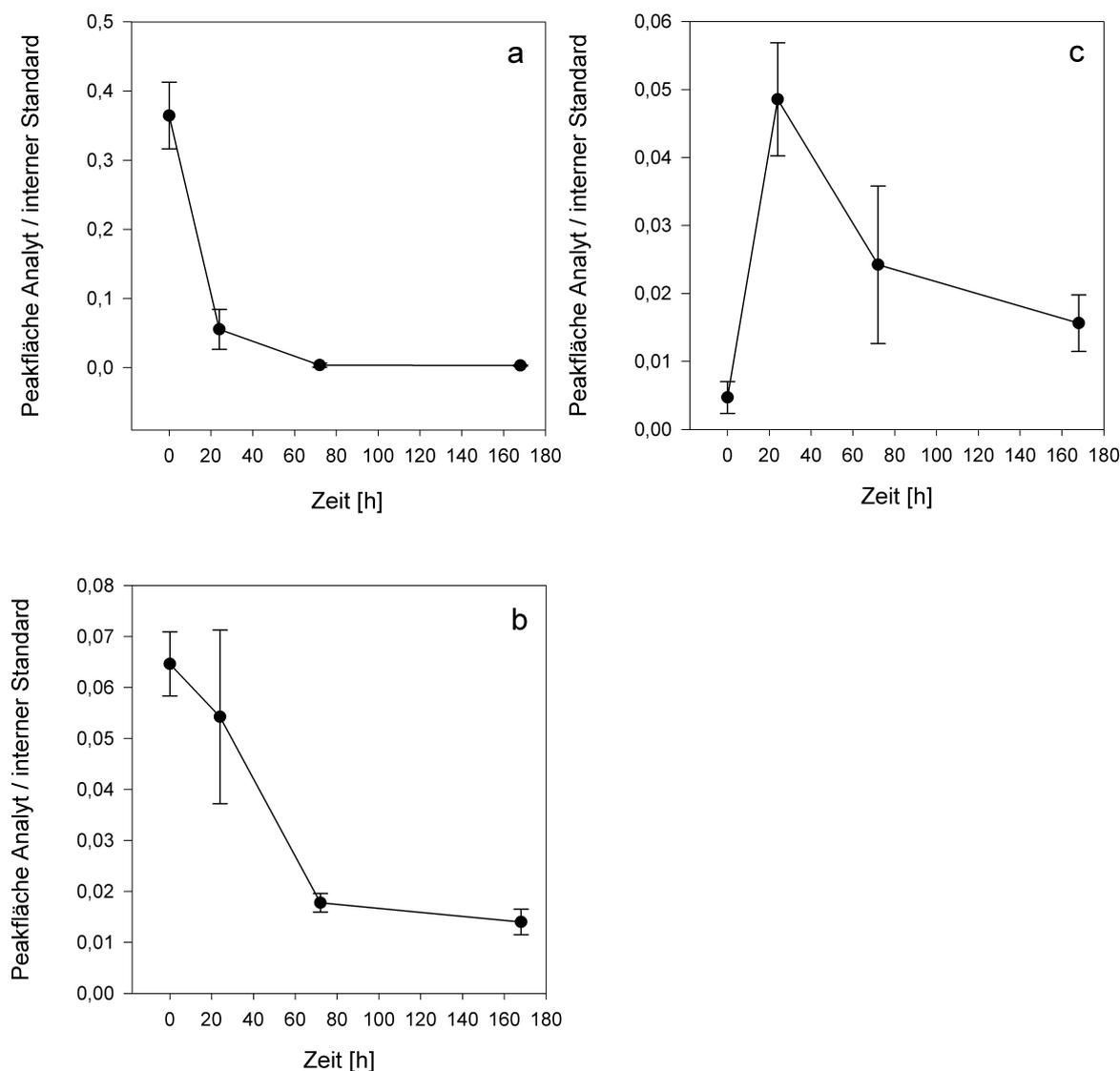


Abbildung 3.17: Relative Mengen an Diclofenac und Metaboliten in Wurzelzellen von *A.rusticana*. Diclofenac (a), 4'-OH-Diclofenac (b) und 4'OH-Diclofenac-Glucopyranosid (c). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte von drei biologischen Replikaten \pm Standardabweichung.

In Abbildung 3.17a ist der Verlauf der Menge an freiem Diclofenac gegen die Zeit aufgetragen. Unmittelbar nach dem Umsetzen in nicht beaufschlagtes Medium ist die Konzentration des freien Wirkstoffs am höchsten. Die Entgiftungskaskade steht noch am Anfang, jedoch liegen bereits zu diesem frühen Zeitpunkt erste Stoffwechselprodukte des Diclofenacs in den Wurzelzellen vor.

Abbildung 3.17b zeigt die Menge an in den Zellen gebildeten 4'OH-Diclofenac. Wie beim Diclofenac erreicht die Menge des Phase 1-Metaboliten bereits unmittelbar zu Beginn des Experiments die höchsten Werte. Im Gegensatz zum Verlauf der Diclofenac-Konzentration,

bleibt die Menge an hydroxyliertem Diclofenac aber auch nach 24 Stunden noch auf einem im Vergleich zum Anfangswert hohem Niveau.

Die eigentliche Entgiftung des Wirkstoffs erfolgt durch Konjugation des Phase 1 Metaboliten in Phase 2. In den Wurzelzellen von *Armoracia rusticana* erfolgt die Konjugation des Xenobiotikums mit einem Molekül Glucose, wodurch ein Diclofenac-Glycosid-Konjugat entsteht. Der Verlauf der Bildung des Diclofenac-Konjugats ist in Abbildung 3.17c aufgetragen. Deutlich zu erkennen ist dabei, dass das Glycosid unmittelbar zu Anfang des Experiments nicht bzw. nur in sehr kleinen Quantitäten in den Zellen vorlag um dann nach 24 Stunden auf das Fünffache der Ausgangskonzentration, und somit auf den höchsten Wert während der Dauer des Experiments, anzusteigen. Im weiteren Verlauf des Experiments kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme in der Konzentration des Glucopyranosids. Die Kurve folgte ab diesem Zeitpunkt annähernd der Kurve des 4'OH-Diclofenacs. Nach einer Woche lagen die detektierten Mengen aber immer noch deutlich über den zu Beginn des Experiments ermittelten Werten.

Aufnahme und Metabolismus des Wirkstoffs aus dem Medium in die Zellen erfolgen sehr schnell. Bereits nach der kurzen Inkubationszeit von drei Stunden waren erste Stoffwechselprodukte in den Zellen nachweisbar.

3.2.4 Metabolismus von Diclofenac in *H. vulgare*

Die nachfolgenden Daten wurden aus einem unter Gewächshausbedingungen durchgeführten Experiment mit *H. vulgare* erhoben. Dabei wurde die Bildung von Diclofenac-Metaboliten in Blättern und Wurzeln von Gerstenpflanzen untersucht. Die Pflanzen wurden dazu mit 10 und 100 μM Diclofenac belastet. Die untersuchten Zeitpunkte waren 72 Stunden und eine Woche nach der Applikation. In Abbildung 3.18 ist die Bildung der relativen Mengen von Diclofenac, 4'OH-Diclofenac und dem entsprechenden Glucose-Konjugats dargestellt. Verfolgt man die Bildung der einzelnen Metaboliten über die Zeit, fällt auf, dass bei der Belastungssituation mit der geringeren Diclofenac-Konzentration in den Wurzeln das hydroxylierte Diclofenac der dominierende Metabolit war, dessen Konzentration über die Zeit noch weiterhin anstieg und zu jedem Zeitpunkt des Experiments über der Menge des reinen Wirkstoffes lag. Ebenfalls lag nach drei Tagen ein Anteil als glycosiliertes 4'OH-Diclofenac in den Wurzeln vor, dessen Menge über den weiteren Verlauf des Experiments noch weiterhin zunahm. Der geringste relative Anteil lag bei dieser Konzentrationsstufe als reiner unkonjugierter Wirkstoff vor. Nach einer Woche kam es im Vergleich zu den nach drei Tagen beobachteten Mengen sogar zu einem Rückgang in der Konzentration (Abbildung 3.18a). In den Blättern konnte dazu im Gegensatz nach 72 Stunden lediglich unmetabolisiertes Diclofenac detektiert werden. Erst nach weiteren vier Tagen konnten

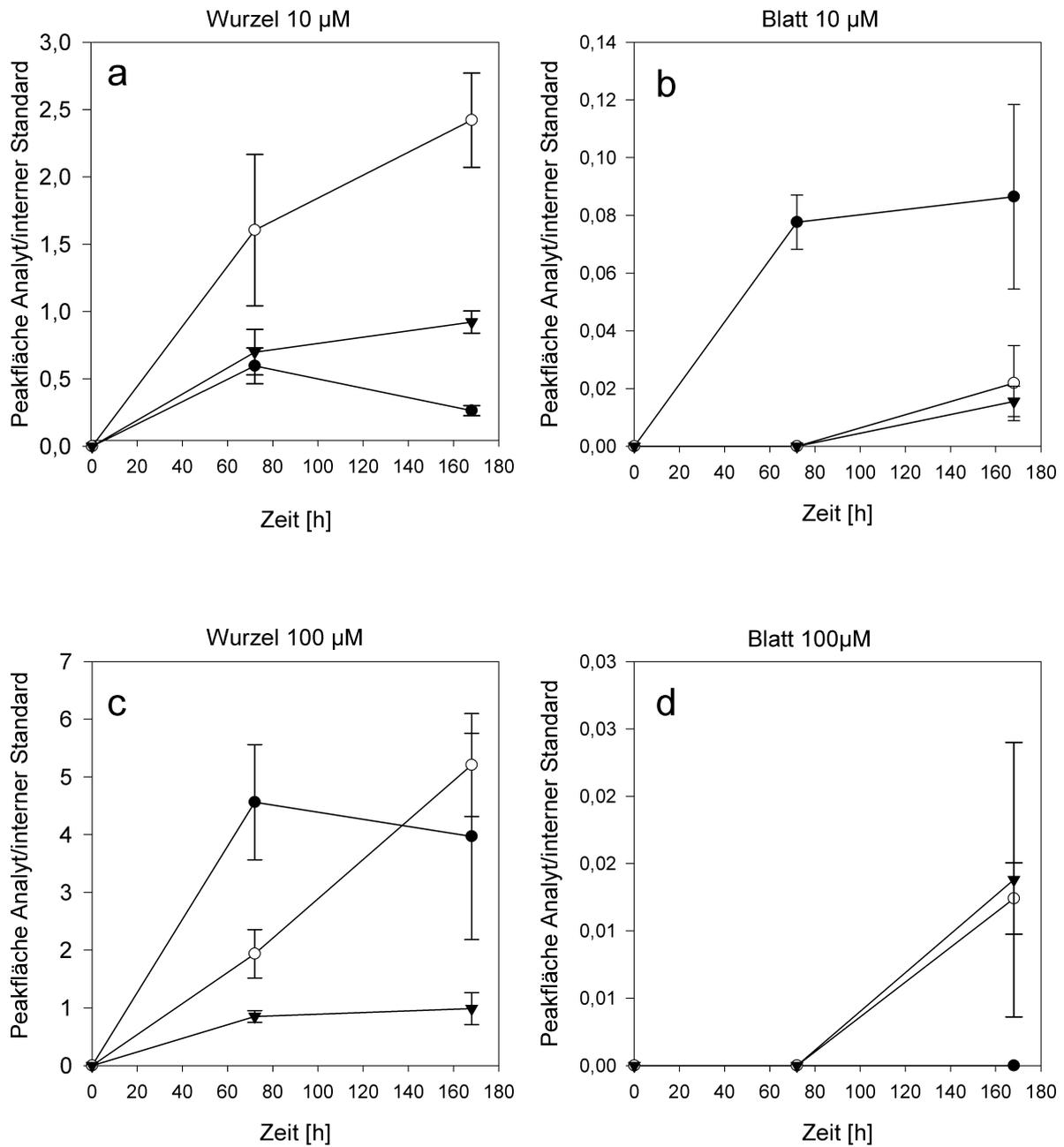


Abbildung 3.18: Relative Menge von Diclofenac und Metaboliten in *H. vulgare*. Relative Mengen von Diclofenac (●), 4'OH-Diclofenac (○) und 4'OH-Diclofenac-Glucopyranosid (▼) in Wurzeln (a, c) und Blättern (b, d) von mit 10 µM (a, b) und 100 µM (c, d) Diclofenac behandelten Gerstenpflanzen. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte von drei biologischen Replikaten \pm Standardabweichung.

kleinste Mengen sowohl des hydroxylierten als auch des mit Glucose konjugierten Wirkstoffes nachgewiesen werden. Alle in den Blättern detektierten Analyten lagen in ihren Mengen deutlich unter den in den Wurzeln beobachteten (Abbildung 3.18b).

Bei einer Belastungssituation mit einer größeren Menge an Wirkstoff ergibt sich ein anderes Bild. Nach einer Dauer von drei Tagen nahm in den Wurzeln das unmetabolisierte Diclofenac noch eindeutig den größten Anteil der untersuchten Analyten ein. Ebenso wie bei dem Experiment mit 10 μM Diclofenac stiegen die Mengen an hydroxylierten sowie mit Glucose konjugierten Diclofenac in den ersten drei Tagen bereits deutlich an, lagen aber noch unter den Mengen des unveränderten Wirkstoffes. Erst nach vier weiteren Tagen, eine Woche nach Applikation des Wirkstoffes, nahm die Menge an Diclofenac in den Wurzeln nicht mehr weiter zu, bzw. es kam sogar zu einem leichten Rückgang in den detektierten Mengen. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil an 4'OH-Diclofenac in den Wurzeln deutlich zu. Die gleiche Tendenz, wenn auch weniger stark ausgeprägt, war auch für das Glucose-Konjugat zu erkennen (Abbildung 3.18c).

Wie auch schon bei der Pilotstudie mit dem radioaktiv markierten Wirkstoff beobachtet wurde, kommt es anscheinend ab einer gewissen Menge an Diclofenac in den Pflanzen zu einer Hemmung des Transports in die oberirdischen Organe. Interessanterweise wurde in keiner der mit 100 μM Diclofenac belasteten Blattproben der reine Wirkstoff gefunden. Erst nach einer Woche konnte in den Blättern 4'OH-Diclofenac und das Glucosekonjugat detektiert werden. Die beobachteten Mengen lagen dabei in der Dimension im Bereich des Parallelexperiments mit einer Wirkstoffbelastung von 10 μM (Abbildung 3.18d).

3.2.5 Einfluss von Diclofenac auf Pigmentgehalte in *H. vulgare*

Das Pigmentmuster in Blättern von Pflanzen wird häufig als Indikator für Stress-Effekte verwendet. In Abbildung 3.19 sind die Mengen der photosynthetisch aktiven Pigmente Chlorophyll a und Chlorophyll b sowie der Carotinoide in Blättern der Gerste unter dem Einfluss von Diclofenac über die Zeit dargestellt.

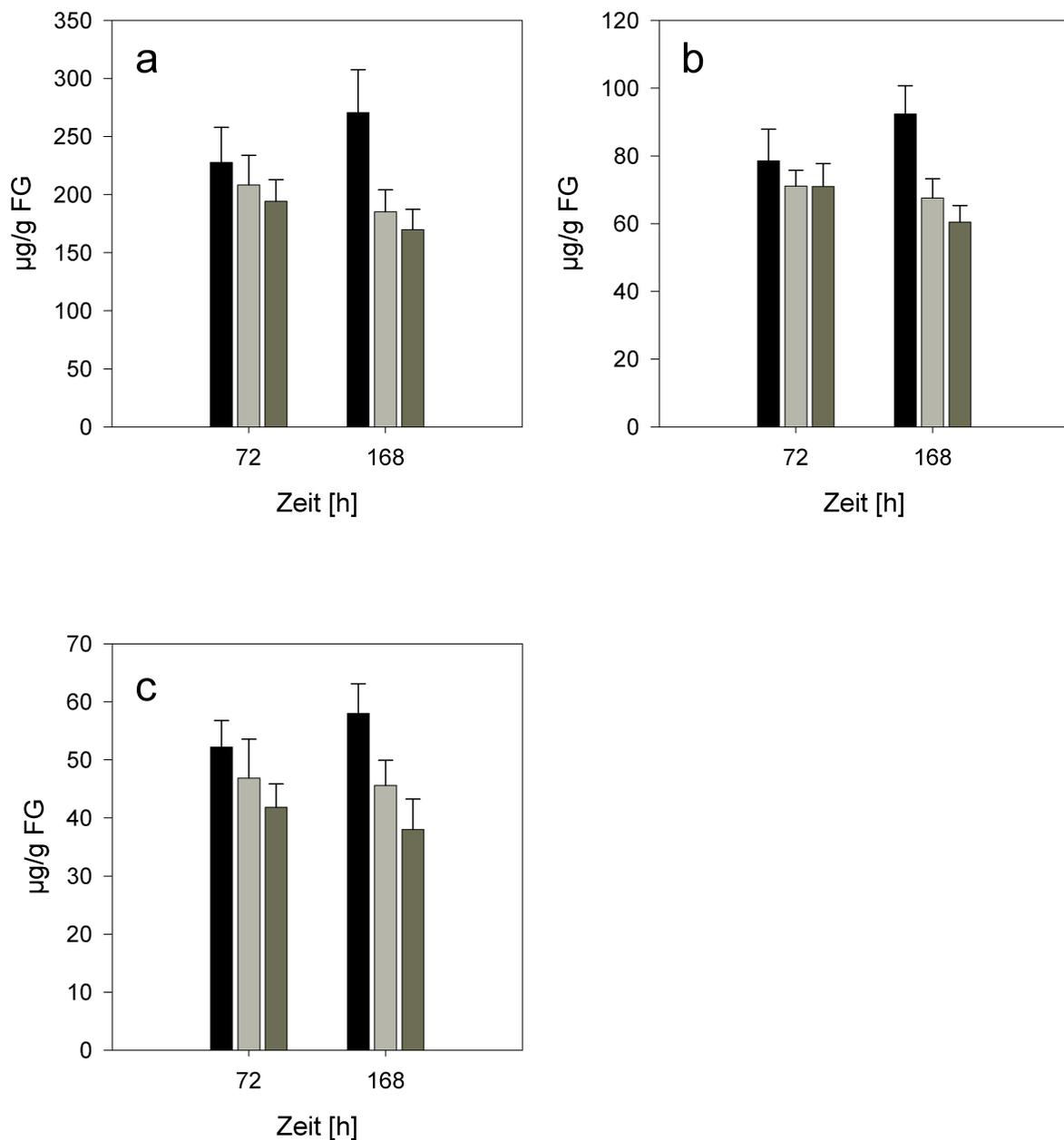


Abbildung 3.19: Einfluss von Diclofenac auf Pigmentgehalte in *H. vulgare*. Chlorophyll a (a), Chlorophyll b (b), Carotinoide (c). Kontrolle (schwarze Balken), 10 µM Diclofenac (hellgraue Balken), 100 µM Diclofenac (dunkelgraue Balken). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten + Standardabweichung.

Tabelle 3.1: Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b sowie Gesamtchlorophyll zu Carotinoiden in Blättern von *H. vulgare* nach Diclofenacbehandlung.

	72h		168h	
	Chl a/b	Chl a+b/Car	Chl a/b	Chl a+b/Car
Kontrolle	2,90	5,86	2,93	6,26
10 μM	2,93	5,96	2,74	5,54
100 μM	2,74	6,34	2,80	6,06

Für alle drei untersuchten Pigmente war in den unbehandelten Pflanzen ein Anstieg in ihrer Konzentration über die gesamte Dauer des Experiments zu beobachten (schwarze Balken in Abbildung 3.19a, b, c). Es wurde zudem deutlich, dass die Behandlung mit Diclofenac einen negativen Einfluss auf die Pigmentmengen hatte. Zu jedem Zeitpunkt des Experiments lagen die Mengen der analysierten Pigmente in den mit Diclofenac behandelten Pflanzen unter den Mengen in den unbehandelten Kontrollen. Dieser Effekt war bereits nach einer Dauer von drei Tagen erkennbar, wenngleich auch noch nicht statistisch gesichert. Des Weiteren war auch schon zu diesem frühen Zeitpunkt für Chlorophyll a und die Carotinoide eine Abnahme der Gehalte in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration zu beobachten. Bei beiden lagen bei der höchsten Belastungsstufe mit 100 μ M Diclofenac die niedrigsten Pigmentkonzentrationen vor.

Nach weiteren vier Tagen, bei einer Expositionsdauer von einer Woche, veränderten sich die Mengen an Pigmenten in den mit Diclofenac belasteten Pflanzen noch deutlicher. Während es bei den Kontrollpflanzen bei allen Pigmenten zu einer altersbedingten Zunahme kam, gingen die Konzentrationen in den behandelten Pflanzen noch weiter zurück. Besonders deutlich war dabei der Effekt des Diclofenacs auf die Chlorophylle. Die Chlorophyll a- und Chlorophyll b-Konzentrationen lagen nach einer Woche signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe, wobei dieser Effekt bei der höheren Diclofenac-Konzentration noch etwas stärker ausgeprägt war.

In Tabelle 3.1 sind die Verhältnisse der beiden Chlorophylle a und b zueinander sowie das Verhältnis des Gesamtchlorophylls zur Menge der Carotinoide aufgeführt. Das Verhältnis der Chlorophylle a und b lag während des gesamten Experiments bei 3:1 und befand sich damit in dem von LICHTENTHALER (1987) beschriebenen Bereich. Unter Diclofenacbelastung lag eine geringe Tendenz zu einer Verringerung des Verhältnisses vor, was auf einen potentiellen Rückgang der Menge an Chlorophyll b schließen ließ. Das Verhältnis von Gesamtchlorophyll (Chl a+b) zur Carotinoidmenge lag während des gesamten Experiments bei ca. 6:1 und entsprach damit ebenfalls dem von GÖTZ (2008) beschriebenen Bereich.

3.2.6 Einfluss von Diclofenac auf den Glutathiongehalt in *H. vulgare*

Der Thiolgehalt in pflanzlichen Geweben wird stark von verschiedenen exogenen Faktoren wie z. B. Temperatur, Schwefelgehalt in Boden oder Nährmedium, Exposition mit Schwermetallen oder Xenobiotika, etc. beeinflusst (MAY *et al.*, 1998). Daher war es wichtig die Reaktionen des GSH-Pools auf Pharmaka zu untersuchen. Glutathion sowohl in reduzierter als auch in oxidiert Form stellt in pflanzlichen Zellen als Antioxidant ein zentrales Molekül bei der Bewältigung von oxidativen Stress dar.

Die Versuchspflanzen wuchsen für eine Woche in mit Diclofenac beaufschlagtem Nährmedium (10 μM und 100 μM). Der Gehalt an Glutathion wurde nach drei Tagen und einer Woche bestimmt. In allen untersuchten Proben lag der Gesamt-Glutathiongehalt in den Wurzeln mit Werten zwischen 50 und 100 nmol/g FG deutlich unter den in den Blättern bestimmten Werten von bis zu 250 nmol/g FG (Abbildung 3.20, Diagramm a). Vor allem in den Blättern (Abbildung 3.20, Diagramm b) ist zudem zu erkennen, dass in den unbehandelten Kontrollen das Verhältnis von GSH zu GSSG stets deutlich auf der Seite des reduzierten Glutathions lag, was den Normalzustand in diesem Entwicklungsstadium der Pflanzen widerspiegelte. Besonders ausgeprägt war dieses Verhältnis in den Blättern der Kontrollpflanzen eine Woche nach der Wirkstoffapplikation, als fast das gesamte Glutathion in seiner reduzierten Form vorlag (Tabelle 3.2).

Nach 72stündiger Diclofenac-Exposition war in den Wurzeln zu erkennen, dass sich das Verhältnis von GSH zu GSSG bereits bei der geringeren Diclofenac-Konzentration zugunsten der oxidierten Form hin verschoben hat. Bei einer Diclofenacbelastung von 100 μM lag in den Zellen signifikant mehr oxidiertes als reduziertes Glutathion vor, was auf einen deutlich beanspruchten Stressstoffwechsel in den Wurzeln zu diesem Zeitpunkt

Tabelle 3.2: Gesamt-Glutathiongehalte und Verhältnis von reduziertem zu oxidierten Glutathion in *H. vulgare* nach Behandlung mit 10 und 100 μM Diclofenac.

	Wurzeln		Blätter	
	GSH/GSSG	Gesamt-Glutathion [nmol/g FG]	GSH/GSSG	Gesamt-Glutathion [nmol/g FG]
Kontrolle 72h	1,40	55,10	2,31	120,20
10 μM 72h	1,30	59,45	1,43	111,22
100 μM 72h	0,50	75,60	0,30	88,20
Kontrolle 168h	1,10	75,20	7,90	258,0
10 μM 168h	0,74	66,92	2,64	246,10
100 μM 168h	0,54	66,40	1,54	165,20

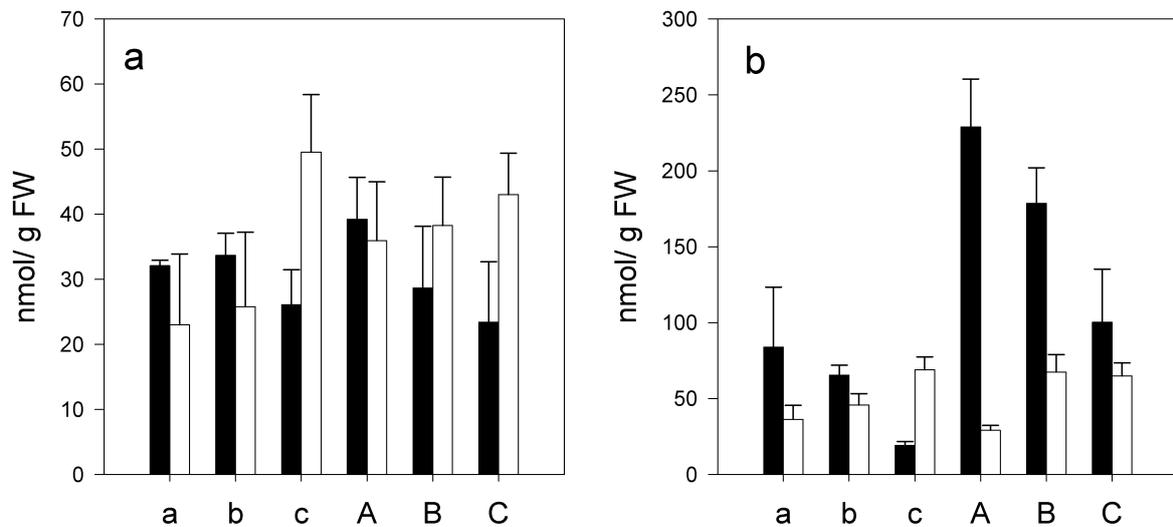


Abbildung 3.20: Menge an Glutathion (reduziert, schwarze Balken; oxidiert, weiße Balken) in Wurzeln (Graph a) und Blättern (Graph b) von *H. vulgare* nach 72 Stunden (a Kontrolle, b 10 µM Diclofenac, c 100 µM Diclofenac) und 168 h (A Kontrolle, B 10 µM Diclofenac, C 100 µM Diclofenac). Werte sind Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten + Standardabweichung.

hindeutete. Dies war der einzige Zeitpunkt im Experiment, an dem auch in den Blättern ein Verhältnis von GSH zu GSSG von kleiner eins vorlag.

Nach einer Woche setzte sich in den Wurzeln ein ähnlicher Trend fort. Selbst bei einer Diclofenac-Konzentration von 10 µM überstiegen die Gehalte des oxidierten Glutathions die des reduzierten.

Dann setzt offenbar eine *de-novo*-Synthese von Glutathion ein. In den Blättern lag nach einer Woche in allen Pflanzen signifikant mehr Glutathion in reduzierter Form vor, wengleich in Anwesenheit von Diclofenac der Gehalt an oxidiertem Glutathion zunahm und sich bei 100 µM Wirkstoff ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis von GSH zu GSSG einstellte.

In Tabelle 3.2 sind Gesamt-Glutathiongehalte sowie die Verhältnisse der reduzierten zur oxidierten Form (GSH/GSSG) zusammenfassend dargestellt.

3.2.7 Einfluss von Diclofenac auf die GST-Aktivität in *H. vulgare*

3.2.7.1 Wurzeln

GSTs stellen eine große Gruppe multifunktionaler Enzyme dar, die an der Entgiftung elektrophiler Xenobiotika beteiligt sind.

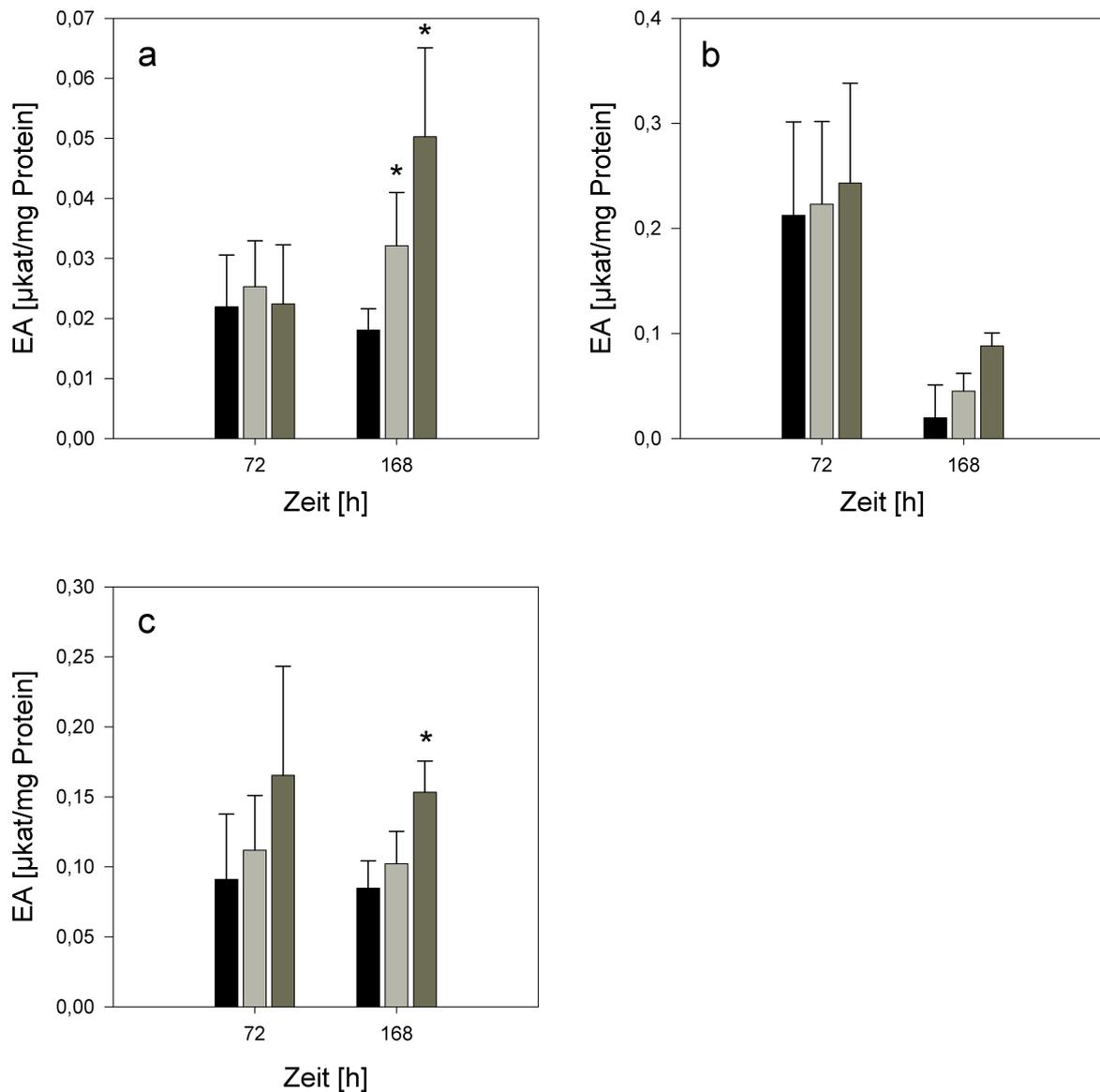


Abbildung 3.21: Spezifische GST-Aktivität in Wurzeln von *H. vulgare* für die Substrate CDNB (a), NBoC (b) und NBC (c). Kontrolle (schwarze Balken), 10 μ M Diclofenac (hellgraue Balken), 100 μ M Diclofenac (dunkelgraue Balken). Werte und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten \pm Standardabweichungen. Signifikanzen im Vergleich zu Kontrolle sind mit * gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).

Die Messung ihrer Aktivität mit verschiedenen Modells substraten neben dem Standardsubstrat CDNB stellt den Versuch dar, Veränderungen in der Aktivität einzelner GST-Isoformen oder GST-Gruppen zu erfassen. In keiner der analysierten Wurzelproben konnte reproduzierbar GST-Aktivität für das Modells substrat DCNB festgestellt werden. Nach einer Exposition der Pflanzen mit dem Wirkstoff Diclofenac für 72 Stunden war in den Wurzeln der Pflanzen auf die spezifische GST-Aktivität für das Substrat CDNB kein signifikanter Einfluss im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festzustellen. Alle zu diesem Zeitpunkt ermittelten Aktivitäten erreichten Werte zwischen 0,02 und 0,03 $\mu\text{kat}/\text{mg}$. Ein ähnliches Bild zeigte sich ebenfalls für das Substrat NBC, für dessen Konjugation nach 72 Stunden noch kein Einfluss von Diclofenac nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zum Substrat CDNB waren die ermittelten Umsätze jedoch um ca. Faktor zehn höher.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen war ein Trend einer Induktion der GST-Aktivität bereits nach 72 Stunden für das strukturverwandte Substrat NBoC zu erkennen, auch wenn die Unterschiede zwischen den einzelnen beprobten Pflanzen zu groß waren, um statistisch abgesicherte Aussagen zu treffen zu können. Dennoch lagen die Mittelwerte für beide Diclofenac-Konzentrationen über denen der unbehandelten Kontrollen und erreichten Werte von maximal 0,16 $\mu\text{kat}/\text{mg}$.

Nach einer Woche waren in den Wurzeln für alle Substrate erhöhte Enzymaktivitäten im Vergleich zwischen der mit Diclofenac behandelten und der unbehandelten Kontrollpflanzen zu beobachten. Für das Substrat CDNB lagen die Mittelwerte der ermittelten Aktivitäten für beide Diclofenac-Konzentrationsstufen auch signifikant ($p \leq 0,05$) über den Mittelwerten der Kontrollen. Beim NBC kam es dagegen insgesamt bei allen Proben zu einem Einbruch in der Aktivität. Auch hier lagen die mit Diclofenac belasteten Pflanzen in ihrer GST-Aktivität über den Kontrollen. Ein sehr ähnliches Bild lieferten die Ergebnisse für das Substrat NBoC. Der beim NBC im Vergleich zum früheren Messzeitpunkt, beobachtete Rückgang in der GST-Aktivität war hier nicht zu erkennen. Bei beiden Konzentrationsstufen war vielmehr ein Aktivitätsanstieg zu erkennen. Nach einer Woche war die Aktivität für das Substrat NBoC in den mit 100 μM behandelten Pflanzen signifikant höher als in den Kontrollen (+ 87 %).

3.2.7.2 Spross

In Gerstenblättern konnte für alle verwendeten Modellsubstrate eine GST-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den stets gesteigerten GST-Aktivitäten in der Wurzel trat hier jedoch zumindest vereinzelt der umgekehrte Effekt einer GST-Hemmung auf. Signifikant war diese Hemmung nach 72 Stunden für das Substrat CDNB. So erreichten die ermittelten Aktivitäten zu diesem Zeitpunkt bei einer Belastung mit 100 μM Diclofenac nur noch 70 % der für die unbehandelten Kontrollen gemessenen CDNB-Aktivität. Die DCNB-Aktivitäten lagen nach 72 Stunden bei 10 und 100 μM Diclofenac leicht über den Werten der Kontrollen, wenn auch nicht signifikant und mit deutlichen Schwankungen unter den einzelnen Proben. Die Aktivitäten der beiden in ihrer Struktur sehr ähnlichen Substrate NBC und NBoC folgen dem Verlauf der CDNB-Aktivität, wenngleich die Unterschiede auch hier nicht signifikant waren.

Nach einwöchiger Versuchszeit kam es für das Substrat CDNB insgesamt zu einem leichten Anstieg in der Aktivität. Die vormals signifikant gehemmte GST-Aktivität bei einer Belastung mit 100 μM Diclofenac war nicht mehr zu beobachten. Die Werte für die behandelten Pflanzen lagen etwas über den Kontrollwerten. Für alle anderen drei Substrate setzte sich der Trend sinkender GST-Aktivitäten in den Blättern fort. So lagen die Aktivitäten für DCNB, NBC und NBoC unter den Werten der Kontrollen und erreichten lediglich die Größenordnung der nach 72 Stunden erhobenen Konjugationsraten.

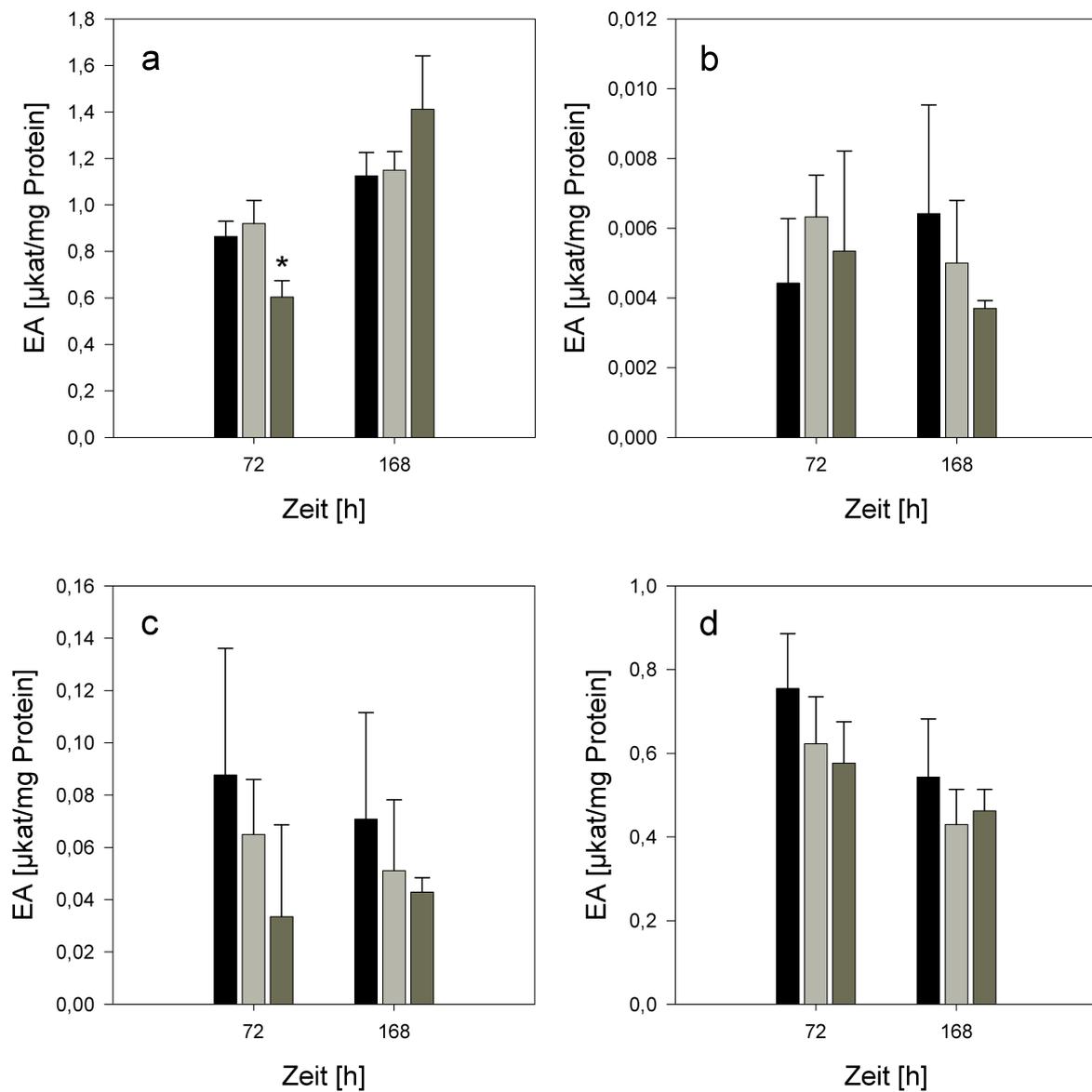


Abbildung 3.22: Spezifische GST-Aktivität in Blättern von *H. vulgare* für die Substrate CDNB (a), DCNB (b), NBoC (c) und NBC (d). Kontrolle (schwarze Balken), 10 μM Diclofenac (hellgraue Balken), 100 μM Diclofenac (dunkelgraue Balken). Werte und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten \pm Standardabweichungen. Signifikanzen im Vergleich zu Kontrolle sind mit * gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).

3.2.8 Einfluss von Diclofenac auf Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels in *H. vulgare*

3.2.8.1 Wurzeln

Neben Glutathion S-Transferasen wurden auch die spezifischen Aktivitäten der Enzyme Peroxidase, Ascorbat-Peroxidase, Glutathion-Reduktase und Katalase unter dem Einfluss von Diclofenac in Blätter und Wurzeln von Gerste untersucht.

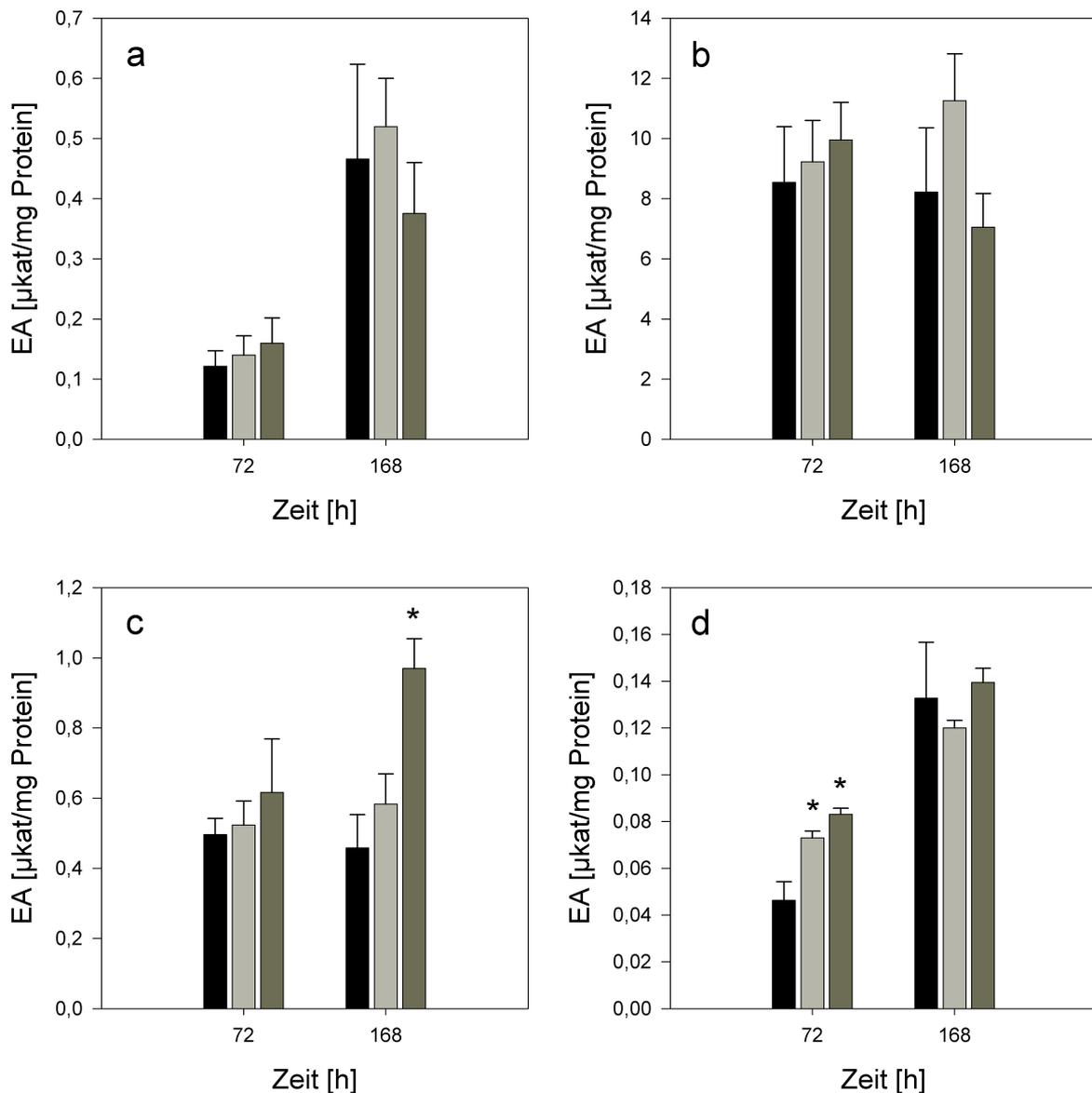


Abbildung 3.23: Spezifische Enzymaktivitäten in Wurzeln in *H. vulgare*: (a) Peroxidase (Substrat Guajacol), (b) Ascorbat-Peroxidase, (c) Glutathion-Reduktase, (d) Katalase. Werte und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten \pm Standardabweichungen. Signifikanzen im Vergleich zu Kontrolle sind mit * gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).

Peroxidase. Peroxidasen kommt neben der Katalyse oxidativer Reaktionen eine große Bedeutung bei der Eliminierung des in der Zelle toxisch wirkenden Wasserstoffperoxid zu. Sie katalysieren dabei dessen Spaltung in Sauerstoff und Wasser und tragen somit zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies bei. Die Bestimmung der Peroxidase-Aktivität mit dem Substrat Guajacol gilt als vergleichsweise unspezifischer Biomarker für pflanzlichen Stress. Die Ergebnisse der Peroxidasebestimmung in mit Diclofenac behandelten Pflanzen sind in Abbildung 3.23a dargestellt. In den Wurzeln trat nach 72 Stunden keine deutliche Steigerung in der Aktivität der Peroxidasen auf. Die Messwerte schwankten in einem Bereich zwischen 0,1 und 0,2 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ mit leicht erhöhten Umsätzen bei steigender Diclofenac-Konzentration. Nach einer Woche war insgesamt eine wahrscheinlich durch das höhere Alter der Pflanzen bedingte Peroxidase-Aktivität zu beobachten. Die höchsten Umsätze wurden hier bei einer Belastung mit 10 μM Diclofenac ermittelt, wohingegen bei der höchsten Belastungsstufe von 100 μM die gemessene Aktivität im Mittel unter den Kontrollpflanzen lag.

Dem Verlauf der POX-Aktivitäten sehr ähnlich erschienen die Ergebnisse für die Aktivitätsbestimmung der Ascorbat-Peroxidase in den Wurzeln.

Ascorbat-Peroxidase. Das Enzym bildet den Anfang der Reaktionskaskade des Ascorbat-Glutathion-Zyklus, der ebenfalls bei der Entgiftung von schädlichen Derivaten des Sauerstoffs eine Rolle spielt. Über die gesamte Versuchsdauer lagen die ermittelten Aktivitäten auf einem hohen Niveau zwischen 8 und 12 $\mu\text{kat}/\text{mg}$. Auch hier kam es nach den ersten drei Versuchstagen unter dem Einfluss von Diclofenac zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Aktivität. Bei der zweiten Probennahme nach einer Woche fanden sich ebenso wie bereits bei der POX die höchsten Umsatzraten in den mit 10 μM Diclofenac belasteten Pflanzen. Auch hier lagen aber die Umsätze bei der höchsten Belastungsstufe unter denen der Kontrollen. Im Vergleich zur 10 μM Gruppe sind die ermittelten APOX-Aktivitäten aber signifikant geringer (3.23b).

Glutathion-Reduktase. Das Enzym Glutathion-Reduktase katalysiert die Reduktion des oxidierten Glutathions (GSSG) in eine reduzierte Form und trägt dabei einen entscheidenden Beitrag zur Glutathionhomöostase bei. Glutathion ist sowohl ein wichtiger Reaktionspartner bei der Konjugation von Xenobiotika als auch ein bedeutendes Reduktionsäquivalent bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies in der pflanzlichen Zelle im Ascorbat-Glutathionzyklus.

Schon nach 72 Stunden war bei einer Belastung mit 100 μM Wirkstoff im Medium einer Steigerung in der Aktivität der Glutathion-Reduktase um 24 % mit einem Maximum von ca. 0,6 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ zu erkennen. Deutlich ausgeprägter reagierten die Pflanzen nach einwöchiger Diclofenac-Exposition. Die ermittelten spezifischen Glutathion-Reduktase-

Aktivitäten lagen in ihrer Dimension im Bereich der Werte nach 72 Stunden. Auch zu diesem Zeitpunkt kam es in Anwesenheit von Diclofenac zu einem Anstieg in der Aktivität. Bei Inkubation mit 100 μM Diclofenac konnten im Vergleich zur Kontrolle mit Werten um 0,4 $\mu\text{kat}/\text{mg}$, Glutathion-Reduktase-Aktivitäten von über 1,0 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ nachgewiesen werden, was einer signifikanten Aktivitätssteigerung um 250 % entsprach. (3.23c)

Katalase. Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgewandelt und trägt dabei direkt zur Entgiftung des zelltoxisch wirkenden Wasserstoffperoxid bei. In den Wurzel wurde die Katalase-Aktivität zu Beginn des Experiments sehr stark durch die Anwesenheit von Diclofenac modifiziert. Bei beiden Konzentrationen des Analgetikums konnte ein signifikanter Anstieg in der Aktivität des Enzyms beobachtet werden, der auf eine verstärkte Bildung von Wasserstoffperoxid im Zusammenhang mit gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies hindeutete.

3.2.8.2 Spross

Der Einfluss einer Diclofenac-Exposition auf wichtige Enzyme des antioxidativen Stoffwechsels wurde auch in den Blättern untersucht (Abbildung 3.24). Deutlich wurde hier, dass der Effekt des Wirkstoffs im Vergleich zu den Wurzeln sehr viel schwächer ausgeprägt war.

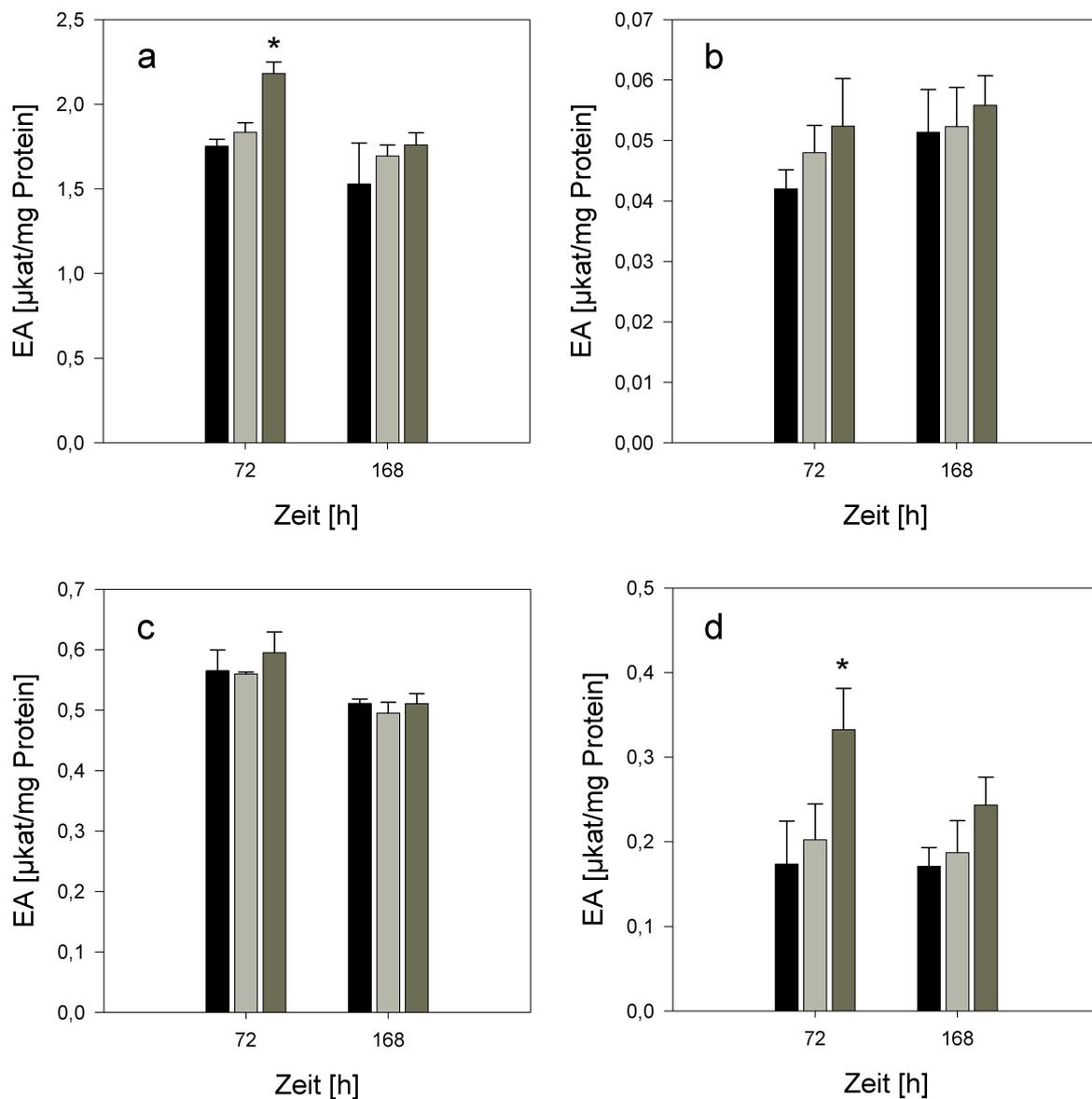


Abbildung 3.24: Spezifische Enzymaktivitäten in Blättern von *H. vulgare*: (a) Ascorbat-Peroxidase, (b) Peroxidase (Substrat Guajacol), (c) Glutathion-Reduktase, (d) Katalase. Kontrolle (schwarze Balken), 10 µM Diclofenac (hellgraue Balken), 100 µM Diclofenac (dunkelgraue Balken). Werte und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten \pm Standardabweichungen. Signifikanzen im Vergleich zu Kontrolle sind mit * gekennzeichnet bei $p \leq 0,05$.

Peroxidase und Ascorbat-Peroxidase. Bei den Peroxidasen ließ sich auch in den Blättern ein schwacher Anstieg in ihrer Aktivität beobachten. Diese Steigerung um +20 % war bei der Ascorbat-Peroxidase nach 72 Stunden signifikant (Abbildung 3.24a). Nach einer Woche pendelten die Werte für die Enzymaktivitäten wieder schwach über dem Level der Kontrollen. Ein ähnliches Muster fand sich bei der mit Guajacol als Substrat gemessenen Peroxidase-Aktivität. Auch war mit steigender Diclofenac-Konzentration eine Aktivitätssteigerung nach drei Tagen zu registrieren, die nach vier weiteren Versuchstagen aber wieder zurückging.

Glutathion-Reduktase. An allen untersuchten Messzeitpunkten schien die Anwesenheit von Diclofenac keinerlei Einfluss auf die Aktivität der Glutathion-Reduktase in den Blättern zu haben. Hier lagen die gemessenen Aktivitäten sehr einheitlich auf dem Level der Kontrollen. Lediglich nach drei Tagen war bei einer Belastung mit 100 µm Diclofenac eine Steigerung in der Aktivität zu erkennen, die sich statistisch nicht absichern ließ.

Katalase. Die Behandlung mit Diclofenac zeigte einen Einfluss auf die Katalase-Aktivität in den Blättern, der sich in erhöhten Enzymaktivitäten widerspiegelte. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt nach 72 Stunden bei einer Wirkstoffkonzentration von 100 µM. Zu diesem Zeitpunkt lagen die Katalase-Aktivitäten für diese Proben signifikant über den Kontroll-Werten. Wie schon für die Wurzeln beschrieben, ging diese starke Induktion nach weiteren vier Tagen in den Blättern wieder etwas zurück. Dennoch lagen auch nach 168 Stunden die Katalase-Aktivitäten der mit Diclofenac behandelten Pflanzen immer noch über den Aktivitäten der Kontroll-Gruppe (Abbildung 3.24d).

3.2.9 Einfluss von Diclofenac auf die Glycosyltransferase-Aktivität in *A. rusticana*

Im Hinblick auf das in Gerste als auch in der Wurzelkultur des Meerrettichs nachgewiesene Glucosekonjugat des Diclofenacs (siehe Abschnitt 3.2.2) sollte die Induzierbarkeit der Glycosyltransferase-Aktivität unter dem Einfluss von Diclofenac untersucht werden.

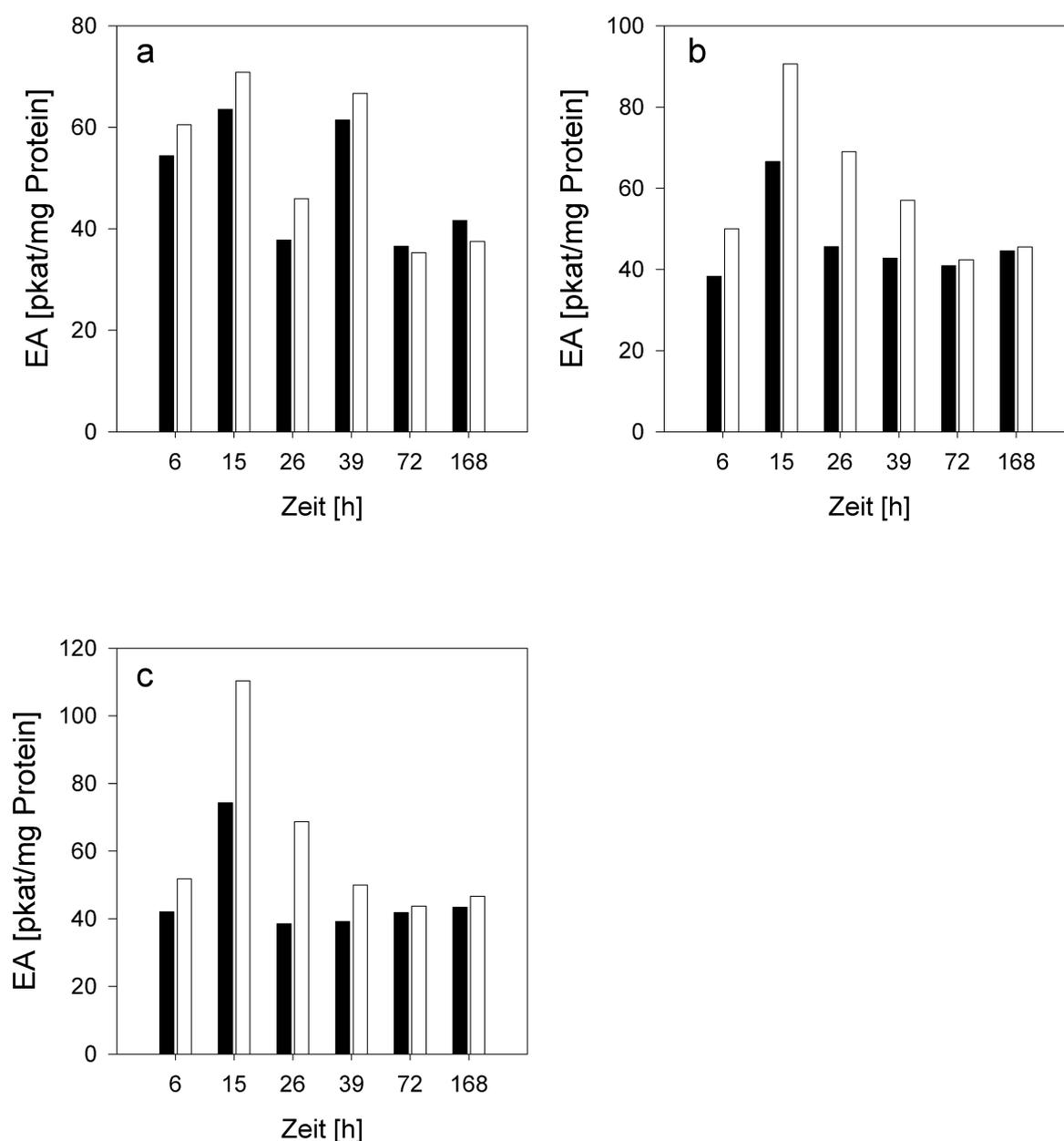


Abbildung 3.25: Spezifische Glycosyltransferase-Aktivitäten in Wurzelzellen von *A. rusticana* für die Substrate TCP (a), Quercetin (b) und Kaempferol (c). Schwarze Balken sind unbehandelte Kontrollen, weiße Balken mit 10 μ M Diclofenac behandelte Proben. Werte repräsentieren Mittelwerte zweier biologischer Replikate.

Dazu wurden *A. rusticana*-Wurzelzellen mit 10 μM Diclofenac inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf ihre Glycosyltransferase-Aktivität für die Substrate 2,3,5-TCP, Quercetin und Kaempferol und 4'OH-Diclofenac hin untersucht.

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit konnten mit dem Substrat 4'OH-Diclofenac allerdings nur einzelne Experimente durchgeführt werden, die allerdings einen qualitativen Umsatz der Substanz durch pflanzliche Glycosyltransferasen belegten.

Die ermittelten Glycosyltransferase-Aktivitäten zu den angegebenen Zeitpunkten für die einzelnen Substrate sind in Abbildung 3.25 dargestellt (TCP (a), Quercetin (b) und Kaempferol (c)). Dabei wurden mehrere Effekte deutlich. Zum einen ist ein zeitlicher Verlauf der Glycosyltransferaseaktivität zu erkennen. Dieser Verlauf gilt dabei sowohl für die unbehandelten Kontrollen als auch die behandelten Zellen. Bei allen analysierten Proben lag die höchste Glycosyltransferase-Aktivität in den Zellen 15 Stunden nach Beginn des Experiments, d. h. nach der Applikation des Wirkstoffs bzw. des Lösungsmittels, vor. Für die beiden endogenen Substrate Kaempferol und Quercetin fielen die ermittelten Glycosyltransferase-Aktivitäten wieder ab und erreichten Werte, die in ihrer Größenordnung den zu Beginn des Experiments ermittelten Aktivitäten ähnelten. Lediglich für das künstliche Substrat 2,3,5-TCP kam es im weiteren Versuchsverlauf nach 39 Stunden erneut zu einem derart starken Aktivitätsanstieg. Vergleicht man die Glycosyltransferase-Aktivitäten der unbehandelten Kontrollgruppe (schwarze Balken) mit der mit 10 μM Diclofenac behandelten Gruppe (weiße Balken), so fällt auf, dass zu den ersten vier Zeitpunkten (6, 15, 26 und 39 Stunden) des Experiments die Enzymaktivitäten der mit Diclofenac behandelten Zellen über denen der Kontrollen lagen. Dieser Effekt war beim 2,3,5-TCP etwas schwächer ausgeprägt als bei den anderen beiden Substraten. Besonders deutlich trat dieser Effekt beim Kaempferol und Quercetin hervor, und dies wiederum zu den Zeitpunkten 15 und 39 Stunden nach der Wirkstoffapplikation. Nach drei Tagen bzw. einer Woche ging dieser Effekt für alle drei untersuchten Substrate wieder zurück. Die Enzymaktivitäten der Kontrollen und der behandelten Zellen lagen dann in etwa wieder gleich auf.

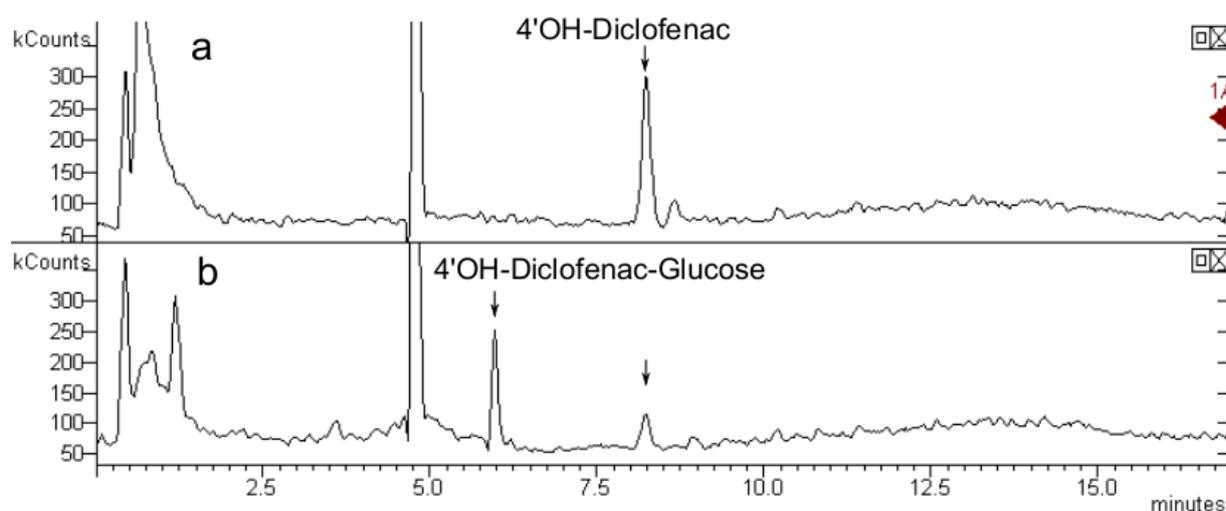


Abbildung 3.26: LC-MS-Chromatogramm eines Tests auf Glycosyltransferase-Aktivität für das Substrat 4'OH-Diclofenac mit Enzym (a) und ohne Enzym (b).

In Abbildung 3.26 ist das LC-MS-Chromatogramm einer Probe für den Test auf GT-Aktivität dargestellt. Der Reaktionsansatz enthielt die unter 2.2.7 angegebenen Komponenten und als Substrat 4'OH-Diclofenac in einer Konzentration von 100 μM sowie eine Enzympräparation (siehe 2.2.5.2) aus der Meerrettich-Wurzelkultur. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde die Reaktion abgestoppt und 5 μl der Probe in das LC-MS-System injiziert.

Während der Inkubation kam es zu einer Konjugationsreaktion, bei der auf das vorgelegte Substrat 4'OH-Diclofenac ein Molekül Glucose übertragen wurde. Der Peak mit einer Retentionszeit von 6,0 Minuten in Abbildung 3.26b zeigte ein m/z von 474 und ließ sich nur in Proben, die sowohl das Enzym als auch eine Glucose-Quelle enthielten, nachweisen. Die MS/MS-Analyse resultierte in exakt dem in Abbildung 3.15 dargestellten Massenspektrum.

3.2.10 P450-Aktivität

Die Beobachtung eines hydroxylierten Diclofenacmetaboliten (vgl. Abschnitt 3.2.2) ließ auf eine Beteiligung der sowohl im Säugerorganismus als auch in Pflanzen bedeutenden Enzymfamilie der P450-Monooxygenasen schließen. Mit Hilfe des unter Abschnitt 2.2.8 beschriebenen Testsystems wurde die mikrosomale P450-Aktivität in Mikrosomenpräparationen von Meerrettich-Wurzelzellen, die für die Dauer von 24 Stunden mit 100 μM Paracetamol bzw. 10 μM Diclofenac inkubiert wurden, bestimmt. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte am Fluoreszenz-Photometer über das Ausbleichen eines fluoreszierenden Farbstoffes. Die Zunahme des Fluoreszenz-Signals entspricht dabei der Menge an verbrauchtem Sauerstoff. Die P450-Enzymaktivität wird als nmol verbrauchter Sauerstoff pro mg Protein angegeben.

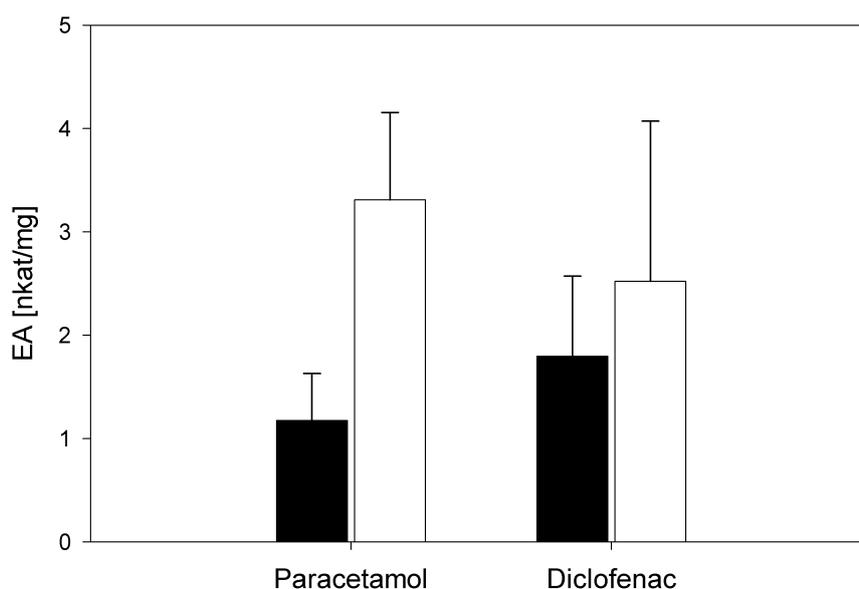


Abbildung 3.27: Spezifische P450-Aktivität in Meerrettich-Wurzelzellen nach Inkubation mit 100 μM Paracetamol bzw. 10 μM Diclofenac für 24 Stunden. Kontrollen (schwarze Balken), behandelte Proben (graue Balken). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte von 3 biologischen Replikaten + Standardabweichung.

Abbildung 3.27 stellt die Ergebnisse eines 24stündigen Inkubationsexperiments mit der Meerrettich-Zellkultur dar. Für beide Wirkstoffe waren die P450-Aktivitäten in den mit Wirkstoff behandelten Proben höher als in den unbelasteten Kontrollen. Dieser Effekt war nach der Paracetamolbehandlung deutlicher ausgeprägt als in den mit Diclofenac behandelten Proben, die in ihren Aktivitäten stärker abwichen. Die bereits beschriebenen Ergebnisse für die identifizierten Metaboliten, lassen auf eine Beteiligung der P450-Enzymgruppe

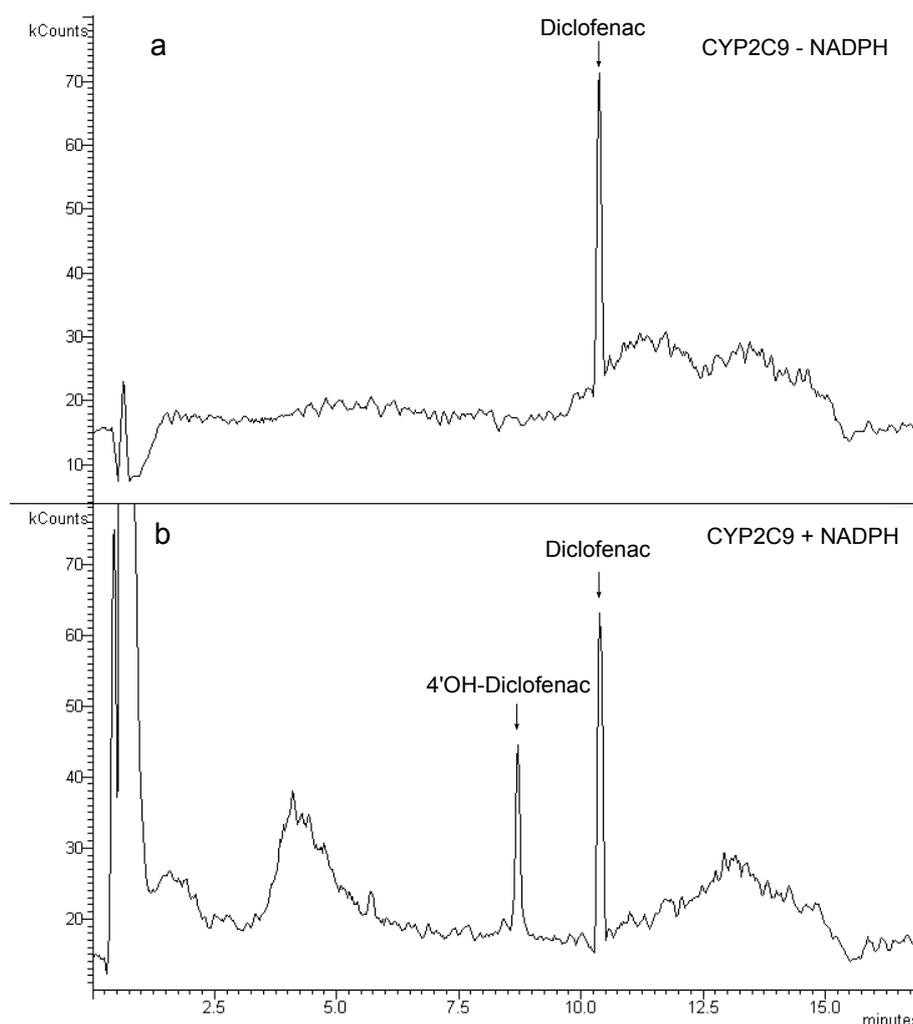


Abbildung 3.28: LC-MS-Chromatogramm: Inkubation von CYP2C9 mit Diclofenac.

schließen. Die dargestellten Ergebnisse belegen einen enzymatischen Umsatz beider Substrate. Die höheren Aktivitäten in den inkubierten Zellen sprechen für eine Induktion der entsprechenden Enzyme.

Im Menschen ist das Protein CYP2C9 aus der Klasse der P450-Monooxygenasen für die Hydroxylierung von Diclofenac zu 4'OH-Diclofenac verantwortlich.

Die dabei ablaufende Oxidation konnte massenspektrometrisch verfolgt werden. P450-Enzyme benötigen für die von ihnen katalysierten Reaktionen NADPH als Reduktionsäquivalent. 10 pmol CYP2C9 wurden mit 200 μ M Diclofenac in der An- und Abwesenheit eines NADPH-regenerierenden Systems (1,3 mM NADPH, 3,3 mM MgCl_2 , 3,3 mM Glucose-6-Phosphat, 0,4 U/ml Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase) für zwei Stunden bei 27 $^\circ\text{C}$ und pH 7,5 (100 mM Tris/HCl) inkubiert. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 200 μ l. Die Reaktion wurde mit 50 μ l ACN/Essigsäure (94/6, v/v) abgestoppt. Die Proben wurden

nach Zentrifugation direkt in das LC-MS-System injiziert und massenspektrometrisch analysiert. In Abbildung 3.28 sind die Chromatogramme der beiden Proben abgebildet. Während es bei der in Abbildung 3.28a dargestellten Probe in Abwesenheit des regenerierenden Systems zu keinerlei Umsatz von Diclofenac und einer Produktbildung kam, ist in Abbildung 3.28b deutlich der Peak des gebildeten 4'OH-Diclofenacs zu erkennen. Die Massenspektren im *Full Scan* und unter MS/MS-Bedingungen bestätigen eindeutig die Struktur des Substrats und des entstandenen Produkts und entsprachen den bereits abgebildeten Spektren der beiden Substanzen Diclofenac bzw. 4'OH-Diclofenac.

3.2.11 Enzymatischer Umsatz von Diclofenac durch Peroxidasen

3.2.11.1 Spektrometrische Charakterisierung des Reaktionsprodukts

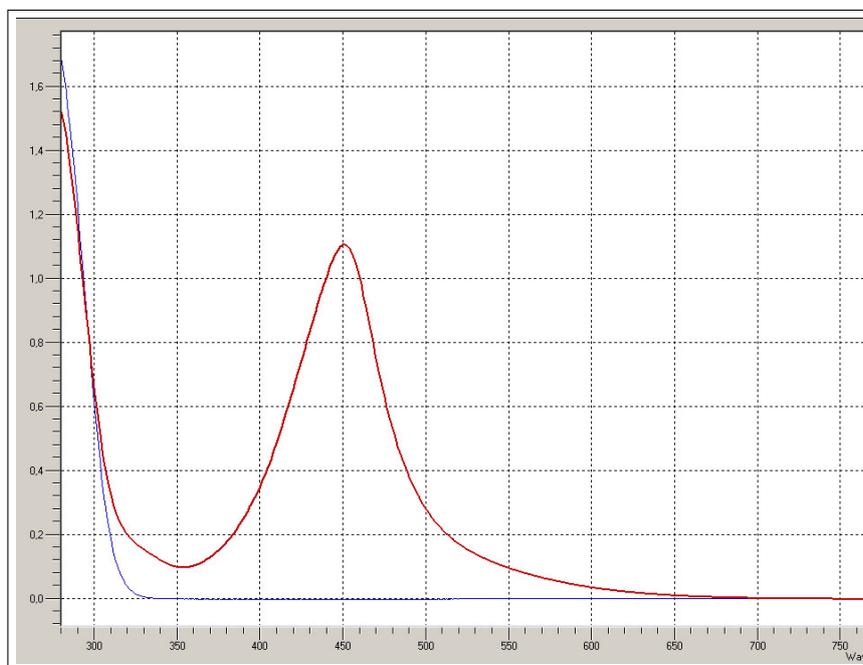


Abbildung 3.29: *Optisches Spektrum des gebildeten Reaktionsprodukts.*

Nach Inkubation von Diclofenac mit Wasserstoffperoxid und Peroxidase aus Meerrettich (HRP) konnte *in vitro* eine rasche Verfärbung des Ansatzes hin zu einer tief orangen Farbe beobachtet werden. Die Aufnahme eines optischen Spektrums im Photometer über einen Wellenlängenbereich von 250-800 nm ergab das in Abbildung 3.29 dargestellte Spektrum. Die blaue Linie stellt dabei das Spektrum des Blanks, d. h. das Spektrum des verwendeten Puffer-Systems dar.

Deutlich war in der Probe ein echtes Absorptionsmaximum bei 450 nm zu erkennen, was auf die Bildung eines durch die enzymatisch katalysierte Reaktion entstandenen

Produkts hinwies. Zur Untermauerung der These einer in Anwesenheit von Peroxidase und Wasserstoffperoxid ablaufenden enzymatisch katalysierten Reaktion mit Diclofenac wurde der enzymatische Umsatz in Abhängigkeit von der Menge an vorhandenem Substrat bzw. in Abhängigkeit der Enzymmenge untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.30a, b dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass der Umsatz über die Dauer von zehn Minuten linear verlief und dabei sowohl von der Menge an eingesetztem Substrat als auch von der im Ansatz verwendeten Enzymmenge abhängig war.

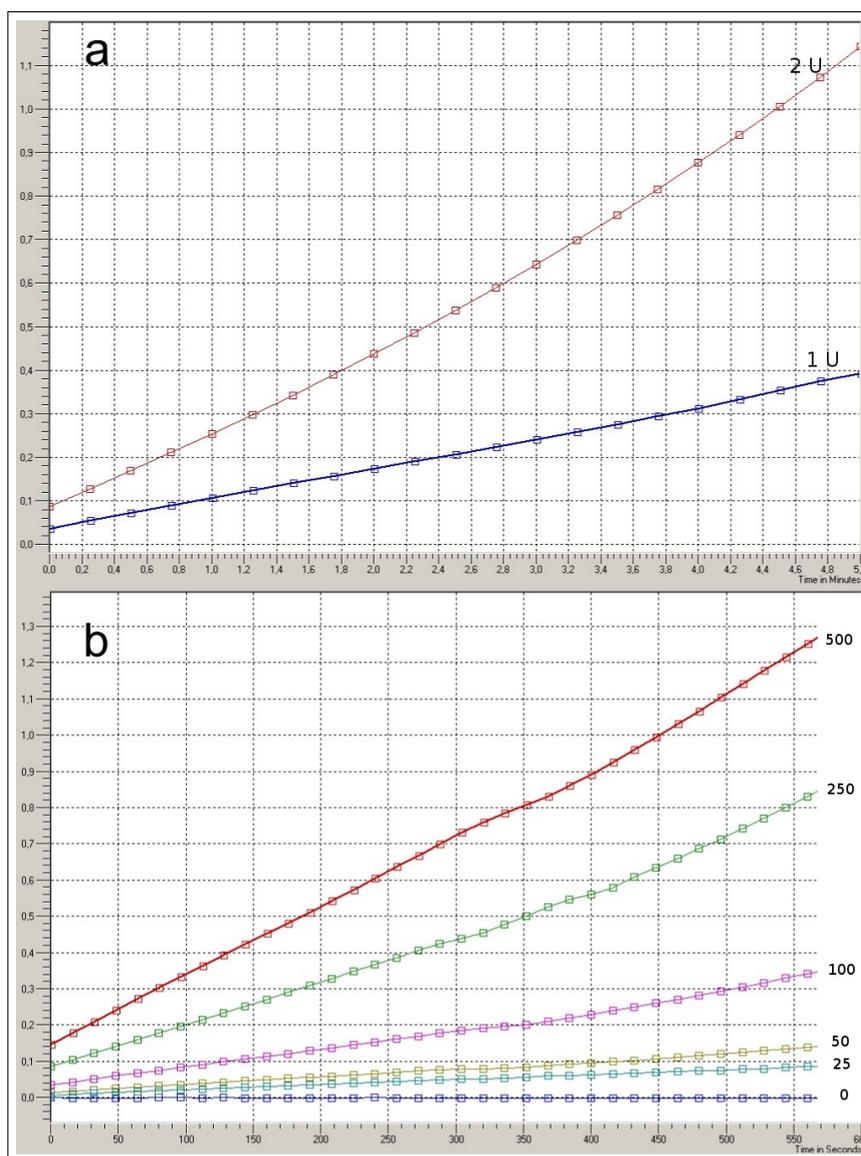


Abbildung 3.30: (a) Absorptionszunahme über die Zeit bei 450 nm in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an HRP. 2 Units POX (rot), 1 Unit POX (blau). (b) Absorptionszunahme über die Zeit bei 450 nm in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration im Ansatz. Zahlenwerte beziehen sich auf die Diclofenac-Konzentration im Ansatz in μM .

Der stärkste Umsatz fand sowohl bei der höchsten Substratkonzentration, als auch bei der größten Menge an eingesetztem Enzym statt. In Abbildung 3.31 ist die bei verschiedenen pH-Werten gemessene Extinktion nach einer Inkubationsdauer von 10 Minuten dargestellt. Im Reaktionsansatz lagen 200 μM Diclofenac, 18 μM Wasserstoffperoxid sowie 20 U Meerrettich-Peroxidase bzw. eine Enzympräparation aus Gerstenwurzeln oder Meerrettichzellen vor. Bei gleicher Menge an eingesetztem Enzym wurde die Extinktion bei 450 nm bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Deutlich ist dabei zu erkennen, dass bei pH 5,5 ein maximaler enzymatischer Umsatz stattfand. Dies war sowohl bei der kommerziell erhältlichen und als rein deklarierten Peroxidase aus dem Meerrettich als auch bei den getesteten Enzympräparationen aus Gerste und der Meerrettich-Wurzelkultur der Fall, was wiederum auf eine direkte Beteiligung von in den Extrakten enthaltenen Peroxidasen schließen ließ. Die dargestellten Daten wurden mit Natriumphosphatpuffern mit den angegebenen pH-Werten ermittelt. Ein alternativer Einsatz von unterschiedlichen Puffersystemen (Succinat, Citrat) im sauren pH-Bereich zeigte in parallel durchgeführten Experimenten keinen Einfluss auf die Menge an gebildetem Reaktionsprodukt (Daten nicht abgebildet).

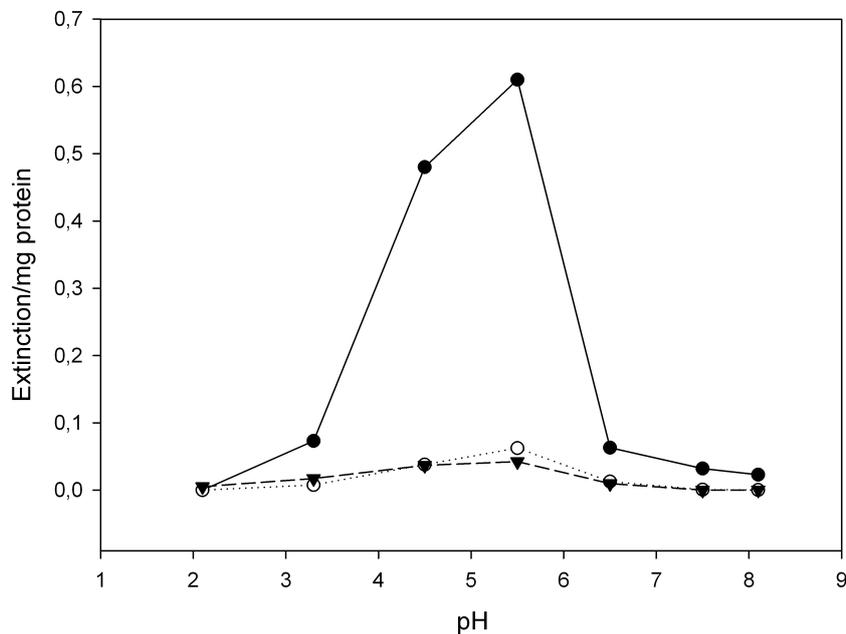


Abbildung 3.31: Enzymatischer Umsatz in Abhängigkeit vom pH-Wert (Natriumphosphat-Puffer). HRP (●), Proteinextrakt von *A. rusticana* (○), Proteinextrakt von *H. vulgare* Wurzel (▲).

3.2.12 Stopped-flow-Spektrometrie mit HRP und Diclofenac

Nachdem in vorherigen Kapitel erstmals der mögliche Umsatz von Diclofenac durch Meerrettich-Peroxidase (HRP) besprochen wurde, konnten kinetische Studien zur Bindung von Diclofenac an HRP durchgeführt werden.

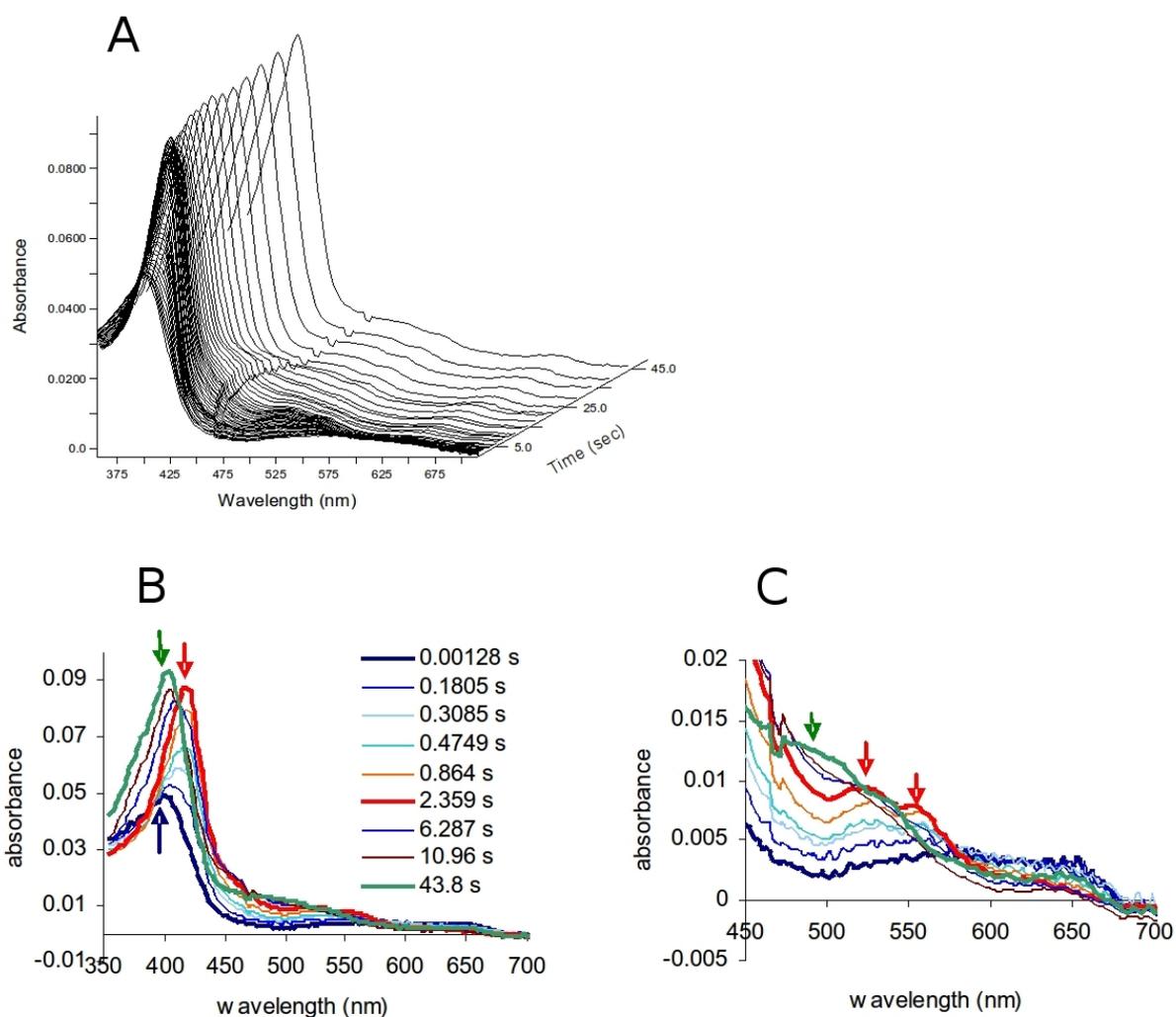


Abbildung 3.32: Reduktion von $1 \mu\text{M}$ HRP-CI durch 50 Moläquivalente Diclofenac in McIlvaine-Puffer bei pH 5,5. Spektraldaten stellen den Übergang von CI (blaues Spektrum, 0,0018 s, $\lambda_{\text{max}}(\uparrow)$: 403 nm) über CII (rotes Spektrum, 2,359 s, $\lambda_{\text{max}}(\uparrow)$: 418,1 nm, 527 nm und 555 nm) nach E (grünes Spektrum, 43,8 s, $\lambda_{\text{max}}(\uparrow)$: 403 nm, 498 nm) dar. Isobestische Punkte: 397 nm (CI/CII), 411 nm (CII/E), 425 nm (CI/E). (A) Rohdaten, (B) Soret Bande, (C) Q-Bande.

Aktive Intermediate der HRP oxidierten Diclofenac. Bei pH 5,5 reagierte das zuvor gebildete CI (Compound I) mit Diclofenac über CII (Compound II) zu E (Enzym im Grundzustand). Dies wurde durch die Verschiebung des Isobestischen Punkts von 397 nm (CI und CII) nach 411 nm (CII und E) bestätigt (Abbildung 3.32A, B, C).

Zusätzlich zeigte die Auswertung der Singulärwertzerlegung (Abbildung 3.33A, B) und der Faktorenanalyse (Abbildung 3.33C) die Bildung dreier, im Spektrum voneinander unterscheidbarer Komponenten, die CI, CII und E zugeordnet werden konnten. Drei V- (Abbildung 3.33A) und U-Vektoren (Abbildung 3.33B) unterschieden sich beständig über alle Wellenlängen bzw. die Zeit und zeigten so das Vorhandensein der entstandenen Zwischenprodukte. Die verbleibenden Vektoren zeigten lediglich ein Rauschen. Die Identifizierung der drei Komponenten rechtfertigte die Anwendung eines Modells mit zwei kinetischen Prozessen auf die Daten, die mit einer zweistufigen Reaktion modelliert wurden: $CI \rightarrow CII \rightarrow E$ (Abbildung 3.33D). Dies wurde weiterhin durch den Vergleich der modellierten Daten mit den kinetischen Daten der Verschiebung der Absorption bei 403 nm und 420 nm bestätigt, die den Zerfall von CI (403 nm), die Bildung von CII (420 nm), den Zerfall von CII (420 nm) und die Bildung von E (403 nm) anzeigten (Abbildung 3.33E). Zusätzlich variierten die Residuen zufällig und zeigten keine systematische Verteilung gegenüber dem fit für alle Wellenlängen (Abbildung 3.33F). Zusammenfassend zeigte das kinetische Modell $CI \rightarrow CII \rightarrow E$ eine gute Korrelation mit den erhobenen Daten.

Wenn die Geschwindigkeitskonstanten pseudo 1. Ordnung (k_{obs}) für die Reduktion von C1 durch Diclofenac gegen die Diclofenac-Konzentration aufgetragen wurden, konnten die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung (k) aus der Steigung der Geraden bestimmt werden (Abbildung 3.34). Ein Korrelationskoeffizient von $R^2=0,9982$ für k_{CI} und $0,9976$ für k_{CII} belegten die gute Korrelation der Daten und die Genauigkeit der bestimmten Umsatzraten 2. Ordnung. Die niedrigen Werte des Y-Achsenabschnitts ($0,5132$ für k_{CI} sowie $0,0945$ für k_{CII}) deuteten auf saubere Präparationen ohne weitere Elektronendonatoren hin (DUNFORD und STILLMAN, 1976). In Tabelle 3.3 sind in der Literatur beschriebene Ratenkonstanten für die Reduktion von HRP-C1 durch Diclofenac und weitere Substrate angegeben.

Tabelle 3.3: Ratenkonstanten 2. Ordnung (k) für die Reduktion von HRP-C1 durch Diclofenac im Vergleich mit anderen Substraten.

Substrat	$k_{CI}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{CII}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	Quelle
Diclofenac	$2,35 \times 10^4$	$8,85 \times 10^2$	vorliegende Arbeit
Diclofenac	$6,05 \times 10^5$	$9,75 \times 10^1$	DUNFORD (1999)
Ferulasäure	$4,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	HENRIKSEN <i>et al.</i> (1999)
Indol-3-propionsäure	$6,6 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	HENRIKSEN <i>et al.</i> (1999)
p-Aminobenzoesäure	$6,5 \times 10^3$	$4,9 \times 10^2$	HENRIKSEN <i>et al.</i> (1999)
Ferrocyanid	$1,4 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	HENRIKSEN <i>et al.</i> (1999)

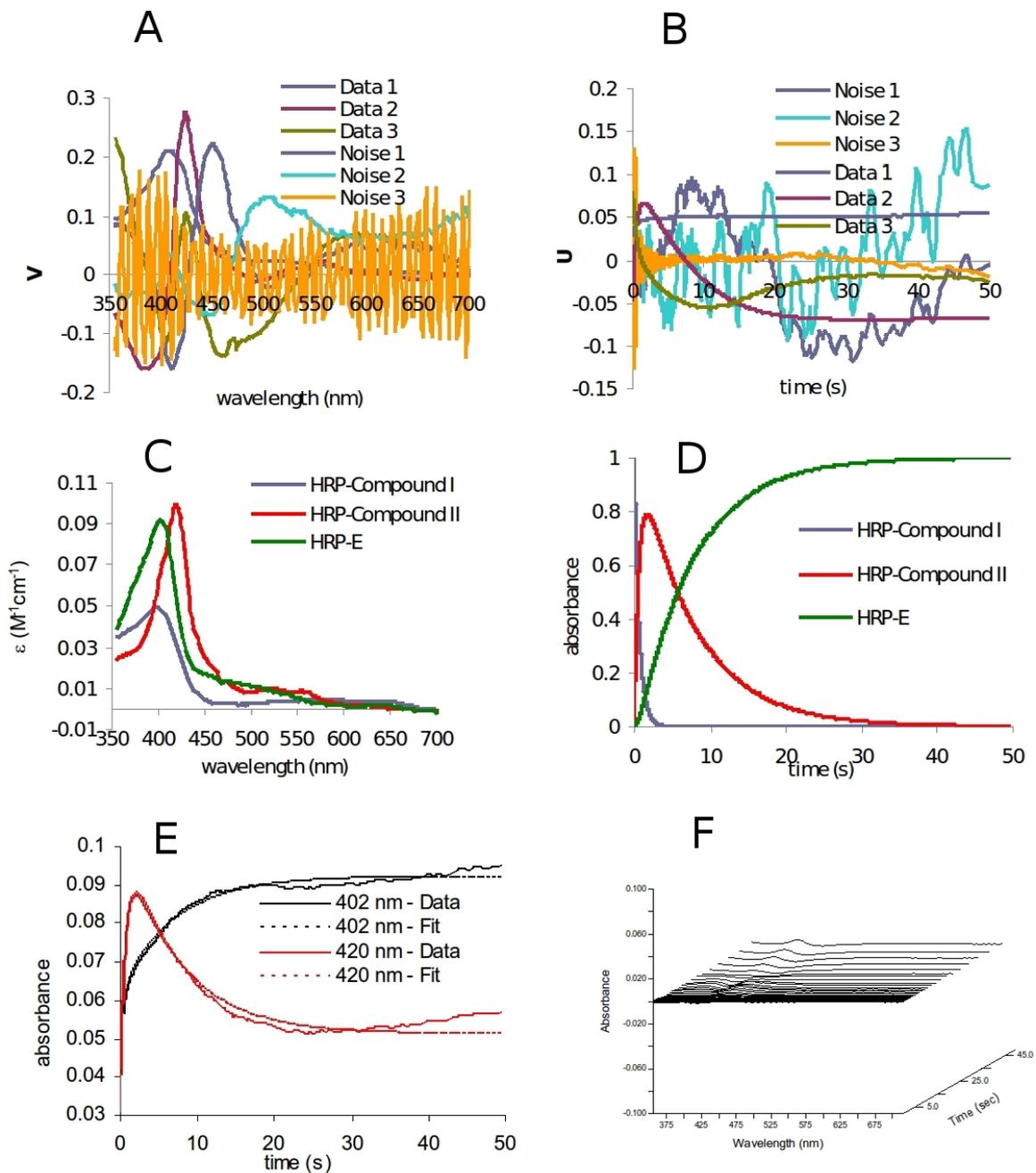


Abbildung 3.33: Stopped- Flow-Analyse des Umsatzes von Diclofenac durch HRP. Reduktion von $1 \mu\text{M}$ HRP-CI durch 50 Moläquivalente Diclofenac in McIlvaine- Puffer bei pH 5,5 (A). V- (B) U-Vektoren (z. B. Intermediate) wurden durch SVD Analyse identifiziert. (C) Durch Faktoranalyse modellierte Absorptionsprofile der Intermediate (z. B. CI, CII und E). (D) Konzentrationsprofile der kinetischen Entwicklung der Intermediärprodukte. (E) Zeitlicher Verlauf der Absorption bei 402 nm (z. B. Zerfall von CI, Bildung von E) und 420 nm (z. B. Bildung und Zerfall von CII) im Vergleich zum modellierten Verlauf (CI→CII→E-Modell). (F) Zufällige Verteilung der Residuen über die Wellenlängen und die Zeit.

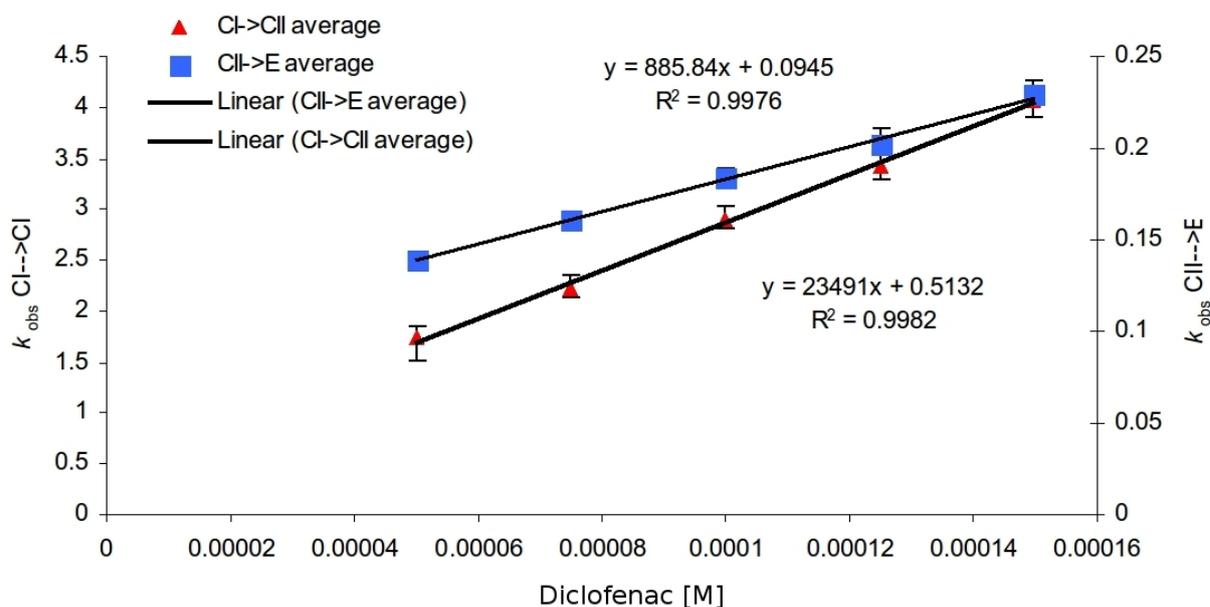


Abbildung 3.34: Kinetische Daten der Reduktion von aktiviertem CI mit Diclofenac bei pH 5,5 in McIlvaine Puffer (k_{obs} =Geschwindigkeitskonstanten pseudo 1. Ordnung).

Damit konnte klar belegt werden, dass Diclofenac durch die HRP katalytisch umgesetzt wurde. Das dabei entstandene Reaktionsprodukt wurde massenspektrometrisch analysiert.

3.2.13 Massenspektrometrische Charakterisierung

Neben der Bestimmung der optischen Eigenschaften des gebildeten Reaktionsproduktes erfolgten massenspektrometrische Untersuchungen um die gebildete orange Substanz genauer charakterisieren zu können. Bei den mit dem gebildeten Stoff durchgeführten Analysen konnte im Vergleich zu Kontroll-Inkubationen ohne Peroxidase ein Signal mit m/z 310 identifiziert werden, welches sich reproduzierbar nur in Inkubationen, die das Enzym enthielten, nachweisen ließ (Abbildung 3.35).

MIYAMOTO *et al.* (1997) beschreiben in ihrer Studie Oxidationsexperimente von Diclofenac mit Hypochloriger Säure (HOCl) und dem Enzym Myeloperoxidase aus den neutrophilen Granulozyten im Säugerorganismus einen dabei entstehenden Metaboliten mit dem gleichen Masse-Ladungsverhältnis von m/z 310. Unter sehr ähnlichen chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen zeigte der Metabolit in MS/MS-Experimenten ein dominierendes Fragment mit m/z 292 (100 %). Das MS/MS-Spektrum des bei Inkubation von Diclofenac, H_2O_2 und der pflanzlichen Peroxidase aus *A. rusticana* entstehenden Metaboliten ist in Abbildung 3.36 dargestellt. Auffällig war dabei die Bildung genau eines Fragments mit m/z 292, welches auf die Abspaltung von H_2O schließen ließ (MIYAMOTO *et al.*, 1997; FORREZ *et al.*, 2010). Die Autoren postulieren

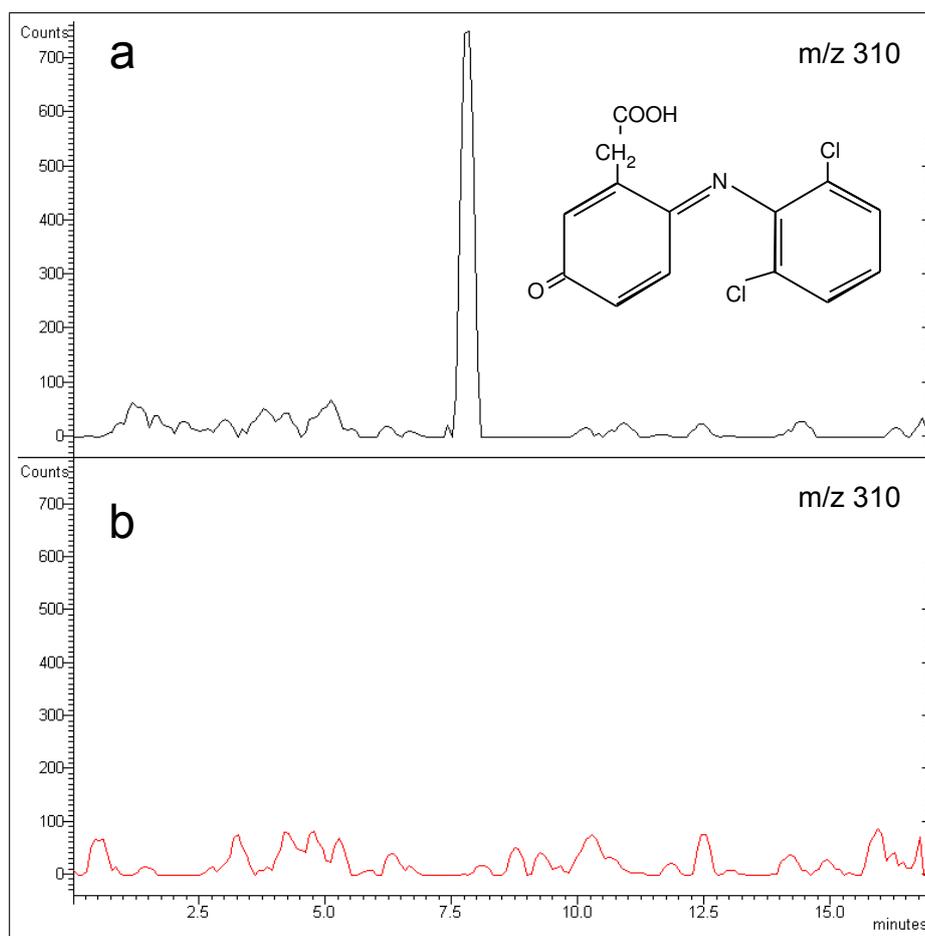


Abbildung 3.35: LC-MS-Chromatogramm von $(M+H)^+$ m/z 310 eines Ansatzes von Diclofenac, HRP und H_2O_2 (a) sowie einem Kontrollansatz ohne HRP (b).

die Entstehung eines reaktiven Iminoquinon-Metaboliten des Diclofenacs. Zusätzlich zu der massenspektrometrischen Untersuchung beschreiben MIYAMOTO *et al.* (1997) ein Absorptionsmaximum für den Metaboliten, welches bei ~ 450 nm liegt und dem in der vorliegenden Arbeit bestimmten Maximum sehr ähnlich war (siehe Abbildung 3.29). Weiterhin konnte eine rasche Entfärbung sowie eine Veränderung des Spektrums nach Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Ascorbinsäure beobachtet werden, was ebenfalls der Schilderung der Autoren der oben genannten Studie entsprach (Daten nicht abgebildet).

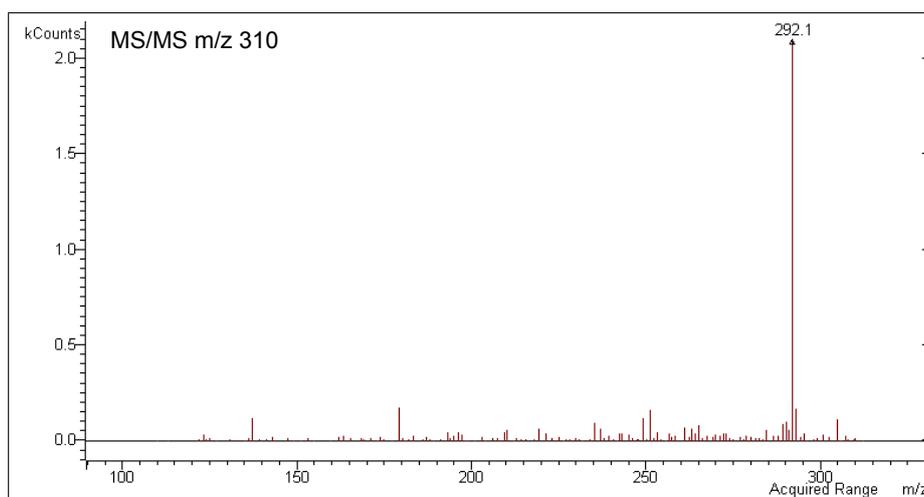


Abbildung 3.36: MS/MS-Spektrum des bei Inkubation von Diclofenac, H_2O_2 und HRP entstehenden Metaboliten mit $(M+H)^+$ m/z 310.

3.2.14 Zusammenfassung der postulierten Metaboliten

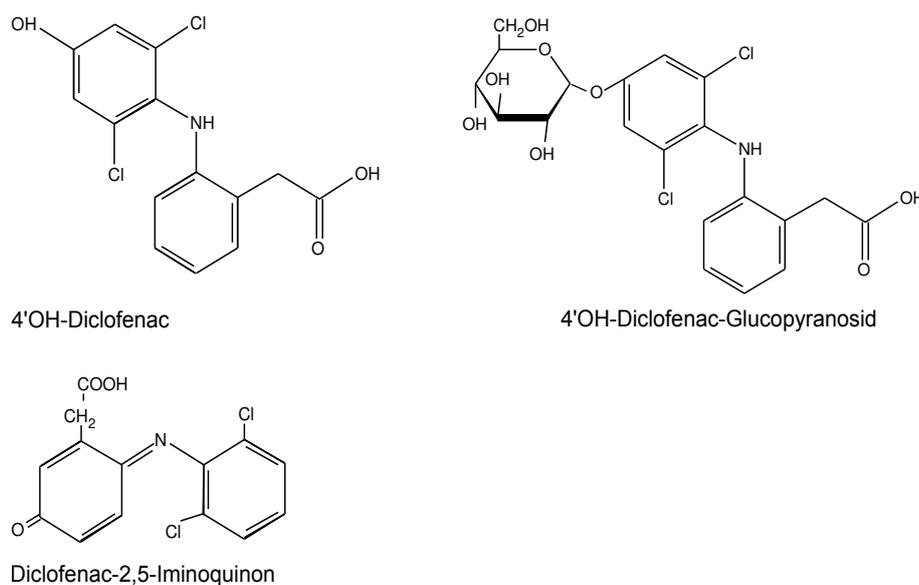


Abbildung 3.37: Postulierte Diclofenacmetaboliten in Pflanzen.

Zum Ende des Kapitels sollen die erwähnten Metaboliten des Diclofenacs noch einmal zusammenfassend erwähnt werden (Abbildung 3.37). Das an 4'-Position hydroxylierte Diclofenac geht aus einer Oxidationsreaktion unter Beteiligung von P450-Monooxygenasen hervor. Glycosilierung erfolgt an der in Phase-1 am Molekül eingefügten Hydroxygruppe. Für die Bildung von Diclofenac-2,5-Iminoquinon wird die Beteiligung pflanzlicher Peroxidasen postuliert.

4 Diskussion

Während die Phytoremediation von Industrieschadstoffen und Schwermetallen (SCHRÖDER *et al.*, 2007; SCHRÖDER und COLLINS, 2002; VANEK *et al.*, 2006) in den letzten Jahren verstärkt Interesse gefunden hat, das auch zu intensiven Studien über den pflanzlichen Entgiftungsstoffwechsel führte, ist die Menge an vorhandenen Daten zur Aufnahme und Entgiftung von Pharmaka in Pflanzen vergleichsweise gering.

Dabei ist gerade von diesen Substanzen, die speziell für Interaktionen mit physiologischen Endpunkten und metabolischen Stellgrößen synthetisiert werden, eine starke Einwirkung auf den Stoffwechsel zu erwarten.

Die für die Studie verwendeten Pflanzen wurden nach mehreren Gesichtspunkten ausgewählt. In bereits durchgeführten Arbeiten hat sich die Gerste als Modellsystem im Labor bewährt. Sie zeichnet sich unter anderem durch ihre ganzjährige Verfügbarkeit und ihre guten Wachstumseigenschaften in hydroponischen Systemen aus. Als Vertreter aus der Familie der Süßgräser (Poaceae) ist sie eng verwandt mit *Phragmites australis*, welches eine herausragende Rolle in der biologischen Abwasserreinigung durch Pflanzen einnimmt (FEDIUC und ERDEI, 2002; YANYU *et al.*, 2010). Auch in der Literatur ist der Einsatz von Gerste für Studien zur Phytoremediation beschrieben (GHALY und FARAG, 2007).

Die sterile Meerrettich-Wurzelkultur eignet sich hervorragend zur Durchführung von Metabolismus-Studien. Die Wachstumsbedingungen können komplett kontrolliert und der Einfluss von Mikroorganismen kann ausgeschlossen werden. Hinzu kommt hier ebenfalls das schnelle Wachstum sowie die Möglichkeit, über einen langen Zeitraum hinweg mit gleichbleibend homogenem Pflanzenmaterial zu arbeiten. Ebenso wie die Gerste ist die Wurzelkultur von *A. rusticana* ein in der pflanzenphysiologischen Forschung etabliertes Modellsystem (NEPOVIM *et al.*, 2004).

Bei beiden verwendeten Wirkstoffen handelt es sich um Vertreter aus der Klasse der nichtopioiden Analgetika, die aufgrund ihrer enormen Verbreitung und der hohen Produktionsmengen als umweltrelevant eingestuft werden müssen. Diclofenac ist eine der pharmazeutischen Substanzen, die schlecht durch herkömmliche Verfahren der Abwasserreinigung eliminiert wird und deshalb besonders häufig in Oberflächengewässern nachgewiesen wird (WIEGEL *et al.*, 2004; HEBERER *et al.*, 2002).

4.1 Paracetamol

Für Paracetamol konnte eine Aufnahme in die Pflanzen nachgewiesen werden. Während diese Studie die Aufnahme von Paracetamol in einem Kurzzeitexperiment in die Wurzelzellen des Meerrettichs beschreibt, untersuchten BARTHA *et al.* (2010) in der aktuellen Studie die Aufnahme und den Einfluss von Paracetamol in *Brassica juncea*. Dabei kommen sie zu einem ähnlichen Ergebnis: Die Aufnahme des Wirkstoffs erfolgt sehr rasch, ebenso wie die mit der Aufnahme einsetzende Metabolisierung der Substanz.

Die Metabolismusstudie von Paracetamol in einem sterilen Modellsystem wie der Wurzelkultur von *A. rusticana* lieferte erneut eine Bestätigung des sogenannten Konzepts der grünen Leber. Mit der Bildung eines Glucose-Konjugats einerseits und der Formation eines Glutathion-Konjugats andererseits sind zwei der im Pflanzenreich bedeutsamsten Mechanismen zur Entgiftung von Xenobiotika verwirklicht. Die Tatsache, dass für einen Wirkstoff zwei voneinander völlig unabhängige Metaboliten nachgewiesen wurden, setzt die Beteiligung zweier ebenfalls unabhängig voneinander arbeitenden Stoffwechselwege voraus.

Der in Menschen am häufigsten gebildete Metabolit des Paracetamol ist die glucuronisierte Form, die zwischen 40 und 67 % der gebildeten Konjugate repräsentiert. Der Rest wird zu einem Teil an Sulfat (20-46 %) oder zum anderen an Cystein (3 %) gebunden (BERTOLINI *et al.*, 2006). Ein Anteil von 5-15 % wird von P450-Monooxygenasen weiter zu N-Acetyl-p-benzoquinonimin (NAPQI) oxidiert, das spontan an Nukleotide, DNA oder RNA binden kann und so seine Toxizität entfaltet. Entgiftung ist nur möglich wenn das NAPQI mit Glutathion weiter reagieren kann (CORCORAN *et al.*, 1980). Der dabei entstehende Paracetamol-Glutathion-Komplex wird weiter in die nichttoxischen Cystein- und Mercapturformen überführt, die dann über den Urin ausgeschieden werden (MILLER *et al.*, 1976).

Die Identifizierung der in Pflanzen gebildeten Paracetamol-Metaboliten erfolgte massenspektrometrisch, wobei der Analyse charakteristischer Massenübergänge in MS/MS-Experimenten eine besondere Bedeutung zukommt.

Detektiert wurden auf diese Art sowohl ein Glucose-Konjugat als auch ein Glutathion-Konjugat bzw. der daraus entstandene Cysteinmetabolit. Der detektierte Massenübergang war im Falle des Paracetamol-Glutathion-Konjugats m/z 457 \rightarrow 328, welcher auf die Abspaltung des Glutamylrests zurückzuführen ist. Exakt der gleiche Massenübergang wurde von MUTLIB *et al.* (2000) und KOSTRUBSKY *et al.* (2005) für Paracetamol-Glutathion in Rattenlebern bzw. menschlichen Hepatozyten beschrieben. Die Identifizierung des Cysteinmetaboliten (m/z 271) erfolgte anhand des Fragments mit m/z 182, welches durch einen Bruch am Schwefelatom im Molekül entsteht.

Die Identifizierung eines Paracetamol-Glucopyranosids erfolgte über die Detektion eines Massendefekts von m/z 162, was der Abspaltung eines Moleküls Glucose entspricht. Das Glucopyranosid von Paracetamol war bis zum jetzigen Zeitpunkt nur in einem aus Boden isolierten filamentösen Pilz beschrieben. Die Autoren der Studie HUANG *et al.* (2006) beschreiben, ebenfalls mit LC-MS detektiert, den entsprechenden Massenübergang von m/z 314 \rightarrow 152. Hinzu kommt, in der vorliegenden Arbeit und als ein weiterer Beleg der Struktur, das Auftreten des entsprechenden Natriumaddukts mit $[M+Na]^+$ m/z 336 und dem entsprechenden Fragment mit m/z 174, was eindeutig auf eine Anlagerung des Natriumions an die Struktur des Paracetamols hindeutet. Die verwendete Ionenfalle erlaubt die Durchführung sogenannter Mehrfachstossexperimente. In MS³-Experimenten konnte das Paracetamol-Glucopyranosid mit m/z 314 in einer ersten Fragmentierung zu m/z 152, und in einer weiteren zu m/z 110 fragmentiert werden.

Neben der massenspektrometrischen Charakterisierung konnte in den beschriebenen Inkubationsexperimenten mit käuflicher β -D-Glucosidase die glycosidische Bindung im von den Wurzelzellen gebildeten Paracetamol-Glucopyranosid wieder enzymatisch aufgespalten werden. Dies hatte zum einen das Verschwinden des Signals m/z 314 bzw. 336 im Chromatogramm zur Folge, und zum anderen resultierte es in der Zunahme um die entsprechende Menge an durch die Spaltung freigesetzten Paracetamol.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen im Vergleich zum Menschen auf eine sehr ähnliche Art der Entgiftung von Paracetamol in Pflanzen schließen. Aufgrund des Fehlens von Glucuronsäure in den meisten Arten ist die Glucuronidierung eines Fremdstoffes in Pflanzen nicht existent, wohingegen eine Konjugation mit Glucose in wenigen Fällen für bestimmte Stoffe auch im Säugerorganismus existiert. KIRKMAN *et al.* (1998) beschreiben in ihrer Studie die Bildung eines Bromfenac-Glycosids in Ratten.

In dem für die Studie verwendeten Modellsystem, der Wurzelkultur von Meerrettich, ist die glycosilierte Form des Paracetamols mit 64 % der am häufigsten auftretende Metabolit. Ausgehend von der Struktur des Paracetamols und dem in MS/MS-Experimenten auftretenden Verlust des Glucoserests ist die Bildung eines O-Glycosids an der Hydroxygruppe der Ringstruktur des Acetaminophens äußerst wahrscheinlich. Die vorliegende Arbeit liefert auch hier den ersten Befund zur Bildung eines Paracetamol-O-Glycosids in Pflanzen.

Die Reaktionen des Wirkstoffs Acetaminophen sowohl mit Glutathion als auch Glucose sind sehr rasch ablaufende Prozesse. Beide konjugierten Formen waren bereits nach einer Inkubationszeit von nur drei Stunden in den Zellen nachweisbar. Der Bildung eines Paracetamol-Glutathion-Komplexes muss die Oxidation des Wirkstoffes zu NAPQI voraus gehen, was stark auf eine Beteiligung des pflanzlichen P450-Monooxygenasen-Enzymsystems schließen lässt.

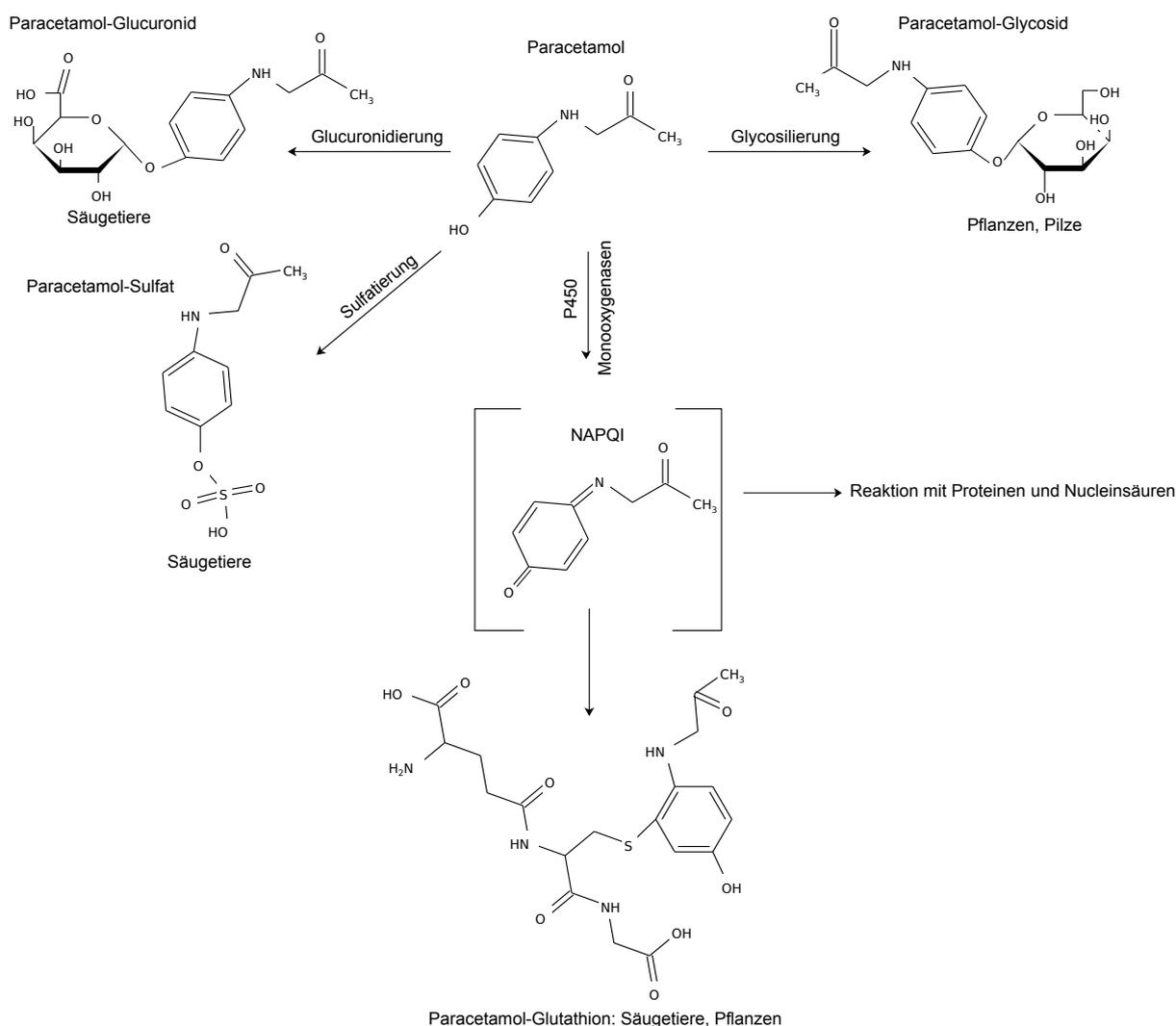


Abbildung 4.1: Postulierter Metabolismus von Paracetamol in verschiedenen Organismen (HUBER et al., 2009).

NAPQI selbst konnte in den Pflanzen als intermediärer Metabolit nicht eindeutig detektiert werden. Dies kann zum einen an der hohen Reaktivität des Intermediates liegen, zum anderen unterscheiden sich Paracetamol und NAPQI in ihrer molaren Masse lediglich um ein Proton, was eine eindeutige Identifizierung im Massenspektrometer erschwert. Ebenso wie im Säuger sind P450-Monooxygenasen in Pflanzen an einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen beteiligt, insbesondere bei der Entgiftung von organischen Fremdstoffen (SIMINSZKY, 2006; PFLUGMACHER und SANDERMANN, 1998a).

Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen stellt das mit Glutathion konjugierte Paracetamol mit 17 % in Pflanzen den kleineren Anteil der beiden Konjugate dar, was wiederum dem im menschlichen Organismus beobachteten Verhältnis der Metaboliten entspricht.

Im Hinblick auf die Phytoremediation von Arzneimittelwirkstoffen wie dem Paracetamol kommt die Bildung eines Paracetamol-Glucopyranosids eine besondere Rolle zu, da die Glycosilierung einen deutlichen Hinweis auf die spätere Bildung von gebundenen Rückständen und somit einem dauerhaften Einbau in die pflanzliche Zellwand gibt (KOMOSSA und SANDERMANN, 1995).

Im Gegensatz zum tierischen System konnte zu keinem Zeitpunkt der durchgeführten Experimente eine sulfatierte Form des Paracetamols in Pflanzen nachgewiesen werden. Sulfotransferasen sind in Pflanzen häufig vorkommende und detailliert untersuchte Enzyme. Ihre Rolle bei der Entgiftung von Xenobiotika ist dennoch offenbar als vergleichsweise gering einzustufen (WEINSHILBOUM *et al.*, 1997). Inwieweit das Fehlen dieser Struktur in den untersuchten Proben tatsächlich auf einen für dieses Substrat fehlenden Stoffwechselweg hindeutet, oder aber ob die Sulfat-Konjugation mit der angewendeten Methode und den zur Verfügung stehenden analytischen Mitteln nicht nachgewiesen werden konnte, bleibt zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch offen. Anzuführen sei aber hier der wiederholte Versuch, das sulfatierte Paracetamol mit unterschiedlichen Enzympräparationen *in vitro* zu erzeugen. Dies gelang jedoch mit keiner der getesteten Fraktionen. Eine Zusammenfassung des Metabolismus von Paracetamol in den verschiedenen Organismen, inklusive der in dieser Arbeit postulierten Verstoffwechslung in Pflanzen ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

4.2 Diclofenac

Mit der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss und der Metabolismus des weltweit verbreiteten Schmerzmittels und Entzündungshemmers Diclofenac auf höhere Pflanzen untersucht. SCHMITT-JANSEN *et al.* (2007) analysieren in ihrer Arbeit die Toxizität von Diclofenac und dessen durch Phototransformation entstehende Abbauprodukte in der einzelligen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus*. Dabei wurde aber lediglich die Reproduktion der Alge unter dem Einfluss des Wirkstoffs und der Phototransformationsprodukte untersucht, wobei diese nicht genauer charakterisiert wurden. Daneben existieren Studien zur Bewertung des ökotoxikologischen Risikos von Diclofenac vor allem in Hinblick auf aquatische Organismen (FERRARI *et al.*, 2003; TRIEBSKORN *et al.*, 2004).

Die vorliegende Studie wurde neben der sterilen Wurzelkultur von *A. rusticana* mit Gerste (*H. vulgare*) durchgeführt, um neben dem vereinfachten System einer Zellkultur tatsächlich den Metabolismus in einer höheren Pflanze analysieren zu können. Mit ^{14}C -markiertem Diclofenac konnte erstmalig die Aufnahme des Wirkstoffs sowohl in Wurzeln als auch in Blätter gezeigt werden. Durch den Wirkstoff verursachter Stress auf die Pflanzen wurde dabei anhand verschiedener Parameter erfasst. Es konnte gezeigt werden, dass von den Pflanzen aufgenommenes Diclofenac einen negativen Einfluss auf den Gehalt der photosynthetisch aktiven Pigmente (Chlorophyll a und Chlorophyll b) sowie die Menge an Carotinoiden in den Blättern der Gerste hat. Des Weiteren konnten in diesem Zusammenhang Effekte auf den Glutathiongehalt, die Aktivität von Glutathion S-Transferasen und wichtige Enzyme des Glutathion-Ascorbat-Zyklus festgestellt werden.

Zentraler Aspekt der Dissertation war die Identifizierung der für die Detoxifizierung verantwortlichen Stoffwechselwege und der daran beteiligten Enzyme sowie eine Charakterisierung der entstehenden Metaboliten.

Im Folgenden sollen die erhobenen Daten kritisch diskutiert und mit der bereits zum Thema vorhandenen Literatur korreliert werden.

4.2.1 Wirkstoffaufnahme

Durch eine Aufnahmestudie mit ^{14}C markiertem Diclofenac konnte die Aufnahme des Wirkstoffs über die Wurzeln und der Transport in den Spross und die Blätter eindeutig belegt werden.

Die Aufnahme war dabei über den Zeitraum von 48 Stunden linear. Das Erreichen einer Sättigung der Aufnahme konnte über die beprobten zwei Tage nicht beobachtet werden. Offensichtlich war das Konzentrationsgefälle zwischen der äußeren Wirkstoffkonzentration im Nährmedium zur Wirkstoffkonzentration im Gewebe stets groß genug. Dies kann zum

einen durch die hohe Konzentration im Medium bedingt sein, zum anderen aber kann der schnell einsetzende Metabolismus, durch den ständig freies Diclofenac verbraucht wird, Grund für ein permanentes Konzentrationsgefälle sein.

Mit Ausnahme von wenigen, in ihrer Struktur Phytohormonen sehr ähnlichen Stoffen ist die Aufnahme und der Transport von Xenobiotika in Pflanzen ein passiv ablaufender Prozess, der auf Diffusion und der Löslichkeit einer Substanz in Membranen und Wasser beruht. Dabei sind die Molekülgröße (TOPP *et al.*, 1986) und die physiko-chemischen Eigenschaften des Stoffes von besonderer Bedeutung (TRAPP, 1995). Es wird angenommen, dass Substanzen mit einem Molekulargewicht > 1000 nicht mehr von biologischen Membranen absorbiert werden können (SANDERSON *et al.*, 2004). Stark polare Moleküle können biologische Membranen nicht passieren, wo hingegen stark lipophile Stoffe an im Boden vorhandenen Strukturen sorbieren und deshalb für die Pflanze nicht verfügbar sind. Eine optimale Aufnahme in Pflanzen ist für Xenobiotika mit einem $\log K_{OW}$ (Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient) zwischen 0,5 und 4 beschrieben (HARVEY *et al.*, 2002; SCHRÖDER und COLLINS, 2002). Für die effektivste Aufnahme einer Chemikalie in den Spross beschreiben BRIGGS *et al.* (1982) einen $\log K_{OW}$ von 2. Des Weiteren besteht eine Abhängigkeit zwischen dem pK_S -Wert (Säurekonstante) einer Substanz und ihrer Mobilität in Pflanzen. Diclofenac liegt mit einem $\log K_{OW}$ von 4 und einem pK_S -Wert von 4,15 noch am Rande des von BROMILOW und CHAMBERLAINE (1998) beschriebenen Bereichs, in dem ein Transport über das Xylem erfolgen kann.

Mit seinen lipophilen Eigenschaften kann das Diclofenac biologische Membranen leicht passieren und so in die Wurzeln gelangen. Die Limitierung der Aufnahme von lipophilen Substanzen durch Absorptionsprozesse an biologische Matrices kann in diesem Falle vernachlässigt werden, auch wenn die Absorption einer Diclofenac-Fraktion an die verwendeten Glasperlen beobachtet werden konnte.

In den Blättern deuten die geringen Mengen an aufgenommenen Diclofenac zu Anfang des Experiments auf eine gewisse Verzögerung im Transport des Wirkstoffs in die Blätter hin. Offensichtlich muss zunächst eine bestimmte Konzentration an Diclofenac in den Wurzeln vorliegen, bis ein linear ansteigender Transport der Substanz in den oberirdischen, transpirierenden Teil der Pflanzen einsetzt.

Die in die Blätter aufgenommenen Mengen von Diclofenac lagen jedoch im Durchschnitt zwei Zehnerpotenzen unter den Gehalten in den Wurzeln.

Aufgrund seiner physiko-chemischen Eigenschaften muss von einem eingeschränkten Transport von Diclofenac über das Xylem ausgegangen werden. Das junge Alter der Pflanzen und die Anzucht in einem geschlossenem System und den daraus resultierenden

Transpirationsraten sind weitere Faktoren, welche den geringen Transport in die Blätter erklären können.

WINKER *et al.* (2010) untersuchten die Aufnahme der beiden Humanarzneimittel Carbamazepin und Ibuprofen in das deutsche Weidelgras (*Lolium perenne*) vor dem Hintergrund des Einsatzes von Humanurin als Dünger in der Landwirtschaft.

In der über einen Zeitraum von drei Monaten angelegten Studie beschreiben die Autoren eine Aufnahme von Carbamazepin in die Blätter und Wurzeln von *L. perenne*. Dabei wurden die höchsten Gehalte des Wirkstoffs (34 %) in Spross und Blättern und nur ein geringer Anteil von 0,3 % in den Wurzeln der Pflanzen wiedergefunden. Ibuprofen wurde effektiv biologisch abgebaut und konnte weder in Wurzel noch in Blättern der Versuchspflanzen nachgewiesen werden.

Aufgrund der wesentlich längeren Exposition fällt ein direkter Vergleich der Experimente schwer, dennoch kann der deutlich niedrigere K_{OW} -Wert von 2,45 (bei pH 7,4) den im Vergleich zum Diclofenac effektiveren Transport des Carbamazepins in die Blätter erklären.

Die Ergebnisse des mit einer Wirkstoffkonzentration von 100 μM durchgeführten Experiments widersprechen der These einer konzentrationsabhängigen Diclofenacaufnahme in die Pflanzen. In den Wurzeln lagen bei dieser Wirkstoffkonzentration die Diclofenac-Gehalte nach 48 Stunden im Durchschnitt unter den Gehalten der Pflanzen aus dem Parallel-Experiment mit 10 μM Diclofenac. In den Diclofenac-Gehalten der Blätter wird dieser Unterschied allerdings weniger stark deutlich. Offenbar sind die Pflanzen bei beiden Experimenten ab einer gewissen Wirkstoffkonzentration in der Wurzel nicht in der Lage, größere Mengen an Diclofenac in die Blätter zu transportieren.

4.2.2 Antioxidativer Stoffwechsel und Glutathion-Gehalte

Die Bildung von ROS in Pflanzen kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen akkumulieren ROS in der pflanzlichen Zelle als toxische Nebenprodukte aus Reaktionen des anaeroben Stoffwechsels bei verschiedenen Stresssituationen. Andererseits fungieren sie als wichtige und für die Pflanzen unverzichtbare Signalmoleküle bei der Signaltransduktion (MILLER *et al.*, 2008). Oftmals wirken exogene Faktoren als Auslöser für die Entstehung von oxidativen Stress. Diese exogenen Faktoren können biotischer Natur sein, wie beispielsweise Pathogenbefall bzw. Verwundung durch Fressfeinde. Wasser-, Trocken-, Salz- oder UV-Stress sind abiotische Auslöser, die in der Pflanze oxidativen Stress verursachen und die Bildung von ROS fördern können. Oftmals jedoch handelt es sich um abiotische Faktoren anthropogenen Ursprungs, die auf die Pflanzen einwirken. Dies können die Belastung mit Schwermetallen oder eben auch die Exposition der Pflanzen mit Xenobiotika unterschiedlichster Art und Herkunft sein (MITTLER, 2002; MAKSYMIEC, 2007).

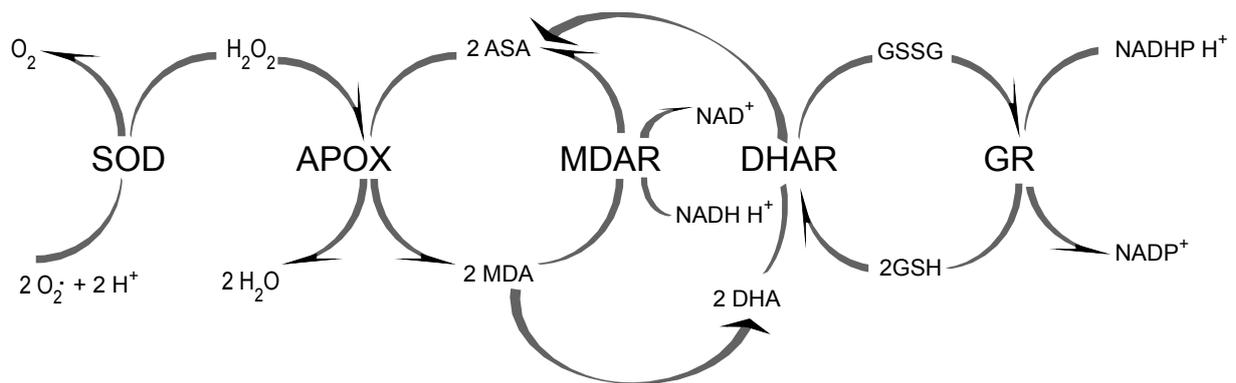


Abbildung 4.2: Ascorbat-Glutathion-Zyklus. Entgiftung von Superoxid und Wasserstoffperoxid unter Verbrauch von Ascorbat und der Regenerierung von Ascorbat auf Kosten von Glutathion und NADPH (nach FOYER et al. (1994)).

Der Gehalt an photosynthetisch aktiven Pigmenten in Pflanzen wird in der Literatur oftmals als Indikator für pflanzlichen Stress genutzt (HEGEDÜS *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2007; JIANG und YANG, 2009). In den durchgeführten Experimenten zeigte die Behandlung mit Diclofenac einen deutlichen Einfluss auf den Chlorophyll- und Carotinoidgehalt in den Blättern der Gerste. Der Effekt war dabei abhängig von der Diclofenac-Konzentration und schon innerhalb der ersten drei Tage zu beobachten. Die Chlorophyll-Homöostase in Pflanzen kann empfindlich durch reaktive Sauerstoffspezies beeinflusst und gestört werden. Die reduzierten Pigmentgehalte in den Pflanzen waren ein erster Anhaltspunkt für die durch Diclofenac hervorgerufene Entstehung von ROS.

Pflanzen haben aufgrund ihrer sessilen Lebensweise Mechanismen und Schutzreaktionen entwickelt, um mit oxidativen Stress in Form von ROS umzugehen. In den Expositions-Experimenten konnte ein Einfluss des Diclofenacs auf einzelne Enzyme des oxidativen Stoffswechsels festgestellt werden. Diclofenac wirkte in den Wurzeln induzierend auf die Enzyme Glutathion-Reduktase und Katalase und verursachte generell einen leichten Anstieg in der Aktivität der Peroxidasen. Gemeinsam wirken diese Enzyme sowohl bei der Entgiftung, als auch bei der Wiederherstellung des für die Pflanzen notwendigen Gleichgewichts an ROS mit.

Katalase-Aktivitäten waren vor allem nach 72 Stunden und bei einer Belastung mit der sehr hohen Diclofenac-Konzentration von 100 μM erhöht, was auf eine zelluläre Reaktion gegen die erhöhte Bildung von H_2O_2 zu diesem frühen Zeitpunkt des Experiments hindeutet. Die im weiteren Verlauf des Experiments absteigende Induktion der Katalase-Aktivität lässt auf eine funktionierende Abwehr der Pflanzen schließen. In den Blättern war eine ähnliche Situation zu beobachten, wengleich sich hier die erhöhten Aktivitäten auch noch nach einer Woche nachweisen ließen.

Auffällig war die signifikante Erhöhung der Glutathion-Reduktase-Aktivität in den Wurzeln nach drei Tagen. Diese Aktivität korreliert dabei mit den zu diesem Zeitpunkt ermittelten Thiol-Gehalten. Mit einem Verhältnis GSH zu GSSG von 0,5 war dieses ungewöhnlich stark zu Gunsten der oxidierten Form hin verschoben, was die hohe GR-Aktivität zu diesem Zeitpunkt erklären kann. In den Blättern war GSH/GSSG bis auf einen Messpunkt bei einer Belastung mit 100 μM nach 72stündiger Belastung kleiner eins. Auch wenn sich zu diesem Zeitpunkt in den Blättern ebenfalls leicht erhöhte GR-Aktivitäten nachweisen ließen, so ist die Korrelation jedenfalls nicht eindeutig. Vielmehr deuten die Daten einen Zusammenhang mit den gleichzeitig sehr hohen Katalase-Aktivitäten an.

Betrachtet man die erhobenen Daten für den Gehalt an Glutathion, wird ein deutlicher Trend erkennbar. Mit steigender Diclofenac-Konzentration sinkt das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion, denn GSH kommt eine herausragende Bedeutung als zellulärer Redoxpuffer zu, und der angesprochene Quotient GSH/GSSG gibt den Redox-Status an. Sinkt dieser Quotient unter einen bestimmten Wert, kann es zu einer akuten Schädigung der Zelle durch oxidativen Stress kommen (SCHRÖDER *et al.*, 2003; NOCTOR, 2006). GSH kann in seiner reduzierten Form über die nucleophile Sulfhydryl-Gruppe direkt mit ROS wie mit dem Superoxid-Anion O_2^- reagieren und wird dabei selbst zu GSSG oxidiert. Das Potential zur Entgiftung von ROS über das GSH-Redox-System ist dabei abhängig von der Menge des vorhandenen Glutathions, dem oben beschriebenen Redox-Status sowie der Aktivität der Glutathion-Reduktase (FOYER *et al.*, 2005).

Eine weitere wichtige Funktion nimmt GSH bei der Regeneration des Ascorbats im bereits erwähnten Ascorbat-Glutathion-Zyklus ein, wo es als Reduktionsäquivalent bei der durch das Enzym Didehydroascorbat-Reduktase (DHAR, EC 1.8.5.1) katalysierten Reaktion ebenfalls zu GSSG oxidiert wird, welches dann durch die GR unter dem Verbrauch von NADPH wieder in seine reduzierte Form überführt wird (vgl. Abbildung 4.2).

Der Verbrauch an reduziertem GSH kann also entweder durch eine direkt ablaufende Entgiftungsreaktion mit ROS oder aber eben indirekt über den Ascorbat-GSH-Zyklus erklärt werden. Beiden Verbrauchswegen geht die Bildung von ROS voraus.

Fasst man die Daten zusammen, so deuten vor allem der sinkende Redox-Status und die unter Diclofenac-Einfluss erhöhten Enzymaktivitäten von Glutathion-Reduktase und Katalase auf eine durch Diclofenac verursachte Bildung von ROS hin.

Insgesamt muss bei dieser Art von Experimenten und der Diskussion der Ergebnisse bedacht werden, dass es sich bei den erhobenen Daten von Enzymaktivitäten und Thiol-Gehalten lediglich um Momentaufnahmen eines sehr dynamischen Systems handelt. Die eigentliche Dynamik konnte mit der geringen Anzahl an Messpunkten nicht erfasst werden und würde eine spezifische Betrachtung erfordern.

4.2.3 Glutathion S-Transferasen

Der Einfluss von Diclofenac auf die GST-Aktivitäten in Gerste ist aufgrund der ermittelten Daten nur sehr schwierig zu bewerten, da GSTs sowohl durch ROS als auch sehr spezifisch in ihrer Aktivität beeinflusst werden können. In der Literatur ist für viele Xenobiotika eine GST-induzierende Wirkung beschrieben (SCHRÖDER und PFLUGMACHER, 1996; ANDERSON und DAVIS, 2004; YOON *et al.*, 2007). Für einzelne Substrate konnte dieser Effekt auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden, die Umsatzraten für andere Substrate waren hingegen herabgesetzt. Eine deutliche Induktion konnte nach einer Woche für beide Diclofenac-Konzentrationen in den Wurzeln für das Substrat CDNB registriert werden. CDNB gilt in der Literatur als Standard und ist das am häufigsten verwendete Substrat für die Messung von GST-Aktivitäten. Zu diesem Zeitpunkt lagen für CDNB auch in den Blättern leicht erhöhte Aktivitäten vor, woraus man zu diesem Zeitpunkt auf eine generelle und stressbedingte Induktion der Enzyme schließen kann.

Tendenziell konnte eine Induktion der GSTs in den Wurzeln und dazu im Gegensatz ein Einbruch an Aktivität in den Blättern verzeichnet werden. Dies gilt besonders für den Umsatz der Substrate NBC und NBoC. Anscheinend wirkt das Diclofenac spezifisch auf einzelne GST-Isoformen, die für die Übertragung von GSH auf eben diese beiden strukturverwandten Substrate verantwortlich sind. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kommen LYUBENOVA *et al.* (2007), die in ihrer Arbeit den hemmenden Einfluss von Cadmium auf pflanzliche GSTs untersuchen. Auch NEUSTIFTER (2007) beschreibt in der Pilotstudie zum Abbau von Analgetika in einer naturnahen Pflanzenkläranlage einen ähnlichen Effekt. In der Arbeit wurden Rhizomstücke von *Phragmites australis* für 24 Stunden in 100 µM Diclofenac-Lösung inkubiert und daraufhin die GST-Aktivität in den Geweben für das Substrat CDNB bestimmt. Auch hierbei kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Induktion der Umsatzraten für dieses Substrat. Allerdings wurden in der Arbeit keine Enzymaktivitäten für andere Substrate ermittelt was keinen weiteren direkten Vergleich zulässt.

POPPENBERG (2009) untersucht den Einfluss verschiedener Analgetika auf die Wasserlinse *Lemna minor*. Für den Einfluss auf die Aktivität der Glutathion S-Transferasen kommt er zu sehr ähnlichen Ergebnissen. So konnte auch in dieser Studie eine Induktion einzelner GST-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experiments beobachtet werden.

4.2.4 Glycosyltransferasen

Aus allen Proben von Gerste und Meerrettich konnte ein Glucopyranosid des hydroxylierten Diclofenacs extrahiert werden. Die Bestätigung, dass die Glycosilierung tatsächlich an der Hydroxygruppe an 4'-Position des Diclofenacs erfolgt, lieferte ein Enzymtest für Glycosyltransferasen, bei dem 4'-OH-Diclofenac als Substrat verwendet wurde. Das entstandene Glucose-Konjugat konnte dabei eindeutig massenspektrometrisch identifiziert werden und bestätigte die Beteiligung von Glycosyltransferasen am pflanzlichen Metabolismus von Diclofenac.

Glycosyltransferasen übertragen ein Molekül Glucose auf eine Vielzahl von kleinen und lipophilen Molekülen. Akzeptormoleküle sind dabei Phytohormone, Stoffe aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel aber eben auch eine Reihe an Xenobiotika (BOWLES *et al.*, 2006).

Die spezifische GT-Aktivität für das exogene Substrate 2,3,5-TCP sowie für die beiden endogenen Substrate Quercetin und Kaempferol aus der Klasse der Flavonoide wurde in Meerrettich-Wurzelzellen untersucht. Dabei wurden in allen mit Diclofenac inkubierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, höhere GT-Aktivitäten für alle drei Substrate festgestellt. Dieser Effekt war in den ersten 48 Stunden besonders deutlich ausgeprägt und deutet auf eine auf Diclofenac zurückzuführende Induktion von GTs hin.

Ein interessanter Befund in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die Behandlung der Zellen mit Diclofenac sich stärker auf den Umsatz der Flavonoide auszuwirken scheint. Bei beiden endogenen Substraten waren die Unterschiede in den GT-Aktivitäten zwischen behandelten und unbehandelten Zellen deutlicher präsent.

Eine der grundlegenden Eigenschaften von Glycosyltransferasen ist ihre Regionselektivität. Viele Glycosyltransferasen akzeptieren das gleiche Akzeptormolekül, den Zuckerrest binden sie aber dabei spezifisch an unterschiedlichen Orten am Substrat (LIM *et al.*, 2003; BOWLES *et al.*, 2006). Diese Tatsache könnte eine Erklärung für den beschriebenen Befund liefern. Quercetin und Kaempferol zeigen im Vergleich zum 2,3,5-TCP deutlichere Struktur analogien zu der an 4'-Position hydroxylierten Form des Diclofenacs. Bei beiden Flavonoiden erfolgt die Glucose-Konjugation ebenfalls an 4'-Position.

Denkbar wäre also die Induktion einer oder mehrerer GTs durch die Behandlung mit Diclofenac, die selektiv die Konjugation mit Glucose an 4'-Position katalysieren.

4.2.5 Metabolismus von Diclofenac

Der Metabolismus von Humanarzneimitteln in Pflanzen ist ein weitgehend unbearbeitetes Forschungsgebiet. Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, pflanzliche Diclofenac-Metaboliten zu extrahieren und zu identifizieren. Der Metabolismus von Diclofenac im Säugetierorganismus ist in den Grundzügen sehr gut untersucht und dennoch nach wie vor Gegenstand aktueller Studien.

Die Entgiftung im Säugetier erfolgt über mehrere Stoffwechselwege. Das System der P450-Monooxygenasen spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle. Verschiedene Isoenzyme aus der Klasse der P450s oxidieren Diclofenac an dessen Ringstrukturen. Dies geschieht an unterschiedlichen Positionen des Moleküls und resultiert in der Bildung von 4'OH-Diclofenac, 3'OH-Diclofenac bzw. 5'OH-Diclofenac. 4'OH-Diclofenac stellt in dieser Reihe den am wichtigsten und am häufigsten gebildeten Metaboliten dar (DAVIES und ANDERSON, 1997). 50 Prozent der eingenommenen Diclofenac-Dosis verlässt den Körper über den Urin als 4'OH-Diclofenac bzw. als ein Konjugat der Glucuronsäure (PEREZ und BARCELO, 2008). In den vorliegenden Studien konnte analog zum Metabolismus im Säugetier die Bildung des Primärmetaboliten 4'OH-Diclofenac nachgewiesen werden. 4'OH-Diclofenac wurde sowohl aus pflanzlichen Geweben extrahiert als auch in *in vitro*-Tests mit Mikrosomenpräparationen erzeugt. Die Identifizierung erfolgte dabei mit LC-MS bzw. LC-MS/MS-Methoden (detektierter Massenübergang war bei positiver Ionisierung m/z 312-294) über den Vergleich mit einem analytischen Standard.

Ebenso wie im Säuger war 4'OH-Diclofenac der am häufigsten detektierte Metabolit sowohl in den Wurzelzellen von *A. rusticana* als auch in den Blättern und Wurzeln der Gerste. Die Glucuronidierung im Säuger erfolgt über die Carboxylgruppe des Diclofenacs und erzeugt ein Acyl-Glucuronid. Glucuronidierungs-Reaktionen kommen in Pflanzen offenbar nicht vor. Vielmehr findet eine Entgiftung über die durch Glycosyltransferasen katalysierte Konjugation mit Glucose statt. Die Konjugation von hydroxyliertem Diclofenac mit einem Molekül Glucose konnte im Rahmen dieser Studie eindeutig bestätigt werden. Massenspektrometrische Untersuchungen (detektierter Massenübergang war bei positiver Ionisierung m/z 474→312) in Kombination mit einem enzymatischen Verdau mit β -Glucosidase bestätigten die chemische Struktur des gebildeten O-Glukosids, dessen Bildung zu unserem jetzigen Wissen in noch keinem Organismus beschrieben wurde.

Ebenso wie der Phase 1-Metabolit 4'OH-Diclofenac konnte dessen Glucose-Konjugat direkt aus pflanzlichen Zellen extrahiert und auch in einem Enzymassay für Glycosyltransferasen *in vitro* gebildet werden. Die Tatsache, dass reines Diclofenac nicht von isolierten pflanzlichen Glycosyltransferasen umgesetzt wird, deckt sich mit der Beobachtung von TANG und MA (2005) die, allerdings in Mikrosomen aus der menschlichen Leber,

keine Konjugation von Diclofenac mit Glucose beobachten konnten. Die vorangehende Hydroxylierung scheint deshalb in jedem Fall essentiell zu sein.

Ein ebenfalls bisher in Pflanzen nicht beschriebener Stoffwechselweg ist der Umsatz von Diclofenac durch pflanzliche Peroxidasen. Diese auf die Beobachtung einer Farbreaktion zurückzuführende Entdeckung konnte in weiterführenden Untersuchungen zweifelsfrei bestätigt werden. Mit Hilfe von sequentieller stopped-flow Spektroskopie konnte dann auch die Reduktion von aktiviertem HRP-CI durch Diclofenac über CII eindeutig belegt werden. Die Tatsache, dass pilzliche Peroxidasen Diclofenac umsetzen können ist seit längerer Zeit bekannt (ZHANG und GEISSEN, 2010). Im Säuger ist die in aktivierten neutrophilen Granulozyten lokalisierte Myeloperoxidase als das für die Reaktion verantwortliche Enzym beschrieben (MIYAMOTO *et al.*, 1997; ZUURBIER *et al.*, 1990). ZUURBIER *et al.* (1990) beschreiben die Bildung eines intensiv orange gefärbten Produkts, welches aus der Reaktion von Diclofenac mit H_2O_2 in Anwesenheit von Myeloperoxidase hervorgeht. Das entstandene Produkt mit einem Absorptionsmaximum von 452 nm wurde durch FAB-MS als Dihydroxyazobenzen identifiziert.

Trotz der orangen Färbung und einem Absorptionsmaximum bei 450 nm, konnte die Bildung von 2,2'-Dihydroxyazobenzen experimentell im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. MIYAMOTO *et al.* (1997) konnten trotz sehr ähnlicher Reaktionsbedingungen die Bildung des postulierten Reaktionsprodukts 2,2'-Dihydroxyazobenzen ebenfalls nicht konfirmieren. Ausgehend von der Struktur von 2,2'-Dihydroxyazobenzen fällt es zudem schwer, den Reaktionsmechanismus für dessen Bildung nachzuvollziehen.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen deuten stark auf die Bildung des postulierten Diclofenac-2,5-Iminoquinon-Metaboliten hin. Im *Full Scan* zeigte dieser Metabolit $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z 310. In anschließenden MS/MS-Untersuchungen trat ein Produkt mit m/z 292 deutlich hervor, das aus der Abspaltung von einem Molekül Wasser hervorgeht. Die geschilderte Art der Fragmentierung für Diclofenac-2,5-Iminoquinon deckt sich mit der vorhandenen Literatur (MIYAMOTO *et al.*, 1997; GRÖNING *et al.*, 2007; FORREZ *et al.*, 2010). MIYAMOTO *et al.* (1997) beschreiben die Bildung von Diclofenac-2,5-Iminoquinon nach Inkubation von Diclofenac mit dem Enzym Myeloperoxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Chlorid-Ionen, sowie nach Inkubation von Diclofenac mit aus Säugerblut isolierten, neutrophilen Granulozyten. Aus diesem Grund ist der in Abbildung 4.3 dargestellte Unterschied im Diclofenac-Metabolismus in Tieren, Pflanzen und Bakterien zu erklären.

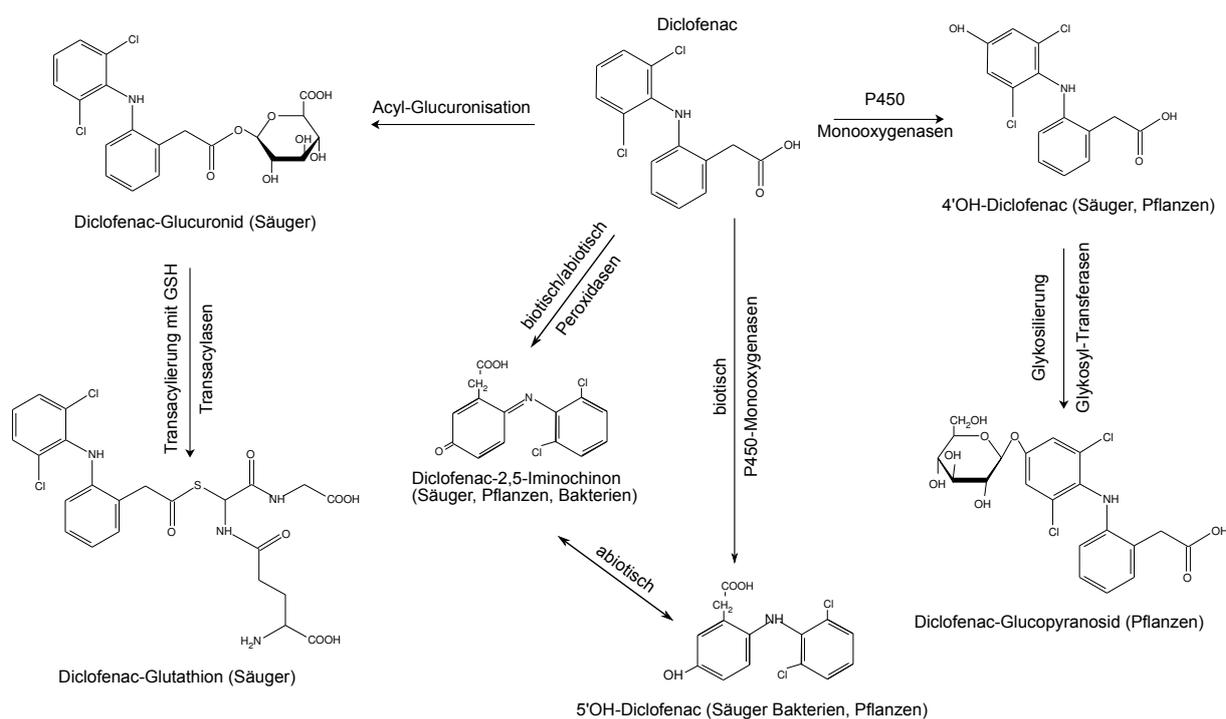


Abbildung 4.3: Postulierter Metabolismus von Diclofenac in verschiedenen Organismen. Alle als in Pflanzen vorkommend beschriebenen Metaboliten basieren auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

GRÖNING *et al.* (2007) beobachten die Entstehung von Diclofenac-2,5-Iminoquinon bei Laborversuchen unter aeroben Bedingungen in Bioreaktoren, die mit Flusssediment mit einer aktiven mikrobiellen Gemeinschaft in der Anwesenheit von Diclofenac betrieben wurden. Die Entstehung des Metaboliten wird dabei nur in Anwesenheit der Mikroben beobachtet, nicht aber in den Experimenten mit autoklaviertem Sediment. Die Autoren berichten einen schnellen und effektiven Abbau von Diclofenac durch die im Sediment vorhandene mikrobielle Gemeinschaft. Dabei macht es keinen Unterschied, ob diese bereits an den Wirkstoff adaptiert war. Des weiteren kommt es zu einem Einbruch der Abbauraten bei höheren Diclofenac-Dosen im Bereich von 70 μM , die auf eine für die mikrobielle Gemeinschaft toxische Menge des Wirkstoffs bzw. dessen Abbauprodukts hinweist.

FORREZ *et al.* (2010) erreichen die Bildung von Diclofenac-2,5-Iminoquinon durch Oxidation von Diclofenac an einer Matrix aus biologisch hergestelltem Mangandioxid (MnO_2) in wässriger Lösung. 5-10 % des durch die Behandlung mit biologischem MnO_2 entfernten Diclofenac liegen demnach als Iminoquinon des Diclofenacs vor. Aber auch die Behandlung einer wässrigen Diclofenac-Lösung mit Ozon kann zu einer Bildung von Diclofenac-2,5-Iminoquinon führen (SEIN *et al.*, 2008).

Alle genannten Studien postulieren dabei eine Bildung von 5'-OH-Diclofenac, welches als reaktives und instabiles Intermediärprodukt entsteht. GRÖNING *et al.* (2007) postulieren

eine biotische Bildung, da das Iminochinon nur in den Bioreaktoren mit dem biologisch aktiven Sediment nachgewiesen wurde. Die Bildung von 4'OH-Diclofenac wird im Menschen durch CYP2C9 katalysiert (LEEMANN *et al.*, 1993), die Oxidation zu 5'OH-Diclofenac erfolgt durch die Cytochrome CYP3A4, CYP2C8 und CYP2C19 (NGUI *et al.*, 2000). 5'OH-Diclofenac kann in wässriger Lösung spontan in Diclofenac-2,5-Iminochinon übergehen (SHEN *et al.*, 1999). Diclofenac-2,5-Iminochinon gilt aufgrund seiner hohen Reaktivität und der Eigenschaft kovalent an Proteine zu binden als hepatotoxisch wirkende Substanz.

Die vorliegenden Daten deuten auf eine durch pflanzliche Peroxidasen katalysierte Bildung von Diclofenac-2,5-Iminochinon hin. Die Frage, ob dabei zuerst 5'OH-Diclofenac entsteht bzw. ob das Iminochinon nach einiger Zeit in 5'OH-Diclofenac übergeht, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht beantwortet werden und bleibt Teil der aktuellen Forschung. 5'OH-Diclofenac fragmentiert in MS/MS-Experimenten auf die gleiche Art wie die an 4'-Position hydroxylierte Form. Unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen ist für das 5'OH-Diclofenac eine etwas kürzere Retentionszeit zu erwarten. Da die Substanz nicht als analytischer Standard zur Verfügung stand, war es nicht möglich, ihre Existenz eindeutig zu belegen wenngleich in einzelnen Proben eine im Vergleich zum 4'OH-Diclofenac etwas geringere Retentionszeit in Verbindung mit einem Signal von m/z 312 auf das Vorhandensein der Substanz hindeuteten. Abbildung 4.3 fasst den beschriebenen Metabolismus von Diclofenac in den verschiedenen Organismen unter Berücksichtigung der erhobenen Daten zusammen.

4.3 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit bestätigt die hervorragende Eignung der Zellkultur von *A. rusticana* zur Durchführung von Metabolismus-Studien mit neuen Wirkstoffen innerhalb einer pflanzlichen Matrix. Als ein kompaktes, steriles System schnell wachsender Zellen erfüllt es wichtige Eigenschaften zum Studium der Wirkstoffaufnahme und der Evaluierung der in Pflanzen ablaufenden metabolischen Vorgänge. Dies deckt sich mit der Einschätzung von NEPOVIM *et al.* (2004), die in ihrer Arbeit mit dem selben System die Effekte von Schwermetallen und Substanzen aus der Klasse der Nitroaromaten auf die Glutathion S-Transferase-Aktivität beschreiben.

Die hier dargelegten Ergebnisse belegen eindrucksvoll die Möglichkeiten, die heutzutage mit Hilfe moderner LC-MS-Technik gegeben sind. Eine Identifizierung neuer Metaboliten ohne die entsprechenden analytischen Standards ist mit dem Einsatz klassischer HPLC mit UV/VIS-Detektoren schlichtweg nicht möglich (OLIVEIRA und WATSON, 2000). Die Identifizierung und Strukturaufklärung mittels NMR ist aufwendig und die entsprechende Technik nicht immer verfügbar. Die gezielte Durchführung und genaue Analyse von MS/MS-Experimenten erlaubt es sehr detailliert, Rückschlüsse auf die Art des Analyten zu ziehen, denn ein analytischer Lauf vermittelt bereits eine Vielzahl an Informationen. Ein geeignetes, den Analyten angepasstes System aus mobiler und stationärer Phase ermöglicht die effektive Auftrennung komplexer Stoffgemische. Die Retentionszeit bietet dabei einen ersten Anhaltspunkt über die Polarität bzw. Hydrophobizität einer Substanz. Im normalen Modus erhält man exakte Informationen über das Molekulargewicht des Analyten, welches Hinweise auf ein Vorkommen bekannter oder unbekannter, aber zu erwartender Substanzen in der analysierten Probe gibt. In der Arbeit von herausragender Bedeutung war die Identifikation und Charakterisierung von *in vivo* oder *in situ* gebildeter Phase-1 und Phase-2-Metaboliten von Paracetamol und Diclofenac. Im Falle des 4'-OH-Diclofenacs erfolgte die Identifizierung über den Vergleich der Retentionszeit und der Massenspektren eines analytischen Standards. Sämtliche Phase-2 Metaboliten wurden durch die gezielte Fragmentierung in MSⁿ-Experimenten identifiziert. Im Falle der gebildeten O-Glucoside erfolgte eine Bestätigung der Struktur über einen enzymatischen Verdau mit der substratspezifischen β -D-Glucosidase. Die Kombination beider Methoden erscheint in diesem Zusammenhang als ein zuverlässiger Ansatz zur Bestätigung von β -D-O-Glucosiden zu sein.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit war die Einschätzung des Potentials zum Einsatz von Pflanzen in der Phytoremediation von Arzneimitteln. Die dargestellten Ergebnisse belegen eindrucksvoll die Existenz pflanzlicher Entgiftungssysteme für die beiden Wirkstoffe Diclofenac und Paracetamol. Pflanzen können beide Stoffe aufnehmen, und es findet ein

Metabolismus statt, der den in Säugetieren ablaufenden Vorgängen sehr ähnlich ist. Die Bildung von Glutathion- und Glucose-Konjugaten deutet in jedem Falle auf eine Elimination der Substanz aus dem Cytosol und einen Transport in die Vakuole bzw. den apoplastischen Raum hin.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt lagen für beide Substanzen nur äußerst begrenzte Informationen zum pflanzlichen Metabolismus vor, weshalb in den durchgeführten Studien Konzentrationen verwendet wurden, welche die tatsächlichen Gehalte im Abwasser um ein Vielfaches übersteigen. Die Arbeit mit den tatsächlich auftretenden Wirkstoffmengen hätte aller Wahrscheinlichkeit nach nicht zu einer Identifizierung der Stoffwechselwege geführt. Dennoch sollte im Hinblick auf weiterführende Studien diese Tatsache nicht vernachlässigt werden.

Die Analyse der Pigment- und Glutathiongehalte sowie die Betrachtung der Aktivitäten zentraler Enzyme aus dem oxidativen Stress-Stoffwechsel deuten auf die durch Diclofenac hervorgerufene Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies hin, wenngleich die Effekte hierbei verstärkt bei der sehr hohen Wirkstoffkonzentration von 100 μM auftraten. Insgesamt scheinen Pflanzen mit ihrer vorhandenen Enzymausstattung und den ihnen zur Verfügung stehenden Systemen zur Pufferung von oxidativen Stress durchaus in der Lage zu sein, die beiden untersuchten Wirkstoffe aufzunehmen, zu entgiften und damit auch für eine gewisse Zeit zu tolerieren.

Weiterführende Studien zu diesem Thema werden folgen. Dabei erscheint es wichtig, die in der vorliegenden Arbeit an zwei Modellsystem gewonnenen Erkenntnisse auf tatsächlich in der Phytoremediation eingesetzte Spezies wie *Phragmites australis*, *Typha latifolia* oder *Brassica juncea* anzuwenden und zu überprüfen. Ziel muss es sein, unter realistischen Bedingungen und in langfristig angelegten Experimenten die tatsächlichen Endpunkte im Stoffwechsel zu identifizieren und die Effizienz einer pflanzlichen Reinigungsstufe zu belegen. Die hier dargelegten Ergebnisse zur Aufnahme und zum Metabolismus der beiden Humanarzneimittel Paracetamol und Diclofenac können dazu in der Zukunft einen wichtigen Teil beitragen.

Literaturverzeichnis

- ANDERSON, B. J., **2008** Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anaesthesia* **18**: 915–921.
- ANDERSON, J. V., und D. G. DAVIS, **2004** Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione s-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiologia Plantarum* **120**: 421–433.
- ATV, **1998** Der Zustand der Kanalisation in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse der ATV-Umfrage 1997.
- BARTHA, B., C. HUBER, R. HARPAINTNER, und P. SCHRÖDER, **2010** Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* l. czern.: investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environmental Science and Pollution Research* : 1–10.
- BD Biosciences – Discovery Labware, **2006** *Technical Bulletin 443 Calculating Oxygen Concentration from Fluorescence Data on the BD™Oxygen Biosensor System*. Bedford, MA 01730.
- BERTOLINI, A., A. FERRARI, A. OTTANI, S. GUERZONI, R. TACCHI, *et al.*, **2006** Paracetamol: New vistas of an old drug. *Cns Drug Reviews* **12**: 250–275.
- BESTWICK, C. S., **1998** Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology* **118**: 1067–1078.
- BOOTH, J., E. BOYLAND, und P. O. SIMS, **1961** An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *The Biochemical Journal* **79**: 516–524.
- BOUTAUD, O., D. M. ARONOFF, J. H. RICHARDSON, L. J. MARNETT, und J. A. OATES, **2002** Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7130–7135.

- BOWLES, D., J. ISAYENKOVA, E. K. LIM, und B. POPPENBERGER, **2005** Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 254–263.
- BOWLES, D., E. K. LIM, B. POPPENBERGER, und F. E. VAISTIJ, **2006** Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 567–597.
- BRADFORD, M. M., **1976** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- BRIGGS, G. G., R. H. BROMILOW, und A. A. EVANS, **1982** Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science* **13**: 495–504.
- BROMILOW, R. H., und K. CHAMBERLAINE, **1998** Designing molecules for systemicity. In R. Atkin und D. Clifford, Hrg, *Mechanisms and regulation of transport processes*. Monogr. 18, British plant growth regulation group, London, 121–132.
- BURKEN, J. G., **2003** Uptake and metabolism of organic compounds: Green-liver model. In S. C. McCutcheon und J. L. Schnoor, Hrg, *Phytoremediation*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, 59–84.
- BURKHARDT, M., C. STAMM, C. WAUL, H. SINGER, und S. MÜLLER, **2005** Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland. *Journal of Environmental Quality* **34**: 1363–1371.
- CLEUVERS, M., **2003** Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* **142**: 185–194.
- CORCORAN, G. B., J. R. MITCHELL, Y. N. VAISHNAV, und E. C. HORNING, **1980** Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Molecular Pharmacology* **18**: 536–542.
- DASCENZO, G., A. DICORCIA, A. GENTILI, R. MANCINI, R. MASTROPASQUA, *et al.*, **2003** Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *The Science of the Total Environment* **302**: 199–209.

- DAUGHTON, C. A., und T. A. TERNES, **1999** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives, Supplements* : 907–938.
- DAVIES, N. M., und K. E. ANDERSON, **1997** Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clinical Pharmacokinetics* **33**: 184–213.
- DAVIN, L. B., und N. G. LEWIS, **1992** Phenylpropanoid metabolism: biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins **26**: 325–375.
- DAWSON, R. M. C., D. C. ELLIOTT, W. H. ELLIOT, und K. M. JONES, **1986** *Data for Biochemical Research*. Oxford Science Publications, Oxford, UK.
- DEMOLL, R., **1954** Viren, Hormone, Wuchsstoffe und Antibiotica im Abwasser. *gwf Wasser Abwasser* **95(4)**: 97–100.
- DIXON, D. P., M. SKIPSEY, und R. EDWARDS, **2010** Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**: 338–350.
- DOLE, M., L. L. MACK, R. L. HINES, R. C. MOBLEY, L. D. FERGUSON, *et al.*, **1968** Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics* **49**: 2240.
- DOROFEEVA, N. A., O. I. BARYGIN, A. STARUSCHENKO, K. V. BOLSHAKOV, und L. G. MAGAZANIK, **2008** Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *Journal of Neurochemistry* **106**: 429–441.
- DROTAR, A., P. PHELPS, und R. FALL, **1985** Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science* **42**: 35–40.
- DUNFORD, H. B., **1999** *Heme peroxidases*. Wiley Blackwell, New York, USA.
- DUNFORD, H. B., und J. S. STILLMAN, **1976** On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chemistry Reviews* **19**: 187–251.
- EDWARDS, R., **2000** Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5**: 193–198.
- EICHLER, W., **2006** Literaturstudie zu Eigenschaften und Vorkommen von Antibiotika, Bakterien und antibiotikaresistenten Bakterien, insbesondere im Abwasser und in Kläranlagen, sowie bekannte und mögliche Verfahren zu Detektion, Quantifizierung und unschädlicher Entsorgung.

- EISENWIRTH, M., **2000** Leckortung – Künftige Herausforderungen und Lösungen. Entsorgungs-Praxis **18**: 52–57.
- FEDIUC, E., und L. ERDEI, **2002** Physiological and biochemical aspects of Cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. Journal of Plant Physiology **159**: 265–271.
- FENT, K., A. A. WESTON, und D. CAMINADA, **2006** Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands) **76**: 122–159.
- FERRARI, B., N. PAXÉUS, R. L. GIUDICE, A. POLLIO, und J. GARRIC, **2003** Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. Ecotoxicology and Environmental Safety **55**: 359–370.
- FLOWER, R. J., und J. R. VANE, **1972** Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). Nature **240**: 410–411.
- FORREZ, I., M. CARBALLA, K. VERBEKEN, L. VANHAECKE, T. TERNES, *et al.*, **2010** Diclofenac oxidation by biogenic manganese oxides. Environmental Science & Technology **44**: 3449–3454.
- FOYER, C. H., P. DESCOURVIÈRE, und K. J. KUNERT, **1994** Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant, Cell and Environment **17**: 507–523.
- FOYER, C. H., L. D. GOMEZ, und P. D. R. HERDEN, **2005** *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, chapter Glutathione. Wiley-Blackwell, 1–24.
- FREAR, D., **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.
- FRIMMEL, F., und C. ZWIENER, **2004** Residues of clofibrac acid, ibuprofen and diclofenac in the aquatic environment and their elimination in the sewage treatment and drinking water production. In K. Kümmerer, Hrg, *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer, Berlin, 121–132.
- FROVA, C., **2003** The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. Physiologia Plantarum **119**: 469–479.

- GHALY, A. E., und A. H. FARAG, **2007** Phytoremediation of anaerobic digester effluent for water purification and production of animal feed. *American Journal of Agricultural and Biological Science* **2**: 1–14.
- GÖTZ, C., **2008** *Quorum sensing in der Rhizosphäre. Interaktion von N-Acyl-Homoserinlactonen mit Gerste (Hordeum vulgare L.) und Yambohne (Pachyrhizus erosus (L.) Urban) unter besonderer Berücksichtigung von Enzymen des antioxidativen und des glutathionabhängigen Entgiftungsstoffwechsels.* Dissertation, Technische Universität, München.
- GRÖNING, J., C. HELD, C. GARTEN, U. CLAUSSNITZER, S. R. KASCHABEK, *et al.*, **2007** Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere* **69**: 509–516.
- HALLING-SØRENSEN, B., S. NORS NIELSEN, P. F. LANZKY, F. INGERSLEV, H. C. HOLTEN LÜTZHØFT, *et al.*, **1998** Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* **36**: 357–393.
- HANISCH, B., B. ABBAS, W. KRATZ, und G. SCHÜÜRMAN, **2004** Humanarzneimittel im aquatischen Ökosystem. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* **16**: 223–238.
- HARVEY, P. J., B. F. CAMPANELLA, P. M. L. CASTRO, H. HARMS, E. LICHTFOUSE, *et al.*, **2002** Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution Research International* **9**: 29–47.
- HAYES, J., und D. PULFORD, **1995** The glutathione s-transferase supergene family: regulation of *gst* and the contribution of the isoenzymes to cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 445–520.
- HEBERER, T., K. REDDERSEN, und A. MECHLINSKI, **2002** From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Science and Technology : a Journal of the International Association on Water Pollution Research* **46**: 81–88.
- HEGEDÜS, A., S. ERDEI, und G. HORVATH, **2001** Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science* **160**: 1085–1093.

- HENRIKSEN, A., A. T. SMITH, und M. GAJHEDE, **1999** The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 35005–35011.
- HOU, B. K., E. K. LIM, G. S. HIGGINS, und D. J. BOWLES, **2004** N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 47822–47832.
- HUANG, H. H., L. H. LIN, P. ZHANG, X. L. QI, und D. F. ZHONG, **2006** Formation of glucoside conjugate of acetaminophen by fungi separated from soil. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **31**: 103–108.
- HUBER, C., B. BARTHA, R. HARPAINTNER, und P. SCHRÖDER, **2009** Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants - two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environmental Science And Pollution Research* **16**: 206–213.
- JAENICKE, L., **1984** *Einführung in die Praxis des Biochemikers*. Institut für Biochemie der Universität Köln.
- JIANG, L., und H. YANG, **2009** Prometryne-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**: 1687–1693.
- KIRKMAN, S. K., M. Y. ZHANG, P. M. HORWATT, und J. SCATINA, **1998** Isolation and identification of bromfenac glucoside from rat bile. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals* **26**: 720–723.
- KOLPIN, D. W., E. T. FURLONG, M. T. MEYER, E. M. THURMAN, S. D. ZAUGG, *et al.*, **2002** Response to comment on pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* **36**: 4007–4008.
- KOMOSSA, D., und H. J. SANDERMANN, **1995** Plant metabolic studies of the growth regulator maleic hydrazide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 2713–2715.
- KOSTRUBSKY, S. E., J. F. SINCLAIR, S. C. STROM, S. WOOD, E. URDA, *et al.*, **2005** Phenobarbital and phenytoin increased acetaminophen hepatotoxicity due to inhibition of UDP-glucuronosyltransferases in cultured human hepatocytes. *Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology* **87**: 146–55.

- KREUZINGER, N., M. CLARA, B. STRENN, und H. KROISS, **2004** Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. *Water Science and Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research* **50**: 149–156.
- KÜMMERER, K., **2004** *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer, Berlin, second edition.
- LANGEBARTELS, C., und H. HARMS, **1985** Analysis for nonextractable (bound) residues of pentachlorophenol in plant cells using a cell wall fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **10**: 268–279.
- LEE, H., **2003** Diclofenac inhibition of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research* **992**: 120–127.
- LEEMANN, T., C. TRANSON, und P. DAYER, **1993** Cytochrome P450TB (CYP2C): A major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver? *Life Sciences* **52**: 29–34.
- LEVSEN, K., H. SCHIEBEL, B. BEHNKE, R. DOTZER, W. DREHER, *et al.*, **2005** Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A* **1067**: 55–72.
- LICHTENTHALER, H. K., **1987** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembrans. *Methods in Enzymology* **148**: 351–382.
- LIM, E.-K., S. BALDAUF, Y. LI, L. ELIAS, D. WORRALL, *et al.*, **2003** Evolution of substrate recognition across a multigene family of glycosyltransferases in *Arabidopsis*. *Glycobiology* **13**: 139–145.
- LUNDHOLM, C. D., **1997** DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* **118**: 113–128.
- LYUBENOVA, L., C. GÖTZ, A. GOLAN-GOLDHIRSH, und P. SCHRÖDER, **2007** Direct effect of Cd on glutathione s-transferase and glutathione reductase from *Calystegia sepium*. *International Journal of Phytoremediation* **9**: 465–473.

- MAKKAR, R. S., A. TSUNEDA, K. TOKUYASU, and Y. MORI, **2006** *Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese(II)-dependent peroxidase, laccase and β -glucosidase. *FEMS Microbiology Letters* **200**: 175–179.
- MAKSYMIEC, W., **2007** Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **29**: 177–187.
- MARQUEZ, L. A., and H. B. DUNFORD, **1995** Transient and steady-state kinetics of the oxidation of scopoletin by horseradish peroxidase compounds I, II and III in the presence of NADH. *European Journal of Biochemistry* **233**: 364–371.
- MARRS, K. A., M. R. ALFENITO, A. M. LLOYD, and V. WALBOT, **1995** A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* **375**: 397–400.
- MARTINOIA, E., M. MAESHIMA, and H. E. NEUHAUS, **2007** Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**: 83–102.
- MAY, M. J., T. VERNOUX, C. LEAVER, M. VAN MONTAGU, and D. INZE, **1998** Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**: 649–667.
- MCILVAINE, T. C., **1921** A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry* **49**: 183–186.
- MESSNER, B., O. THULKE, and A. R. SCHAFFNER, **2003** *Arabidopsis* glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* **217**: 138–146.
- MILLER, G., V. SHULAEV, and R. MITTLER, **2008** Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* **133**: 481–489.
- MILLER, R. P., R. J. ROBERTS, and L. J. FISCHER, **1976** Acetaminophen elimination kinetics in neonates, children and adults. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **19**: 284–294.
- MITTLER, R., **2002** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405–10.

- MIYAMOTO, G., N. ZAHID, und J. P. UETRECHT, **1997** Oxidation of diclofenac to reactive intermediates by neutrophils, myeloperoxidase, and hypochlorous acid. *Chemical Research in Toxicology* **10**: 414–419.
- MURASHIGE, T., und F. SKOOG, **1962** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- MUTLIB, A. E., J. SHOCKCOR, R. ESPINA, N. GRACIANI, A. DU, *et al.*, **2000** Disposition of glutathione conjugates in rats by a novel glutamic acid pathway: characterization of unique peptide conjugates by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/NMR. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **294**: 735–745.
- NEPOVIM, A., R. PODLIPNA, P. SCHRÖDER, P. SOUDEK, und T. VANEK, **2004** Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere* **57**: 1007–1015.
- NEUSTIFTER, J. E., **2007** *Phytoremediation organischer Schadstoffe mit Hilfe von Phragmites australis*. Dissertation, Technische Universität, München.
- NEWTON, G. L., R. DORIAN, und R. C. FAHEY, **1981** Analysis of biological thiols: Derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* : 383–387.
- NGUI, J. S., W. TANG, R. A. STEARNS, M. SHOU, R. R. MILLER, *et al.*, **2000** Cytochrome P450 3A4-mediated interaction of diclofenac and quinidine. *Drug Metabolism and Disposition* **28**: 1043–1050.
- NIESSEN, W. M. A., **2006** *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. CRC press, Boca Raton, third edition.
- NOCTOR, G., **2006** Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell & Environment* **29**: 409–425.
- OAKS, J. L., M. GILBERT, M. Z. VIRANI, R. T. WATSON, C. U. MEYER, *et al.*, **2004** Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* **427**: 630–633.
- OLIVEIRA, E. J., und D. G. WATSON, **2000** Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Biomedical Chromatography* **14**: 351–372.

- OLRY, A., F. SCHNEIDER-BELHADDAD, D. HEINTZ, und D. WERCKREICHART, **2007** A medium-throughput screening assay to determine catalytic activities of oxygen-consuming enzymes: a new tool for functional characterization of cytochrome P450 and other oxygenases. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **51**: 331–340.
- PANTER, G., **1999** Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. *Chemosphere* **38**: 3579–3596.
- PEREZ, S., und D. BARCELO, **2008** First evidence for occurrence of hydroxylated human metabolites of diclofenac and aceclofenac in wastewater using QqLIT-MS and QqTOF-MS. *Analytical Chemistry* **80**: 8135–8145.
- PFLUGMACHER, S., und H. SANDERMANN, **1998a** Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. *Plant Physiology* **117**: 123–128.
- PFLUGMACHER, S., und H. SANDERMANN, **1998b** Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* **49**: 507–511.
- PICKERING, G., V. ESTÈVE, M.-A. LORiot, A. ESCHALIER, und C. DUBRAY, **2008** Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **84**: 47–51.
- POMATI, F., C. ORLANDI, M. CLERICI, F. LUCIANI, und E. ZUCCATO, **2008** Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological Sciences* **120**: 129–137.
- POPPEBERG, M., **2009** Untersuchung von *Lemna minor* auf ihre Entgiftungs- und Phytoremediationskapazität von Pharmaka.
- RADJENOVIC, J., M. PETROVIĆ, und D. BARCELÓ, **2009** Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research* **43**: 831–41.
- RICHMAN, A., A. SWANSON, T. HUMPHREY, R. CHAPMAN, B. MCGARVEY, *et al.*, **2005** Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **41**: 56–67.

- RÖNNEFAHRT, I., J. KOSCHORRECK, und M. KOLOSSA-GEHRING, **2002** Arzneimittel in der Umwelt. Teil 2: Rechtliche Aspekte und Bewertungskonzepte. Mitteilungsblatt. Mitteilungsblatt der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie **8**: 6–9.
- SACHER, F., S. GABRIEL, M. METZINGER, S. ALEXANDRA, M. WENZ, *et al.*, **2002** Arzneimittelwirkstoffe im Grundwasser: Ergebnisse eines Monitoring-Programms in Baden-Württemberg = Occurrence of drugs in groundwaters: Results of a monitoring program in Baden-Württemberg. *Vom Wasser* **99**: 183–195.
- SANDERSON, H., R. A. BRAIN, D. J. JOHNSON, C. J. WILSON, und K. R. SOLOMON, **2004** Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology* **203**: 27–40.
- SCHEER, C. E., F. DIEKMANN, und A. STAMPFL, **2007** How plants cope with foreign compounds - Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research* **14**: 114–122.
- SCHMITT-JANSEN, M., P. BARTELS, N. ADLER, und R. ALTENBURGER, **2007** Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**: 1389–1396.
- SCHNEIDER, C., E. MÖHLE, G. STENZ, K. PETER, und J. W. METZGER, **2001** Arzneimittel in Siedlungsabfällen und in Deponiesickerwässern. *Müll und Abfall* **6**: 362–369.
- SCHRÖDER, P., **2001** The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. In D. Grill, M. Tausz und L. J. DeKok, Hrg, *Significance of glutathione to plant adaptation to the environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 155–183.
- SCHRÖDER, P., **2006** Enzymes transferring biomolecules to organic foreign compounds: a role for glucosyltransferase and glutathion S-transferase in phytoremediation. In M. Mackova, D. N. Dowling und T. Macek, Hrg, *Phytoremediation and Rhizoremediation*. Springer, Niederlande, 133–142.
- SCHRÖDER, P., und C. COLLINS, **2002** Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation* **4**: 247–265.

- SCHRÖDER, P., D. DAUBNER, H. MAIER, J. NEUSTIFTER, und R. DEBUS, **2008** Phytoremediation of organic xenobiotics - Glutathione dependent detoxification in phragmites plants from european treatment sites. *Bioresource Technology* **99**: 7183–7191.
- SCHRÖDER, P., C. FISCHER, R. DEBUS, und A. WENZEL, **2003** Reaction of detoxification mechanisms in suspension cultured spruce cells (*Picea abies* L. Karst.) to heavy metals in pure mixture and soil eluates. *Environmental Science and Pollution Research* **10**: 225–234.
- SCHRÖDER, P., J. NAVARRO-AVINO, H. AZAIZEH, A. G. GOLDBIRSH, S. DIGREGORIO, *et al.*, **2007** Using phytoremediation technologies to upgrade waste water treatment in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* **14**: 490–497.
- SCHRÖDER, P., und S. PFLUGMACHER, **1996** Induction of glutathione S-transferase activity in Norway spruce by xenobiotics and herbicide safeners. *Journal of Applied Botany* **70**: 97–100.
- SCHULTE-OEHLMANN, U., J. OEHLMANN, und W. PÜTTMANN, **2007** Humanpharmakawirkstoffe in der Umwelt: Einträge, Vorkommen und der Versuch einer Bestandsaufnahme. *UWSF – Z Umweltchem Oekotox* **19**: 168–179.
- SCIANCELEPORE, V., V. LONGONE, und F. S. ALVITI, **1985** Partial purification and some properties of peroxidase from Malvasia grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **36**: 105–110.
- SEIN, M. M., M. ZEDDA, J. TUERK, T. C. SCHMIDT, A. GOLLOCH, *et al.*, **2008** Oxidation of diclofenac with ozone in aqueous solution. *Environmental Science & Technology* **42**: 6656–6662.
- SHEN, S., M. R. MARCHICK, M. R. DAVIS, G. A. DOSS, und L. R. POHL, **1999** Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac. *Chemical Research in Toxicology* **12**: 214–22.
- SHIMABUKURO, R. H., **1976** Glutathione conjugation of herbicides in plants and animals and its role in herbicidal selectivity. *Asian-Pacific Weed Science Society* : 183–186.
- SIMINSZKY, B., **2006** Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochemistry Reviews* **5**: 445–458.

- SONG, N. H., X. L. YIN, G. F. CHEN, und H. YANG, **2007** Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. *Chemosphere* **68**: 1779–1787.
- TANG, C. Y., und B. MA, **2005** Glycosidation of an endothelin ETA receptor antagonist and diclofenac in human liver microsomes: Aglycone-dependent UDP-sugar selectivity. *Drug Metabolism and Disposition* **33**: 1796–1802.
- TERNES, T., **1999** Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment* **225**: 81–90.
- THOM, R., I. CUMMINS, D. P. DIXON, R. EDWARDS, D. J. COLE, *et al.*, **2002** Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry* **41**: 7008–7020.
- TOPP, E., I. SCHEUNERT, A. ATTAR, und F. KORTE, **1986** Factors affecting the uptake of ¹⁴C-labeled organic chemicals by plants from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **11**: 219–28.
- TOZUKA, Z., H. KANEKO, T. SHIRAGA, Y. MITANI, M. BEPPU, *et al.*, **2003** Strategy for structural elucidation of drugs and drug metabolites using (MS)_n fragmentation in an electrospray ion trap. *Journal of Mass Spectrometry* **38**: 793–808.
- TRAPP, S., **1995** *Plant Contamination - Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- TRIEBSKORN, R., H. CASPER, A. HEYD, R. EIKEMPER, H. KÖHLER, *et al.*, **2004** Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **68**: 151–166.
- URASE, T., und T. KIKUTA, **2005** Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research* **39**: 1289–300.
- VANACKER, H., T. L. W. CARVER, und C. H. FOYER, **1998** Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* **117**: 1103–1114.

- VANEK, T., A. NEPOVIM, R. PODLIPNA, A. HEBNER, Z. VAVRIKOVA, *et al.*, **2006** Phytoremediation of explosives in toxic wastes. In I. Twardowska, H. E. Allen, M. M. Häggblom und S. Stefaniak, Hrg., *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*, volume 69 of *Nato Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences*. Springer Netherlands, 455–465.
- VERMA, S., und R. S. DUBEY, **2003** Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* **164**: 645–655.
- WEINSHILBOUM, R., D. OTTERNESS, I. AKSOY, T. WOOD, C. HER, *et al.*, **1997** Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J* **11**: 3–14.
- WERCK-REICHART, D., und R. FEYEREISEN, **2000** Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* **1**: 3003.1–3003.9.
- WIEGEL, S., A. AULINGER, R. BROCKMEYER, H. HARMS, J. LÖFFLER, *et al.*, **2004** Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* **57**: 107–26.
- WINKER, M., J. CLEMENS, M. REICH, H. GULYAS, und R. OTTERPOHL, **2010** Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *The Science of the Total Environment* **408**: 1902–1908.
- WOLF, A. E., K.-J. DIETZ, und P. SCHRÖDER, **1996** Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Letters* **384**: 31–34.
- XU, J., L. WU, W. CHEN, und A. C. CHANG, **2008** Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A* **1202**: 189–195.
- YANYU, S., S. CHANGCHUN, J. SONGBAI, C. JUNHAI, G. JUN, *et al.*, **2010** Hydroponic uptake and distribution of nitrobenzene in *Phragmites australis*: potential for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **12**: 217–225.
- YOON, J. M., D. J. OLIVER, und J. V. SHANKS, **2007** Phytotoxicity and phytoremediation of 2,6-dinitrotoluene using a model plant, *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* **68**: 1050–1057.

-
- ZHANG, J., und M. B. KIRKHAM, **1996** Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist* **132**: 361–373.
- ZHANG, Y., und S. U. GEISSEN, **2010** In vitro degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin peroxidase. *Journal of Hazardous Materials* **176**: 1089–1092.
- ZUURBIER, K., A. BAKKENIST, R. FOKKENS, N. NIBBERING, R. WEVER, *et al.*, **1990** Interaction of myeloperoxidase with diclofenac: Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by diclofenac and oxidation of diclofenac to dihydroxyazobenzene by myeloperoxidase. *Biochemical Pharmacology* **40**: 1891–1808.

Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Prof. Peter Schröder für die Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit zur Durchführung der Dissertation in seiner Arbeitsgruppe. Ich möchte mich für seine fachliche Unterstützung, sein Engagement und das von ihm entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Bei Prof. Arnulf Melzer und Prof. Wilfried Huber bedanke ich mich für den Prüfungsvorsitz und das Koreferat im Prüfungsausschuss. Bei Prof. Jürgen Geist für seine kurzfristige Zusage als Prüfer. Bei Prof. Anton Hartmann für die Möglichkeit die Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Ich bedanke mich ganz besonders bei den Mitglieder der Arbeitsgruppe Schröder. Viele sind während der Zeit gekommen und gegangen. Lyudmila, Du warst von Anfang an da. Danke für Deine Hilfe in den vergangenen vier Jahren. Rudi, für Deine große Hilfe im Labor und vor allem für die Pflege unserer schönen Zellkultur. Bernadett für die gute Zusammenarbeit an unserem Thema und die schöne gemeinsame Zeit. Tina und Max für die gute Zusammenarbeit. Allen anderen die geholfen oder einfach nur das Leben in der AG bereichert haben: Ali, Felix, Uwe, Sergio, Juliane, Paul, Angelique, Rachel, Christopher, Martin, Arthur, Raymond. Silvia Hanyka für Ihre Unterstützung im Sekretariat. Jürgen und Roland für den ein oder anderen guten Ratschlag. Bei Franz Buegger, für seine Hilfe in technischen Fragen. Dr. Robert May für den guten Tausch.

Ich bedanke mich bei der AG Schmitt für die gute Zusammenarbeit. Mike, danke für Deine Unterstützung und die schöne Zeit in unserem "Garten".

Für die Unterstützung bei der Arbeit im Gewächshaus möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Babro Winkler, Dagmar Schneider und allen voran bei Peter Kary bedanken. Für die gute Nachbarschaft im 22er bedanke ich mich bei den Kollegen vom BIOP.

Für Ihre Gastfreundschaft und die tolle Zusammenarbeit in Prag bedanke ich mich sehr herzlich bei Dr. Miroslav Matucha und Dr. Sándor Forczek.

Bei Dr. Martina Preiss und Prof. Patricia Harvey aus London für die spontane Kooperation und die große Hilfe.

Ich bedanke mich bei bei COST-859 für die Möglichkeit meine Arbeit mehrmals in einem wunderbaren Umfeld präsentieren zu dürfen.

Ich bedanke mich unbekannterweise bei all den Menschen, die nicht damit aufhören in ihrer Freizeit tolle, leistungsfähige und vor allem freie Software zu entwickeln, mit der ein Großteil dieser Arbeit angefertigt wurde. Ihnen gebührt mein voller Respekt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken. Bei all den lieben Menschen hier in Freising, die mich immer wieder ermuntert haben. Bei Clemens fürs Reden und Lesen. Bei Dir Elke, für Deine Hilfe und Deine Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Freising, den 1. September 2010

Christian Huber