



Der Einsatz von (P450-transgenen) Pflanzenzellsuspensionskulturen als Modellsysteme zur Untersuchung der Metabolisierbarkeit von Umweltschadstoffen

Maren Anne Breuer* (MarenAnne.Breuer@rwth-aachen.de), Andreas Schäffer (Andreas.Schaeffer@bio5.rwth-aachen.de), Ingolf Schuphan (schuphan@bio5.rwth-aachen.de), Burkhard Schmidt (burkhard.schmidt@post.rwth-aachen.de), Aachen

Abstrakt

Der Umsatz von ^{14}C -Methoxychlor (MXC) wurde in Pflanzenzellsuspensionskulturen verschiedener Spezies untersucht. Nährmedium und Zellextrakt wurden einer Glycosid-Hydrolyse unterzogen und mittels Radio-Dünnschichtchromatografie und Radio-HPLC analysiert. Die nicht-extrahierbaren Rückstände wurden durch Verbrennungsanalyse bestimmt. Der Anteil an löslichen Metaboliten lag in den Tabak- und Karottenkulturen zwischen 68-84%, in den Soja- und Weizenkulturen nur zwischen 14-32%. Als Hauptmetaboliten ließen sich in allen Suspensionskulturen mono-Hydroxy-MXC, bis-Hydroxy-MXC und tris-Hydroxy-MXC nachweisen. Weiterhin wurden Metabolismusstudien mit transgenen Zellkulturen durchgeführt. Der Einsatz von Pflanzenzellkulturen ermöglicht es, in kurzer Zeit Metaboliten-Profile zu ermitteln, lösliche Metaboliten zu identifizieren, nicht-extrahierbare Rückstände zu bestimmen und Metaboliten in größeren Mengen zu produzieren.

Einleitung

Für eine ökotoxikologische Risikoeinschätzung, z.B. im Rahmen der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln, ist es notwendig, die Abbaubarkeit von Fremdstoffen in bedeutenden Umweltkompartimenten zu untersuchen. Das wichtigste Kompartiment diesbezüglich ist das Pflanzensystem, da es die Hauptquelle für die Applikation von Fremdstoffen darstellt. Weiterhin interessiert aber auch das Verhalten der Xenobiotika in Tieren und Menschen. Kenntnisse über Abbau- und Umwandlungsprodukte sind besonders dann von Bedeutung, wenn die Produkte in hohen Mengen auftreten, beständig sind, toxikologische Relevanz besitzen oder schädigende Auswirkungen auf Mensch, Tier und Naturhaushalt zeigen [1,2,3].

Sterile Pflanzenzellkulturen bieten sich als Systeme an, die pflanzenphysiologisch bedingte Metabolisierbarkeit eines Wirkstoffes zu bestimmen. Sie charakterisieren die jeweils arteigene enzymatische Kapazität, aufgenommene Fremdstoffe zu metabolisieren [3].

Die Vorteile dieser Methode bestehen in der einfachen Handhabbarkeit der Zellsuspensionskulturen, der kurzen Versuchsdauer von nur wenigen Tagen, guter Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen und – im Vergleich zu Versuchen mit intakten Pflanzen oder Pflanzenteilen – geringem Gesamtaufwand. Weiterhin können die Untersuchungen unbeeinflusst durch Fremdeinwirkungen wie Mikroorganismen oder UV-Licht durchgeführt werden [3].

Durch die fortschreitende Entwicklung der molekularbiologischen Möglichkeiten in den letzten Jahrzehnten ist es zudem möglich geworden, Pflanzen mit Fremd-Genen zu modifizieren. Hinsichtlich der hier diskutierten Problematik wurden erste Versuche dazu 1991 von einer japanischen Forschungsgruppe an intakten Pflanzen durchgeführt. Sie integrierten und exprimierten Cytochrom-P450-Gene aus Rattenleber in Tabak-Pflanzen und zeigten, dass dieses Auswirkungen auf die metabolische Aktivität der transgenen Pflanze hatte [4]. Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysieren oxidative Reaktionen von endogenen und exogenen lipophilen Komponenten [5]. Aufgrund dieser Fähigkeit spielen sie eine wichtige Rolle beim Fremdstoffmetabolismus, z.B. beim Abbau von Pflanzenschutzmitteln, in Menschen, Tieren und Pflanzen. Durch die Einführung eines O-Atoms werden lipophile in hydrophilere Substanzen umgewandelt. In der Regel führt dieses zu einer Entgiftung der Substanz, es kann aber auch zu einer Bioaktivierung kommen.

Im Menschen sind 11 P450-Isoenzyme (CYP1A1, -1A2, -2A6, -2B6, -2C8, -2C9, -2C18, -2C19, -2D6, -2E1 and -3A4) für über 90% des Metabolismus von Fremdstoffen von Bedeutung [6]. Ohkawa et al. zeigten 1998, dass die Expression von P450-Monooxygenasen aus Säugetieren mit überlappender Substratspezifität in Pflanzen nicht nur zur Toleranz gegenüber Herbiziden, sondern auch zu einer Steigerung der metabolischen Aktivität gegenüber verschiedenen Fremdstoffen führt. Der Metabolismus in Pflanzen und Menschen konnte auf diesem Weg verglichen werden [7].

Im Laufe der Zeit wurden weitere Pflanzen, wie z.B. Reis [8], und auch Pflanzenzellsuspensionskulturen [9] mit humanen P450 ausgestattet, um weitere Erkenntnisse über den Abbau von Pflanzenschutzmitteln sowohl in der Pflanze als auch im Menschen zu erhalten.

Seit 2001 wurden von uns im Rahmen eines sogenannten „Oxidative Metabolic Profiling“ eine Reihe von bekannten Pflanzenschutzmitteln in Metabolismusstudien mit verschiedenen transgenen und nicht-transgenen Zellkulturen erfolgreich getestet [9,11].

Durchführung

Die Pflanzenzellsuspensionskulturen wurden entweder in Eigenarbeit (Karotte) etabliert oder von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Braunschweig (Soja, Weizen, Tabak) bezogen. Durch Agrobakterien- vermittelte Transformation wurden die Tabakkulturen separat mit der cDNA der humanen P450-Monooxygenasen *cyp1a1*, *cyp1a2* und *cyp3a4* ausgestattet. Der Nachweis der stabilen Transformation erfolgte durch Polymerasekettenreaktion und Western Blot Analyse [10].

Die Zellkulturen wurden in 20-25 mL ihres jeweils bevorzugten Nährmediums kultiviert und alle 7 (Soja), 10 oder 11 (Tabak, Karotte) und 14 Tage (Weizen) subkultiviert. Dazu wurde jeweils 1 g Zellmasse in frisches Medium eingewogen. Die Aufarbeitung der Metabolismusansätze erfolgte am letzten Tag des Wachstumszyklusses, die Applikation der radioaktiv-markierten Testsubstanzen (25-45µg / 20-50µl / ca.2x10⁶ dpm), je nach gewählter Inkubationszeit, an den Tagen zuvor. In einem ersten Schritt wurden die Zellen unter Vakuum vom Nährmedium getrennt und deren Frischgewicht bestimmt. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese mit einem Ultraschalldesintegrator behandelt und der Zellextrakt ebenfalls unter Vakuum abgesaugt. Die Radioaktivität in Nährmedium und Zellextrakt wurde durch Szintillationszählung bestimmt. Die Zellrümpfer wurden am Oxidizer verbrannt. War davon auszugehen, dass Metaboliten als konjugierte Verbindungen vorliegen könnten, wurden die Extrakte einer enzymatischen (β-Glukosidase) oder sauren Hydrolyse (2h, 2 M HCl) mit anschließender Extraktion unterzogen. Die Identifikation der Metaboliten erfolgte mittels Radio-Dünnschicht- (DC), Hochleistungsflüssigkeits- (HPLC, HPLC-MS) und/oder Gaschromatografie (GC, GC-MS).

Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Metabolismusstudien von Methoxychlor mit unterschiedlichen nicht-transgenen Zellkulturen dargestellt. Der Anteil an Radioaktivität im Nährmedium war mit weniger als 6% in allen Kulturen sehr gering. Es wurde im weiteren Versuchsverlauf auf eine Analyse dieser Fraktion verzichtet. Der deutlich höhere Anteil an Radioaktivität (ca. 70-87%) im Zellextrakt sprach für eine gute Aufnahme der Testsubstanz ins Zellinnere, was für die Durchführung von Metabolismusstudien als wünschenswert anzusehen ist. Der Anteil an nicht-extrahierbaren Rückständen (NER) war insgesamt gering, obwohl ein deutlicher Unterschied zwischen den Karotten- und Tabakkulturen (0,8%) und den Soja- und Weizenkulturen (5,2-5,9%) erkennbar ist. Dieses ist vermutlich auf einen unterschiedlichen Zellwandaufbau, z.B. den Anteil an Lignin, zurückzuführen. Als Maß für die Qualität und Aussagekraft einer Metabolismusstudie dient die Wiederfindungsrate. Diese sollte mehr als 90% betragen. Ist dies nicht der Fall, so ist von der Bildung flüchtiger Komponenten auszugehen. Da der Dampfdruck von Methoxychlor als sehr gering eingestuft wird [12], wurden die niedrigen Wiederfindungsraten (Tabak, Soja, Weizen) auf Probleme bei der Versuchsaufarbeitung zurückgeführt.

	Tabak	Karotte	Soja	Weizen
applizierte Menge an Methoxychlor [µg]	45	25	25	25
Inkubationszeit [h]	72	48	48	48
¹⁴C im Medium	1,6	2,6	5,8	4,6
¹⁴C im Zellextrakt	74,6	87,3	70,2	77,1
nicht-extrahierbares ¹⁴C	0,8	0,8	5,9	5,2
wiedergefundenes ¹⁴C	77,0	90,7	81,9	86,9
wiedergefundenes Methoxychlor*	5,7	3,4	55,8	45,2
lösliche Metaboliten*	68,9	83,9	14,4	31,9

Tab.1: Verteilung der Radioaktivität in nicht-transgenen Pflanzenzellsuspensionskulturen nach 48h, bzw. 72h der Inkubation und Applikation von 25µg, bzw. 45 µg ¹⁴C-Methoxychlor. Die ermittelten Werte beziehen sich auf 100% der applizierten Radioaktivität (ca. 2 x 10⁶ dpm).

Das unterschiedliche Vermögen der einzelnen Kulturen zur Metabolisierung von Methoxychlor wird durch den Anteil an wiedergefundener Ursprungssubstanz und löslichen Metaboliten deutlich. Letztere waren in der Tabak- und Karottenkultur deutlich höher als in den beiden anderen Kulturen. Es ergaben sich somit Umsätze von 71,3% für die Tabakkultur, 87,3% für die Karottenkultur, 26,1% für die Sojakultur und 41,7% für die Weizenkultur. Die HPLC-Chromatogramme in Abb. 2 zeigen, um welche Metaboliten es sich im Einzelnen handelte. Die Identifikation erfolgte durch Co-Chromatografie mit nicht-markierten Referenzverbindungen. Die Verschiebung der Retentionszeiten der Proben von ca. 30 Sekunden ist durch eine verlängerte Laufstrecke bis zum Radiodetektor zu erklären.

Durch die Soja- und Weizenkulturen wurden mono- und tris-Hydroxy-Methoxychlor zu etwa gleichen Anteilen gebildet, wohingegen durch die Tabakkultur bis- und tris-Hydroxy-Methoxychlor zu etwa gleichen Anteilen gebildet wurden. Im Zellextrakt der Karottenkultur waren mono-, bis- und tris-Hydroxy-Methoxychlor nachweisbar. Der Anteil des einfach-hydroxylierten Metaboliten war dabei doppelt so hoch, wie der des zweifach-hydroxylierten und ca. 4-mal so hoch, wie der des dreifach-hydroxylierten Metaboliten. Die Ergebnisse der Radio-Dünnschichtchromatografie (Abb.2) bestätigen diese Metabolitenverteilung weitestgehend.

In Tab. 2 sind die Umsatzraten verschiedener Pflanzenschutzmittel durch transgene Tabakzellkulturen dargestellt.

Die 1NtA1-Kultur¹ zeigte, im Vergleich zur nicht transgenen Kultur, einen sehr hohen Umsatz bei Cyprodinil und Fluometuron, wohingegen die 1NtA2-Kultur² hohe Umsatzraten bei Atrazin, Carbaryl, Cyprodinil, Diflubenzuron, Fluometuron und Metamitron aufwies. Die 3NtA4-Kultur³ dagegen zeigte die höchsten Umsatzraten für Fluometuron und Metamitron, die aber verglichen mit den 1NtA1- und 1NtA2-Kulturen deutlich niedriger lagen. Anhand der Daten von Nitrofen konnte gezeigt werden, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit für alle Kulturen positiven Einfluss auf die Umsatzrate der Testsubstanz hat [11].

Zusammenfassung

Durch den Einsatz von Pflanzenzellsuspensionskulturen ist es möglich, Fremdstoffe hinsichtlich ihrer Metabolisierbarkeit zu testen. Ziele dabei sind die Ermittlung der Umsatzraten von verschiedenen Fremdstoffen, die Identifikation und Quantifizierung von löslichen Metaboliten, die Quantifizierung und Charakterisierung nicht-extrahierbarer Rückstände, die Untersuchung der Metaboliten-Muster und - im biotechnologischen Sinne - die Produktion von Metaboliten, die für weitere Untersuchungen von Interesse sein könnten.

Es können in kurzer Zeit Aussagen über die pflanzeigene, enzymatisch-bedingte Metabolisierbarkeit der untersuchten Testsubstanz erhalten werden. Werden zusätzlich humantransgene Zellkulturen eingesetzt, so können auch Informationen über den Metabolismus im Säugetier erhalten werden.

Literatur

- [1] Schmidt, B. in: Hall, Hoagland, Zablotowicz, *ACS Symposium Series 777- Pesticide Biotransformation in plants and microorganisms* (2001), 40
- [2] BBA (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft *Richtlinie für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren*, Teil IV, 3-2 / 1 (1992)
- [3] Schuphan, I., Schmidt, B., Veit, P. *Gesunde Pflanzen* (1990), 42, 8, 276
- [4] Saito, K., Noji, M., Ohmori, S., Imai, Y., Murokoshi, I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Plant Biology* (1991) 88, 7041
- [5] Ohkawa, H., Tsujii, H., Shimoji, M., Imajuku, Y., Imaishi, H. *J. Pestic. Sci.* (1999), 24, 197
- [6] Inui, H., Shiota, N., Yukiko, M., Yoshiko, I., Inoue, T., Kodama, T., Ohkawa, Y., Ohkawa, H. *J. Pestic. Sci.* (2001), 26, 28
- [7] Ohkawa, H., Shiota, N., Yamada, T., Inui, H., Ohkawa, Y. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* (1998) 12, 17

- [8] Hirose, S.; Kawahigashi, H.; Ozawa, K.; Shiota, N.; Inui, H.; Ohkawa, H.; Ohkawa, Y. *J. Agric. Food. Chem.* (2005), 53, 3461
- [9] Schmidt, B.; Faymonville, T.; Gembé, E.; Joußen, N.; Schuphan, I. *Chem. Biodiv.* (2006), 3, 878-896
- [10] Bode, M., Doktorarbeit, RWTH Aachen, 2004; Bode, M., Stöbe, P., Thiede, B., Schuphan, I., Schmidt, B. *Pest. Manag. Sci.* (2004), 60, 49; Bode, M., Haas, M., Faymonville, T., Thiede, B., Schuphan, I., Schmidt, B. *J. Environ. Sci. Health Part B* (2006), 41, 201
- [11] Schmidt, B., Jousen, N., Bode, M., Schuphan, I. *Biochem. Soc. Trans.* (2006b), 34, 1241
- [12] <http://extoxnet.orst.edu/pips/methoxyc.htm> , 25.01.2009, 19.52h

Korrespondenzadresse

Maren Breuer
RWTH Aachen
Institut für Umweltforschung – Biologie V
LS. f. Umweltbiologie und –chemodynamik
Worringerweg 1
52074 Aachen, Germany
Tel. 0241 - 8026681
Fax 0241 - 8022182

¹ Zellkultur von *Nicotiana tabacum* L. separat transformiert mit humanem *cyp1a1*

² Zellkultur von *Nicotiana tabacum* L. separat transformiert mit humanem *cyp1a2*

³ Zellkultur von *Nicotiana tabacum* L. separat transformiert mit humanem *cyp3a4*

Substanz	Applikations- menge	Inkubations- zeit	Tabak + CYP1A1	Tabak + CYP1A2	Tabak + CYP3A4	Tabak Nicht- transgen
	[μg]	[h]	[%]	[%]	[%]	[%]
Atrazin, H	20	48	36,3	100,0	n.d.	20,2
Carbaryl, I	20	24	48,8	99,8	27,5	21,8
Cyprodinil, F	20	24	99,8	93,5	n.d.	13,8
DDT, I	20	48	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Diflubenzuron, I	20	48	25,8	89,8	18,6	15,6
Dimethoat, I	20	48	12,3	30,5	n.d.	17,5
Fluometuron, H	45	48	86,7	95,2	42,6	62,1
Metamitron, H	20	48	55,3	93,1	31,9	39,4
Nitrofen, H	20	48	22,5	20,9	n.d.	18,3
Nitrofen, H	20	120	45,3	57,9	n.d.	37,4

Tab.2: Übersicht der Umsätze verschiedener Pflanzenschutzmittel durch transgene Tabakzellensuspensionskulturen [11]. Angegeben sind die Mittelwerte aus 3 Parallelen. H: Herbizid, I: Insektizid, F: Fungizid, n.d. nicht durchgeführt

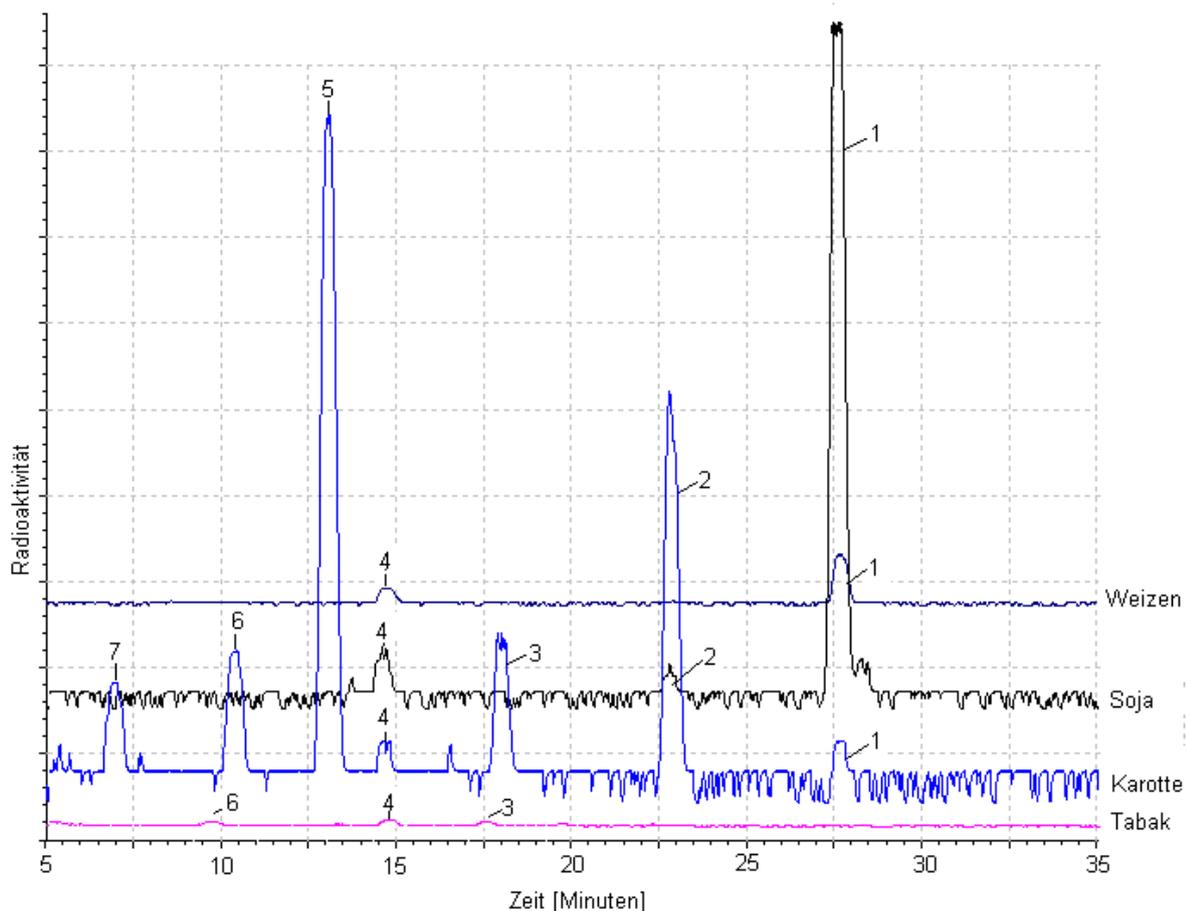


Abb. 1: Radio-HPLC- Chromatogramme der Zellextrakte der nicht-transgenen Kulturen nach der hydrolytischen Spaltung möglicher Glukose-Konjugate. Die Identifikation von ^{14}C -Methoxychlor (1) und seinen Metaboliten (2-4) erfolgte durch Co-Chromatografie mit nicht-markierten Referenzverbindungen. Retentionszeiten waren dabei 26,80 min für Methoxychlor, 22,00 min für mono-Hydroxy-Methoxychlor (2), 17,17 min für bis-Hydroxy-Methoxychlor (3) und 14,38 min für tris-Hydroxy-Methoxychlor (4). 5 – 7 verblieben als nicht-identifizierbare Substanzen.

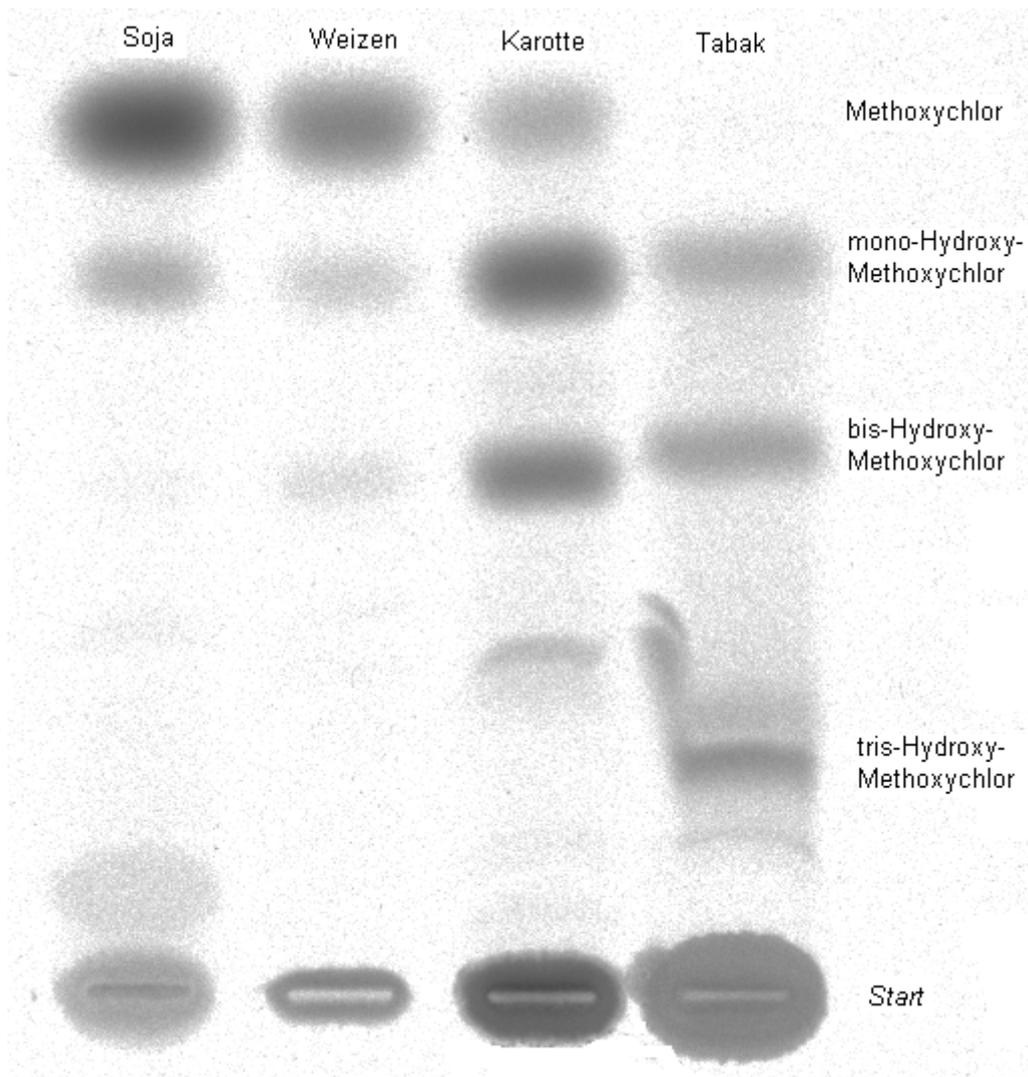


Abb. 2: Radio-Dünnschichtchromatogramm der Zellextrakte der nicht-transgenen Kulturen nach der Hydrolyse. Die Identifikation von ^{14}C -Methoxychlor und seinen Metaboliten erfolgte durch Co-Chromatografie mit nicht-markierten Referenzverbindungen.