

Themengebiet: **Schadstoffe in der Umwelt**

Xenobiotika

Bestimmung des Proteingehaltes in Nadelgehölzen zum
Wirkungsnachweis organischer Fremdstoffe



Lernziele:

- Definition Xenobiotika allgemein und in der Umwelt sowie relevante Eintragspfade
- Verstehen von potentiellen Wirkmechanismen und Abbauwegen in der Umwelt und im Zusammenhang mit Entgiftungsreaktionen in Organismen
- Darstellung Aufbau Transferasen und Ablauf Konjugatbildung
- Aneignung Bradford-Test mit Durchführung

1. Einleitung

Xenobiotika (der natürlichen Umwelt fremde Stoffe) haben in den letzten Jahrzehnten besondere Aufmerksamkeit erfahren, nachdem ihre Einwirkung auf das Klima der Erde sowie ihre Schadwirkung und Anreicherung in Organismen festgestellt worden waren. Bei diesen Stoffen kann es sich um organische (z.B. POPs, CO₂, Kunststoffpartikel) wie auch anorganische Verbindungen (z.B. Schwermetalle, Nitrate, Phosphate) handeln, welche als Stäube, Feinstäube, Gase oder gelöst vorliegen. Der Eintrag von Xenobiotika in die Biosphäre kann signifikant sein und aus diffusen oder punktuellen Quellen stammen.

Verbindungen mit lipophilem Charakter können sich, einmal von Organismen aufgenommen, anreichern (Bioakkumulation) und über die Trophieebenen höhere Konzentrationen erreichen (Biomagnifikation). Eine Aussage über das Anreicherungspotential von organischen Schadverbindungen in Organismen kann über den Octanol-Wasser-Koeffizienten erfolgen.

Tabelle 1: Übersicht log K_{OW}-Werte ausgewählter Verbindungen

Verbindung	log K _{OW}
Acetamid	-1,155
Methanol	-0,824
Ameisensäure	-0,413
Diethylether	0,833
1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	2,17
p-Dichlorbenzol	3,37
Hexamethylbenzol	4,61

Je positiver der log K_{OW} einer Verbindung, desto lipophiler/hydrophober ist diese und hat somit das Potential sich im Fettgewebe von Organismen anzureichern.

Eine Schadstoffaufnahme bei Pflanzen findet durch eine Kontamination des Bodens, des Wassers und der Luft statt.^[1] Schadstoffe aus der Luft können dabei aus weitentfernten Quellen stammen und zu einer Kontamination der Pflanzen führen.^[2]

Ubiquitär in Pflanzen, Tieren und Menschen vorkommende Glutathion S - Transferasen (GST) dienen dabei als wichtige Entgiftungsenzyme für xenobiotische Substanzen (Biotransformation). GST sind multifunktionale dimere Proteine, wobei die Polypeptid-Untereinheiten homo- oder heterodimer aufgebaut sein können. Als Entgiftungsenzym gewinnt die Glutathion S-Transferase praktische Bedeutung im Wirkungs-Monitoring von Waldökosystemen, da über die Wachsschicht eine Reihe phytotoxischer chlorierter Kohlenwasserstoffe in den zellulären Raum der Nadeln aufgenommen werden.^[4] Zudem

wirkt sie als Komplexbildungsreagenz bei den von der Pflanze aufgenommenen Schwermetallen und trägt somit zur vorläufigen Entgiftung bei, da die Pflanze diese Komplexe meist in den Vakuolen der Zellen speichert.^[5]

Glutathion S-Transferasen katalysieren die Konjugation elektrophiler, hydrophober Verbindungen mit der SH-Gruppe von reduziertem Glutathion (GSH). Die Konjugate besitzen eine höhere Wasserlöslichkeit und werden unter Abspaltung der Glutamat- und Glycinreste metabolisiert. Die Entgiftungsprodukte werden aus der Zelle exportiert und nach der Bildung flüchtiger Metabolite ausgeschieden.

Die Konjugatbildung von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mit GSH durch Glutathion S-Transferase katalysiert, ist in Abbildung 1 dargestellt.

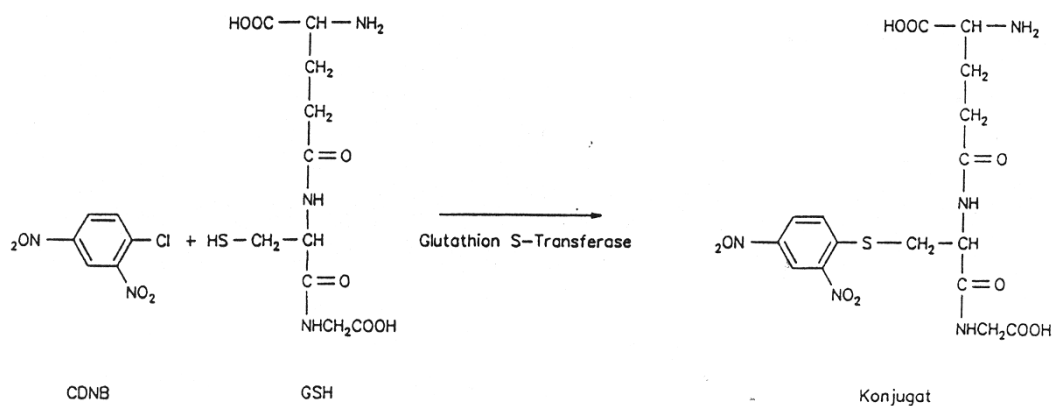


Abbildung 1: Konjugatbildung, katalysiert durch GST

Quantitativ erfasst werden kann diese Reaktion über den photometrischen Bradford-Test. Dieser beruht darauf, dass durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G-250 an positiv geladene Proteine eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) eintritt. Da dies eine Gleichgewichtsreaktion ist, besteht ein gekrümmter Zusammenhang zwischen BSA-Konzentration und Extinktion.^[3]

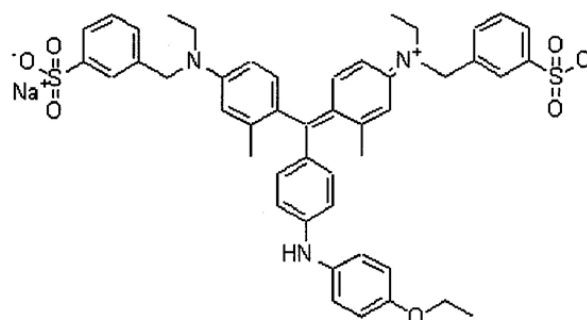


Abbildung 3: Strukturformel von Coomassie Brilliantblau G-250

Das im Versuch verwendete Rinderserumalbumin (BSA) gehört zur Klasse einfacher Proteine, die aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und einem geringen Prozentsatz Schwefel bestehen. Ihre genaue chemische Zusammensetzung ist nicht bekannt. Albumine gerinnen durch die Einwirkung von Wärme, mineralischen Säuren, Alkohol und Ether. Sie sind in Wasser und in schwachen Salzlösungen löslich. Albumine sind ein wichtiger Bestandteil von Nahrungsmitteln. Sie kommen in tierischen Stoffen wie Eiklar, Milch und Muskeln sowie im Blutplasma (auch im menschlichen) vor. Sie finden sich ebenfalls in Pflanzen, vor allem in Samen. Da Albumin bei Erwärmung auf 71 °C gerinnt, eignet es sich zur Entfernung von Schwebstoffen, was u. a. zur Klärung von Lösungen beim Raffinieren von Zucker ausgenutzt wird. Albumine bilden mit vielen Metallsalzen, wie z. B. Quecksilber-2-Chlorid, Kupfersulfat und Silbernitrat, unlösliche Verbindungen, weshalb sie als Antidot zu diesen Giften eingesetzt werden. Eine Paste aus Albumin und Calciumhydroxid (gelöschter Kalk) härtet zu einer steinharten Substanz aus und wird zum Kleben von zerbrochenem Steingut verwendet.

2. Versuchsdurchführung

Es werden **3** konservierte Nadelproben unterschiedlicher Standorte und/oder Nadelhölzer verwendet. An den Mischproben der Nadeln soll der Proteingehalt der Nadelproben photometrisch nach der Methode von Bradford bestimmt werden.

Enzympräparation

1 g Acetontrockenpulver (genaue Einwaage notieren!) werden in 25 ml 0,1 M Enzympräparationspuffer unter Kühlung (Eis) 1 min mit dem Ultra-Turrax (11000 rpm) homogenisiert. Das Homogenisat wird auf 4 Tips verteilt und auf Eis gestellt bis von allen Nadelproben Homogenisate hergestellt wurden.

Anschließend werden die Tips auf Zentrifugengläser verteilt und 40 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Aus allen Tips einer Probe jeweils die klare überstehende Lösung abnehmen und in einem separaten Gefäß als Mischprobe vereinigen.

Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Der Proteingehalt der Extrakte wird nach der Methode von Bradford bestimmt. Als Kalibrationsstandard dient Rinderserumalbumin (BSA). Die Kalibrationen werden in einem Bereich von 0-160 µg/ml aufgenommen. Folgende Abbildung zeigt das Beispiel einer solchen Kalibrationskurve:

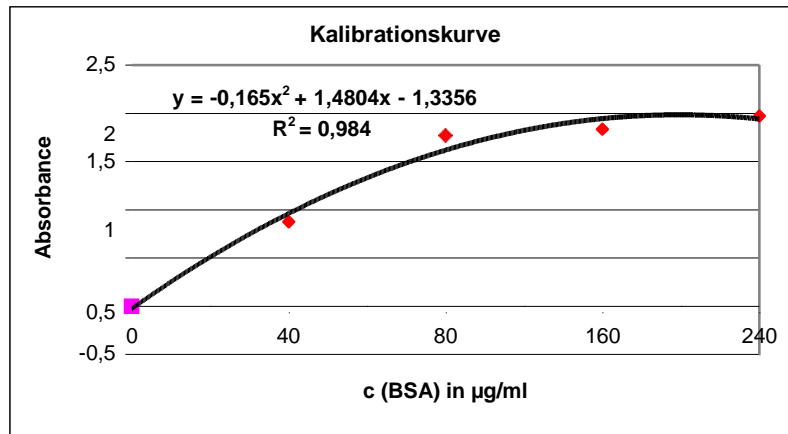


Abbildung 4: Kalibrationskurve, aufgenommen mit BSA-Standardlösungen

Dazu werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Volumina BSA-STD L und E-Puffer direkt in eine Küvette pipettiert.

Tabelle 1: Zu pipettierende Volumina für die Kalibrationsreihe

	V (BSA-STD L) [µL]	V (E-Puffer) [µL]	c BSA [µg/mL]
blank	0	1000	0
KL 1	50	950	20
KL 2	100	900	40
KL 3	200	800	80
KL 4	400	600	160

Anschließend werden noch 2 mL Farbreagenzlösung Coomassie Brilliantblau zugegeben und nach 5 Minuten (bitte immer die gleiche Zeit nehmen, auch wenn es 6 Minuten sind!) wird die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Referenz dient E-Puffer. Die Kalibration wird als Doppelbestimmung durchgeführt.

Unbekannte Proben

1. 100 μL Enzymextrakt, 900 μL E-Puffer und 2 mL Farbreagenz in eine Küvette pipettieren, 5 Min stehen lassen, anschließend Extinktion messen, Doppelbestimmung!
2. 200 μL Enzymextrakt, 800 μL E-Puffer und 2 mL Farbreagenz in eine Küvette pipettieren, 5 Min stehen lassen, anschließend Extinktion messen, Doppelbestimmung!

Der Kalibrationskurve entsprechend eine Regression durchführen. Auf Grundlage der angepassten Funktion erfolgt die Berechnung der unbekannt Probe.

Herstellung der Stammlösungen

Puffer pH 7,8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$)

0,4082 g KH_2PO_4

5,7055 g K_2HPO_4

In 250 mL Maßkolben überführen und mit entionisiertem Wasser auffüllen

Puffer zur Enzympräparation (E-Puffer)

1,0 g Polyvidon 25 (PVP K10) -> zur Stabilisierung

0,5 g EDTA

In 100 mL Maßkolben überführen und mit Puffer pH 7,8 auffüllen

Stammlösung Rinderserumalbumin (BSA-STDL)

0,04 g Rinderserumalbumin

In 100 mL Maßkolben überführen und mit Puffer pH 7,8 auffüllen

Bereits hergestellt: **Coomassie Brilliantblau G 250** (Farbreagenzlösung)

3. Antestat

Für das Antestat sollten Sie folgende Aspekte kennen:

- Ziel des Versuchs in 1-2 Sätzen
- Aufbau und Durchführung Bradford-Test
- Mögliche Risiken und Gefahrenquellen im Umgang mit den im Versuch Anwendung findenden Chemikalien und Lösungen

Hinweise zur Auswertung

In das Protokoll gehören:

1. Alle ermittelten Daten (Einwaagen Acetontrockenpulver, Messwerte der UV-VIS Messung)
2. Graphische Darstellung der Kalibrierkurve
3. Berechnung der Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ der einzelnen Nadelproben aus der Kalibrationsfunktion
4. Berechnung des Proteingehalts in mg/g der einzelnen Nadelproben (genaue Einwaage und Volumen des E-Puffers beachten!)
5. Diskussion der Ergebnisse (Wie kann es zu Schwankungen zwischen den Standorten/Baumarten kommen; Was sind mögliche Fehlerquellen im Versuch)

4. Literatur

[¹] Trapp, S., Matthies, M., Dynamik von Schadstoffen – Umweltmodellierung mit CemoS, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996

[²] Dreyer, A. et al., Halogenated flame retardants in tree samples applied as bioindicators for atmospheric pollution, Chemosphere 208, 2018, 233-240

[³] Bradford, M.M., A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72, 1976, 248

[⁴] Lamourex, G.L. et al., Diphenyl ether herbicide metabolism in a spruce cell suspension

culture: The identification of two novel metabolites derived from glutathione conjugate,
Pest. Biochem. Physiol. 39, 1991, 291

[⁵] Pflugmacher, S. und Schröder, P., Glutathion S-transferases in trees: Inducibility by
various organic xenobiotics,
Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 158, 1995, 71