



Vergleich eines Rezeptorbindungstests basierend auf Fluoreszenzpolariometrie mit einem Hefezell-Assay – Bestimmung der estrogenen Gesamtaktivität in Umweltproben



T. Schultis, P. Spengler, A. König, J.W. Metzger

Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA), Bandtäle 2, 70569 Stuttgart (Büsnau), Universität Stuttgart

Anlass

Chemikalien, die im Verdacht stehen, das Hormonsystem von Mensch und Tier zu stören, stehen derzeit im Mittelpunkt vieler Diskussionen. Zu den endokrin wirksamen Verbindungen gehören dabei neben natürlichen und synthetischen Estrogenen auch Phyto- oder Xenoestrogene. In dieser Arbeit wurde das Potenzial des Kompetitions-Assays basierend auf Fluoreszenzpolariometrie mit dem herkömmlichen Hefezell-Assay (Yeast Estrogen Screen-Assay) anhand der Bestimmung der estrogenen Gesamtaktivität in Umweltproben verglichen.

Material und Methoden

Untersucht wurden zahlreiche Reinsubstanzen, Abwasserproben aus dem Kläranlagenzu- und ablauf des Lehr- und Forschungskläranwerks Stuttgart-Büsnau sowie Proben aus Oberflächengewässern.

Probenaufbereitung:

- Filtration über Glasfaserfilter und Einstellung von pH 2 mit konz. Schwefelsäure
- Festphasenanreicherung an RP-C 18, Gefriertrocknung des Adsorbens und Elution mit Aceton
- Chromatographie an Kieselgel, Fließmittel: Hexan/Aceton : 60/40
- Aufnahme in Screening-Pufferlösung und Einengung im Stickstoffstrom

Prinzip des Kompetitions-Assays:

- Komplex aus fluoreszierendem Liganden und Estrogenrezeptor → **hohe Polarisation**
- Komplex mit Verdünnungsreihe der Testsubstanz bzw. Umweltprobe inkubieren
- Mit steigender Konzentration der Testkomponente folgt größere Konkurrenz mit fluoreszierendem Liganden um Rezeptorbindung → **Polarisation sinkt**
- Die Bindungsaffinität der Testkomponente ist als **IC₅₀-Wert** charakterisiert.

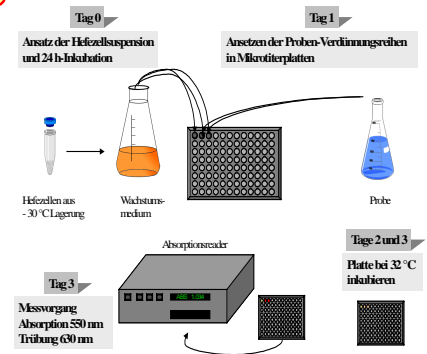


Abb. 1. Prinzip des Hefezell-Assays.

Ergebnisse und Diskussion

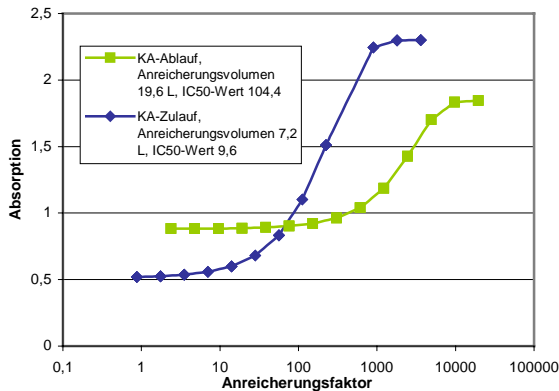


Abb. 2. Untersuchung von Abwasser aus der Kläranlage Stuttgart-Büsnau mit dem Hefezell-Assay; Ergebnisse des Kompetitions-Assay (ER-β): Zulauf IC₅₀-Wert 6,5; Ablauf IC₅₀-Wert 44,9.

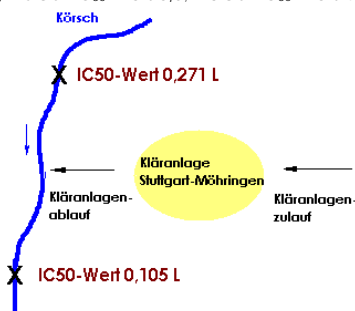


Abb. 3. Untersuchung des Oberflächengewässers Korsch, Stuttgart-Möhringen mit dem Hefezell-Assay.

Tab. 1. Ergebnisse der Messung von Reinsubstanzen mit dem Kompetitions-Assay (ER-α und ER-β) und dem Hefezell-Assay.

| Substanz | Kompetitions-Assay (ER-α) IC ₅₀ -Wert in M | Kompetitions-Assay (ER-β) IC ₅₀ -Wert in M | Hefezell-Assay IC ₅₀ -Wert in M |
|----------------------|---|---|--|
| 17β-Estradiol | 7,38 E-9 | 5,55 E-9 | 6,68 E-10 |
| Estron | 6,97 E-8 | 8,69 E-8 | 3,01 E-9 |
| 17α-Ethinylestradiol | 2,16 E-9 | 8,17 E-9 | 5,55 E-10 |
| Diethylstilbestrol | 3,76 E-8 | 5,07 E-8 | 8,03 E-9 |
| Genistein | 5,75 E-7 | 1,21 E-8 | 6,39 E-7 |
| Indole-3-carbinol | 8,15 E-4 | 2,29 E-3 | 3,42 E-5 |
| Bisphenol A | 3,20 E-6 | 3,43 E-6 | 6,55 E-6 |
| 4-Octylphenol | 1,18 E-6 | 2,28 E-6 | n.a. |
| 4-Nonylphenol | 2,19 E-5 | 5,53 E-6 | n.a. |
| 4-n-Nonylphenol | 1,00 E-4 | 3,37 E-5 | n.a. |
| NP1EC [#] | 2,53 E-5 | 9,00 E-6 | k.F |
| Fenarimol | 1,73 E-5 | 1,72 E-5 | k.F |
| Ethylparaben | n.a. | n.a. | 5,83 E-5 |
| Propylparaben | n.a. | n.a. | 8,43 E-6 |
| Butylparaben | n.a. | n.a. | 8,30 E-6 |
| Benzylparaben | n.a. | n.a. | 1,16 E-6 |

[#] 4-Nonylphenoxyessigsäure, n.a.: nicht auswertbar, k.F.: keine Färbung

Fazit:

- Die Bestimmung der IC₅₀-Werte der ausgewählten Reinsubstanzen war mit mindestens einem der beiden in-vitro-Testverfahren möglich.
 - Die Elimination von estrogen wirksamen Verbindungen in der Kläranlage Stuttgart-Büsnau war mit beiden Assays nachweisbar.
 - Eintrag von estrogen aktiven Substanzen in das Oberflächengewässer Korsch durch Abwasser aus der Kläranlage Stuttgart-Möhringen war nachweisbar.
- Die kombinierte Anwendung beider in-vitro-Assays ist für die Erfassung der estrogenen Aktivität von Reinsubstanzen und Umweltproben sehr gut geeignet.

Dieses Projekt wird finanziell gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF (02WU0167)