

# YES-Assay – Optimierung durch Zellaufschluss

T. Schultis, J.W. Metzger

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

## Hintergrund:

Der Yeast Estrogen Screen-Assay (YES) stellt ein gängiges *in vitro*-Testsystem für die Bestimmung der estrogenen Gesamtaktivität in Umweltproben dar.

### Vorteile:

- Hohe Sensitivität
- Gute Praktikabilität
- Hohe Aussagekraft
- Geringe Kosten

### Nachteile:

- Lange Inkubationsdauer von 3 – 5 Tagen

## Ziel:

Verkürzung der Inkubationsdauer des YES-Assays bei gleichzeitigem Erhalt der hohen Sensitivität.

## Methoden:

1. YES-Assay mit *Sacch. cerev.*: Inkubationsdauer 72 h

2. Lyticase-Aufschluss:

- Inkubation der Hefezellen mit estrogen wirksamen Substanzen in Mikrotiterplatten (4h)
- Lysis der Hefezellen mit Lyticase und Triton X100
- Zugabe von CPRG und Messung der Absorption nach 2h

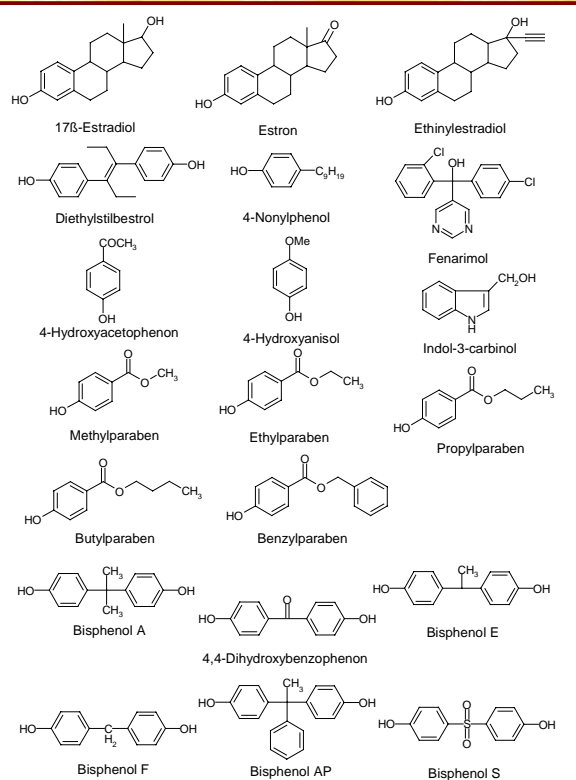
## Ergebnisse:

- Der Lyticase-Aufschluss minimiert die Testdauer des YES-Assays von 72 bis 120 Stunden auf 7,5 Stunden bei erhöhter Sensitivität.
- Die IC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Reinsubstanzen lagen beim Lyticase-Aufschluss i.d.R. um eine Zehnerpotenz niedriger als beim herkömmlichen YES-Assay.
- Mit dem Lyticase-Aufschluss konnte z.T. die estrogenen Aktivität von Substanzen bestimmt werden, beispielsweise Methylparaben, deren Bestimmung mit dem YES-Assay nicht möglich war.

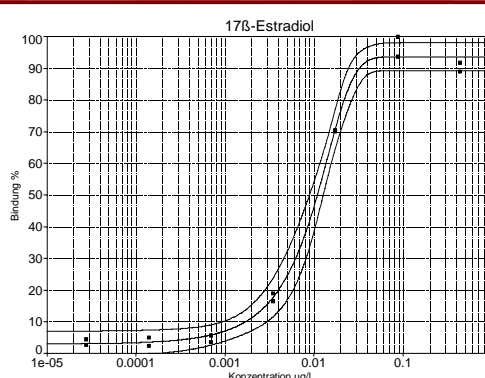
Ergebnisse der Untersuchung von Reinsubstanzen.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Wert [M] YES-Assay <sup>#</sup>	IC <sub>50</sub> -Wert [M] Lyticase-Aufschluss <sup>§</sup>
17β-Estradiol	4,44 ± 1,53 · 10 <sup>-10</sup> %	4,82 ± 0,99 · 10 <sup>-11</sup> †
17α-Ethinylestradiol	5,55 ± 0,79 · 10 <sup>-10</sup>	6,87 ± 2,67 · 10 <sup>-11</sup>
Estron	2,54 ± 0,28 · 10 <sup>-9</sup>	3,83 ± 1,06 · 10 <sup>-10</sup>
Techn. Nonylphenol	n.a.	2,43 ± 0,33 · 10 <sup>-6</sup>
Fenarimol	k.F.	k.F.
Indol-3-carbinol	3,42 ± 0,75 · 10 <sup>-5</sup>	1,57 · 10 <sup>-4</sup> †
DES	8,03 ± 2,15 · 10 <sup>-9</sup>	3,92 ± 1,08 · 10 <sup>-10</sup>
4-Hydroxyacetophenon	1,04 ± 0,20 · 10 <sup>-3</sup>	9,78 ± 1,59 · 10 <sup>-5</sup>
4-Hydroxyanisol	2,07 ± 0,39 · 10 <sup>-3</sup>	5,33 ± 0,39 · 10 <sup>-4</sup>
Bisphenol A	6,55 ± 1,05 · 10 <sup>-6</sup>	1,31 ± 0,45 · 10 <sup>-6</sup>
Bisphenol E	3,68 ± 1,26 · 10 <sup>-6</sup>	9,49 ± 0,14 · 10 <sup>-7</sup>
Bisphenol F	3,06 ± 0,85 · 10 <sup>-6</sup>	6,45 ± 0,93 · 10 <sup>-7</sup>
Bisphenol AP	1,93 ± 0,55 · 10 <sup>-5</sup>	1,31 ± 0,23 · 10 <sup>-6</sup>
Bisphenol S	1,50 ± 0,36 · 10 <sup>-4</sup>	1,04 ± 0,27 · 10 <sup>-4</sup>
4,4'-Dihydroxybenzophenon	5,75 ± 0,26 · 10 <sup>-5</sup>	4,41 ± 1,60 · 10 <sup>-6</sup>
Methylparaben	n.a.	1,52 ± 0,07 · 10 <sup>-6</sup>
Ethylparaben	5,83 ± 1,14 · 10 <sup>-5</sup>	4,86 ± 4,16 · 10 <sup>-6</sup>
Propylparaben	8,43 ± 2,36 · 10 <sup>-6</sup>	1,60 ± 0,11 · 10 <sup>-6</sup>
Butylparaben	8,30 ± 2,29 · 10 <sup>-6</sup>	4,19 ± 0,35 · 10 <sup>-6</sup>
Benzylparaben	1,16 ± 0,29 · 10 <sup>-6</sup>	8,13 ± 0,26 · 10 <sup>-7</sup>

<sup>#</sup> 3-fach-Bestimmung; <sup>§</sup> 2-fach-Best.; <sup>†</sup> 24-fach-Best.; <sup>‡</sup> 7-fach-Best.; <sup>∇</sup> 1-fach-Best.; n.a.: nicht auswertbar; k.F.: keine Färbung;



Untersuchte Reinsubstanzen.



Bestimmung von 17β-Estradiol mit Hilfe des Lyticase-Aufschlusses; (Beispielkurve); IC<sub>50</sub> = 3,49 · 10<sup>-11</sup> M, n = 14; r<sup>2</sup> = 0,9965.