

Mit biologischem Testsystem gegen die Wasserverschmutzung

Hefezellenassay zur Erfassung von Östrogenen und östrogen wirksamen Substanzen

Das Unternehmen quo data, Dresden hat in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben im Rahmen eines gemeinsamen FuE Vorhabens ein statistisch gesichertes Verfahren entwickelt, das die Messung von hormonell wirksamen Substanzen in Wasser oder einer wasserähnlichen Matrix (z. B. Trinkwasser, Getränke, Abwasser, Urin) ermöglicht. Das Augenmerk liegt dabei nicht auf der Kontrolle einzelner östrogen wirksamer Stoffe, sondern auf der summarischen Wirkung aller Substanzen mit östrogenen Aktivitäten.

Das Messprinzip

A-Yes Assay heißt das neue biologische invitro Testsystem mit transgenen *Arxula adenivorans* Hefezellen als mikrobielle Komponente. Die Hefezellen enthalten eine Rezeptor-Expressionskassette mit konstitutivem TEF1-Promotor und dem Gen für den menschlichen Östrogenrezeptor α (hER α).

In einer zweiten Expressionskassette, der Reporter-Expressionskassette, wurde ein Promotor (GAA-Promotor) mit einer Erkennungssequenz (Estrogen-Rezeptor-Elemente = ERE-Region) für den Östrogenrezeptor ausgerüstet und mit dem Gen für das Enzym Phytase (Reportergen) fusioniert. Bindet eine östrogen wirksame Substanz an den Rezeptor hER α , wird dieser transaktiviert, so dass er an die auf der Reporter-Expressionskassette lokalisierte DNA-Erkennungssequenz (ERE-Region) binden kann. Dies hat die Expression dieser Kassette zur Folge, welche die rekombinante Phytase synthetisiert und sezerniert (ausscheidet). Da die Phytaseaktivität direkt mit der Aktivität der östrogen wirksamen Substanz korreliert, kann die östrogene Aktivität über den biochemischen Nachweis der Phytase ermittelt werden (Abb. 1). Für den biochemischen Phytasenachweis wird p-Nitrophenylphosphat als Substrat eingesetzt, das durch die Phytase in Phosphat und p-Nitrophenolat (Abb. 2) gespalten wird. Hierbei kommt es zu einer Farbreaktion, deren Stärke mit Hilfe eines Photometers (Reader) exakt definiert werden kann. Die Konzentration von p-Nitrophenolat ist somit ein Maß für die östrogene Aktivität zugegebener Substanzen, die

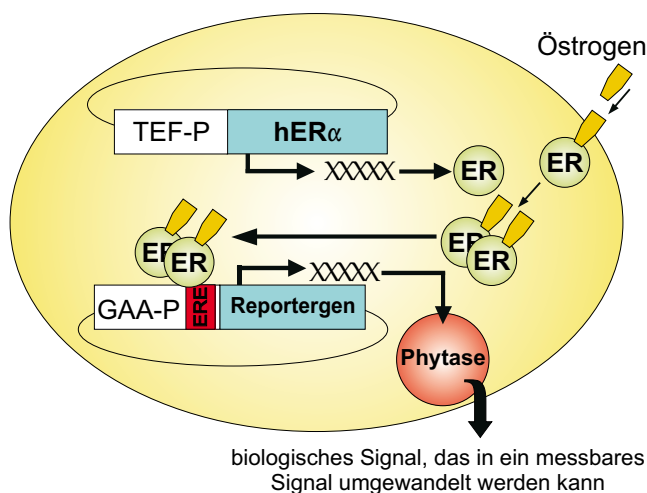


Abb. 1: Schema zur Detektion von östrogen wirksamen Substanzen mit dem A-Yes Assay

Zahlreiche in der jüngsten Vergangenheit durchgeführte Studien zur Umwelt-, Nahrungs- und Futtermittelanalytik haben bestätigt, dass viele der dabei detektierten Substanzen eine östrogene Aktivität aufweisen. Sie gelangen beispielsweise über den Urin von Milchvieh- oder Kläranlagen in unsere Oberflächengewässer und weiter in die Nahrungskette. Da die in den Gewässern gefundenen Schadstoffkonzentrationen möglicherweise für die immer wieder neu zu beobachtenden Entwicklungsstörungen bei aquatischen Organismen verantwortlich sind und zugleich schädliche Effekte bei den Vorgängen der Fortpflanzung und Entwicklung bei Tieren und Menschen verursachen können [1–3], besteht ein Bedarf an biologischen Testsystemen, die kostengünstig und unkompliziert zuverlässige Aussagen über das östrogene Potenzial von Nahrungs-, Futtermittel- und Umweltpollen liefern.

sich bis zu einer Nachweisgrenze von weniger als 5 ng/l 17 β -Östradiol (E2) in reinem Wasser und ab 10 ng/l in stark kontaminiertem Abwasser detektieren lässt. Das A-Yes Assay gehört so zu den sensitivsten bekannten Östrogenmessmethoden [4]. Es liefert innerhalb von 26 Stunden ein zuverlässiges Ergebnis, wobei die reine Arbeitszeit rund 1,5 Stunden beträgt (Abb. 3). Der Test-Kit wird ab September 2008 über die quo data GmbH kommerziell erhältlich sein.

Die Anwendungsbereiche

Da das Messverfahren als Mikrotiterplattentest ausgelegt ist, eignet es sich besonders für die Laboranalytik, mit dessen Hilfe hier zeit- und kostengünstig gemessen werden kann. Das A-Yes Assay versetzt Produzenten als auch behördliche Kontrollorgane in die Lage, den Abbau östrogen wirksamer Substanzen zu überwachen und zugleich deren Einleitung in die Nahrungskette

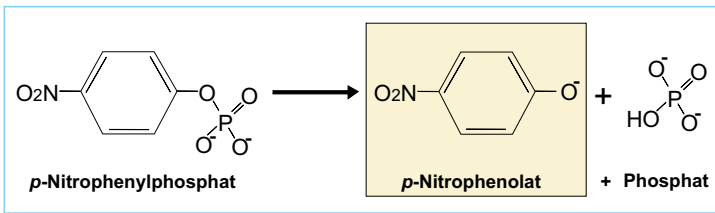


Abb. 2: Östrogenbestimmung durch Spaltung des p-Nitrophenylphosphates in p-Nitrophenolat (gelb) durch die Phytase phyK

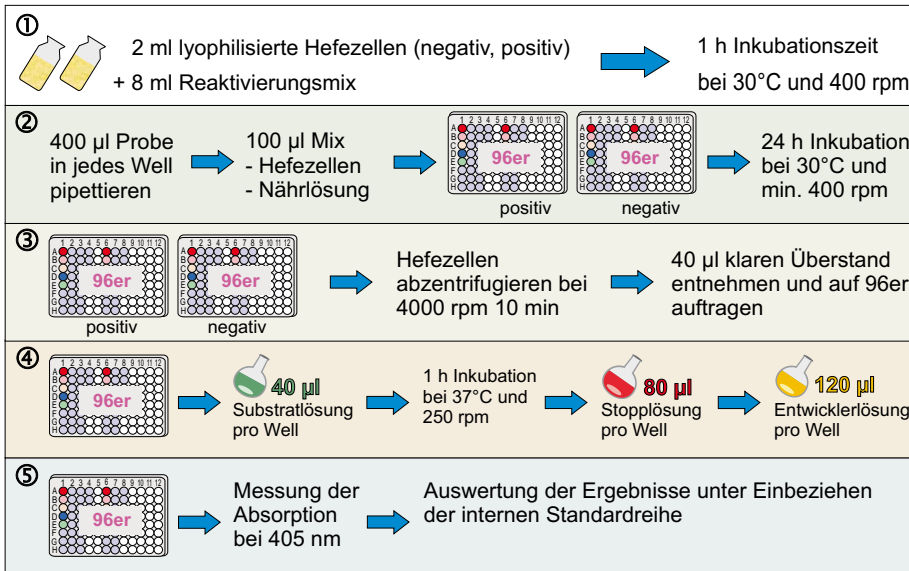


Abb. 3: Arbeitsschritte zum Nachweis östrogenener Aktivitäten in Umweltproben mit Hilfe des A-Yes Test Kits

bzw. Umwelt zu protokollieren sowie deren tatsächliche Verteilung und Wirkung zu prüfen. Der Einsatz des Testsystems ist daher in folgenden Branchen möglich:

- Nahrungs- und Futtermittelindustrie bzw. -analytik
- Wasserversorgungs- und Abwasserbranche (Umwelt-Prozessanalytik) – Überwachung von Wasseraufbereitungs- und Kläranlagen etc.
- Produktions- und Prozessanalytik in der chemischen Produktion (Chemie, Pharmazie) und in der Lebensmittelproduktion
- Analytik in den Life Sciences und in der biochemischen Forschung – Überwachung von Bioreaktoren, Produkteingangskontrolle, Pflanzenschutzmittelzulassung, Pharmawicklung und -zulassung

Fazit

Das auf Basis einer transgenen Hefe arbeitende außerordentlich robuste A-Yes Assay ermöglicht die Detektion östrogen wirksamer Substanzen und liefert selbst bei stark veränderter Matrix stabile Messergebnisse ohne aufwändige Probenvorbereitung. Es verbessert das Monitoring von Schadstoffkonzentrationen in Nahrungs-, Futtermittel und Umweltproben und verringert gleichzeitig die Untersuchungskosten durch seine preiswerte Herstellung.

Literatur

- [1] Witorsch R. J.: Reg Toxicol Pharmacol 36, 118–130 (2002)
- [2] Bruhn, T.; Gülden, M.; Ludwig, S.; Seibert, H.: Einstufung von Schadstoffen als endokrin wirksame Substanzen, Text 65/99 Umweltbundsamt, Berlin (1999)
- [3] Kojim, H.; Katsura, E.; Takeuchi, S.; Niiyama, K.; Kobayashi, H.: Environm Health Pers 112, 524–531 (2004)
- [4] Hahn, T.; Tag, K.; Riedel, K.; Uhlig, S.; Baronian, K.; Gellissen, G.; Kunze, G: Biosensors Bioelectron 21, 2078–2085 (2006)

► KONTAKT

Kirsten Simon
PD Dr. Steffen Uhlig
 quo data GmbH
 Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik
 Dresden
 Tel.: 0351/403566-31
 Fax: 0351/403566-39
 k.simon@quodata.de
 www.quodata.de

Prof. Dr. Gotthard Kunze
Dr. Martina Körner
 IPK Gatersleben
 Leibniz-Institut für Pflanzengenetik
 und Kulturpflanzenforschung
 Gatersleben