



DIN NA I 19-01-03-05-09 AK
**Hormonelle Wirkung/
Xenohormone**

Zusammenstellung:

Dr. Christel Weins

66132 Saarbrücken

Phone: +49 681 9893003

E-Mail: c.weins@weins.de



Motivation

- Hormonähnlich wirkende Stoffe anthropogenen Ursprungs in der Umwelt (Xenohormone) können den natürlichen Hormonhaushalt von Lebewesen derart beeinträchtigen, dass deren Reproduktion negativ beeinflusst wird. Populationsrelevante Störungen können die Folge sein.
- In regulatorischer Hinsicht wurden bereits Maßnahmen mit dem Ziel ergriffen, negative Auswirkungen von Xenohormonen auf die Umwelt zu minimieren. Es wurden beispielsweise Umweltqualitätsnormen (UQN) für prioritäre Stoffe eingeführt, von denen einige in begründetem Verdacht stehen, hormonähnlich zu wirken.
- Hormonähnlich wirkende Stoffe werden diffus und über Punktquellen in die Gewässer emittiert. Zumindest für rezeptorgekoppelte Wirkungen ist eine **additive** Mischungstoxizität anzunehmen. Daher ist die alleinige Abbildung und Kontrolle des Risikos über UQN nicht ausreichend.
- Zur Komplementierung der Risikobewertung und zum Monitoring von Emissionen von Chemikalien mit Kombinationswirkung wie rezeptoraktivierende Xenohormone sollten Biotestverfahren eingesetzt werden. Bisher existiert allerdings kein zertifiziertes Testverfahren für den aquatischen Bereich.



Der Auftrag des DIN AKs

Bund-Länder erteilten Auftrag an den Normungsausschuss Wasserwesen (NAW), eine DIN Norm zu entwickeln für ein Messverfahren für hormonelle Wirkung speziell für Abwässer aus Kläranlagen.

Vorgaben:

Native Wasserprobe

Nachweis möglichst von 1 ng/L



Testverfahren

Bestimmung rezeptoraktivierender Xenohormone

- Humane Zelllinien
 - E-Screen Proliferationstest mit einer humanen Brustkrebszelllinie (MCF-7)
 - Human in vitro ER reporter gene assay (niederländische Methode,)
- Transformierte Hefezellen
 - Yeast Estrogen Screen (YES) nach Routledge und Sumpter
 - In vitro
 - Speed-YES Test nach Routledge und Sumpter
 - Wirkungsbezogene Analytik (immobilisierte Probe)
 - A-Yes Test (patentiert von Quo Data)



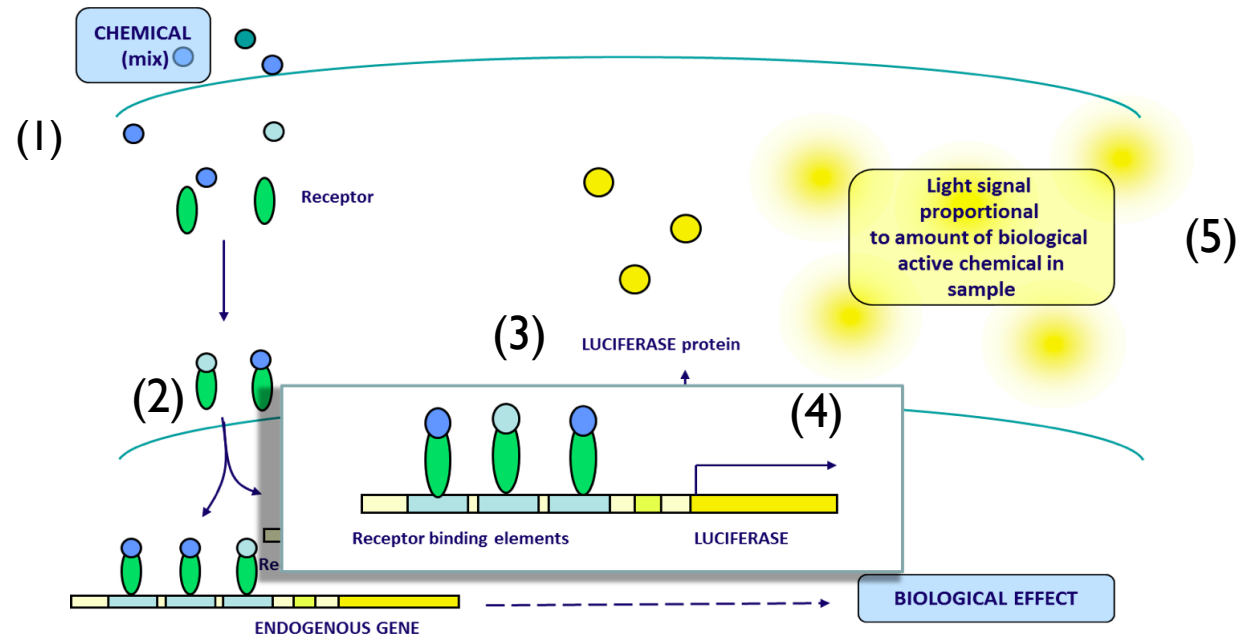
E-Screen Proliferationstest

- in vitro- Proliferationstest mit einer humane Brustkrebszelllinie (MCF-7)
- Effekt: Zellen teilen sich vermehrt bei Anwesenheit von estrogenartig wirkenden Verbindungen
- Messprinzip/Quantifizierung: Kolorimetrische Proteinbestimmung

Anmerkung:

2 Labore im AK

Human in vitro ER reporter gene assay



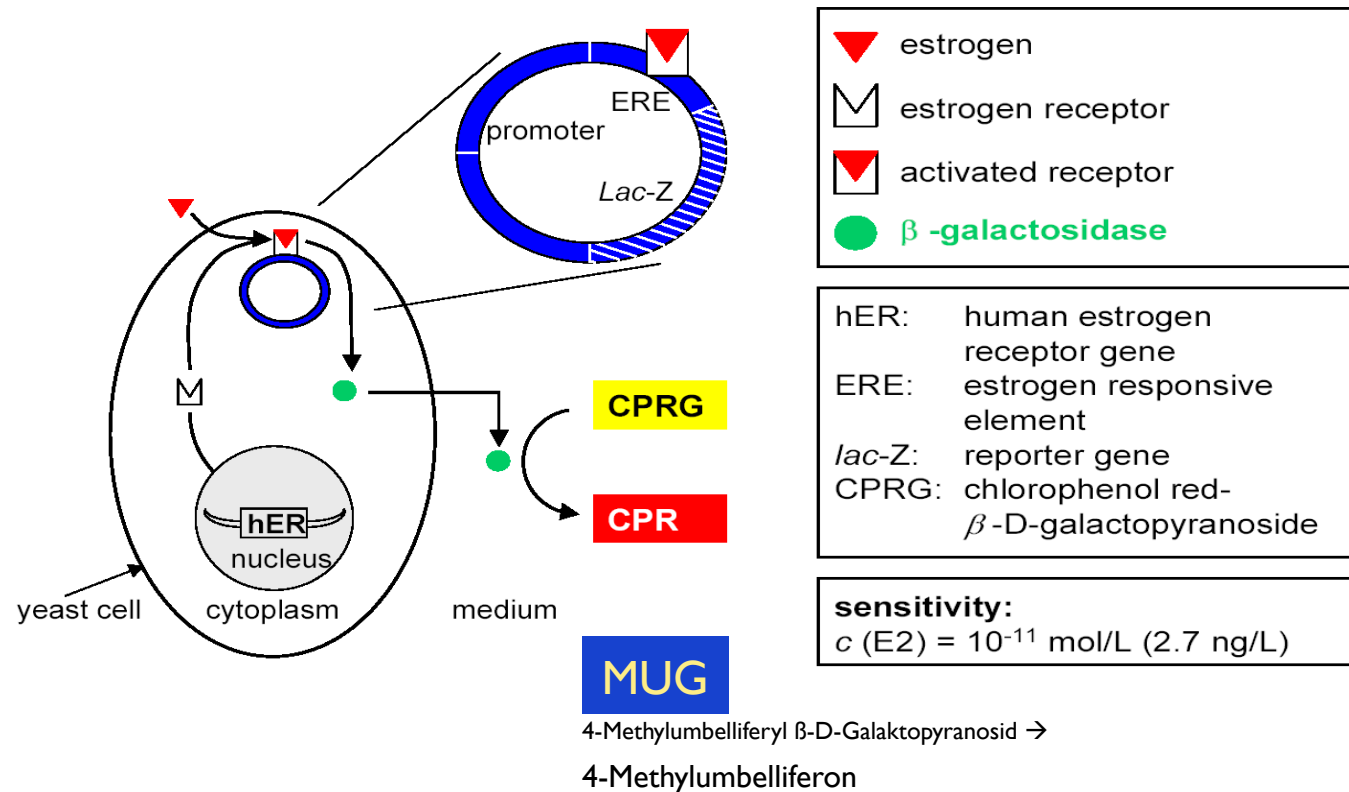
- (1) Der ER-Agonist (e.g. Standard oder chemischer Mix) diffundiert in menschliche Zellen durch die Zellmembran.
- (2) Der ER-Agonist bindet an den Rezeptor.
- (3) Der ER-Agonist/Rezeptor gelangt in den Zellkern und das Konstrukt bindet an die rezeptorbindenden Elemente.
- (4) Luciferase Enzyme wird aktiviert und Luciferase Proteine werden gebildet.
- (5) Durch Zugabe von Luciferin wird Licht emittiert.

Das Lichtsignal ist proportional zu dem Gehalt an biologisch aktiven Chemikalien in der Standardlösung oder in der Probe.

Anmerkung:

3-4 Labore im AK

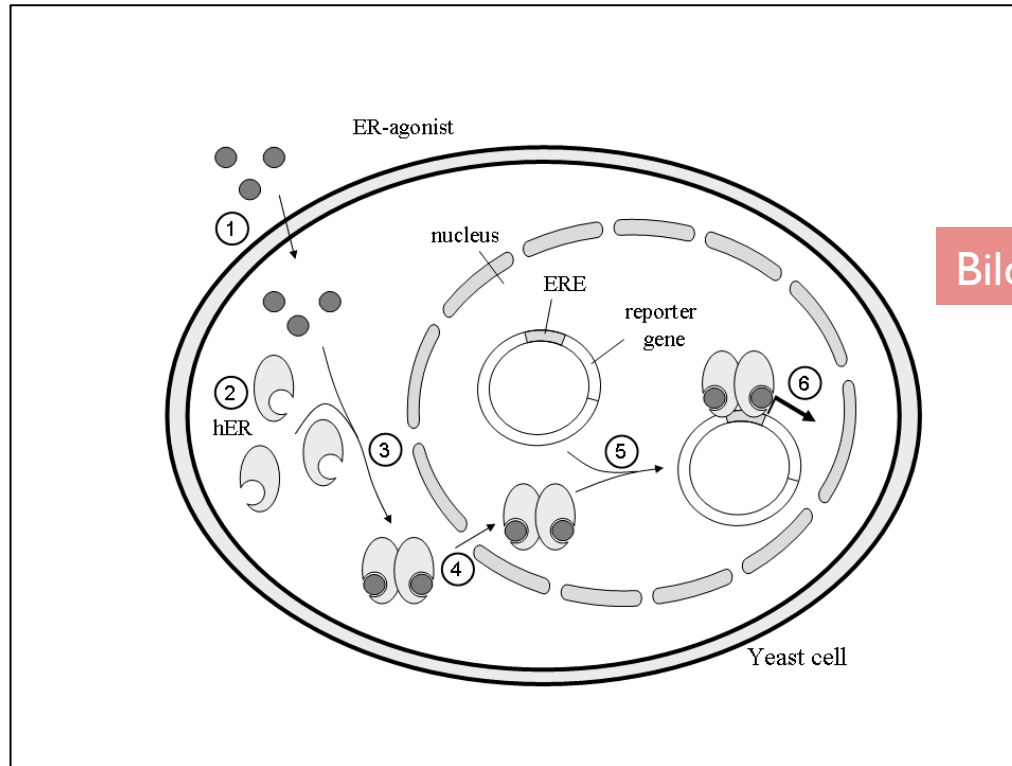
Schema des Yeast Estrogen Screen (YES) Tests nach Routledge und Sumpter



Anmerkung: derzeit der verbreitetste Test in Deutschland

A-YES Test

(patentiert von Quo Data)

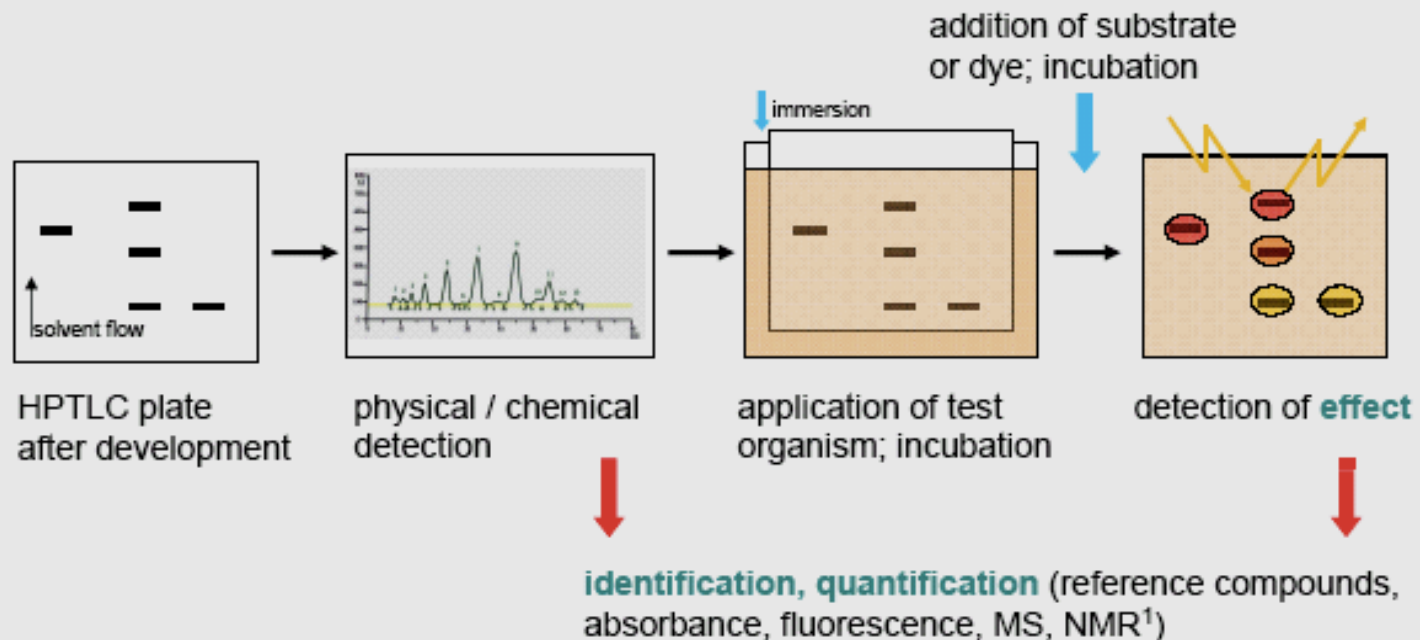


Bildung von Phytase

Anmerkung: 2 Labore im AK

SPEED-Yes Test

Schema der wirkungsbezogenen Analytik



➡ Screening methods for detection of bioactive compounds in complex mixtures

➡ Pharmaceutical research¹, environmental analysis^{2, 3}

¹ Hostettmann et al. *Phytochem. Anal.* 1991, 2, 199-203.

² Weins, C.; Jork, H. J. *Chromatogr. A* 1996, 750, 403-407. ³ Eberz, G. et al. *Chromatographia* 1996, 43, 5-9.

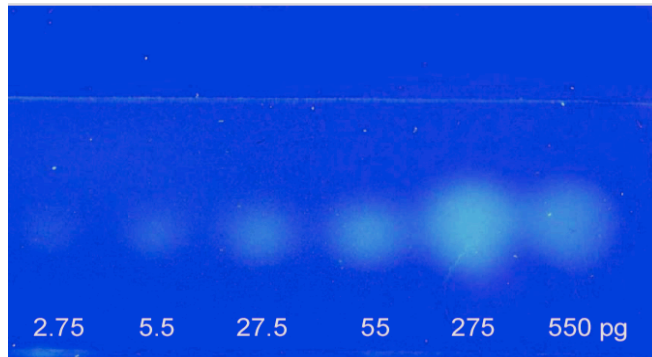


Prinzip der wirkungsbezogenen Analytik

- **Schritt 1:** Bioaktive Stoffe werden auf der stationären Phase durch planare Flüssigkeitschromatographie nach Polarität getrennt
- **Schritt 2:** Verdampfen der mobilen Phase
- **Schritt 3:** Immobilisierung des Testorganismus auf der stationären Phase unter optimalen Kultivierungsbedingungen für den Testorganismus, Induktion des Zielenzyms im Testorganismus
- **Schritt 4:** Optimierte Bedingungen für den enzymatischen Umsatz eines selektiven Substrats (pH, Puffer,..)
- **Schritt 5.** Optimierte Bedingung für die Detektion des enzymatisch gebildeten Produktes

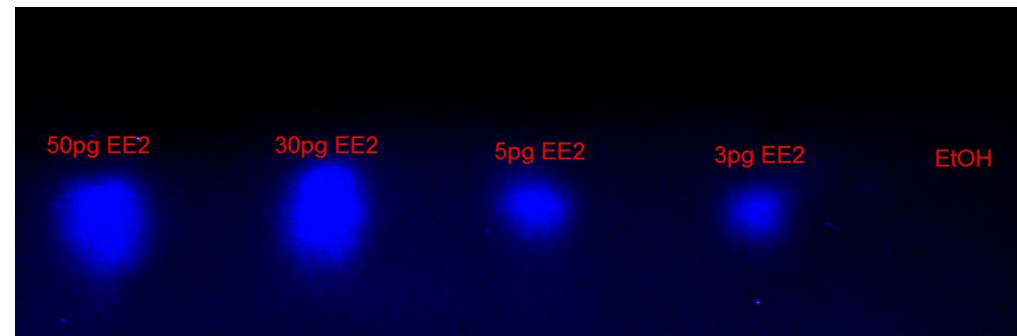
Entwicklung des YES Testes 2004 bis 2012

Detektion der Östrogen Aktivität (17 α -ethinestradiol)



A New Bioautographic Screening Method for Detection of Estrogenic Compounds, M. B. Mueller, C. Dausend, C. Weins, and F. H. Frimmel *Chromatographia*, 60, pp 207- 211, 2004

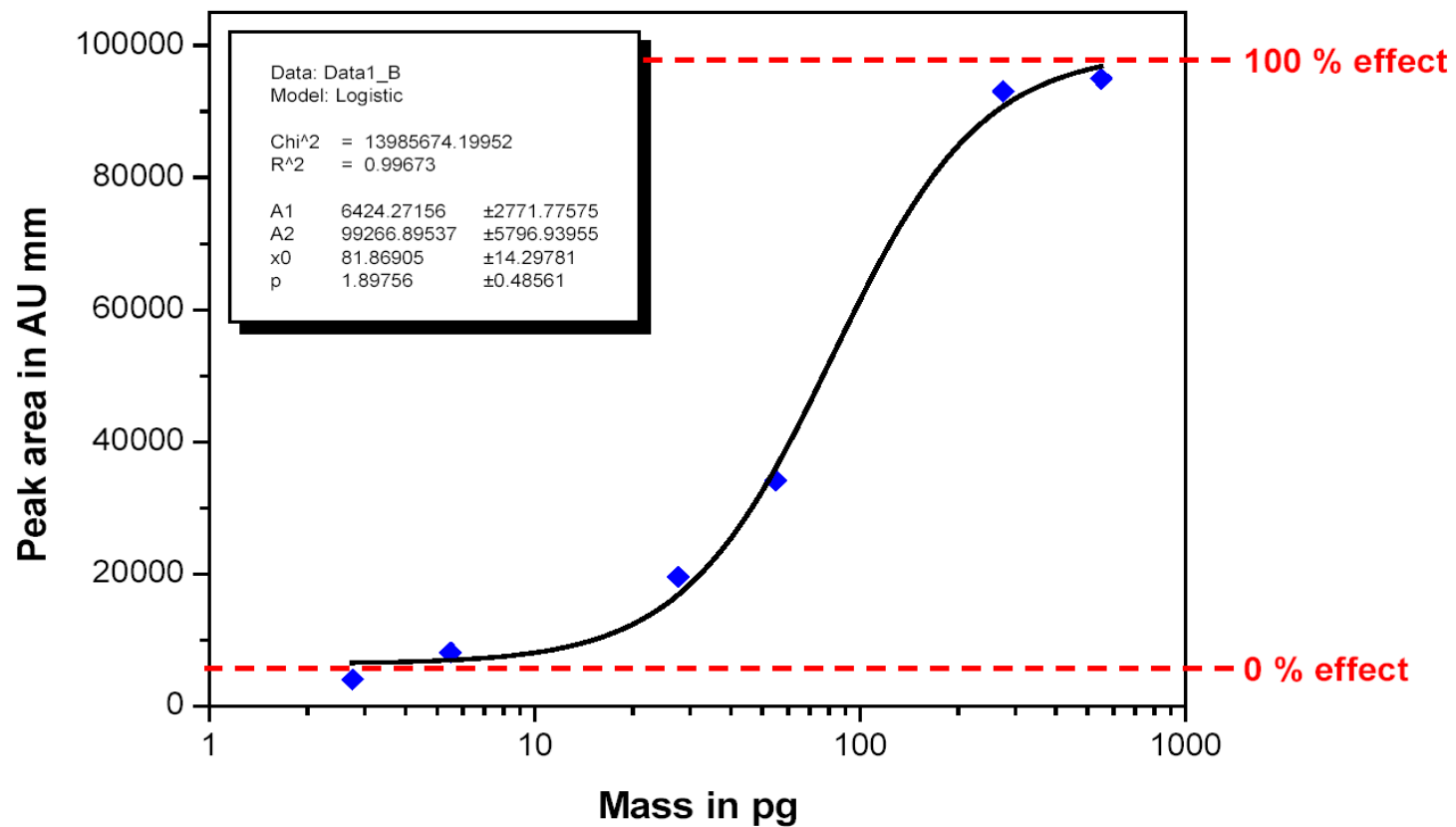
**2012 liegt die
Detektionsgrenze bei
der Arbeitsgruppe
Buchinger und
Schönborn bei 0.3-0.4 pg**



Spira and Buchinger , BfG Federal Institute of Hydrology, Koblenz, unpublished, 2011, detection, Yeast Estrogen Screen (YES) According to Routledge and Sumpter

YES Test: auf der HPTLC Platte

Dosis Wirkungskurve des HPTLC-YES Test mit β -Estradiol





Derzeitiger Stand und weiteres Vorgehen

- Störung durch die Matrix werden eliminiert
- Die Reduzierung der Testzeit von 72 auf 5 h
- die derzeitige Nachweisgrenze liegt bei 0,5-0,3 µg
- Erste Ergebnisse mit Realproben liegen vor
- Eine Unterarbeitsgruppe soll diesen Test weiter bearbeiten und eine Arbeitsvorschrift (DIN Entwurf) diesem DIN Arbeitskreis NA I 19-01-03-05-09 AK vorlegen inkl. Prevalidierungsdaten