2018

YES we can!

Warum komplizierter, teurer „Yeast Estrogen Screen“, wenn es auch einfach und günstig geht?

AUTOREN: KATRIN SPENST, MARIE KÖNIG

Inhalt

1. Einleitung 2
1.1 Projektfindung 2
1.2 Projektbeschreibung 2
1.3 Die Problemlage 2
1.4 Der YES-Nachweis 3
2. Ausgangssituation 5
2.1 Ausgangsprotokoll 5
2.2 verwendete Geräte 7
2.2.1 Lyticase 7
3. Vereinfachung des Verfahrens 7
3.1 Erste Anpassungen- Erstes Prototyp-Protokoll 8
2.1 Herstellung einer Referenz Östradiol-Reihe 8
2.1.1 Östradiol- Aufbereitung 8
2.1.2 Östradiol Verdünnung 8
2.2.2 Hefe- Aufbereitung 8
2.2.3 Ergebnisermittlung 9
3.2 Alternative Aufschlussverfahren 9
4. Vereinfachtes Protokoll 12
5. Ermittelte Ergebnisse 13
5.1 Ergebnisse des ersten vereinfachten Protokolls 13
5.2 Ergebnisse des zweiten vereinfachten Protokolls 14
6. Schlussfolgerung 16
7. Danksagung 16

1. Einleitung

1.1 Projektfindung

Auf der Suche nach einem interessanten Projektthema stießen wir recht schnell auf das Gebiet der Ökotoxikologie. Jedoch konnten wir uns bei der großen Auswahl der verschiedenen Aspekte nicht direkt entscheiden. Von Bienensterben bis Plastikverschmutzung zogen wir verschiede Themengebiete in Betracht, bis wir uns schließlich für ein noch nicht allzu durchleuchtetet entschieden: endokrin-wirkende Stoffe. Als Erstes wollten wir Grundlagenforschung betreiben und mit dem YES lokale Gewässer untersuchen. Diese Idee mussten wir aber immer mehr in den Hintergrund stellen, als sich uns verschiedenen Durchführungsschwierigkeiten in den Weg stellten. Damit hatten wir unser Projekt gefunden: Wir entschieden uns den YES soweit zu vereinfachen und günstiger zumachen, dass er für eine breitere Masse verfügbar wird und unser Erkenntnisstand wächst.

1.2 Projektbeschreibung

Warum kompliziert, wenn es auch einfach geht?

In der Ökotoxikologie wird der Yeast Estrogen Screen (YES-test) als kompetenter Nachweis für kleinste Mengen östrogen-wirkender Stoffe[1] verwendet. Hierfür allerdings braucht man teure Gerätschaften und Chemikalien, die uns nicht zur freien Verfügung standen. Deswegen haben wir uns darauf konzentriert diesen Test zu vereinfachen, sodass wir und Andere mit vergleichbarer Ausstattung und möglichst geringem Kostenaufwand genaue Ergebnisse erzielen können. Zudem untersuchten wir verschiedene Proben auf ihre östrogene Wirkung.

1.3 Die Problemlage

„Die endokrin-wirkenden Chemikalien sind der Klimawandel für unsere Gesundheit und die der Umwelt. Sie stellen eine fundamentale Bedrohung da.“[2]

Endokrin-wirkende Stoffe sind in unserem Alltag omnipräsent: Sie stecken als Zusatzstoffe in Kosmetika, Pestiziden und zuletzt in Plastik.

Als endokrin-wirkende Stoffe bezeichnet man Hormone die Abläufe im Körper steuern. Besonders während der Embryonalentwicklung spielen Endokrine eine wichtige Rolle bei der Entwicklung. In dieser Phase sind die Auswirkungen von einem gestörten Hormonhaushalt besonders gravierend und irreversible. Unfruchtbarkeit, Brust-, Prostata-, Hoden- oder Eierstockkrebs können die Folgen von

---

[1] Currently available definitions of “endocrine disrupter” are either neutral in terms of specifying the toxicological relevance of the effects to be described, or they introduce the idea of adversity. Latest definition: “A change in morphology, physiology, growth, reproduction, development or lifespan of an organism
which results in impairment of functional capacity or impairment of capacity to compensate for additional stress or increased susceptibility to the harmful effects of other environmental influences”. (STATE OF THE ART ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTERS Final Report Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3;Annex 1 SUMMARY OF THE STATE OF THE SCIENCE Revised version, 29 January 20121; Authors: Andreas Kortenkamp, Richard Evans, Olwenn Martin, Rebecca McKinlay, Frances Orton, Erika Rosivatz)

[2] Lisette van Vliet; Health and Environment Alliance, HEAL, Ph.D. in International Relations and Environmental Studies from the Australian National University in Canberra. (http://old.env-health.org/a/1846)

einer endokrinen Belastung während der Schwangerschaft sein, ebenso vorzeitige Geschlechtsreife, Entwicklungsstörungen, Fettsucht, Diabetes, Hodenhochstand, Missbildungen des Penis und polyzystischen Fibrose. Aber auch im Fortgeschrittenenalter sind vor allem Spätfolgen zu beobachten. Bereits in den 90 Jahren begann die Debatte über Regulierungsmaßnahmen in der EU. Der Auslöser hierfür war ein starker Anstieg der Unfruchtbarkeit bei Männern. Auch in der Umwelt ließen sich Auswirkungen dieser endokrin-wirkenden Stoffe nachweißen, da man vermehrt beobachten konnte, dass männliche Fische in Groß Britannien weibliche Eiweißstoffe produzierten[3]. Dennoch herrscht Unklarheit über die Zahl und eine treffende Definition endokrin-wirkender Stoffe in der EU. Eine Liste, sowie Evaluation von verdächtigen Molekülen fehlt. Ebenso ist es immer noch ein Streitthema, ob Endokrine nach einem Konzentrationsgrenzewert oder doch Mengen unabhängig reguliert werden sollten. Im Moment scheint es so, als seien viele endokrin-wirkende Stoffe Konzentration unabhängig schädlich. Die EU Kommission gab somit einen Forschungsbericht der Bestandsausnahme über endokrin wirkende Chemikalien in Auftrag: Der Kortenkamp-Bericht[4] kam zu dem Schluss, dass die Problemlage von hoher politischer Wichtigkeit ist. Trotz gegebener Grundlage für einen Gesetzesentwurf, blieb dieser aus.[5]

1.4 Der YES-Nachweis

Der Yeast Estogen Screen ist ein in vitro Verfahren zum Nachweis von östrogen-wirkenden Stoffen in Flüssigkeiten. Hierfür wird ein rekombinierter Hefestamm verwendet: Den Stamm zeichnet aus, dass er zum einen in seinem Genom die Gensequenz für den menschlichen Östrogen Rezeptor aufweist (hER), welcher in das Chromosom integriert wurde. Zum anderen besitzt der Hefeplasmid das, aus *Escherichia coli* stammende, lac-Z Reportergen, welches das Enzym β-Galctosidase codiert. In dem Bakterium *Escherichia coli* dient das Enzym β-Galctosidase, um das Disaccharid Lactose zu Glucose und Galactose zu spalten. Die Genaktivität lässt sich hier durch das Operonmodell erklären: Der für das Enzym codierende Genabschnitt wird nach dem Prinzip der Substratinduktion reguliert, indem vor das codierende Gen eine Regulationssequenz geschaltet ist, das Operon. Ist das Substrat nicht vorhanden bindet ein Protein, der Repressor, an das Operon und verhindert somit die Transkription des dahinter geschalteten Gens. Nur wenn das Substrat des Enzyms vorhanden ist bindet dieses an den Repressor, was eine Konformationsänderrung des Repressors zur Folge hat. Dadurch kann der Repressor nicht mehr an den Operon-DNA-Abschnitt binden und löst sich. Das Enzym β-Galctosidase wird produziert.

Dieser Regulationsmechanismus wurde nun so verändert, dass das Enzym β-Galctosidase nur abgeschrieben wird, wenn ein Stoff in die Zelle gelangt der an den menschlichen Östrogenrezeptor binden kann. Wird β-Galctosidase also produziert ist ein östrogen-wirkenden Stoff in der Flüssigkeit.

Zuerst veränderte man also die Regulatorsequenz so, dass sie nicht auf das eigentliche Substrat der β-Galctosidase reagiert, sondern auf östrogen-wirkenden Stoffe. Da in das Genom des Hefestammes das Gen für den menschlichen Östrogenrezeptor (hER) integriert wurde, produziert die Hefezellen Östrogenrezeptoren, welche frei im Cytoplasma vorliegen. Das Operon des Lac-Operons wurde nun aber durch ein „estrogen responsive element“ ersetzt. Der Östrogenrezeptor kann nun als eine Art

---

[3] A SURVEY OF ESTROGENIC ACTIVITY IN UNITED KINGDOM INLAND WATERS
Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Fisheries Laboratory, Remembrance Avenue, Burnham-on-Crouch, Essex CM0 8HA, United Kingdom ‡Department of Biology and Biochemistry, Brunel University, Uxbridge, Middlesex UB8 3PH, United Kingdom

[4] STATE OF THE ART ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTERS Final Report Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3;Annex 1 SUMMARY OF THE STATE OF THE SCIENCE Revised version, 29 January 20121; Authors: Andreas Kortenkamp, Richard Evans, Olwenn Martin, Rebecca McKinlay, Frances Orton, Erika Rosivatz

[5] https://www.youtube.com/watch?v=kHlSMZEMosI

Repressor verstanden werden. Der Rezeptor bindet solange an diese Regulatorsequenz und verhindert somit die Transkription, bis ein Molekül an den Rezeptor bindet und dieser sich löst und somit die Transkription des Strukturgens möglich macht.

Eben jene Transkription des Strukturgens wird dadurch sichtbar gemacht, dass ein Substrat, das Chlorophenol red-β-D-Galactopyranosid (gelbe Farbe) von dem Produkt, das Enzym β-Galctosidase in chlorophenol red (rote Farbe) und Galactopyranosid gespalten wird. Das Edukt CPRG dieser enzymatischen Reaktion besitzt eine gelbe Farbe (Wellenlänge 540 nm), während das Produkt CPR dagegen rot erscheint. Somit kann anhand der Intensität der Farbveränderung im Wellenlängenbereich von 580 nm eine Aussage darüber getroffen werden wie viele und wie stark Stoffe in einer Flüssigkeit östrogenähnlich wirken.

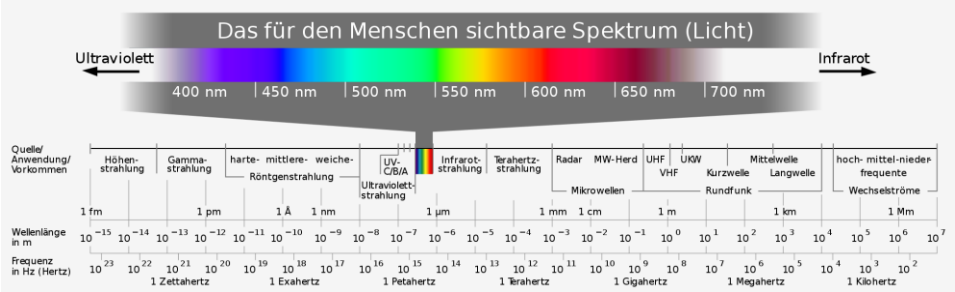


Abbildung 1: Wellenlängen-Spektrum des Lichtes[6]

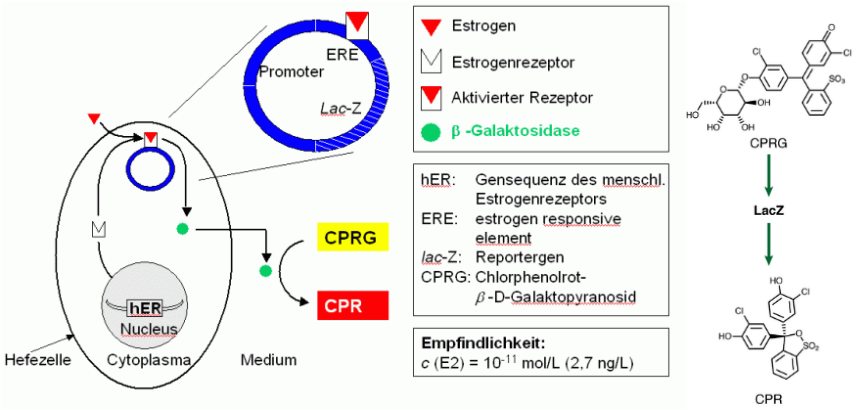


Abbildung 1: Mikrobiologische Vorgänge innerhalb der rekombinierten Hefe[7]

Abbildung 2: Umwandlung des Eduktes CPRG zum Produkt CPR[8]

Vorteile des YES sind, dass er eine sehr genaue Aussage über Konzentration und Wirkung liefert. Im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren ist er sehr Empfindlich und kann kleinste Mengen östrogen-

[6] https://www.google.de/search?q=wellenl%C3%A4ngen+licht&client=firefox-b&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiMkYmuz9fYAhXCWBQKHUzDBvQQ_AUICigB&biw=1252&bih=600#imgrc=-xuoVRx3XmoQUM:

[7] https://www.google.de/search?q=yes+screen&client=firefox-b&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiA-Z3o0tPYAhUCaRQKHYLOBQYQ_AUICigB&biw=1252&bih=600#imgrc=pcWzNHaAgyLiUM:

[8] https://www.google.de/search?q=cprg+cpr&client=firefox-b&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi09Yj9zdfYAhUKPBQKHQnHAnMQ_AUICigB&biw=1252&bih=600#imgrc=DrS_Ahd68d9WEM:

wirkender Stoffe nachweisen. Zudem kann er auch bisher unbekannte Stoffe die östrogenähnlich sind nachweisen.[9]

2. Ausgangssituation

2.1 Ausgangsprotokoll

Yeast Estrogen Screen (YES-assay) for the detection of ER-active compounds

Note: Protocol and the yeast is a gift of Prof. J.P. Sumpter, Brunel University, UK

PREPARATION AND STORAGE OF MINIMAL MEDIUM AND MEDIUM COMPONENTS
Minimal medium and medium components prepared in glassware contaminated with an estrogenic chemical will lead to elevated background expression. Glassware, spatulas, stirring bars, etc., must be scrupulously cleaned, and should not have had prior contact with steroids. Rinse glassware, spatulas, stirring bars twice with absolute ethanol, and leave to dry. Alternatively, wash twice with methanol, and once with ethanol.

Chemicals Minimal Medium pH 7.1

Add 13.61 g KH2PO4, 1.98 g (NH4)2S04, 4.2 g KOH pellets, 0.2 g MgSO4, 1 ml Fe2(S04)3 solution (40 mg/50 ml H20), 50 mg L-Ieucine, 50 mg L-histidine, 50 mg adenine, 20 mg L-arginine-HCI, 20 mg L-methionine, 30 mg L-tyrosine, 30 mg L-isoleucine, 30 mg L-lysine-HCI, 25 mg L-phenylalanine, 100 mg L-glutamic acid, 150 mg L-valine, and 375 mg Lserine to 1 L double-distilled water. Place on heated stirrer to dissolve. Dispense 45 ml aliquots into glass bottles. Sterilise at 121°C for 10 min, and store at room temperature.

D-(+)-Glucose

Prepare a 20% w/v solution. Sterilise in 20 ml aliquots at 121°C for 10 min. Store at room temperature. L-Aspartic Acid Make a stock solution of 4 mg/ml. Sterilise in 20 ml aliquots at 121°C for 10 min. Store at room temperature.

Vitamin Solution

Add 8 mg thiamine, 8 mg pyridoxine, 8 mg pantothenic acid, 40 mg inositol, and 20 ml biotin solution (2 mgl/100 ml H20) to 180 ml double-distilled water. Sterilise by filtering through a 0.2 um pore size disposable filter, in a laminar air flow cabinet. Filter into sterile glass bottles in 10 ml aliquots. Store at 4 °C. L-Threonine Prepare a solution of 24 mg/ml. Sterilise in 10 ml aliquots at 121°C for 10 min. Store at 4 °C.

Copper (II) Sulfate

Prepare a 20 mM solution. Sterilise by filtering through a 0.2 um pore size filter, in a laminar flow cabinet. Filter into sterile glass bottles in 5 ml aliquots. Store at room temperature.

Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG)

Make a 10 mg/ml stock solution. Sterilise by filtering through a 0.2 um pore size filter into sterile glass bottles, in a laminar flow cabinet. Stare at 4 °C.

II. PREPARATION AND STORAGE OF CHEMICALS

[9] ESTROGENIC ACTIVITY OF SURFACTANTS AND SOME OF THEIR DEGRADATION PRODUCTS ASSESSED USING A RECOMBINANT YEAST SCREEN
EDWIN J. ROUTLEDGE* and JOHN P. S UMPTER Department of Biology and Biochemistry, Brunel University, Uxbridge, Middlesex UB8 3PH, UK

Glassware must be scrupulously cleaned since contamination may give rise to false positives. Rinse all glass bottles twice with absolute ethanol (or twice with methanol, and once with ethanol), and leave to dry. Weigh chemicals directly into bottles. Prepare the 17β-estradiol stock for the standard curve in absolute ethanol, at 2xl0-7 M (54.48 ug/L). Stock solutions of tested chemicals are usually prepared in absolute ethanol or DMSO. Environmental samples are usually prepared in DMSO.

III. ASSAY PROCEDURE

Note: Carry out all yeast work aseptically in a laminar flow cabinet.

Day 0

Preparation of yeast for assay: Prepare growth medium by adding 5 ml glucose solution, 1.25 ml L-aspartic acid solution, 0.5 ml vitamin solution, 0.4 ml L-threonine solution, and 125 uI copper (II) sulfate solution to 45 ml minimal medium. Transfer to a sterile conical flask (final volume of approximately 50 ml). Add 125 uI of 10X concentrated yeast stock from cryogenic vial. lncubate at 28°C for approximately 24 hours on an orbital shaker, or until turbid.

Day 1

Serially dilute chemicals in absolute ethanol or DMSO (100 uI volumes), in a 96-well microtitre plate. Transfer 10 uI aliquots of each concentration (for EtOH) or 4 ul for DMSO to a 96-well optically fiat bottom microtitre plate. Add 10 uI absolute ethanol or 4 ul DMSO to blank wells. When used EtOH leave chemicals in the assay plate to evaporate to dryness. Prepare assay medium by adding 0.5 ml CPRG to 50 ml fresh growth medium. Seed this medium with 4x10^7 yeast cells (usually between 0.5 ml and 2 ml) from the 24-h culture prepared on Day 0. For every 2.5 assay plates, prepare 50 ml assay medium. Add 200 uI of the seeded assay medium (growth medium containing CPRG and yeast) to well using a multichannel pipette.

Each plate should contain at least one row of blanks (solvent and assay medium only), and each assay should have a 17B-estradiol standard curve. Be aware that same chemicals (particularly alkylphenolic chemicals) creep across the assay plate to contaminate adjacent wells, and should therefore be placed on separate plates. Seal the plates with autoclave tape and shake vigorously for 2 min on a titre plate shaker. lncubate at 32°C in a naturally ventilated heating cabinet.

Day 2 Shake the plates vigorously for 2 min, to mix and disperse the growing cells. Return to 32°C incubator. Day 4 After incubating for 3 days, shake plates (2 min) and leave for approximately 1 hour to allow the yeast to settle. Read the plates at an absorbance of 540 nm (optimum absorbance for CPRG 575 nm) and 620 nm (for turbidity) using a plate reader.

Leave the plates at room temperature and read later if necessary.

IV. CALCULATIONS

To correct for turbidity, the following equation needs to be applied to the data: Corrected value = chem. abs. (540 nm) - [chem. abs. (620 nm)-blank abs. (620 nm)]

To determine the estrogenic potency of an environmental extract, the response of a suitable concentration can be interpolated in a dose-response curve of the reference compound 17βestradiol (E2). A suitable concentration is a concentration giving a response that fits into the linear part of the E2 dose-response curve. The estrogenic potency of the compound or environmental extract is expressed as EEQ (estradiol equivalents). The estrogenic potency of a compound is usually expressed relative to E2 using the EC50 values.

V. KEY REFERENCES Beresford, N., Routledge, E.J., Harris, c.A. and Sumpter, J.P. 2000. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 162, 22-33. Harris, c.A., Henttu, P., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. 1997. The estrogenic

activity of phthalate esters in vitro. Environ. Health. Perspect. 105,802-811. Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and same of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ. Toxicol. Chem. 13, 241-248. Routledge, EJ. and Sumpter, J.P. 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. 1. Biol. Chem. 272, 3280-3288. Sohoni, P. and Sumpter, J.P. 1998. Several environmental estrogens are also antiandrogens.1. Endocrinol. 158, 327-339.[10]

2.2 verwendete Geräte

Verwendet werden im Ausgangsprotokoll: eine Zentrifuge, ein Vortexer, ein Mikrotiterplatten-Photometer (96-well), ein Schüttel-Inkubator, Finnpipetten mit Spitzen, Pipetten, eine Feinwaage, eine Heizplatte, und eine Sicherheitswerkbank.

Spektral Photometer

Das spektral Photometer wurde dafür genutzt um die Anzahl der Zellen in den Proben zu bestimmen.

Dies gelingt durch die Lichabsorption der Moleküle. Bei einem Spektralphotometer wird weißes Licht durch ein Prisma so zerlegt, dass nur Licht mit einer bestimmten Wellenlänge durch eine Blende auf die Analysenlösung fallen kann.

Hierbei stehen OD 580 bzw. OD 600 für die jeweiligen Wellenlängen des verwendeten Lichts. Die restlichen Strahlen, welche nicht absorbiert wurden treffen auf eine Photozelle, welche die Lichtschwächung registriert.

Je mehr von dieser Wellenlänge absorbiert wurde, desto mehr Zellen bzw. Verfärbung gab es.[11]

2.2.1 Lyticase

Die Lyticase ist ein Enzym, welches aus dem Organismus ‚oerskovia xanthineolytia' isoliert wurde. Seine Funktion ist es die Zellwand abzubauen und zu zersetzten. Dieser Prozess ist abhängig von der Konzentration des Enzyms. Ein weiterer Faktor der den Zersetzungsprozess beeinflusst ist der pH-Wert der Lösung. Lyticase wird zumeist bei Hefezellen eingesetzt, da diese eine besonders dichte Zellwand besitzen.[12]

3. Vereinfachung des Verfahrens

Es zeigt sich, dass für den YES viele verschiedene Geräte und Chemikalien verwendet werden. Die Schwierigkeit, die sich nun ergab war zu bewerten, welche Geräte und Chemikalien in jedem Falle unverändert bleiben müssen und welche durch günstigere ersetzt werden können.

---

[10] Amt für Gewässerkunde in Koblenz
[11] http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/photometer/51334
[12] https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-015-8529-1, http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504004850, http://jb.asm.org/content/142/2/414.short https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6991473

Wir kamen zum Schluss, dass ganz besonders zwei Aspekte einen hohen Kostenaufwand nach sich ziehen, aber nicht zwangsläufig für die mikrobiologischen Abläufe innerhalb der Hefezelle notwendig sind.

Zum einen verwendete das Amt für Gewässerkunde in Koblenz ein Mikrotiterplatten-Photometer (96-well), welches besonders für hohe Probenzahlen praktisch ist. Jedoch ist es bei gleicher Funktionsweise im Vergleich zu einem Küvetten-Photometer teurer.

Zum andere findet der Zellaufschluss mit Hilfe des Enzyms Lyticase statt, welches sehr hohe laufende Kosten verursacht. Das Verfahren des Zellaufschlusses hat, solange es zum Aufbrechen der Zellwand und –Membran führt und nicht zur Denaturierung der Proteine, keine Auswirkungen auf die Reaktionsabläufe während des Testes.

Als erstes musste das Protokoll an die Verwendung eines Küvetten-Photometers angepasst werden: Hierfür sind größere Probenansätze notwendig, also mussten alle Mengenangaben angepasst werden.

3.1 Erste Anpassungen- Erstes Prototyp-Protokoll

2.1 Herstellung einer Referenz Östradiol-Reihe

2.1.1 Östradiol- Aufbereitung

Zu Beginn muss das Östradiol für die Referenz-Reihe in 0,3% Ethanol-Lösung auf einen Anteil von 500 ng/l verdünnt werden.

Hierzu wir eine 5 mg/ml Östradiol-Lösung zuerst im Verhältnis 1:100 in 100% Ethanol gelöst. Dieser Vorgang wird ein weiteres Mal mit der hergestellten Lösung wiederholt. Danach folgt eine 1:3 Verdünnung. Schließlich wird die letzte Lösung im Verhältnis 1:333 in Wasser gelöst.

2.1.2 Östradiol Verdünnung

In diesem Schritt wird die aufbereitete Östradiol-Lösung in der Wasserprobe so gelöst, dass wir Proben mit der ungefähren Konzentration von 500 ng/l, 250 ng/l, 125 ng/l, 62 ng/l, 31 ng/l, 16 ng/l, 8 ng/l und 4 ng/l erhalten.

2.2.2 Hefe- Aufbereitung

Im Folgendem muss die Menge der Hefekultur für den Versuch bestimmt werden.

Um dies zu erreichen maßen wir mit Hilfe einer OD 600 die Dichte unserer Ausgangskultur, wobei wir die Nährlösung der Hefe zum Nullen verwendeten. Oft ist hier zuerst eine 1:10 Verdünnung notwendig, um eine OD 600 durchführen zu können. Daraufhin zentrifugierten wir die benötigte Hefelösung und resuspendierten die Hefezellen in der Nährlösung McDo. Es wird angestrebt eine optische Dichte von 50-60 FAU zu erreichen. Schließlich müssen noch Kupfer, Antibiotikum und Glucose zu der Hefelösung hinzugegeben werden. Nach Zugabe aller genannten Stoffe sollte die Trübung der Lösung 25 FAU betragen. Die Nährlösung mit den Hefen wird schließlich in die Östradiol-Reihe bzw. die zu untersuchende Probe gegeben. Diese Ansätze werden nun weitere 18 Stunden bei 30 °C inkubiert.

2.2.3 Ergebnisermittlung

Nach der Inkubation der Hefeansätze muss erneut eine OD 600 durchgeführt werden, um das gleichmäßige Wachstum der Hefen zu überprüfen.

Schließlich werden die benötigten Mengen an Hefelösung und Substrat berechnet zusammengegeben. Daraufhin erfolgt der Zellaufschluss, um den Enzymen den Zugang zum Substrat zu ermöglichen. Jenes erfolgt durch das Verdauungsenzym Lyticase. Für einen effizienten Zellaufschluss wird der Ansatz ein weiteres Mal für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. War der Zellaufschluss erfolgreich erscheint die Lösung klar und es kann nun mit einer OD 580 der Grad der Verfärbung und somit schließlich die Konzentration der östrogen-wirkenden Stoffe ermittelt werden

3.2 Alternative Aufschlussverfahren

Da bei dem Verfahren des Yeast Estrogen Screen´s sichergestellt werden muss, dass das Enzym β-Galactosidase funktionstüchtig bleibt oder mögliche chemischen Stoffe mit dem Farbstoff CPRG ausbleiben, schlossen wir zunächst chemische Aufschlussverfahren aus. Zudem wollten wir höhere Kosten durch enzymatische Abbaumechanismen vermeiden. Somit blieb uns der Mechanismus des mechanischen Zellaufbruchs: Auch hier sollten Anschaffungen von Geräten wie zB. Ultraschall- oder Hochdruck-Homogenisatoren verhindert werden. Somit blieben uns drei vielversprechende Verfahren. Zum einen könnten die Hefezellen, die neben einer Phospholipid-Doppelschicht noch eine Zellwand aus β-1,3-Glucan besitzen, durch osmotischen Druck zum Platzen gebracht werden, wobei jenes auf Grund der stabilen Zellwand vielleicht nicht so effektiv ist. Zum anderen können Scherkräfte durch Gefrieren oder eine Glasperlenmühle genutzt werden.

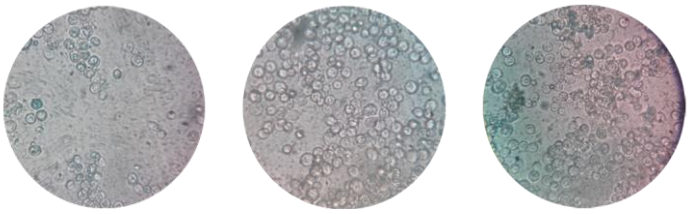
Da sich die rekombinierte Hefe in ihrem Zellaufbau nicht von Brauhefe-Stämmen unterscheidet nutzen wir letztere für unsere folgenden Versuche. Als Nachweisreaktion für einen erfolgreichen Zellaufschluss verwendeten wir eine Bromthymolblau-Färbung der Zellen. Der Farbstoff kann nicht durch intakte Zellwand und –Membran in die Zelle eindringen, deswegen erscheinen alle unbeschädigten Zellen farblos, wohingegen alle toten, zerstörten Zellen den Farbstoff aufnehmen und sich anfärben lassen.[13]

Experiment 1 und Negativkontrolle der Probe 0:

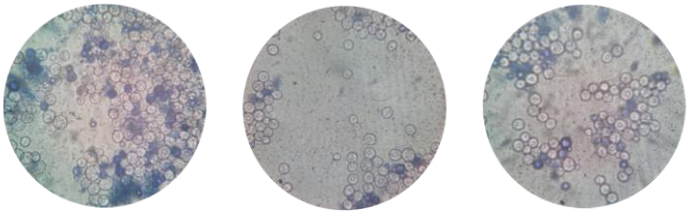
Der erste Testdurchlauf, indem wir den Aufschluss der Zellen durch Zerreiben mit Sand im Mörser mit der Glasperlenmühle vergleichen wollten, erwies sich als fehlerhaft. Beim Vergleich von den Aufschlussverfahren (drei Minuten mit Sand und Mörser zerreichen, vortexen eines Eppendorf –Tubes mit 30%, 50% oder 35% des gesamten Gewichtes der Hefekultur in Form von Glasperlen) zeigte sich keine erhebliche Veränderung der Todesrate im Vergleich mit der der Negativkontrolle. Der prozentuale Anteil der toten Zellen betrug zwischen 0,03 und 0,1 %. Als wahrscheinlichste Fehlerquelle vermuteten wir eine zu frühe Färbung der Zellen mit Bromthymolblau. Weitere Ursachen könnten das Mikroskop oder das Vorgehen während des mechanischen Aufschlussverfahrens sein.

Somit testeten wir unsere erste Hypothese, indem wir eine weitere Negativkontrolle unmittelbar vor dem Mikroskopieren auf dem Objektträger mit Bromthymolblau färbten und lediglich vor dem Betrachten kurz mit Wasser spülten. Dieses Experiment lieferte schließlich eine Ausgangs-Todesrate der Hefezellen von 5%, was als sehr viel wahrscheinlicher erschien.

[13] VOENMILEI -Diagnostischer Leitfaden zur mikroskopischen Gärkontrolle, Josef Valentin HERRMANN und Erna SCHINDLER, LWG, Fachzentrum Analytik



Experiment 1 (3 Mikroskop-Aufnahmen):
Probe 0+ Zusatz:
33,3- 50 % des ges. Gewichtes Glaskugeln 0,5 mm Durchmesser
1-7 Minuten vortexen

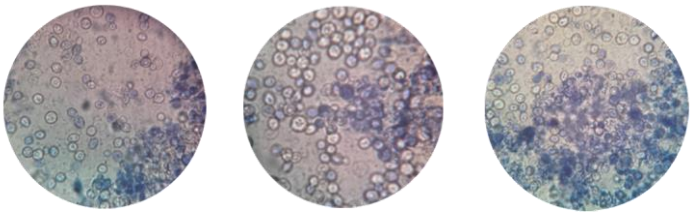


Negativkontrolle (3 Mikroskop-Aufnahmen):
Probe 0:
Brauhefelösung bei 5-10°C gelagert

Experiment 2:

Im nächsten Schritt stellten wir die Todesrate der Negativkontrolle mit der des zweiten Versuchaufbaus gegenüber. Wir führten eine Glaskugelmühle durch. Dafür befüllten wir 1/3 des Gewichtes der Hefekultur mit Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,5 mm und vortexten den Ansatz für 5 Minuten. Um eine bessere Beschleunigung der Glasperlen zu begünstigen wählten wir Gefäße mit strak abgerundetem Boden. Zudem empfiehlt es sich das Reagenzgefäß ab und zu horizontal zu vortexen. Mit diesem Verfahren erzielten wir eine Todesrate von 45%.

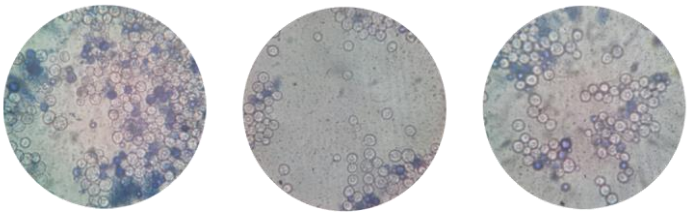
Abbildung 2: Verwendeter Vortexer beim Glasmühlenverfahren ("Vortex-Genie 1 Touch-Mixer" von "Scientific Industries")



Experiment 2 (3 Mikroskop-Aufnahmen):
Probe 0+ Zusatz:
33,3 % des ges. Gewichtes Glaskugeln 0,5 mm Durchmesser
5 Minuten vortexen

Negativ Kontrolle der Probe 1/2:

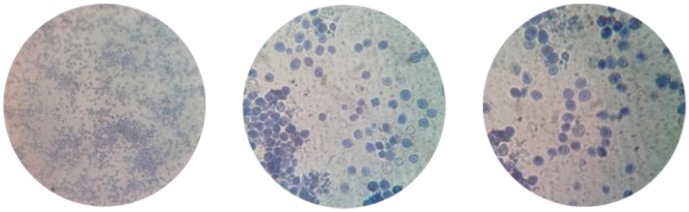
In der folgenden Experimentreihe setzten wir die Hefezellen noch weiterem Stress aus dadurch, dass wir eine 1:2 Verdünnung der Hefe mit destilliertem Wasser durchführten. Da die Konzentration von gelösten Stoffe innerhalb der Hefezellen höher ist als die der umgebenden Flüssigkeit aus Hefemedium und destilliertem Wasser, wird der osmotische Druck zu einer überproportionalen Diffusion von Wassermolekülen in die Zelle führen. Das zunehmende Volumen innerhalb der Hefezellen führt zum Zerbersten der Zellmembran und –Wand oder es wird zumindest eine deutlich starrere Zellwand hervorrufen. Die Todesrate der Negativkontrolle der Probe 1 beträgt 14%, was verglichen mit 5% Todesrate der Probe 0 zeigt, dass osmotischer Druck bereits einem kleinem Anstieg des Anteils der Zellen mit beschädigten Zellwand nach sich zieht.



Negativkontrolle (3 Mikroskop-Aufnahmen):
Probe 1:
50% Brauhefelösung, 50% destilliertes Wasser,

Zudem ließen wir die Hefelösung mit destilliertem Wasser gefrieren. Da Wasser im gefrorenen Zustand eine geringer Dichte aufweist (und somit auch mehr Volumen einnimmt), sollte hierbei die Zellmembran und –Wand ebenfalls zerplatzen.

Das Ergebnis zeigt eine hohe Todesrate von 66,8% (vgl. Todesrate der Negativkontrolle Probe 0 =5% oder der Negativkontrolle der Probe 1 = 14%).

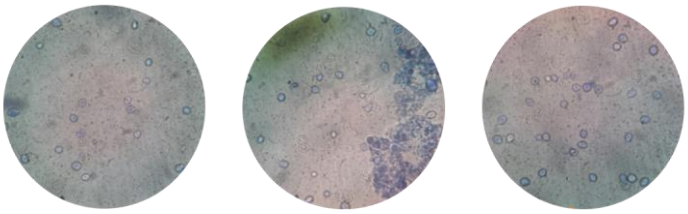


Negativkontrolle (3 Mikroskop-Aufnahmen):
Probe 2:
50% Brauhefelösung, 50% destilliertes Wasser,
nach Gefrieren

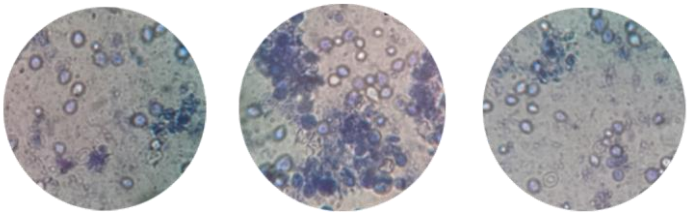
Experiment 3 und 4:

Beim Experiment 3 und 4 verfuhren wir wie bei Experiment 2 nur benutzen wir Probe 2. Des Weiteren fügten wir bei Versuch 3 die Hälfte des Gewichtes der zweiten Probe in Form von Glaskugel hinzu. Bei Versuch 4 wurde 1/3 des Gewichtes der zweiten Probe in Glaskugel beigefügt.

Die Auswertung zeigt eine gesteigerte Todesrate im Vergleich zur Negativkontrolle (66,8%): Das Verfahren beim dritten Experiment resultierte in einer Todesrate von 68,1%, wohingegen Versuch 4 bei 72% der Zellen die Zellwand zerstörte.



Experiment 3 (3 Mikroskop-Aufnahmen):
Probe 2 + Zusatz:
50% des ges. Gewichtes Glaskugeln 0,5 mm Durchmesser
5 Minuten vortexen

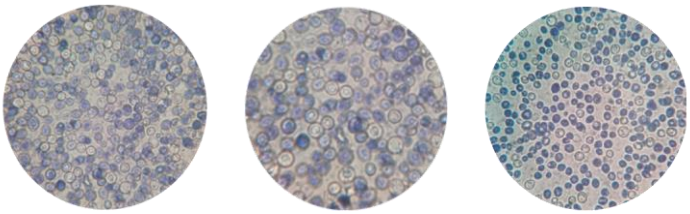


Experiment 4 (3 Mikroskop-Aufnahmen):
Probe 2 + Zusatz:
33,3 % des ges. Gewichtes Glaskugeln 0,5 mm Durchmesser
5 Minuten vortexen

Experiment 5:

Abschließend überprüften wir, ob wir durch niedrigere Temperaturen während des Experimentes den Anteil der zerstörten Zellwände erhöhen können: Da eine geringere thermische Energie zu verminderter molekular Bewegung führt, sollten hierdurch die Zellwand unflexibler werden. Jenes sollte das Zerplatzen, während dem Wirken der Scherkräfte, begünstigen.

Hierfür beurteilten wir die Todesrate der Probe 1, der 1/3 des Gewichtes in Form von Glaskugel beigefügt wurde und welche 5 Minuten bei einer Temperatur von 1-4°C gevortext wurde, an dem Ergebnis der Negativkontrolle der Probe 1 (14%). Durch das Verfahren des fünften Experimentes erzielten wir die höchste Todesrate mit einem Wert von 78,3%.



Experiment 5 (3 Mikroskop-Aufnahmen):
Probe 1+ Zusatz:
33,3 % des ges. Gewichtes Glaskugeln 0,5 mm Durchmesser
5 Minuten bei 1-4°C vortexen

Schlussfolgerung:

Sowohl die Zugabe von destilliertes Wasser als auch Gefrieren und das Verfahren der Glasperlenmühle führen zu einem sehr hohen Anteil von Hefezellen mit zerstörter Zellwand.

Wir entscheiden uns somit für den Entwurf unseres YES-Protokolls folgenden Zellaufschluss zu verwenden: Die Proben wird im Verhältnis 1:2 mit destilliertem Wasser gemischt. Darauffolgend lagern wir die Probe bis zum Gefrieren der Lösung bei unter 0°C. Schließlich füllen wir die Probe in abgerundete Eppendorf Tubes. Zudem fügen wir 1/3 des Gewichtes der Probe in Glasperlen (mit einem Durchmesser von 0,5 mm) hinzu. Wir halten die Temperatur der Proben, wenn nötig durch Kühlen, unter 5 °C und vortexen die Probe für 5 Minuten. Hierbei schüttelten wir ab und zu die Proben und vortexten sie horizontal.

4. Vereinfachtes Protokoll

1. Tag

Herstellung des Wachstumsmediums und Inkubation der Hefezellen, sowie die Produktion der Östradiol-Reihe und den Wasserproben (3,6ml) mit zusätzlichen Negativkontrollen.

Die Inkubation sollte in einem Schüttelinkubator bei 28°C stattfinden.

2. Tag

Hefezellen abnehmen und mit einer Verdünnung eine OD 600 durchführen, bis der Wert bei ca. 60-70 FAU liegt (diesen haben wir mit einer Verdünnung von 1:50 erreicht). Das Wachstumsmedium wird zum Nullen genutzt. Ungefähr 64 ml verdünntes Wachstumsmedium mit Hefezellen herstellen und mit 1,6 ml zu den Proben geben. Diese bei 30°C 18 Stunden in einem Brutschrank inkubieren lassen.

3. Tag

Eine OD 600 mit den jeweiligen Proben durchführen, verdünnen sodass es im linearen Bereich ist und mithilfe von Rückrechnung den Zellenanteil in den Proben bestimmen.

In einem neuen Epi mit einem Anteil von 1,25ml LacZ-Puffer mit CPRG zu 0,75 ml Probe zusammenmischen. In unserem Fall 0,875ml LacZ-Puffer mit CPRG zu 0,525ml Probe.

Die Röhrchen mit ca. 1/3 Glaskugeln füllen, sodass 2/3 Flüssigkeit vorhanden ist und die Proben in den Gefrierschrank stellen (bei -20°C 30 min).

Danach Auftauen lassen und 5 min bei 4°C vortexen.

Dann 1,5 ml Überstand abnehmen und bei 30°C 30 Minuten inkubieren.

Wegen der Trübung sollten die Proben nochmal zentrifugiert werden und der Überstand bei einer OD 580 gemessen werden.

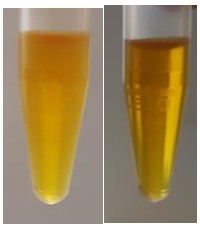


Abbildung 3: Vergleich der Trübung vor und nach dem Zentrifugieren

5. Ermittelte Ergebnisse

5.1 Ergebnisse des ersten vereinfachten Protokolls

Untersuchte Probe	OD 600 Messwert*	OD 580 Messwerte*
Negativ Kontrolle: Nährmedium (ohne Hefe) + Wasser	0,0410	0,0111
Negativ Kontrolle: Nährmedium (ohne Hefe) + 0,3 % Ethanollösung	0,0530	0,0105
Hefe + Nährmedium + Wasser	0,732	-
Hefe + Nährmedium + 0,3 % Ethanollösung	0,647	-
500 ng/l Östradiol	0,539	2,3
250 ng/l Östradiol	0,645	2,31
125 ng/l Östradiol	0,688	2,2690
62 ng/l Östradiol	0,707	1,9290
31 ng/l Östradiol	0,685	0,9760
16 ng/l Östradiol	0,765	0,2850
8 ng/l Östradiol	0,763	0,1290
4 ng/l Östradiol	0,846	0,1030
Probe: 913 (Fließgewässersediment)	0,895	0,2050
Probe: 913 + 125 ng/l Östradiol	0,722	
Probe: 911 (Fließgewässersediment)	0,889	0,0750
Probe: 911 + 62 ng/l Östradiol	0,581	2,0820
Probe: Volvic	0,944	0,0940

Probe: Volvic + 62 ng/l Östradiol	0,689	2,1250

*Abbildung 4: OD 600 sowie OD 580 Werte der Östradiol-Reihe und verschiedenen Proben *genullt mit destilliertes Wasser*

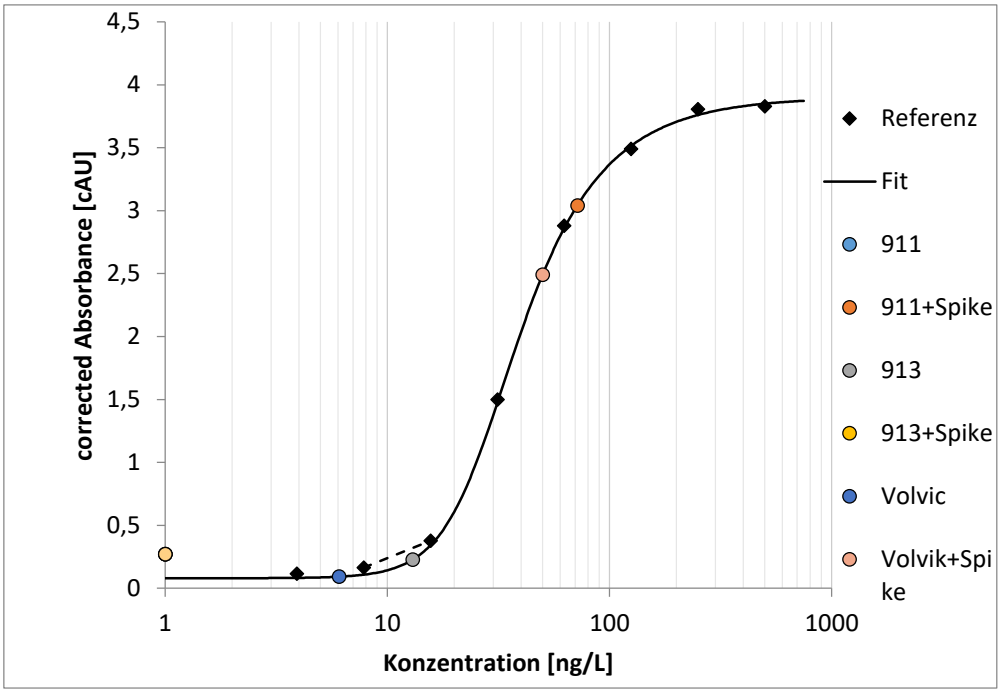


Abbildung 5: Referenzkurve Östradiol-Reihe mit Lyticase-Aufschluss (Erstellt mit Exel)

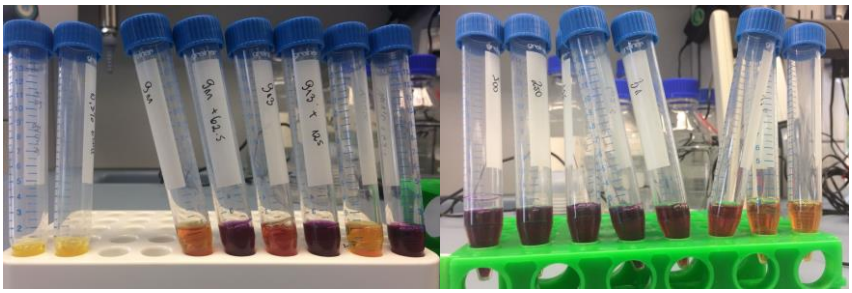


Abbildung 6: Ergebnisse des ersten Protokolls (Lyticase): Proben links, Östradiol-Reihe rechts

5.2 Ergebnisse des zweiten vereinfachten Protokolls

Abbildung 7: Vortex-Vorgang

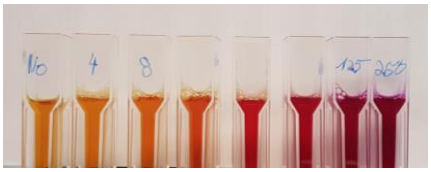
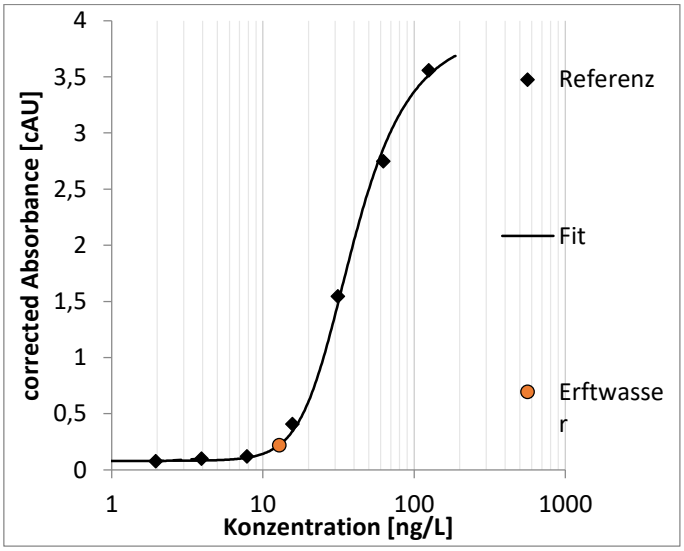


Abbildung 8: Ergebnisse ersten Protokolls(Lyticase) , Östradiol-Reihe

Untersuchte Probe	OD 580 Messwert* Lyticase Aufschluss	OD 580 Messwerte* Destilliertes Wasser+ Ein
Negativ Kontrolle: Nährmedium mit Hefe + destilliert	0,6444	1,4404
250 ng/l Östradiol	3,2799(außerhalb des linearen Bereichs)	3,2516
125 ng/l Östradiol	3,2358 (außerhalb des linearen Bereichs)	3,2965
62 ng/l Östradiol	3,2964	3,1878
31 ng/l Östradiol	2,7821	2,1037
16 ng/l Östradiol	1,2178	0,8551
8 ng/l Östradiol	0,8329	0,6414
4 ng/l Östradiol	0,6905	0,7535
Probe: Erftwasser	0,6590	0,5280
Probe: Leitungswasser	0,2737	0,0233

Abbildung 9:OD 580 Werte der Östradiol-Reihe und verschiedenen Proben *genullt mit destilliertes Wasser



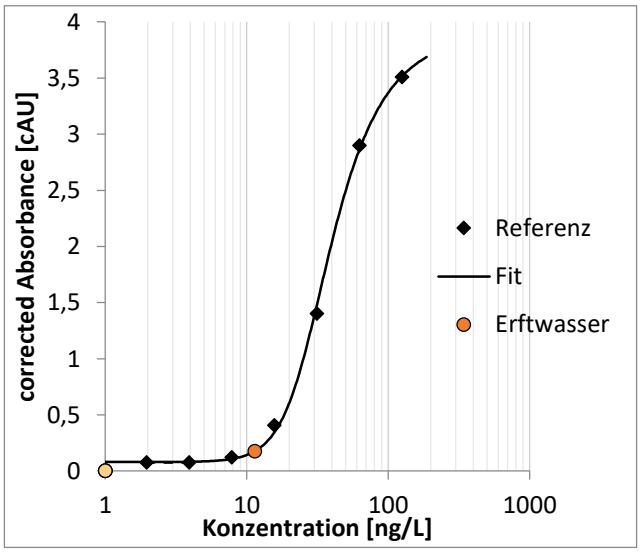


Abbildung 10: Referenzkurve Östradiol-Reihe mit Lytikase-Aufschluss (Erstellt mit Exel)

Abbildung 11: Referenzkurve Östradiol-Reihe mit Glasperlenmühle-Aufschluss (Erstellt mit Exel)

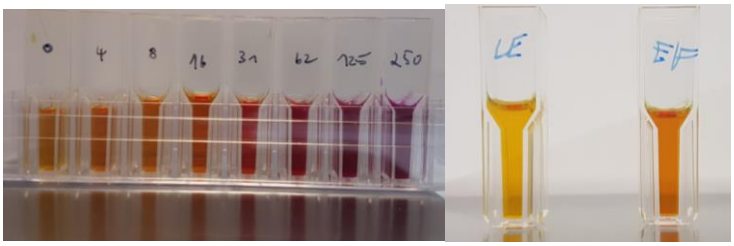


Abbildung 12: Ergebnisse der endgültigem Protokolls (Glaskugelmühle), Östradiol-Reihe links, Proben rechts

6. Schlussfolgerung

Letztendlich lässt sich zusammenfassen, dass sowohl unserer erstes leicht vereinfachtes YES-Protokoll, als auch unser zweites stark vereinfachtes Protokoll mit deutlich reduziertem Kostenaufwand vergleichbare Ergebnisse lieferte. Mit Hilfe des selbstentwickelten Aufschluss-Verfahrens konnten wir einen erfolgreichen YES-Test durchführen und kamen zu ebenso aussagekräftigen Werten im Vergleich zum Lyticase-Aufschluss.

Zudem konnten wir sowohl in dem Mineralwasser der Marke Volvic (8 ng/l), als auch in Leitungswasser und in dem lokalen Gewässer „Erft“ (13 ng/l) östrogen-wirkende Stoffe nachweisen. Jenes kann als durchaus bedenklich bewertet werden, betrachtet man den Sachverhalt, dass viele Wissenschaftler für ein Mengen unabhängiges Verbot östrogen-wirkender Stoffe plädieren.

7. Danksagung

Wir wollen uns ganz herzlich bei dem Amt für Gewässerkunde in Koblenz, insbesondere bei Frau Pfänder bedanken. Frau Pfänder leitete uns in den Ablauf der Yeast Estrogen Screens ein und zeigte uns worauf besonderen Wert gelegt werden sollte. Zudem stellte uns das Amt für Gewässerkunde in Koblenz ihr S1 Labor für unsere erste Versuchsreihe, sowie alle Reagenzien zur Verfügung.

Auch möchten wir unserem Betreuungslehrer Herr Nebe für seine tatkräftige Unterstützung und sein offenes Ohr danken.