

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Detektion von endokrinen Disruptoren mittels Fluoreszenzkorrelations- spektroskopie

Dr. Kirsten, Hanna Jankevics, Horst Vogel

École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), Schweiz

LCPPM, DC, EPF Lausanne

CH-1015 Lausanne

kirsten.leufgen@epfl.ch

Registriernummer der Online-Anmeldung: 152

Vortrag

In den letzten Jahren hat das Auftreten sogenannter endokriner Disruptoren zunehmend Besorgnis erregt. Es handelt sich hierbei um Substanzen, die das endokrine System stören und somit eine erhebliche Gefahr für Mensch und Tier darstellen. Diese Substanzen sind im menschlichen Alltag allgegenwärtig und finden sich beispielsweise in Kosmetika, Reinigungsmitteln und Kunststoffen, aber auch in Pestiziden und industriellen Chemikalien. Ihnen ist nur die biologische Aktivität, das heißt ihre hormonelle Wirkung gemein, nicht aber ihre chemische Identität.

Häufig ist der Östrogenrezeptor Zielscheibe endokriner Disruption. Dieser Rezeptor gehört zur großen Familie der Steroidrezeptoren und wird normalerweise durch das Hormon Östrogen (17 β -Estradiol) kontrolliert. Er ist involviert in die Morphogenese reproduktiver Organe und den Erhalt der Fortpflanzungsfähigkeit. Als nuklearer Rezeptor aktiviert er Transkriptionsfaktoren und steuert damit direkt die Genexpression und Synthese der beteiligten Proteine. Eine Störung dieser Aktivität durch endokrine Disruption kann sich in Form verschiedenster physischer Merkmale wie etwa mangelnder Geschlechtsdifferenzierung, dem Verlust der Fortpflanzungsfähigkeit sowie Karzinomen der Fortpflanzungsorgane äußern. Die Störung hat damit nicht nur Konsequenzen für einzelne Individuen, sondern kann auch ganze Populationen betreffen, etwa durch die Herabsetzung der Fortpflanzungsrate.

Schnelle und empfindliche biologische Testverfahren zur Erfassung endokriner Disruptoren sind daher unbedingt erforderlich. Um sinnvolle gesetzliche Richtlinien erstellen zu können, müssen Substanzen eindeutig als endokrine Disruptoren klassifiziert werden und ihre minimal gefährdende Konzentration bestimmt werden. Besonderer Wert muß dabei auf die tatsächliche Relevanz der Tests für östrogene

Aktivität gelegt werden. So ist allein die Bindung eines östrogenen Liganden, Östrogens selbst oder eines endokrinen Disruptors, an den Rezeptor nicht hinreichend für das Vorliegen östrogenen Aktivität. Vielmehr muß hierzu eine ganze Reaktionskaskade bis hin zur pleiotropen Antwort ablaufen. Diese Kaskade kann, muß aber nicht durch die Bindung eines Liganden ausgelöst werden.

Unsere Assays zielen daher nicht allein auf Ligandenbindung, sondern vielmehr auf mehrere aufeinanderfolgende Schritte: Rezeptor/Ligand-Bindung, Rezeptor-Dimerisierung und Rezeptor/DNA-Bindung. Weiterhin beziehen wir in unsere Tests auch den Steroidrezeptor-Koaktivator SRC1 mit ein. Dieser ist für die volle Transkriptionsaktivität des Östrogenrezeptors zwingend erforderlich. Alle Assays basieren dabei auf Fluoreszenzverfahren. Um einen möglichst optimalen Test hinsichtlich Arbeits- und Zeitaufwand, Sensitivität und Preis entwickeln zu können, erproben wir verschiedene Fluoreszenztechniken, variieren dabei den jeweils fluoreszenzmarkierten Bindungspartner und untersuchen den Einfluß des Reinheitsgrades der beteiligten Proteine.

Im Rahmen dieses Vortrags beschränken wir uns auf die Präsentation von Tests, die auf dem Einsatz der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) basieren. Diese Methode erlaubt die Untersuchung von Bindungsereignissen in biologischen Assays auf dem Niveau einzelner Moleküle. Bindungskonstanten, Assoziations- und Dissoziationsraten sowie Bindungskinetiken können in Echtzeit erfaßt werden. Gemessen werden temporäre Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität eines winzigen, konvokalen Volumenelements als Funktion der Zeit. Mittels Autokorrelation der zeitabhängigen Fluoreszenzsignale können dann die Zahl der Moleküle im betrachteten Volumenelement sowie ihre charakteristischen Translations- und Rotationsdiffusionszeiten berechnet werden. Aus diesen Diffusionszeiten können Größe und Form der Partikel bestimmt werden. Diese lassen Rückschlüsse etwa auf das Vorliegen von Bindungsereignissen zu. Die großen Vorteile der Methode liegen in der kurzen Meßzeit (ms bis Minuten) sowie der extrem kleinen Menge an Material, die benötigt wird (Konzentrationen von pM- μ M, Volumina von 5-50 μ l).

Literatur

[1] Hovius et al.: „Fluorescence techniques: Shedding light on ligand-receptor interactions“ TIPS 21, 266-273 (2000).

[2] Wohland et al.: „Study of ligand-receptor interactions by fluorescence correlation spectroscopy with different fluorophores ...“ Biochemistry 38, 8671-8681 (1999).