Entwicklung einer Methode zum Nachweis und zur Identifikation endokrin wirksamer Substanzen mit estrogenem Potential aus Abwässern nach Anreicherung mit Hilfe des immobilisierten Estrogenrezeptors α

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt vom
Staatl. geprüften Lebensmittelchemiker
Uwe Bieling
aus Halle/Saale

2011

Berichter: Prof. Dr. H. Fr. Schröder
Univ.-Prof. Dr. A. Schäffer

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2011

Veröffentlicht im Shaker Verlag, Aachen

D 82 (Diss. RWTH Aachen University, 2011)

Berichte aus der Umweltwissenschaft

Uwe Bieling

Entwicklung einer Methode zum Nachweis und zur Identifikation endokrin wirksamer Substanzen mit estrogenem Potential aus Abwässern nach Anreicherung mit Hilfe des immobilisierten Estrogenrezeptors α

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: D 82 (Diss. RWTH Aachen University, 2011)

Copyright Shaker Verlag 2011
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0385-7
ISSN 0946-7173

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Misura ciò che è misurabile —
e rendi misurabile ciò che non lo è.

Messen, was messbar ist —
messbar machen, was nicht messbar ist.

Galileo Gallilei,
ital. Universalgelehrter
(* 15. Februar 1564,
† 8. Januar 1642)

Ein Teil der hier veröffentlichten Ergebnisse wurden bereits der wissenschaftlichen Öffentlichkeit vorgestellt.

- U. Bieling, W. Gebhardt, M. Zimmermann und H. Fr. Schröder (**2007**) Determination of estrogenic compounds using the human estrogen receptor α for concentration and liquid chromatography for identification. *Poster anlässlich der »Ecohazard 2007«*, Frankfurt/Main
- U. Bieling, R. F. Sena, J. L. Tambosi, W. Gebhardt, R. F.P.M. Moreira, H. J. José, M. Favier und H. Fr. Schröder (**2007**) LC-MS- and -MS^n -determination of anthropogenic and biogenic endocrine disruptor compounds (EDC) with an estrogenic potential in Brazilian wastewater and surface waters. *Vortrag anlässlich der »International Conference on Sustainable Sanitation: Food and Water Security for Latin America«*, Fortaleza, Brasilien
- U. Bieling, M. Zimmermann und H. Fr. Schröder (**2008**) Ausnutzung biospezifischer Wechselwirkungen zur Bioanalytik — Auf der Suche nach hormonähnlichen Umweltchemikalien. *RWTH Aachen Themenheft Bionik*, Aachen
- U. Bieling, W. Gebhardt, M. Zimmermann und H. Fr. Schröder (**2008**) Determination of estrogenic and anti-estrogenic compounds in wastewater after concentration by the human estrogen receptor α and using liquid chromatography – mass spectrometry for identification and characterisation. *27th International Symposium on Chromatography*, Münster
- S. G. Schrank, U. Bieling, H. J. José, R. F. P. M. Moreira und H. Fr. Schröder (**2008**) Generation of Endocrine Disruptor Compounds during Ozone Treatment of Tannery Wastewater Confirmed by Biological Effect Analysis and Substance Specific Analysis. *Water Science & Technology*, 51(1): 31–38. doi: 10.2166/wst.2009.762

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ix

Abbildungsverzeichnis xi

Tabellenverzeichnis xiii

Sequenzverzeichnis xv

1. Einleitung und Problemstellung 1
1.1. Anabolismus und Katabolismus von Estrogenen im Menschen 1
1.2. Der humane Estrogenrezeptor α 5
1.3. Endokrin wirksame Verbindungen 7
1.3.1. Ausgewählte Endokrin wirksame Verbindungen 17
1.4. Überblick über instrumentelle Bestimmungsmethoden von endokrin wirksamen Chemikalien 19
1.4.1. Flüssigkeitschromatographische Bestimmungsmethoden 20
1.4.2. Gaschromatographische Bestimmungsmethoden 25
1.4.3. Sonstige Bestimmungsmethoden 26
1.5. Überblick über biologische Wirktests 27
1.5.1. Yeast Estrogen Screen 27
1.5.2. MVLN-Test 27
1.5.3. E-Screen 28
1.5.4. Enzyme-linked Rezeptor Assay 28
1.6. Ziel der Arbeit 29

2. Material und Methoden 31
2.1. Mikrobiologisch-molekulargenetische Materialien 31
2.1.1. Chemikalien/Verbrauchsmaterialen 31
2.1.2. Geräte 33
2.1.3. Lösungen und Reagenzien 34
2.1.4. Nährmedien 34
2.1.5. Puffer 35
2.1.6. Hefen- und Bakterienstämme 36
2.1.7. Bakterien-Vektoren 36
2.1.8. Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion 37
2.1.9. Oligonukleotide für Sequenzierungen 37
2.1.10. Kits 38
2.1.11. Größenmarker 38
2.2. Mikrobiologisch-molekulargenetische Methoden 38
2.2.1. Kultivierungsbedingungen 38

2.2.2. Anlegen von Stammkulturen 38
2.2.3. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen 39
2.2.4. Herstellung verschiedener Expressionsvektoren 39
2.2.5. Expression des humanen Estrogenrezeptors α in *E. coli* 44
2.3. Chemisch-analytische Materialien 49
2.3.1. Chemikalien/Verbrauchsmaterialen 49
2.3.2. Geräte 49
2.4. Chemisch-analytische Methoden 50
2.4.1. Festphasenextraktion von endokrin wirksamen Chemikalien . . 50
2.4.2. Rezeptoraffinitätsextraktion von endokrin wirksamen Chemikalien 50
2.4.3. Flüssigkeitschromatographische Trennung mit anschließender massenspekrometrischer Detektion 51
2.5. Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen 52
2.5.1. Detailierte Ausführungen zur Bestimmung der Nachweis und Bestimmungsgrenzen 53

3. Ergebnisse **57**
3.1. Molekulargenetische Versuche 57
3.1.1. Klonierung des Expressionsvektors pTRC99a-LBD-hERα-His_6 . 57
3.1.2. Klonierung des Expressionsvektors pTRC99a-StrepTag II-LBD-hERα-His_6 58
3.1.3. Sequenzvergleich der konstruierten Expressionsvektoren in Bezug zur Vorlage pYEPE10 59
3.1.4. Expression der C-Terminal Polyhistidin markierten Ligandenbindedomäne des humanen Estrogenrezeptors α 63
3.1.5. Expression der StrepTag II und Polyhistidin markierten Ligandenbindedomäne des humanen Estrogenrezeptors α 63
3.1.6. Optimierung der Aufreinigung des StrepTag II und Polyhistidin markierten Ligandenbindedomäne des humanen Estrogenrezeptors α 66
3.1.7. Weitere in dieser Arbeit erstellte Expressionsvektoren 68
3.2. Chemisch-analytische Ergebnisse 68
3.2.1. Bestimmung spezifischer Massen und Optimierung der Detektionsmethode der estrogenen Zielverbindungen 68
3.2.2. Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der EDC . 70
3.2.3. Nachweis der Funktionsfähigkeit des Rezeptors durch selektive Extraktion estogener Substanzen aus Abwasser 73
3.2.4. Anwendung der selektiven EDC-Anreicherung auf reale Abwasserproben 77
3.2.5. Anwendung der selektiven Anreicherungsmethode auf Probenmaterial aus einer Krankenhauskläranlage 86
3.2.6. Erkennung und Versuch der Identifizierung unbekannter Estrogene unter selektiver LBD-hERα Extraktion in Kombination mit substanzspezifischer LC-MS-MS-Analyse 88

4. Diskussion **91**
4.1. Molekulargenetische Versuche 91
4.1.1. Klonierung des Expressionsvektors pTRC99a-LBD-hERα-His_6 . 91
4.1.2. Klonierung des Expressionsvektors pTRC99a-StrepTag II-LBD-hERα-His_6 91
4.1.3. Sequenzvergleich der konstruierten Expressionsvektoren in Bezug zur Vorlage pYEPE10 92
4.1.4. Expression des C-Terminal Polyhistidin markierten humanen Estrogenrezeptors α 93
4.1.5. Expression des StrepTag II und Polyhistidin markierten humanen Estrogenrezeptors α 93
4.1.6. Optimierung der Aufreinigung des StrepTag II und Polyhistidin markierten humanen Estrogenrezeptors 93
4.1.7. Weitere in dieser Arbeit erstellte Expressionsvektoren 95
4.2. Chemisch-analytische Versuche 95
4.2.1. Bestimmung spezifischer Massen und Optimierung der Detektionsmethode der estrogenen Zielverbindungen 95
4.2.2. Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der EDC . 95
4.2.3. Nachweis der Funktionsfähigkeit des Rezeptors durch selektive Extraktion estogener Substanzen aus Abwasser 97
4.2.4. Anwendung der selektiven EDC-Anreicherung auf reale Abwasserproben 98
4.2.5. Anwendung der selektiven Anreicherungsmethode auf Probenmaterial aus einer Krankenhauskläranlage 101
4.2.6. Erkennung und Versuch der Identifizierung unbekannter Estrogene unter selektiver LBD-hERα Extraktion in Kombination mit substanzspezifischer HPLC-MS-MS-Analyse 103

5. Zusammenfassung **105**

Anhang **107**

A. Sequenzen der eingesetzen Vektoren **107**
A.1. pCM184-Ubi4-hER-His_6 107
A.2. pET24a(+)hER-His_6 108
A.3. pREP2-AGS-hER-His_6 109
A.4. pTrc99a-hER-His_6 110
A.5. pTRC99a-LBD-hERα-His_6 111
A.6. pTRC99a-StrepTag II-LBD-hERα-His_6 111
A.7. pYEPE10-hERα 112

Literaturverzeichnis **113**

Lebenslauf **129**

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein bekannte Abkürzungen wie durch den »Style-Guide« von Elsevier Australia [2007] und Coghill und Garson [2006] beschrieben, wurden hier nicht aufgenommen.

APCI ..... chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl.: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)

API ..... Athmosphäredruckionisation (engl.: Atmosperic Pressure Ionisation)

APPI ..... Photoionisation bei Atmosphärendruck (engl.: Atmospheric Pressure Photo Ionisation)

BG ..... Bestimmungsgrenze (engl.: Limit of Quantification; LOQ)

bp ..... Basenpaare (engl.: Base pairs)

BPA ..... Bisphenol A

DAD ..... Diodenarray Detektor

DNA ..... Desoxyribonukleinsäure (engl.: Deoxyribonucleic Acid)

dsDNA ..... doppelsträngige DNA

E1 ..... Estron

E2 ..... 17β-Estradiol

E3 ..... Estriol

ECD ..... Elektroneneinfangdetektor (engl.: Electron capture detector)

EDC ..... endokrin wirksame Verbindung (engl.: Endocrine disrupting compounds)

EE2 ..... 17α-Ethinylestradiol

EEQ ..... 17β-Estradiol-Äquivalenz (engl.: 17β-Estradiol-Equivalent)

ELISA ..... Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ELRA ..... Enzymgekoppelter Rezeptortest (engl.: Enzyme Linked Receptor Assay)

ER ..... Estrogenrezeptor

ESI ..... Elektrosprayionisation (engl.: Electro Spray Ionisation)

FID ..... Flammenionisationsdetektor

GC ..... Gaschromatographie (engl.: Gas Chromatography)

hERα ..... humaner Estrogenrezeptor α

HPLC ..... hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)

HTam .....Hydroxytamoxifen
LBD .....Liganden- (bzw. Hormon-)Bindedomäne
LC .....Flüssigkeitschromatographie (engl.: Liquid Chromatography)
m/z .....Masse zu Ladung
MS.....Massenspektrometer, Massenspektrometrie
NG .....Nachweisgrenze (engl.: Limit of Detection; LOD)
PCR .....Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: Polymerase chain reaction)
p-NP .....*para*-Nonylphenol (Isomerenmischung)
p-OP.....*para*-Octylphenol
S/N .....Signal zu Rausch-Verhältnis (engl.: Signal to Noise Ratio)
SIM .....Messung ausgewählter Ionen (engl.: Selected Ion Monitoring)
SPE .....Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction)
SV .....Säulenvolumen
t_R .....Retentionszeit
Test .....Testosteron
TIC .....Gesamtionenstrom (engl.: Total Ion Current)
Vtg .....Vitellogenin
XIC .....extrahierte Massenspur (engl.: Extracted Ion Current)

Abbildungsverzeichnis

1.1. Ana- und Metabolismus von Estrogenen im Menschen 3
1.2. Allgemeines Strukturprinzip von Nuclear- bzw. Steroidrezeptoren . . . 5
1.3. Wirkmechanismus nukleärer Rezeptoren der Gruppe I 6
1.4. Aufbau eines Cys_2-Cys_2-Zinkfinger und Interaktion der DBD mit der DNA durch Stabilisierung der Konformation des Proteins durch die Zinkfinger 7
1.5. Sequenz des humaner Estrogenrezeptor α 8
1.6. Die Ligandenbindungsdomäne mit eingelagertem natürlichem Hormon 17β-Estradiol 9

2.1. Flachgelapparatur für Polyacrylamidgelelektrophoresen 46
2.2. Semi-Dry-Blotting 48
2.3. Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze 56

3.1. Struktur des humanen Estrogenrezeptor α-Expressions-Plasmids pYEPE10 57
3.2. Klonierung der LBD des humaner Estrogenrezeptor α in den pTRC99a-Vektor unter Addition eines C-Terminalen His_6-Tags 58
3.3. Klonierung der LBD des humaner Estrogenrezeptor α in den pTRC99a-Vektor unter Addition eines N-Terminalen Strep Tag II und eines C-Terminalen His_6-Tags 59
3.4. Vergleich der Ligandenbindungsdomäne des humaner Estrogenrezeptor α verschiedener Vektoren mit der cDNA bzw. der chromosomalen genetischen Sequenz 62
3.5. Expression der His_6 markierten Ligandenbindedomäne des humaner Estrogenrezeptor α 64
3.6. Expression der StrepTag II und His_6 markierten Ligandenbindedomäne des humaner Estrogenrezeptor α 65
3.7. Optimierung der Aufreinigung der StrepTag II und His_6 markierten Ligandenbindedomäne des humaner Estrogenrezeptor α 67
3.8. Kalibrationsgeraden und Vertrauensbänder des natürlichen Sexualhormones 17β-Estradiol und dessen Metaboliten 17β-Estradiol-Acetat, Estron und Estriol 71
3.9. Kalibrationsgeraden und Vertrauensbänder der synthetischen Antikontrazeptiva 17α-Ethinylestradiol und Medroxyprogesteron-Acetat 71
3.10. Kalibrationsgeraden und Vertrauensbänder der Xenoestrogene Bisphenol A und *para*-Nonylphenol 72
3.11. Substanzspezifische LC-MS Untersuchungen zur Absicherung der Wiederfindung von gespiktem 17β-Estradiol aus einer realen Abwasserprobe (Ablauf) im Vergleich zwischen RP-C_{18}- und der EDC-selektiv anreichernden LBD-hERα-Säule. 74

3.12. Wiederfindungsraten von 17β-Estradiol (Estrogen) und Hydroxytamoxifen (Antiestrogen) aus PBS-Puffer bzw. aus Abwasser (Ablauf Nachklärung) in den einzelnen Fraktionen - Durchlauf, Waschfraktion, Essigsäure-Elutionslösung und methanolisches Nacheluat. 76
3.13. Ergebnisse der Extraktion und Wiederfindung von 17β-Estradiol aus einer Zulaufprobe der ARA Aachen-Soers in Abhängigkeit von der Probenlagerung 78
3.14. Ergebnisse der Extraktion und Wiederfindung von Estron unter Verwendung einer Zulaufprobe der ARA Aachen-Soers in Abhängigkeit von der Probenlagerung 80
3.15. Ergebnisse der Extraktion und Wiederfindung von Estriol unter Verwendung einer Zulaufprobe der ARA Aachen-Soers in Abhängigkeit von der Probenlagerung 82
3.16. Ergebnisse der Extraktion und Wiederfindung von Bisphenol A unter Verwendung einer Zulaufprobe der ARA Aachen-Soers in Abhängigkeit von der Probenlagerung 83
3.17. Ergebnisse der Extraktion und Wiederfindung von *para*-Nonylphenol unter Verwendung einer Zulaufprobe der ARA Aachen-Soers in Abhängigkeit von der Probenlagerung 85
3.18. Steroidhormongehalte in unterschiedlich behandelten Krankenhausabwässern des KKH Waldbröl nach wirkungsspezifischer Anreicherung mittels LBD-hERα und anschließender substanzspezifischer LC-MS-Bestimmung. 86
3.19. Xenoestrogengehalte (Bisphenol A und *para*-Nonylphenol) in unterschiedlich behandelten Krankenhausabwässern des KKH Waldbröl nach wirkungsspezifischer Anreicherung mittels LBD-hERα und anschließender substanzspezifischer LC-MS-Bestimmung. 87
3.20. Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen des unterschiedlich behandelten Krankenhausabwassers des KKH Waldbröl, entnommen an den unterschiedlichen Probenahmestellen. 87
3.21. Screening auf ein unbekanntes Estrogen, beobachtet im Ablauf der KA Aachen-Soers nach EDC-selektiver Anreicherung mit Hilfe des LBD-hERα 89
3.22. Detektion (LC-MS) und Charakterisierung (LC-MS-MS) eines aufgrund der Anreicherung auf der LBD-hERα-Säule als potentielles, bisher unbekanntes Estrogen erkannten Stoffs 90

4.1. Versuch der Identifizierung mittels hochaufgelöster MS-MS-Fragmentierung der endokrin-wirksamen, unbekannten Substanz mit der Summenformel $C_{18}H_{37}O_3$ 103
4.2. Überlagerung der Strukturen der unbekannten mittels LBD-hERα unbekannten, estrogenen Substanz und 17β-Estradiol zum Zweck der Verdeutlichung der Strukturparallelität des 17β-Estradiol und des unbekannten, estrogen-wirksamen Stoffes. 104

Tabellenverzeichnis

1.1. Blutserumgehalte von 17β-Estradiol und Estriol im menschlichen Organismus unter Berücksichtigung einer eventuellen Schwangerschaft. . . . 4
1.2. Zusammensetzung der Estrogene in der 40. Woche der Gravidität und Lutealphase 5
1.3. Vergleich der Zu- und Ablaufkonzentrationen biogener und synthetischer endokrin wirksame Verbindung bei der Abwasserreinigung 10
1.4. Vergleich der Zu- und Ablaufkonzentrationen anthropogener endokrin wirksame Verbindung bei der Abwasserreinigung 11
1.5. Relative Bindungsaffinitäten natürlicher und synthetischer estrogener Substanzen an rekombinanten Estrogenrezeptor verschiedener Spezies . 13
1.6. In dieser Arbeit untersuchte EDCs 18
1.7. Übersicht über flüsigchromatographische Bestimmungsmethoden von EDCs in verschiedenen Matrices 22

2.1. Zusammensetzung der 50 µL Reaktionslösung für die iProof-PCR . . . 40
2.2. Programm des Thermocyclers für die iProof-PCR 40
2.3. Zusammensetzung der 50 µL Reaktionslösung für die Go*Taq*-PCR . . . 43
2.4. Programm des Thermocyclers für die Go*Taq*-PCR 43
2.5. Pipettierschema für das Gießen zweier SDS-Gele 46
2.6. Gradientenprogramm für die chromatographischen Trennung 51
2.7. Säulenspezifikation, Flussrate und Make-up-Fluss für die Analyse der EDCs 51
2.8. Injektorparameter 51
2.9. Parameter der LTQ-Orbitrap 51

3.1. Imidazolkonzentrationen der Waschschritte zur Optimierung der Proteinaufreinigung 66
3.2. In dieser Arbeit erstellte Expressionsvektoren 68
3.3. Zur Quantifizierung verwendete Ionen (m/z) der unterschiedlichen EDCs im negativen Modus 69
3.4. Zur Quantifizierung verwendete Ionen (m/z) der unterschiedlichen EDCs im positiven Modus 69
3.5. Parameter der Kalibrationsgeraden, sowie daraus resultierende analytische Grenzen 70
3.6. Durch Standardaddition aus den Kalibrationsdaten der Tab 3.5 abgeschätzte Ablaufkonzentration der EDCs 73

4.1. Ermittelte Ablaufkonzentration der einzelnen EDCs 96

Sequenzverzeichnis

A.1. pCM184-Ubi4-hER-His_6 107
A.2. pET24a(+)hER-His_6 108
A.3. pREP2-AGS-hER-His_6 109
A.4. pTrc99a-hER-His_6 110
A.5. pTRC99a-LBD-hERα-His_6 111
A.6. pTRC99a-StrepTag II-LBD-hERα-His_6 111
A.7. pYEPE10-hERα 112