

Gewebekulturtests zum Nachweis östrogen aktiver Substanzen als Alternative zum uterotrophen Assay

Ulrich MAYR

Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim,
Emil-Wolff-Str. 10, D-7000 Stuttgart 70

Zusammenfassung:

Es wurden die Grundlagen für zwei biologische Systeme zur Bestimmung östrogenener Aktivitäten, vor allem im Hinblick auf die Beurteilung von Futtermitteln erarbeitet, von denen das erste, der Nachweis spezifischer Proteine in MCF-7-Zellen (humane Brustkrebszellen), bereits erfolgreich zur quantitativen Bestimmung von 17 β -Östradiol, dem Mykoöstrogen Zearalenon und fünf Phytoöstrogenen herangezogen wurde. Bei der Bestimmung des relativen östrogenen Potentials dieser Substanzen (die Bezugsgröße ist 17 β -Östradiol) wurden ähnliche Werte gefunden wie sie aufgrund des uterotrophen Tests angegeben werden. Am Beispiel von künstlich mit Zearalenon kontaminierten Getreideproben konnte gezeigt werden, daß MCF-7-Zellen nicht nur zur Untersuchung von Reinsubstanzen, sondern auch zur Untersuchung biologischen Materials geeignet sind. Eine quantitative Bestimmung der zugesetzten Zearalenonmenge war in allen Fällen möglich. Das MCF-7-System ist also prinzipiell geeignet, in die agrarwissenschaftliche Praxis, z. B. zur Untersuchung von Futtermitteln, Eingang zu finden.

Im zweiten Testsystem kamen genetisch veränderte Mauszellkulturen zum Einsatz, wobei als Meßgröße der hormonellen Aktivität die Synthese eines bakteriellen Enzyms (Chloramphenicol-Acetyltransferase = CAT) diente. In diesem System wurden Untersuchungen mit Zearalenon durchgeführt.

Beide Testsysteme sind äußerst empfindlich und dem bisher gebräuchlichen uterotrophen Assay mit Mäusen und Ratten an Meßgenauigkeit und Reproduzierbarkeit überlegen. Sie können nicht nur innerhalb der agrarwissenschaftlichen, sondern auch innerhalb der pharmazeutischen Forschung den uterotrophen Assay in den meisten Fällen ersetzen.

Möglichkeiten zur Vereinfachung der Testprotokolle werden diskutiert.

Summary: Tissue Culture Tests as an Alternative to the Uterotrophic Assay in the Detection of Estrogenic Active Compounds.

The bases for two biological systems which ascertain estrogenic activity were worked out. The primary aim was to assess animal foodstuff. The first system, the measurement of estrogen-specific proteins in MCF-7 cells (human breast cancer cells), has

been used for a quantitative estimation of 17 β -estradiol, the mycoestrogen zearalenone and five phytoestrogens. Estimates of the relative estrogenic potentials of these substances using the MCF-7 test yields results similar to those of the uterotrophic assay. Analyses of cereal samples artificially contaminated with zearalenone showed that MCF-7 cells are suitable for examining not only purified compounds, but also biological material. A quantitative estimation of added zearalenone was possible in each case. In principle, then, the MCF-7 system can be suitably introduced into agronomical practice, for example in the examination of animal foodstuff.

The second test system is based on genetically transformed mouse cell cultures. The synthesis of a bacterial enzyme (chloramphenicol-acetyltransferase, CAT) is used to measure hormone activity. This system was tested with zearalenone.

Both test system are extremely sensitive and superior to the uterotrophic assay with mice and rats, concerning the accuracy of measurement and reproducibility. They can replace this commonly used bioassay in most cases – both in agronomic and in pharmaceutical research.

Ways of simplifying the experimental procedures are discussed.

1. Einleitung:

Innerhalb der agrarwissenschaftlichen Forschung kommt dem Nachweis östrogen aktiver Substanzen in Futtermitteln und Futterpflanzen eine nicht unerhebliche Rolle zu, da die Aufnahme dieser Inhaltsstoffe beim landwirtschaftlichen Nutztier zu Krankheitssymptomen führt. Diese werden unter dem Begriff "Hyperöstrogenismus-Syndrom" zusammengefaßt; u.a. zählen dazu reversible und irreversible Infertilität, entzündliche Veränderungen des Genitaltraktes (oft Ausgangspunkt für Sekundärerkrankungen), sowie eine Beeinträchtigung der fötalen Entwicklung bis hin zu Mißbildungen und dem Tod des Fötus (1,2).

Als verursachende Substanzen wurden zum einen Schimmelpilzprodukte (Myko-östrogene) nachgewiesen, wie das von verschiedenen Fusarienstämmen gebildete Resorcyssäurelacton Zearalenon mit seinen Derivaten (RALs), die als häufige und meist starke Kontamination in Getreide und Getreideprodukten auftreten. Daneben handelt es sich um Inhaltsstoffe höherer Pflanzen, Phytoöstrogene, chemisch gesehen Coumestane und Isoflavone. Diese sind u.a. in verbreiteten Futterpflanzen, wie z.B. Erdklee, Rotklee, Luzerne oder Soja zu finden (3,4).

Die genannten Verbindungen können zwar chemisch durch instrumentell-analytische Methoden nachgewiesen werden, es existiert jedoch kein Verfahren, in dem alle bekannten Myko/Phytoöstrogene gleichzeitig und in einem Schritt nachgewiesen werden können. Zudem wären natürlich nur solche Verbindungen erfaßbar, die

chemisch bereits charakterisiert sind. Es ist jedoch äußerst wahrscheinlich, daß pflanzliche bzw. Pilzprodukte mit beträchtlicher östrogenen Wirkung existieren, die chemisch überhaupt noch nicht identifiziert sind.

Für die Agrarwissenschaft, insbesondere die Tierernährung, liefert in der Regel der Nachweis der Gesamtheit des östrogenen Potentials von Futtermitteln, unabhängig von der Zusammensetzung der östrogenen Einzelkomponenten, die eigentlich interessante Aussage. Zu diesem Nachweis ist ein biologisches Meßverfahren, ein Tierversuch nötig, wobei üblicherweise der sog. "uterotrophe Assay" eingesetzt wird. Bei dieser Methode wird juvenilen oder ovariectomierten weiblichen Mäusen (oder Ratten) eine Testsubstanz mittels Magensonde oder Injektion verabreicht, nach 4 Tagen werden die Tiere getötet, die Uteri präpariert und ausgewogen. Die östrogenabhängige Zunahme des Uterusgewichtes dient dann als Meßgröße für die hormonelle Aktivität der Substanz (5).

Innerhalb der Agrarwissenschaft wird dieser Tierversuch nicht nur zur Beurteilung von Futtermitteln eingesetzt, sondern auch zur Bearbeitung anderer wissenschaftlicher Fragestellungen, z.B.

- Überprüfung von Inaktivierungsverfahren von Myko/Phytoöstrogenen,
- Isolation unbekannter Myko/Phytoöstrogene,
- Charakterisierung von Schimmelpilzstämmen und Pflanzenarten als Produzenten solcher Substanzen.

Eine noch weit größere Rolle dürfte der uterotrophe Assay in der pharmazeutischen Forschung spielen. Synthetische Östrogene und Antiöstrogene sind wichtige Pharmaka, wobei letztere (z.B. Tamoxifen) erfolgreich bei der Therapie östrogenabhängiger Tumore eingesetzt werden. Dieser Forschungsbereich wird intensiv bearbeitet, und dementsprechend hoch dürfte der Verbrauch an Versuchstieren in diesem Zusammenhang sein.

Vorbehalte gegen diesen Tierversuch ergeben sich aus der Sicht des Tierschutzgedankens, da die Zahl der Tieropfer sehr hoch ist: Pro Meßpunkt sind mindestens 5 bis 6 Tiere zu kalkulieren, zusammen mit diversen Kontrollen addiert sich der Tierversuch bei den üblichen Meßreihen sehr rasch auf mehrere Hundert. Darüber hinaus ist der uterotrophe Assay mit einigen meßtechnischen Problemen belastet (5). Erhebliche Ungenauigkeiten ergeben sich z.B. bereits bei der Entnahme und Gewichtsbestimmung der Uteri durch anhaftendes nicht-uterines Gewebe und unterschiedliche Wasserverluste (Austrocknung) bei der Wägebprozedur. Darüber hinaus ist die Uterusreaktion als solche abhängig vom Tierstamm, vom Gesundheitszustand der Tiere (Körpergewichtszunahme), vom exakten Alter und vom verabreichten Futter

(5,6,7). Hohe Streuungen der Einzelmessungen und schlechte Reproduzierbarkeit von Ergebnissen in verschiedenen Labors sind die nicht zu vermeidende Konsequenz.

In der hier dargestellten Arbeit werden die Grundlagen zu zwei Alternativen beschrieben, die auf den Einsatz von Labortieren völlig verzichten und gleichzeitig die o.g. meßtechnischen Probleme nicht aufweisen, also auch unabhängig vom Tierschutzgedanken für eine praktische Anwendung prinzipiell attraktiv sein dürften. Beide Testsysteme wurden zunächst auf den Nachweis der biologischen Aktivität des Mykoöstrogens Zearalenon angewandt, mittlerweile auf fünf der häufigsten Phytoöstrogene ausgedehnt (8,9).

2. Ergebnisse:

In beiden Testsystemen werden permanente Zelllinien eingesetzt. Als Meßgröße dient jeweils die Induktion eines östrogenspezifischen Proteins.

2.1 Induktion von Exoproteinen in menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7).

Bereits 1980 wurde von Westley und Rochefort beschrieben, daß das körpereigene Östrogen 17 β -Östradiol in MCF-7-Zellen die Synthese von mindestens zwei Eiweißstoffen, die aus der Zelle ausgeschleust werden (Exoproteine), induziert (10). MCF-7-Zellen sind menschliche Brustkrebszellen, die sich unbegrenzt in Kulturgefäßen züchten lassen, keinem Alterungsprozess und damit auch keinen physiologischen Veränderungen im Verlauf der Passagen unterliegen. Die von Westley and Rochefort beschriebenen Befunde liefern die Grundlage zur quantitativen Bestimmung der biologischen Aktivität anderer östrogenen Substanzen, wie dem Mykoöstrogen Zearalenon. Am deutlichsten ist die Induktion eines östrogenspezifischen Exoproteins vom Molekulargewicht 52 kDa zu beobachten, das im Nährmedium der Zellen nachgewiesen werden kann und als Meßgröße herangezogen werden kann (8).

MCF-7-Zellen werden dazu in östrogenfreiem Medium (Dulbecco's Minimal Essential Medium mit 10% fötalem Kälberserum, dem durch eine Behandlung mit dextranbeschichteter Aktivkohle endogene Steroide entzogen worden sind) vorkultiviert, in Mikrotiterplatten ausgesät und kurz vor Erreichen der Konfluenz mit der Testsubstanz inkubiert. Diese Inkubation erstreckt sich über 3 Tage, anschließend werden die Proteine mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert, die synthetisierten Exoproteine durch

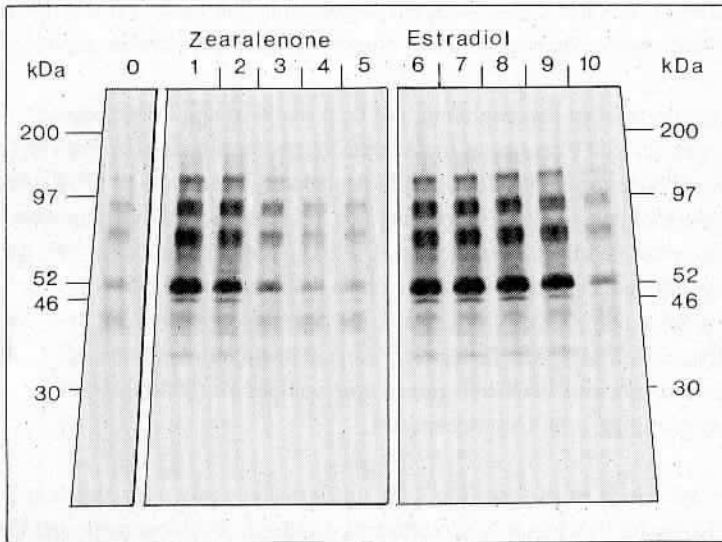


Abb. 1: Fluorogramm ³⁵S-methioninmarkierter Exoproteine, produziert von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Zearalenon und 17 β -Östradiol.

0: Kontrolle ohne Testsubstanzen.

1 - 5: Zearaleonbehandelte Zellen. Konzentrationen in Molarität: (1) = 6.4×10^{-9} M, (2) = 1.6×10^{-9} M, (3) = 4×10^{-10} M, (4) = 1×10^{-10} M, (5) = 2.5×10^{-11} M.

6 - 10: Östradiolbehandelte Zellen. (6) = 1.6×10^{-9} M, (7) = 4×10^{-10} M, (8) = 1×10^{-10} M, (9) = 2.5×10^{-11} M, (10) = 6.2×10^{-11} M.

Rechter und linker Rand: Molekulargewichtsskala in Kilodalton (kDa). Die Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem Gradientengel (10-20% Acrylamid) nach Molekulargewichten getrennt.

Elektrophorese des Nährmediums auf Polyacrylamidgelen nach Größe aufgetrennt und schließlich durch Fluorographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Abb. 1 zeigt ein solches Fluorogramm, auf dem die Wirkung körpereigenen 17 β -Östradiols mit der von Zearalenon in verschiedenen Verdünnungsstufen verglichen wird. Im Vergleich zur Kontrolle (ohne Testsubstanz) ist sowohl in 17 β -Östradiol- als auch in zearalenonbehandelten Zellen eine neu auftretende, starke Proteinbande vom Molekulargewicht 52 kDa zu beobachten. Die ED₅₀ (=effektive Dosis, hier definiert als diejenige Menge an Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft) liegt für 17 β -Östradiol bei 1×10^{-11} M (molar), für Zearalenon bei ca. 5×10^{-10} M, die Empfindlichkeitsschwelle des Testsystems liegt also außerordentlich tief: 5×10^{-10} M Zearalenon bedeutet eine Nachweisgrenze von weniger als 0,000 000 160 g Zearalenon pro Liter, z.B. Getreideextrakt.

Dieser Befund wurde in (8) veröffentlicht, mittlerweile wurden im gleichen System die Phytoöstrogene Biochanin A, Coumestrol, Daidzein, Formononetin und Genistein getestet. Erwartungsgemäß induzieren auch diese Substanzen die Synthese des östrogenspezifischen 52 kDa Exoproteins. Bei der Bestimmung der ED₅₀ ergab sich gemäß des relativen östrogenen Potentials dieser Verbindungen die folgende Reihe: 17 β -Östradiol, Zearalenon, Coumestrol, Genistein, Biochanin A, Formononetin, wobei 17 β -Östradiol die höchste, Formononetin die niedrigste östrogene Aktivität hat (9). Diese Reihenfolge stimmt mit der durch andere Autoren im uterotrophen Test ermittelten Reihenfolge überein, auch im Hinblick auf die quantitative Abstufung (11,12).

Für die agrarwissenschaftliche Anwendung des Tests, wie sie Forschungsaufgabe des Autors ist, ist es von entscheidender Wichtigkeit, östrogen aktive Substanzen nicht nur als Reinsubstanz, sondern als Bestandteil biologischen Materials, insbesondere Getreideextrakten, nachweisen zu können. Dies ist am Beispiel künstlich mit Zearalenon kontaminierter Weizen-, Gerste- und Haferproben gelungen, wobei in allen Fällen eine korrekte quantitative Bestimmung möglich war. Gleichzeitig wurde eine im Vergleich zum chemischen Nachweis vereinfachte Extraktionsmethode ausgearbeitet. Details dieser Resultate werden in einer gesonderten Publikation dargestellt (9).

2.2. Nachweis der östrogenspezifischen Expression eines fremden Gens in Mauszellen.

Als zweites Testsystem kam ein genetisches Konstrukt zum Einsatz, das von der Arbeitsgruppe um G. Ryffel, Universität Essen, zur Aufklärung der östrogen-regulierten Genexpression entwickelt wurde (13,14).

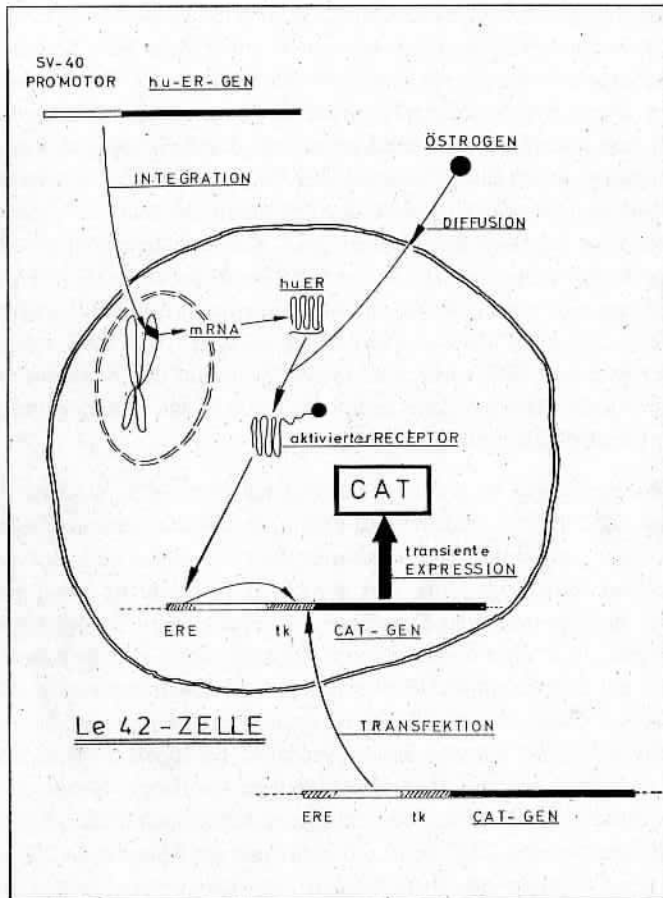


Abb. 2: Schematische Darstellung des Le42/CAT-Systems. Erklärung im Text. Abkürzungen: SV-40 Promotor: Genpromotor aus dem Genom des SV-40 Virus. huER: menschlicher Östrogenrezeptor. ERE: estrogen-responsive element des Vitellogenins des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. tk: Promotor des Thymidinkinasegens des Herpes Simplex Virus. CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase. Unten rechts ist der in diesem Zusammenhang interessierende Abschnitt des Plasmids, das in die Le42-Zellen eingeschleust wird, dargestellt. Das vollständige Plasmid ist eine ringförmig geschlossene DNA.

Die Wirkung östrogen aktiver Steroidhormone besteht auf molekularer Ebene hauptsächlich in einer Veränderung der Expression bestimmter Gene bzw. Gen-Netzwerke, die zu einer charakteristischen Veränderung der Physiologie der verschiedenen Zielzellen führt. Dabei entfalten diese Hormone ihre Aktivität nicht durch direkte Interaktion mit dem jeweiligen Gen, sondern indirekt durch Bindung an einen intrazellulären Rezeptor, ein Eiweißmolekül. Die Bindung eines Hormonmoleküls bewirkt eine Änderung der Konformation des Rezeptors, der nun als "aktivierter Rezeptor" in der Lage ist, einen spezifischen DNA-Abschnitt zu erkennen und sich an diesen anzulagern (vgl. auch Abb. 2). Die genaue Basensequenz dieses DNA-Abschnittes wurde erstmals von G. Ryffel und Mitarbeitern im Detail aufgeklärt und wird als *estrogen-responsive element* oder ERE bezeichnet (14). Der Komplex aus aktiviertem Rezeptor und ERE wirkt nun in einer Weise auf den Promotor des nächstgelegenen Gens, daß ein bislang nicht oder nur schwach transkribiertes Gen plötzlich stark transkribiert wird (15,16,17).

Das hier verwendete System ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Als Zielzellen dienen sog. Le42-Zellen. Dies sind Maus-L-Zellen, in deren Genom das Gen des menschlichen Östrogenrezeptors (huER), kontrolliert von einem viralen Promotor (SV-40 "early" Promotor), stabil integriert ist (13,14). Konsequenz dieser genetischen Veränderung ist die kontinuierliche Synthese des menschlichen Östrogenrezeptors. In diese Zellen wurde ein in vitro rekombiniertes Plasmid eingeschleust (transient expression), das das Gen für ein bakterielles Enzym, die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) enthält. Vor dieses Gen ist ein *estrogen-responsive element* aus dem Genom des Krallenfrosches *Xenopus laevis* geschaltet, gekoppelt mit dem starken Promotor eines viralen Gens (des Thymidinkinasegens aus Herpes Simplex Virus). Gelangt dieses Plasmid in die Zellen, bewirkt eine anschließende Behandlung mit 17 β -Östradiol die Expression des CAT-Gens, d.h. innerhalb der Mauszellen läßt sich das bakterielle Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase nachweisen, dessen Aktivität als Meßgröße für die Hormonkonzentration herangezogen werden kann.

In diesem System wurde bislang lediglich Zearalenon getestet. Es zeigte sich, daß dieses Mykoöstrogen in der Lage ist, wie 17 β -Östradiol die CAT-Genexpression zu induzieren. Abb. 3 zeigt einen solchen Test, nämlich die Bestimmung der CAT-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen. Die Induktionsschwelle liegt für 17 β -Östradiol zwischen 2.5×10^{-9} und 2.5×10^{-10} M, für Zearalenon zwischen 5×10^{-8} und 5×10^{-9} M. Bezüglich der relativen Wirksamkeit von Zearalenon wurde also das gleiche Ergebnis wie in MCF-7-Zellen gefunden, allerdings ist die Sensitivität geringer. Da die CAT-Aktivität eine einfach und präzise zu bestimmende Meßgröße ist, wird dieses System weiterhin bearbeitet und verbessert.

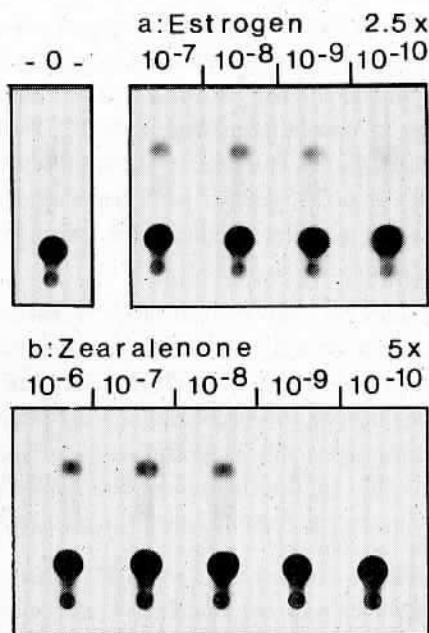


Abb 3: CAT-Aktivität in Lysaten von Le42-Zellen nach Aufnahme des im Text beschriebenen Plasmids und nach Behandlung mit 17 β -Östradiol und Zearalenon in verschiedenen Konzentrationen. Die Kontrolle (0) stellt unbehandelte Zellen dar. Die eingesetzten Konzentrationen sind als Molarität (M) angegeben.

Die Zell-Lysate werden mit ¹⁴C-Chloramphenicol und Acetyl-CoA inkubiert, wobei durch das Enzym CAT acetylierte Derivate des Chloramphenicols gebildet werden. Substrat und Reaktionsprodukte werden dünnstichtchromatographisch aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. In der Abb. repräsentieren die unteren Punkte das eingesetzte Substrat, die oberen Punkte die acetylierten Reaktionsprodukte.

3. Diskussion und Ausblick:

Zum quantitativen Nachweis der biologischen Aktivität östrogenen Verbindungen wurden zwei östrogensensitive Zelllinien eingesetzt: MCF-7-Zellen (menschliche Brustkrebszellen) und Le42-Zellen (genetisch transformierte Maus-L-Zellen). In beiden Testsystemen dient die Induktion östrogenspezifischer Genprodukte als Meßgröße der hormonellen Aktivität: In MCF-7-Zellen ist dies ein neusynthetisiertes Exoprotein, in Le42-Zellen die Aktivität des bakteriellen Enzyms Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT).

Die im MCF-7-System für das Mykoöstrogen Zearalenon, sowie die Phytoöstrogene Coumestrol, Genistein, Daidzein, Formononetin und Biochanin A ermittelten relativen östrogenen Aktivitäten stimmen mit den von verschiedenen Autoren im uterotrophen Assay gefundenen Werten im Wesentlichen überein (11,12). Zudem konnte eine bekannte Menge Zearalenon, die verschiedenen Getreideproben zugesetzt wurde, korrekt bestimmt werden. Das MCF-7-System stellt also eine echte Alternative zum uterotrophen Assay dar wobei es auch bei Futtermitteluntersuchungen praxistauglich sein dürfte.

Allerdings sollte die Methodik für einen routinemäßigen Einsatz vereinfacht und verbilligt werden. Hauptkostenfaktor des Tests in der jetzigen Form sind die verwendeten Radioisotope. Geplant sind deshalb Versuch, das induzierte 52 kDa Exoprotein immunologisch mittels RIA oder ELISA nachzuweisen; in beiden Fällen würden die in vivo Markierung mit Radioisotopen und die zeitaufwendige Elektrophorese wegfallen. Bei einem ELISA könnte völlig auf den Einsatz von Radioaktivität verzichtet werden, bei einem RIA wäre der Einsatz von Radioisotopen vergleichsweise gering.

Ähnlich wie das MCF-System sollte auch das Le42/CAT-System prinzipiell für den Nachweis östrogenen Aktivitäten geeignet sein. Dies wurde allerdings bislang nur für Zearalenon experimentell gezeigt, Versuche mit Phytoöstrogenen und Getreideextrakten stehen noch aus. Auch für dieses System sind Vereinfachungen vorgesehen. Bisher mußte das beschriebene Plasmid vor jedem Versuch in die Zellen eingeschleust werden. Die DNA, die dann frei in der Zelle vorliegt, ist für ca. 1 Woche funktionsfähig, wird aber allmählich durch zelluläre DNasen abgebaut. Um die Prozedur dieser sog. "transient expression" ganz zu umgehen, soll deshalb das Plasmid stabil in das Genom der Zellen integriert werden. Von solchen Zellklonen ist außerdem zu erhoffen, daß zumindest einige eine höhere Sensitivität aufweisen wie in 2.2. beschrieben.

Da zum Nachweis der CAT-Aktivität ebenfalls Radionuklide benötigt werden, ist ein weiteres Ziel der Austausch des CAT-Gens gegen das Luziferasegen. Das Enzym Luziferase katalysiert durch Oxydation von Luziferyl-AMP die Leuchtreaktion, wie sie z.B. bei Glühwürmchen zu beobachten ist. Meßgröße wäre in diesem Fall die Lumineszenz. Diese kann mit speziellen Luziferase-Photometern, aber auch mit Szintillationsmeßgeräten für β -Strahler, wie sie wohl in den meisten Instituten vorhanden sein dürften, quantitativ bestimmt werden.

Beim Le42/CAT- bzw. Le42/Luziferase-System handelt es sich um genetisch veränderte Organismen, bzw. es ist die Handhabung in vitro rekombinierter DNA erforderlich. Dazu müssen prinzipiell bestimmte Sicherheitsbestimmungen eingehalten werden. Da es sich bei den Empfänger"organismen" um Gewebekulturzellen handelt

und keine Gene aus humanpathogenen Organismen verwendet werden, können diese Zellen unter den niedrigsten Sicherheitsbedingungen gehandhabt werden (L1/B1 gemäß Paragraph 10, Abs. 2b und Paragraph 16, Abs. 2c und d der "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren" des BMFT der Bundesrepublik Deutschland).

Die hier vorgestellten Testsysteme können den uterotrophen Assay nicht nur in den meisten Fällen ersetzen, sondern sind diesem in vieler Hinsicht sogar überlegen. Sie zeichnen sich aus durch Verzicht auf Versuchstiere, höhere Empfindlichkeit, höhere Meßgenauigkeit, bessere Reproduzierbarkeit und einfache Handhabung. Allerdings können metabolische Effekte nicht erfasst werden. Chemische Veränderungen z.B. durch Pansenmikroorganismen bei Wiederkäuern oder in der Leber können zu Verbindungen führen, die stärkere, aber auch schwächere Aktivität besitzen als die ursprünglich eingesetzten Substanzen (1). Dieser Schwachpunkt trifft allerdings in gleichem Maß auf den uterotrophen Test mit Mäusen und Ratten zu, wenn die damit gewonnenen Erkenntnisse auf landwirtschaftliche Nutztiere oder den Menschen übertragen werden sollen.

Der Tierversuch dürfte in dieser Beziehung also gegenüber den hier beschriebenen alternativen Methoden keinen zusätzlichen Vorteil bieten; in beiden Fällen wären weiterführende Untersuchungen unumgänglich.

Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, daß das MCF-7- sowie das 42/CAT-System nicht nur innerhalb der agrarwissenschaftlichen Forschung eingesetzt werden können, sondern ganz allgemein immer dort, wo der uterotrophe Assay verwendet wird, z.B. in der pharmazeutischen Forschung und toxikologischen Sicherheitsprüfung.

4. Literaturverzeichnis:

- (1) Müller, H.-M., Hofmann, J. und Mayr U. (1989): "Stoffwechsel und Wirkung von Phytoöstrogenen beim Tier." Übers. Tierernährg. 17, 47-84.
- (2) Kuiper-Goddman, T., Scott, P., Watanabe, H. (1987): "Risk assessment of the mycotoxin zearalenon." Regulatory Toxicology and Pharmacology 7, 253-306.
- (3) Price, K.R., and Fenwick, G.R. (1985): "Naturally occurring oestrogens in foods - a review." Food Additives and Contaminants 2, 73-106.
- (4) Stob, M. (1983): "Naturally occurring food toxicants." In "Handbook of Naturally Occurring Food Toxicants", ed. Rechcigl, M., CRC-Press, 81-100.
- (5) Thipgen, J.E., Lung-An, L., Richter, C.B., Lebetkin, E.H. and Jameson, C.W. (1987): "The mouse bioassay for detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay." Laboratory Animal Science, 37, 596-601.
- (6) Thipgen, J.E., Lung-An, L., Richter, C.B., Lebetkin, E.H. and Jameson, C.W. (1987): "The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: II. Comparative

estrogenic activity of purified, certified and standard open and closed formula rodent diets." Laboratory Animal Science, 37, 602-605.

- (7) Thipgen, J.E., Lebetkin, E.H. Dawes, M.L., Richter, C.B., and Crawford (1987): "The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: III. Stimulation of uterin weight by dextrose, sucrose and corn starch." Laboratory Animal Science, 37, 606-609.
- (8) Mayr, U. (1988): "Estrogen-controlled gene expression in tissue culture cells by zearalenon." FEBS-Letters, 239, 223-226.
- (9) Mayr, U. und Schneider, S. (1990): Publikation in Vorbereitung.
- (10) Westley, B., and Rochefort, H. (1980): "A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cances cell lines." Cell, 20, 353-362.
- (11) Bickoff, E.M., Livingston, A.L., Hendrickson, A.P., and Booth, A.N. (1962): "Relative potencies of several estrogen-like compounds found in forages." Agr. Fd. Chem. 10, 410-412.
- (12) Micheli, R.A., Booth, A.N., Livingston, A.L., and Bickoff, E.M., (1962): "Coumestrol, plant phenolics, and synthetic estrogens: A correlation of structure and activity." J. Med. Pharm. Chem., 5, 321-335.
- (13) Klein-Hitpaß, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1986): "An estrogen-responsive element derived form the 5'-flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells." Cell, 46, 1053-1061.
- (14) Druge, P.M., Klein-Hitpaß, L., Green, S., Stack, G., Chambon, P., and Ryffel, G.U., (1986): "Introduction of estrogen-responsiveness into mammalian cell lines." Nucleic Acids Res., 14, 9329-9337.
- (15) Yamamoto, K.R. (1985): "Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks." Ann. Rev. Genet., 19, 209-252.
- (16) Beato, M., Arnemann, J., Chalepakis, G., Slater, E., and Willman, T. (1987): "Gene regulation by steroid hormones." J. Steroid. Biochem., 27, 9-11.
- (17) Evans, R.M. (1988): "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Science, 240, 889-895.

A U S Z E I C H N U N G

Der Autor des vorstehenden Beitrages, Ulrich Mayr
von der Universität Hohenheim, Stuttgart, erhielt
für seine Arbeit "estrogen-controlled gene
expression in tissue culture cells by zearalenone"
den Felix-Wankel-Tierschutz-Forschungspreis 1989.

Die Redaktion