

**Etablierung von *in vitro* Testsystemen zur Erfassung  
androgener/antiandrogener Wirkungen und  
rechnergestützte Identifizierung hormonell relevanter  
Strukturelemente**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation  
(D 386)

vorgelegt von  
Diplom Lebensmittelchemikerin  
**Sabine Guth**

Betreuer: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2000

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 27. Juli 2000

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Himbert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 1998 und März 2000 im  
Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der  
Universität Kaiserslautern

Herrn Prof. Dr. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des Themas sowie für  
seine Anregungen und wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Schrenk danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Himbert möchte ich mich für die Übernahme des  
Prüfungsvorsitzes bedanken.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Theoretische Grundlagen</b> .....	4
<b>2.1. Endokrine Disruptoren</b> .....	4
2.1.1. Definition.....	4
2.1.2. Estrogenrezeptorliganden.....	4
2.1.3. Androgenrezeptorliganden.....	5
2.1.3.1. Androgene.....	5
2.1.3.2. Antiandrogene.....	7
<b>2.2. Molecular Modelling</b> .....	11
2.2.1. Kraftfeldmethoden.....	12
2.2.2. Konformationsanalyse.....	13
2.2.3. Pharmakophorhypothese und Molekülvergleich.....	14
2.2.4. Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen..	14
<b>2.3. Signaltransduktion durch Hormone</b> .....	17
2.3.1. Steroidhormonrezeptoren.....	17
2.3.1.1. Aufbau von Steroidhormonrezeptoren.....	18
2.3.2. Rezeptor-assoziierte Proteine.....	21
2.3.3. Lokalisierung in der Zelle.....	22
2.3.4. Steroidhormonrezeptor-kontrollierte regulatorische DNA-Sequenzen.....	23
2.3.4.1. Hormone Responsive Elements.....	23
2.3.4.2. Androgenabhängige Promotoren.....	25
2.3.4.2.1. MMTV Promotor.....	25
2.3.4.2.2. PSA Promotor.....	28
2.3.5. Mechanismus der Transkriptionsaktivierung.....	30
2.3.6. Antihormonelle Wirkung.....	32

<b>2.4. Testsysteme zur Erfassung hormoneller Aktivität</b> .....	33
2.4.1. <i>In vivo</i> Testsysteme.....	33
2.4.2. <i>In vitro</i> Testsysteme.....	33
2.4.3. Auswerteverfahren.....	36
<b>2.5. Zelllinien</b> .....	37
2.5.1. CV-1.....	37
2.5.2. COS-7.....	38
2.5.3. MFM-223.....	38
2.5.4. T47D.....	38
2.5.5. SaOS-2.....	39
<b>3. Problemstellung</b> .....	40
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	41
<b>4.1. Etablierung von <i>in vitro</i> Testsystemen zur Erfassung androgener/ antiandrogener Aktivität</b> .....	41
4.1.1. Reporterassays.....	41
4.1.1.1. Transgene Reporterassays.....	41
4.1.1.1.1. Transienter Transaktivierungsassay (COS-7).....	44
4.1.1.1.2. Etablierung eines stabil transfizierten Testsystems.....	48
4.1.1.1.2.1. CV-AR-Luc.....	49
4.1.1.1.2.2. SaOS-2-Luc.....	52
4.1.1.1.2.3. T47D-Luc.....	53
4.1.1.2. Nicht transgene Reporterassays.....	58
4.1.1.2.1. PSA-Assay.....	58
4.1.2. Proliferationsassays.....	61
4.1.2.1. Proliferationsassay mit MFM-223 Zellen.....	62
4.1.2.2. Proliferationsassay mit SaOS-2 Zellen.....	63
4.1.3. Zusammenfassung: Etablierung von <i>in vitro</i> Testsystemen.....	65

<b>4.2. Substanzauswahl: Identifizierung potentiell androgener/ antiandrogener Verbindungen.....</b>	<b>66</b>
<b>4.3. Untersuchung von ausgewählten Verbindungen auf androgene/ antiandrogene Aktivität in den etablierten Testsystemen.....</b>	<b>70</b>
4.3.1. Benzophenon-Analoga.....	71
4.3.1.1. Oxybenzon.....	71
4.3.1.2. p,p'-Dichlorbenzophenon.....	74
4.3.1.3. p,p'-Dibrombenzophenon.....	76
4.3.1.4. p,p'-Dihydroxybenzophenon.....	78
4.3.1.5. p,p'-Dimethoxybenzophenon.....	80
4.3.1.6. Xanthon.....	81
4.3.1.7. Benzophenon.....	83
4.3.1.8. p,p'-DDE.....	85
4.3.2. Phenylharnstoff-Analoga.....	86
4.3.2.1. Linuron.....	86
4.3.2.2. Monolinuron.....	89
4.3.2.3. Metobromuron.....	92
4.3.2.4. Diuron.....	93
4.3.2.5. Fluometuron.....	95
4.3.2.6. Phenylharnstoff.....	96
4.3.2.7. Vinclozolin M2.....	98
4.3.2.8. Hydroxyflutamid.....	99
<b>4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>100</b>
<b>4.5. Molecular Modelling: 3D-QSAR.....</b>	<b>111</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>6. Material und Methoden.....</b>	<b>117</b>

---

<b>6.1. Zellkultur</b> .....	117
<b>6.2. Transformation prokaryontischer Zellen</b> .....	121
6.2.1. Herstellung von transformationskompetenten E.coli.....	121
6.2.2. Transformation von kompetenten E.coli.....	123
<b>6.3. Isolierung von Plasmiden</b> .....	123
6.3.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	123
6.3.2. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	125
<b>6.4. Restriktionsverdau der präparierten Plasmide     und elektrophoretische Auftrennung</b> .....	126
<b>6.5. Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren</b> .....	127
<b>6.6. RT-PCR auf Androgenrezeptor</b> .....	128
6.6.1. Isolierung der Gesamt-RNA.....	128
6.6.2. DNase-Verdau.....	129
6.6.3. Durchführung der RT-PCR.....	129
6.6.4. RNase Verdau.....	131
<b>6.7. Wachstumstest</b> .....	132
<b>6.8. Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Elektroporation</b> .....	134
<b>6.9. Luciferase-Reportergenassay</b> .....	135
<b>6.10. PSA-Assay</b> .....	138
<b>6.11. Molecular Modelling</b> .....	140
<b>7. Literatur</b> .....	142

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AR	Androgenrezeptor
bp	Basenpaar
BTA	basaler Transkriptionsapparat
CoMFA	comparative molecular field analysis
DBD	DNA-bindende Domäne
DHT	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	effective concentration 50%
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen Responsive Element
FKS	fötales Kälberserum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	gonadotropes Releasing Hormon
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid Responsive Element
HBD	hormonbindende Domäne
HRE	Hormone Responsive Element
Hsp	Heat Shock Protein
IC <sub>50</sub> bzw. IC <sub>30</sub>	inhibition concentration 50% bzw. 30%
LH	luteinisierendes Hormon
LTR	Long Terminal Repeat
Luc	Luciferase
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MR	Mineralcorticoidrezeptor
NLS	Kernlokalisierungs-Signale
PLS	partial least squares

---

PR	Progesteronrezeptor
PSA	prostata specific antigen
QSAR	Quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen
RAP	Rezeptor-assoziierte Proteine
RE	Responsive Elements
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transkriptase polymerase chain reaction
SV-40	Simian virus 40
T	Testosteron
TAF	Transkriptionsaktivierungsfaktor
TR	Thyroidhormonrezeptor

## 1. Einleitung

In den letzten 50 Jahren wurden größere Mengen verschiedener synthetischer Chemikalien (Xenobiotika) zur Verbesserung der landwirtschaftlichen Produktivität und bedingt durch moderne Industrieverfahren in die Umwelt eingetragen. Diese Xenobiotika, es handelt sich z.B. um Pestizide, Tenside, Kunststoffmonomere und – additive sowie Produktionsabfallprodukte, können meist aufgrund hoher Lipophilie und langer Halbwertszeiten in der Umwelt und im Körperfettgewebe akkumulieren und so eine erhöhte Konzentration und Bioverfügbarkeit aufweisen. [Danzo, 1998; Colborn et al., 1993]

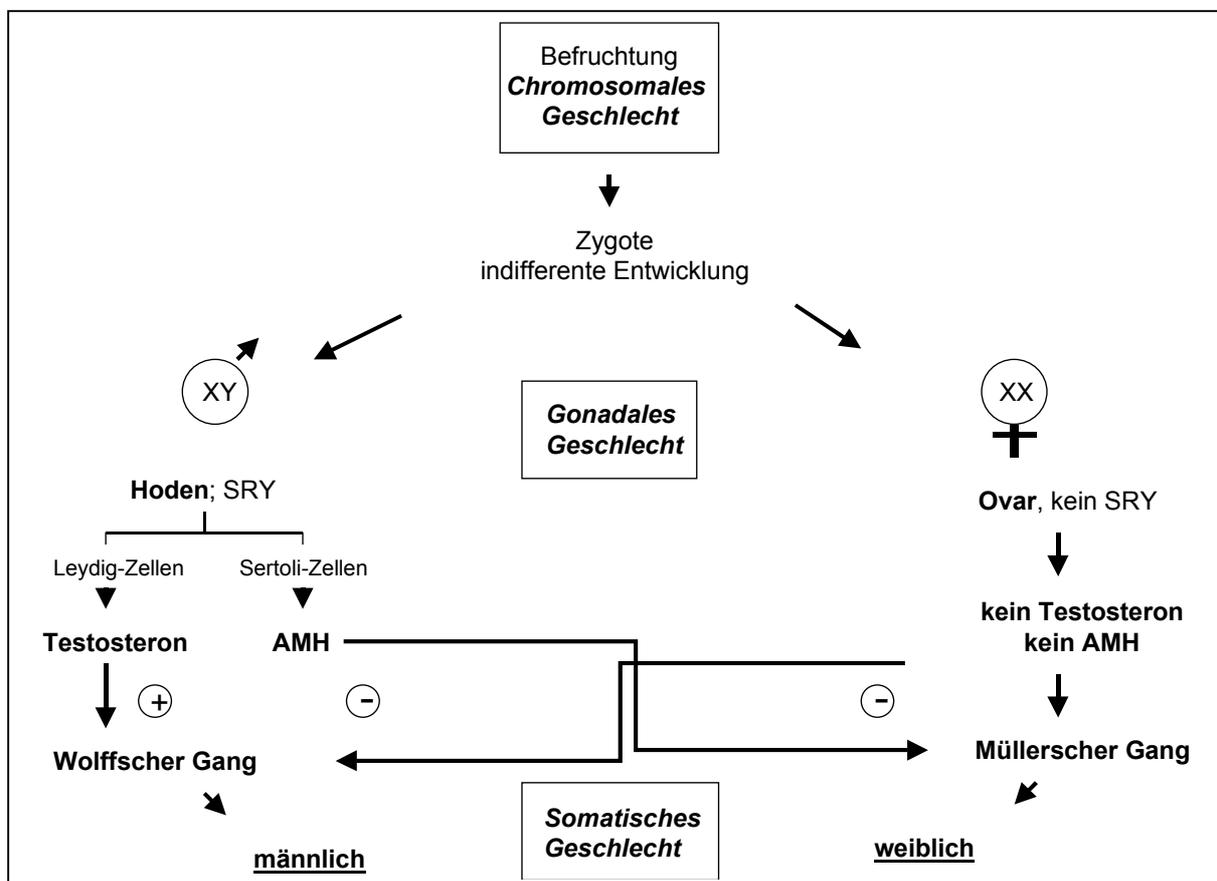
Vor allem durch Beobachtungen an Wildtierpopulationen hat sich die Aufmerksamkeit von Wissenschaft und Öffentlichkeit diesen Umweltchemikalien zugewandt. So zeigten Fische, Vögel, Reptilien, Säugetiere und andere Spezies in bestimmten, mit Xenobiotika (z.B. o,p'-DDT) belasteten Lebensräumen Störungen des Reproduktionstraktes und der Embryonalentwicklung. Dies äußerte sich in Veränderungen an den primären Geschlechtsorganen, einer Verschiebung des Geschlechtergleichgewichtes und einer Beeinträchtigung der Fertilität. [Toppari et al., 1996; Colborn et al., 1993; Colborn und Clement, 1992]

Die Befunde entfachten eine Diskussion, ob bestimmte, als „endokrine Disruptoren“ bezeichnete Verbindungen in der Lage sind, ebenfalls in die Embryonalentwicklung des menschlichen männlichen und weiblichen Genitaltraktes oder in die hormonelle Homöostase von erwachsenen Menschen einzugreifen.

Augenscheinliche Beweise, daß dies der Fall ist, können epidemiologische Studien zum bisherigen Zeitpunkt nicht liefern. Es sind jedoch Hinweise vorhanden, daß sich auffällige Anomalien des männlichen Genitaltraktes wie Hypospadien (offene Harnleiter) [Paulozzi, 1999; WHO, 1991] und Kryptorchismus (Hodenhochstand) [John Radcliffe Hospital Study Group, 1986] sowie das Auftreten von Hodenkrebsfällen [Toppari et al., 1996] bei jungen Männern häufen. Ob auch eine Abnahme der Spermienqualität und –dichte in den letzten Jahrzehnten zu beobachten ist, bleibt dagegen strittig. Die von Carlsen et al., 1992, berichtete

Abnahme in den letzten 50 Jahren wurde sowohl bestätigt [Toppari et al., 1996; Swan, 1997] als auch angezweifelt [Farrow, 1994].

Nichtsdestotrotz ist zu erwarten, daß das größte Risiko für das Auftreten von Reproduktionsstörungen während sensibler Phasen der Embryonalentwicklung von Organen und zentralem Nervensystem sowie während bestimmter neonataler und pubertärer Phasen liegt, in denen Steroidhormone an der feinregulierten Modulation beteiligt sind. Effekte der endokrinen Disruptoren können sich auch möglicherweise erst mit dem Eintreten der Pubertät oder später manifestieren. [Danzo, 1998]



**Abb.1:** Geschlechtsdifferenzierung bei Säugern [nach Spindler, 1997]

SRY = **S**ex **d**etermining **r**egion **Y**;

AMH = **A**nti-**M**üllerian **H**ormone

Bislang standen hauptsächlich synthetische und natürlich vorkommende Stoffe („Phytoestrogene“) mit estrogen/antiestrogener Wirkung im Vordergrund der Forschungsvorhaben. Mittlerweile ist jedoch bekannt, daß auch Verbindungen mit androgen/antiandrogenen Aktivität zu den in belasteten Ökosystemen beobachteten Effekten beitragen können. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang vor allem Pestizidmetabolite wie der Hauptmetabolit von DDT im Warmblüter p,p'-DDE [Kelce et al., 1995] oder Metabolite der Fungizide Vinclozolin [Wong et al., 1995] und Procymidone [Ostby et al., 1999]. Der gemeinsame Eintrag von estrogenen und antiandrogenen Verbindungen könnte das hormonelle Gleichgewicht in die gleiche Richtung verschieben und zum verstärkten Auftreten der genannten Symptome führen.

Daher ist es notwendig, das sich lange Zeit lediglich auf estrogene/antiestrogene Wirkungen konzentrierende Konzept allgemein auf hormonelle Wirkungen auszuweiten. Berücksichtigt werden sollten vor allem auch androgene/antiandrogene Einflüsse, die zur Zeit noch kaum untersucht sind.

## **2. Theoretische Grundlagen**

### **2.1. Endokrine Disruptoren**

#### **2.1.1. Definition**

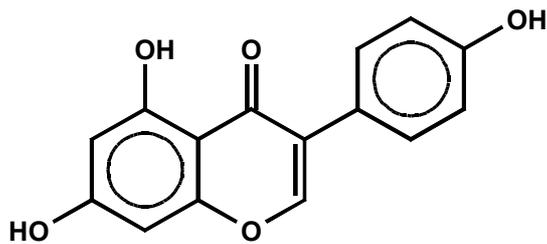
Die allgemeine Definition der OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) lautet [OECD, 1996]:

Endokrine Disruptoren sind Fremdstoffe mit schädlichen Wirkungen auf die Gesundheit in einem unversehrten Organismus oder seiner Nachkommenschaft, die auf Änderungen von endokrinen Funktionen zurückgeführt werden können.

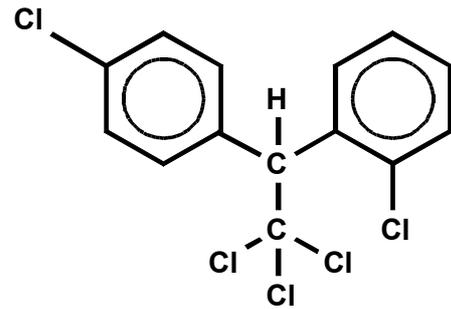
Bisher lag der Schwerpunkt der wissenschaftlichen Untersuchungen bei den estrogenaktiven Verbindungen. In den letzten Jahren sind jedoch auch Substanzen, die Wirkungen von Androgenen antagonisieren können, identifiziert worden. Über den derzeitigen Kenntnisstand soll im folgenden ein kurzer Überblick gegeben werden.

#### **2.1.2. Estrogenrezeptorliganden**

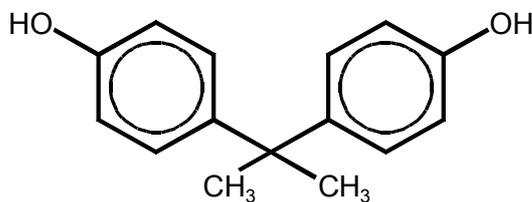
Eine Vielzahl strukturell sehr heterogener Verbindungen, sowohl anthropogenen als auch natürlichen Ursprungs, ist bereits als estrogenaktiv beschrieben. Zu nennen sind aus anthropogener Quelle Detergenzien (z.B. Octylphenol, Nonylphenol) [Jobling und Sumpter, 1993], Kunststoffmonomere und Kunststoffadditive (z.B. Bisphenol A und Phthalate) [Colborn et al., 1993] sowie verschiedene Pestizide (z. B. o,p'-DDT, Kepone, Endosulfan etc.) [Davis, 1993]. Natürliche Estrogenrezeptorliganden werden von Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen produziert (z.B. Coumestrol, Genistein, Zearalenon etc.) [Cassidy, 1998].



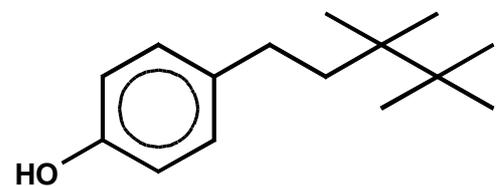
Genistein



o,p'-DDT



Bisphenol A



Nonylphenol

**Abb.2:** Strukturen verschiedener estrogenaktiver Verbindungen

### 2.1.3. Androgenrezeptorliganden

#### 2.1.3.1. Androgene

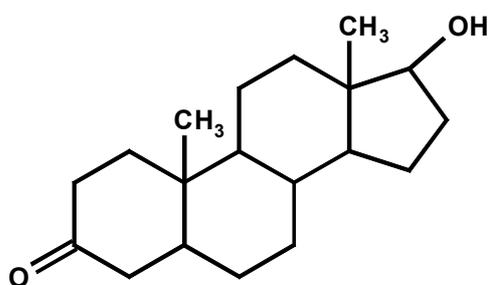
##### Natürliche Androgene

Natürliche Androgene sind Steroidhormone mit 19 C-Atomen. Hauptvertreter ist **Testosteron** (T). Die Biosynthese erfolgt über Squalen, Cholesterin und Pregnenolon. Biologische Wirkform im Körper ist meist das durch 5 $\alpha$ -Reduktase Einwirkung gebildete **5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron** (DHT). Über das Enzym Aromatase erfolgt die Umwandlung von Testosteron zu Estradiol. Die Testosteron-Ausschüttung wird durch die Hypophysenvorderlappenhormone LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH

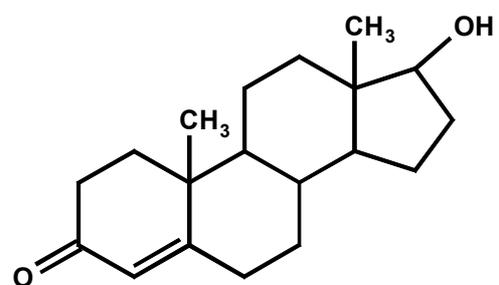
(Follikelstimulierendes Hormon) geregelt. Das übergeordnete Releasing Hormon (GnRH: Gonadotropes Releasing Hormon) wird stoßweise ausgeschüttet. LH fördert die Testosteron-Ausschüttung aus den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens. FSH stimuliert die Bildung eines Androgenbindungsproteins, an das Testosteron im Blut gebunden wird, in den Sertolischen Stützzellen des Hodens. Testosteron hemmt in negativer Rückkopplung die LH-Freisetzung. Die tägliche Sekretionsrate von Testosteron beträgt beim Mann (Hoden) ca. 7 mg, bei der Frau (Ovar, Nebennierenrinde) ca. 0,3 mg.

Wichtige Funktionen sind die Förderung der Geschlechtsdifferenzierung, der Samenbildung und des Geschlechtstribs beim Mann. Weiterhin hat Testosteron anabole, d.h. gewebeaufbauende Wirkung.

[Silbernagel, 1991]



Dihydrotestosteron



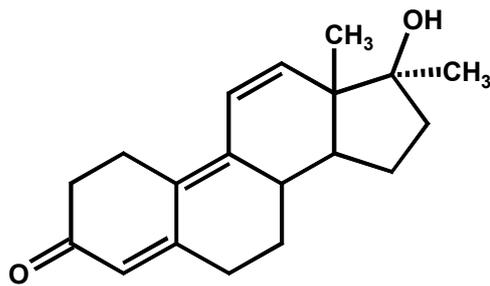
Testosteron

**Abb.3:** Strukturen männlicher Sexualhormone

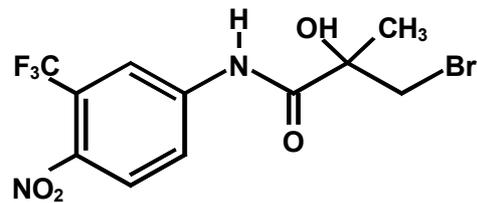
### Synthetische Androgene

Zu den steroidalen Androgenen gehören **Methyltrienolone** (R1881) und **Mibolerone**. [Waller et al., 1996]

Eine Gruppe nichtsteroidaler Androgene wurde vor kurzem beschrieben. Strukturelle Modifikation des bekannten Antiandrogens Bicalutamid (Casodex<sup>®</sup>) führte zu erhöhter androgener Aktivität im Transaktivierungsassay. [Dalton et al., 1998]



R1881



Nichtsteroidales Androgen

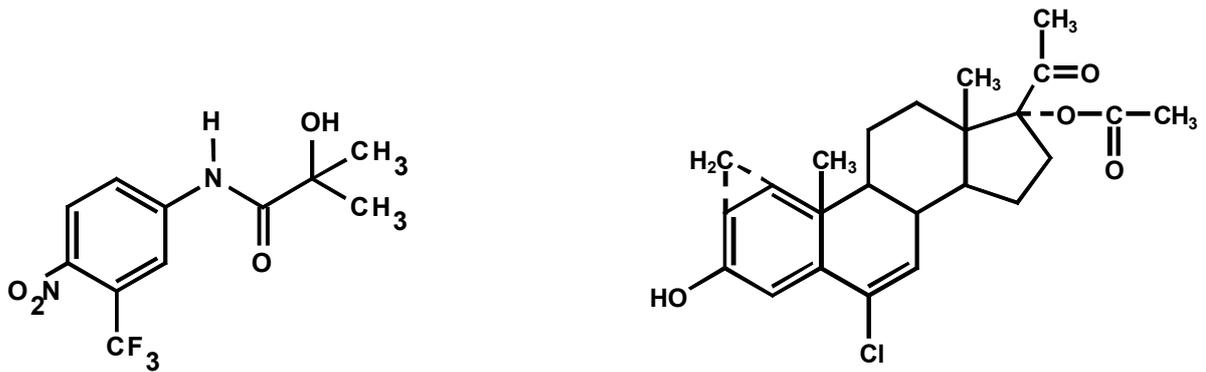
**Abb.4:** Strukturen steroidaler und nicht steroidaler Androgene [Dalton et al., 1998; Waller et al., 1996]

### 2.1.3.2. Antiandrogene

Antiandrogene antagonisieren die durch endogene oder exogene Androgene induzierten biologischen Wirkungen, indem sie kompetitiv die Bindung an den Rezeptor inhibieren. [Teutsch et al., 1994]

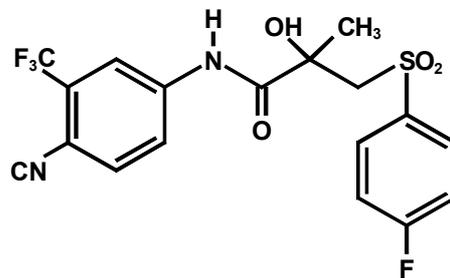
#### **Klinisch etablierte Verbindungen**

Bei der Behandlung von hormonabhängigem Prostatakrebs haben sich verschiedene steroidale und nichtsteroidale Antiandrogene in der Klinik bewährt. Ein steroidaler Vertreter ist der partielle Agonist/Antagonist **Cyproteronacetat**, der auch mit dem Progesteron- und Glucocorticoidrezeptor wechselwirkt. Zu den nichtsteroidalen Antiandrogenern gehören z.B. das bisher als purer Antagonist beschriebene **Hydroxyflutamid** (Metabolit des klinisch eingesetzten Flutamids) sowie der partielle Agonist/Antagonist **Bicalutamid** (Casodex<sup>®</sup>). [Teutsch et al., 1994]



Hydroxyflutamid

Cyproteronacetat



Casodex ®

**Abb.5:** Strukturen klinisch etablierter Antiandrogene bzw. deren Metabolite  
[Teutsch et al., 1994]

## Pestizide

Der Hauptmetabolit von technischem DDT im Warmblüter, **p,p'-DDE**, wurde von Kelce et al., 1995, als potentes Antiandrogen identifiziert. Die Verbindung bioakkumuliert in der Umwelt und findet sich in Lebensmitteln und in menschlichem Fettgewebe. In Körper und Umwelt beträgt die Halbwertszeit über 65 Jahre. [Barquet et al., 1981; Szokolay et al., 1977]

*In vitro* Studien zeigten eine Inhibierung der durch Dihydrotestosteron (DHT) induzierten Transkriptionsaktivierung durch p,p'-DDE. Die Potenz war mit Hydroxyflutamid vergleichbar. [Kelce et al., 1995]

Bei Gabe von p,p'-DDE (100 mg/kg/Tag) an schwangere Ratten vom 14. bis 18. Tag nach der Befruchtung kam es zu Veränderungen an den Geschlechtsorganen männlicher Nachkommen. [Kelce et al., 1995]

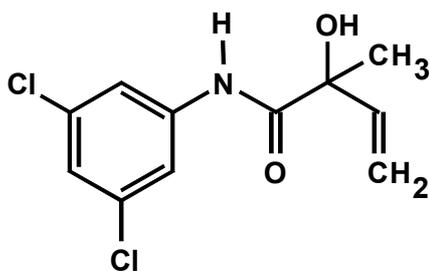
Das Fungizid **Vinclozolin** beeinflusste *in vivo* ebenfalls die sexuelle Differenzierung männlicher Nachkommen bei der Ratte. Perinatale Exposition mit 50 mg/kg/Tag während der Entwicklung führte zum Auftreten von Hypospadien und damit verbundener Unfruchtbarkeit bzw. zu reduzierten Spermienzahlen. Geringere Konzentrationen (12 mg/kg/Tag) reduzierten permanent das Prostatagewicht. Nicht beeinflusst wurde dagegen auch bei längerer Exposition mit hohen Dosen (100 mg/kg/Tag) die Fertilität von erwachsenen männlichen Ratten. [Fail et al., 1995]

Verantwortlich für die antiandrogene Wirkung von Vinclozolin *in vivo* sind die beiden Metaboliten M1 und vor allem M2, die strukturell Hydroxyflutamid ähneln. *In vitro* ist Vinclozolin selbst lediglich ein schwacher Inhibitor, während die beiden Metaboliten eine deutliche, mit Hydroxyflutamid vergleichbare, antiandrogene Aktivität aufweisen. [Wong et al., 1995]

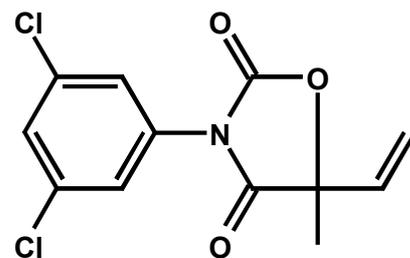
**Procymidone**, ebenfalls ein Dicarboximid Fungizid, ist strukturell Vinclozolin sehr ähnlich. Bei der Metabolisierung kommt es wie bei Vinclozolin zu einer Ringöffnung. Es entsteht ein Struktur analogon zu Hydroxyflutamid. [Waller et al., 1996]

*In vivo*, bei der Induktion von Entwicklungsstörungen des männlichen Genitaltraktes, war Procymidone etwas weniger potent als Vinclozolin.

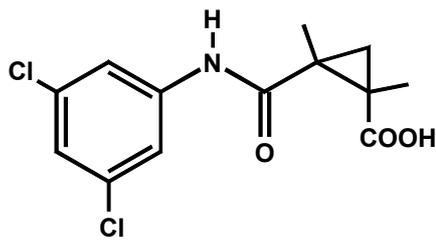
Die *in vitro* Ergebnisse sprechen wiederum für eine metabolische Aktivierung von Procymidone. Im zellfreien System war die Aktivität wesentlich geringer als im Transaktivierungsassay in Affennierenzellen. [Ostby et al., 1999]



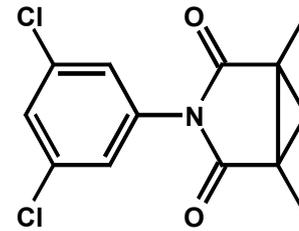
Vinclozolin M2



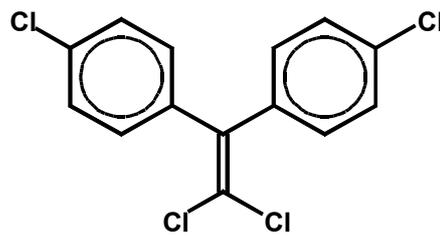
Vinclozolin



Procymidone Metabolit



Procymidone

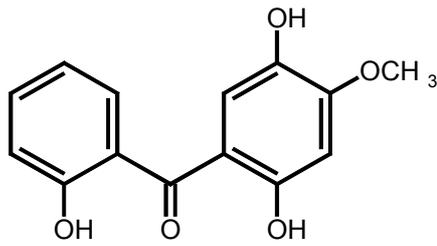


p,p'-DDE

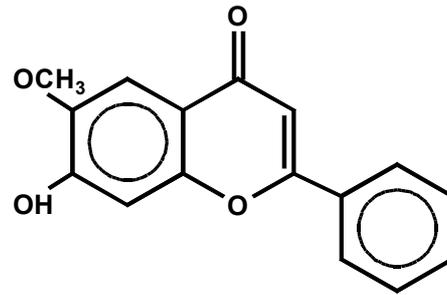
**Abb.6:** Strukturen bekannter antiandrogener Pestizide bzw. Pestizidmetabolite [Waller et al., 1996]

### Phytoantiandrogene

Im Gegensatz zu den bereits gut untersuchten Phytoestrogenen ist über pflanzliche Androgenrezeptorliganden noch wenig bekannt. Eine Interaktion mit dem Androgenrezeptor wurde bisher für eine Reihe von Verbindungen aus der in Indonesien, dem Iran und Vietnam beheimateten Leguminosenart *dalbergia cochinchinensis* gezeigt. Es handelt sich um Verbindungen mit einer Benzophenon- bzw. Flavon-Grundstruktur (Abb.7). [Pathak et al., 1997]



Phytobenzophenon  
(*dalbergia cochinchinensis*)



7-Hydroxy-6-Methoxy-Flavon  
(*dalbergia cochinchinensis*)

**Abb.7:** Strukturen phenolischer Verbindungen aus *dalbergia cochinchinensis* [Pathak et al., 1997]

Zusammenfassend wird deutlich, daß sich Xenoandrogene/-antiandrogene bisher prinzipiell auf zwei Grundstrukturen zurückführen lassen. Auf der einen Seite stehen die mit Hydroxyflutamid verwandten Phenylharnstoff-Analoga, auf der anderen Seite die dem p,p'-DDE ähnlichen Verbindungen, zu denen auch die Benzophenone gehören.

Das Aufstellen von quantitativen Struktur-Aktivitätsbeziehungen zwischen den einzelnen Vertretern der beiden Gruppen kann die Ermittlung von androgenen/antiandrogenen Leitstrukturen ermöglichen. Hierbei kommen verschiedene Molecular Modelling Verfahren zur Anwendung, die im folgenden näher erläutert werden sollen.

## **2.2. Molecular Modelling**

Die dreidimensionale Gestalt eines Moleküls ist von großer Bedeutung für dessen physikalische, chemische und biologische Eigenschaften. Mittels Molecular Modelling Verfahren können realistische dreidimensionale (3D) Molekülstrukturen und ihre physikochemischen Eigenschaften berechnet, dargestellt und bearbeitet werden. Zwei verschiedene Vorgehensweisen sind dabei möglich: Ein Ansatz beruht auf der Extrapolation bekannter experimenteller Daten auf Geometrie und physikochemische Eigenschaften der zu untersuchenden Strukturen. Der andere Ansatz wendet

möglichst genaue Rechenverfahren ausgehend von physikalischen Naturgesetzen (Krauffeldmethoden, quantenmechanische Verfahren) an. [Böhm et al., 1996]

Zur Ermittlung der 3D-Struktur von Androgenrezeptor-Liganden wurden in dieser Arbeit Krauffeldmethoden herangezogen.

### **2.2.1. Krauffeldmethoden**

Krauffeldmethoden sind empirische Verfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und –energien. Ziel ist die Ermittlung einer energetisch günstigen dreidimensionalen Struktur eines Moleküls. Die Beschreibung der zwischen den Atomen wirkenden Kräfte erfolgt in Form einer analytischen Funktion mit anpaßbaren Parametern. Berücksichtigt werden dabei sowohl kovalente als auch nichtkovalente Kräfte. Die zentrale Annahme ist, daß Bindungslängen und –winkel in Molekülen nach Möglichkeit Standardwerte einnehmen. Sterische Wechselwirkungen (van-der-Waals-Wechselwirkungen) können dies unter Umständen verhindern.

Um die Struktur und Energie von Molekülen ausreichend zu berechnen, werden die Terme van-der-Waals-Wechselwirkung, Bindungsstreckung und Winkeldeformation, sowie die Verdrehung von Diederwinkeln berücksichtigt.

Die Ableitung eines Krauffelds erfolgt durch Kalibrierung an experimentellen Daten (3D-Strukturen, aus Infrarot- und Ramanspektren abgeleitete Kraftkonstanten) und quantenmechanischen Rechnungen. In einem Krauffeld werden mehrere unterschiedliche Atomtypen pro Element eingesetzt, um z.B. verschiedenen Bindungs- und Hybridisierungstypen gerecht zu werden.

Bei Krauffeldberechnungen können Probleme auftreten, die bedingt sind durch:

- die Wahl des Systems
- die Wahl der Startgeometrie

Der Einfluß des Lösungsmittels sollte berücksichtigt werden, da sich sowohl Ligand als auch Protein im biologischen System in wässrigem Medium befinden. Fehlt der Einfluß von Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel (z.B. Wasserstoffbrücken), kommt es bei der Optimierung eines Moleküls zu einer energetischen Begünstigung einer

Konformation mit intramolekularen Wasserstoffbrücken. Es muß hier kritisch überprüft werden, ob es sich um unrealistische Artefakte handelt.

Wählt man eine energetisch ungünstige Startgeometrie, führt die Kraftfeldrechnung zu einer Energieminimierung bis zum nächsten lokalen Minimum auf der Energiehyperfläche. Das bedeutet, daß sich die energieminierten Strukturen bei verschiedenen Startgeometrien voneinander unterscheiden können. Es sollten also mehrere Kraftfeldrechnungen mit unterschiedlichen Startgeometrien durchgeführt werden. [Burkert und Allinger, 1982; Böhm et al., 1996]

### **2.2.2. Konformationsanalyse**

Verschiedene Konformationen eines Moleküls können durch Drehung um einzelne Bindungen ineinander überführt werden. In einem realen Molekül sind die Drehungen um diese Bindungen nicht völlig frei, sondern unterliegen einem Potential. Während der Drehungen „rastet“ das Molekül bei bestimmten Winkeln in energetisch günstigen Lagen ein. Die Potentialverläufe können eine Vielzahl von Maxima und Minima entlang einer vollen Umdrehung aufweisen. Diese liegen, relativ zueinander, auf unterschiedlichen Energieniveaus. Das tiefste Minimum, auch als globales Minimum bezeichnet, kann wie folgt ermittelt werden: Die drehbaren Bindungen werden systematisch gedreht (z.B. um jeweils  $10^\circ$ ), die jeweilige Energie des Moleküls in einem Kraftfeld berechnet und so alle relativen Minima bestimmt.

In der Regel ist die Konformation eines isolierten Rezeptorliganden nicht mit der rezeptorgebundenen Konformation identisch. Sie wird zwar meistens in einem energetisch günstigen Bereich liegen, aber nicht unbedingt mit der energetisch günstigsten Konformation übereinstimmen. Es wird also das dem gebundenen Zustand entsprechende Minimum gesucht. Im folgenden soll die Erarbeitung von Kriterien zur Definition der rezeptorgebundenen Konformation dargestellt werden. [Klebe und Mietzner, 1994; Böhm et al., 1996]

### **2.2.3. Pharmakophorhypothese und Molekülvergleich**

Durch die Struktur der Bindungstasche des Rezeptors wird festgelegt, welche funktionellen Gruppen auf Seiten des Liganden für eine Bindung erforderlich sind. Die räumliche Anordnung dieser funktionellen Gruppen im Liganden bezeichnet man als den Pharmakophor, der sich an den Gegengruppen im Protein orientiert. Dabei kann sich die Rezeptorbindetasche auch an die Form des Liganden anpassen („induced fit“), so daß auch sterisch aufwendigere Moleküle noch akzeptiert werden.

Um einen Pharmakophor im Raum zu definieren, benötigt man mindestens drei wechselwirkende Gruppen. Ein Molekülvergleich beinhaltet die Überlagerung von nach einem Pharmakophormodell äquivalenten Molekülteilen. In einem Rechenverfahren werden an diese Gruppen „virtuelle“ Federn angebracht, die sie miteinander verknüpfen. Unter dem Zug der Federn werden die Moleküle räumlich überlagert. Gleichzeitig wird für jedes der Moleküle ein Kraftfeld berücksichtigt, um die Molekülgeometrie nicht völlig zu verzerren. Die gefundene Lösung hängt dabei wieder von den Startbedingungen ab.

Eine Verknüpfung der systematischen Konformationssuche mit einem Pharmakophorvergleich ist ein als „Active Analog Approach“ bezeichnetes Verfahren. Es werden äquivalente Pharmakophorgruppen definiert und am Beispiel eines möglichst starren Moleküls des Datensatzes eine systematische Konformationssuche durchgeführt. Die Abstandsmuster der funktionellen Gruppen während der Suche werden gespeichert und mit den Abstandsmustern der anderen Moleküle verglichen. Daraus ergeben sich die möglichen Bindungsgeometrien der pharmakophoren Gruppen in den Liganden. [Klebe, 1993; Böhm et al., 1996]

### **2.2.4. Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR)**

Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR) erfassen und quantifizieren Zusammenhänge zwischen chemischen Strukturen und biologischen Wirkungen.

Bei den als 3D-QSAR-Methoden bezeichneten Verfahren werden von der 3D-Struktur eines Moleküls abgeleitete Kenngrößen mit den biologischen Daten korreliert. Ziel dieser Ansätze ist die Berechnung und Vorhersage von biologischen Aktivitäten. Voraussetzungen für 3D-QSAR Modelle sind: Alle Moleküle müssen am gleichen

biologischen Target an der gleichen Bindungsstelle angreifen. Sie müssen außerdem ein sehr ähnliches Grundgerüst und äquivalente Pharmakophore aufweisen. [Waller et al., 1996]

Grundlage der 3D-QSAR ist eine räumliche Überlagerung der Wirkstoffmoleküle nach einem der im vorangehenden beschriebenen Verfahren. Diese Überlagerung soll die relative Orientierung in der Bindungstasche so gut wie möglich annähern.

Substanzspezifische Größen für die Korrelation von dreidimensionalen Eigenschaften von Molekülen mit den biologischen Daten sind die sterischen (van-der-Waals-Potential) und elektrostatischen (Coulomb-Potential) Wechselwirkungen. Ein für den Vergleich dieser Wechselwirkungen geeignetes Verfahren ist die CoMFA-Methode (**C**omparative **M**olecular **F**ield **A**nalysis). Probleme können sich ergeben, da diese Methode zwar die enthalpischen (sterischen und elektrostatischen) Beiträge zur Bindungsaffinität, nicht aber die entropischen berücksichtigt. In erster Näherung nimmt man jedoch an, daß diese für alle Moleküle des Datensatzes gleich sind.

Voraussetzung für eine CoMFA-Studie ist ein Datensatz von mindestens 15 strukturell ähnlichen Verbindungen, deren biologische Daten sich über einige Zehnerpotenzen erstrecken. Alle Moleküle werden einer systematischen Konformationsanalyse unterzogen und nach einem Pharmakophorvergleich wie besprochen überlagert. Die überlagerten Moleküle werden in ein Gitter eingebettet, das eine Maschenweite von 1 bis 4 Angström hat. An jeden Gitterpunkt setzt man eine Sonde, z.B. ein Atom mit den Eigenschaften eines Wasserstoffs, Kohlenstoffs oder Sauerstoffs. Die Wechselwirkungsenergien zwischen dieser Sonde und jedem Molekül des Datensatzes werden berechnet. Als das Feld des Moleküls wird die Gesamtheit der Wechselwirkungsbeiträge an den Gitterpunkten bezeichnet. Die Felder der Moleküle des Datensatzes werden miteinander verglichen.

Sterische und elektrostatische Wechselwirkungen werden für Kraftfeldrechnungen mit einem Lennard-Jones- bzw. Coulomb-Potential beschrieben. Geht der Abstand zwischen der Sonde und einem Atom des Moleküls gegen Null, z.B. nahe der Oberfläche des Moleküls, nehmen die beiden Potentiale dem Betrag nach unendlich große Werte an. Sie müssen in einer CoMFA-Analyse durch Vorgabe eines Grenzwerts und Limitierung auf den dort erreichten Wert vermieden werden.

Die Gesamtheit aller Feldbeiträge stellt eine mehrdimensionale Matrix dar. Zur Erklärung der abhängigen Variablen, z.B. der Bindungsaffinität, kann die Regressionsanalyse daher nicht eingesetzt werden. Als statistische Methode eignet

sich die PLS-Analyse (Partial Least Squares). Sie extrahiert aus einer großen Datenmenge relevante und erklärende Faktoren, die sogenannten PLS-Vektoren. Diese beschreiben die Bereiche der Felder, die mit den experimentellen Daten am besten korrelieren. Aufgrund der vielen auszuwertenden Feldpunkte muß eine strenge Kontrolle der statistischen Signifikanz der abgeleiteten Ergebnisse vorgenommen werden. Dies geschieht durch einen als Kreuzvalidierung bezeichneten Test. Dem Datensatz werden dabei eine oder mehrere Verbindungen zufällig entnommen. Mit den verbleibenden Daten wird ein Modell erstellt, anhand dessen die Affinitäten der herausgenommenen Verbindungen vorhergesagt werden. Die Güte der Vorhersagen, ausgedrückt durch den Wert  $q^2$ , stellt ein Maß für die Zuverlässigkeit und Signifikanz des Modells dar. Ein Wert von +1 sagt aus, daß ein perfektes Modell erzielt wurde. Bei einem Wert von 0 ist die Vorhersage des Modells nicht besser oder schlechter als kein Modell. Daher ist ein Modell nur dann signifikant, wenn die  $q^2$ -Werte oberhalb von 0,4 - 0,5 liegen.

Das abgeleitete Modell kann genutzt werden, um die biologische Aktivität neuer, noch nicht getesteter Verbindungen vorherzusagen. Voraussetzung ist allerdings, daß die Strukturvariation im Rahmen des Modells bleibt. [Kubinyi, 1993; Böhm et al., 1996]

## 2.3. Signaltransduktion durch Hormone

### 2.3.1. Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren sind Mitglieder der großen Familie der Kernrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren in vielen verschiedenen Spezies, Vertebraten und Invertebraten, wirken.

Zur Superfamilie der Kernrezeptoren zählen außer den Steroidhormonrezeptoren (Estrogen-, Progesteron-, Androgen-, Glucocorticoid- und Mineralcorticoidrezeptor) auch Thyroid-, Retinolsäure- und Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptoren sowie eine Anzahl sogenannter "Orphan" Rezeptoren, deren Liganden bisher noch nicht bekannt sind. Die einzelnen Mitglieder sind sowohl in der primären Aminosäuresequenz als auch in der Organisation der funktionellen Domänen verwandt. Dies läßt vermuten, daß viele Aspekte des Wirkungsmechanismus konserviert sind. [White und Parker, 1998; Gronemeyer, 1992; Beato, 1991; Beato, 1989]

Steroidhormonrezeptoren spielen als ligandinduzierbare Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle in der endokrinen Signaltransduktion.

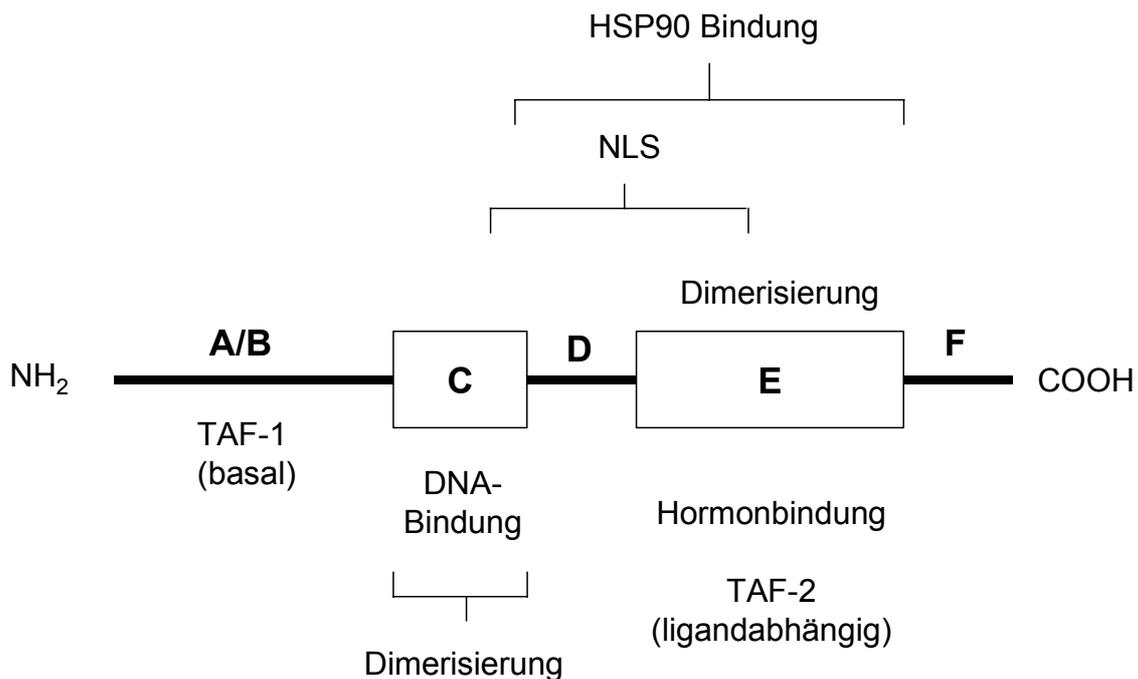
Eine Vielzahl verschiedener Liganden bindet spezifisch an diese Steroidhormonrezeptoren. Dadurch sind sie in der Lage durch die Kontrolle von Gennetzwerken Einfluß auf Wachstum, Entwicklung und Homöostase zu nehmen. Der Ligand-Rezeptor-Komplex wirkt dabei als Transkriptionsfaktor. Durch die Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen, den sogenannten **Hormone Responsive Elements** (HRE), kommt es zur Bildung von Transkriptionskomplexen, die die Genexpression abhängig von Zielgen und -gewebe induzieren oder hemmen. [Wahli, 1991]

Kernrezeptoren können zusätzlich die Transkription von nicht über Hormone Responsive Elements regulierten Genen beeinflussen, indem sie die Aktivität von anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1 oder NF- $\kappa$ B, modulieren. [White und Parker, 1998]

### 2.3.1.1. Aufbau von Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren sind strukturell ähnlich aufgebaut. Sie lassen sich in sechs verschiedene Regionen A - F mit drei funktionellen Domänen (hormonbindende, DNA-bindende und Transaktivierungs-Domäne) unterteilen. Diese sind innerhalb der Superfamilie - mit Ausnahme der Transaktivierungs-Domäne - hochkonserviert .

Aufgrund der Sequenz ihrer Responsive Elements lassen sich zwei Gruppen von Rezeptoren unterscheiden: Eine Gruppe erkennt die Sequenz 5'-TGACCT (Estrogen-, Thyroidhormon-, Retinolsäure- und Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptoren), die zweite bindet an die Sequenz 5'- TGTCT (Progesteron-, Glucocorticoid-, Androgen- und Mineralcorticoidrezeptoren). [Gronemeyer, 1992; Cude et al., 1999]



**Abb.8:** Schematische Darstellung eines Steroidhormonrezeptors [modifiziert nach Gronemeyer, 1992]

***Die hormonbindende Domäne [HBD] [Region E]***

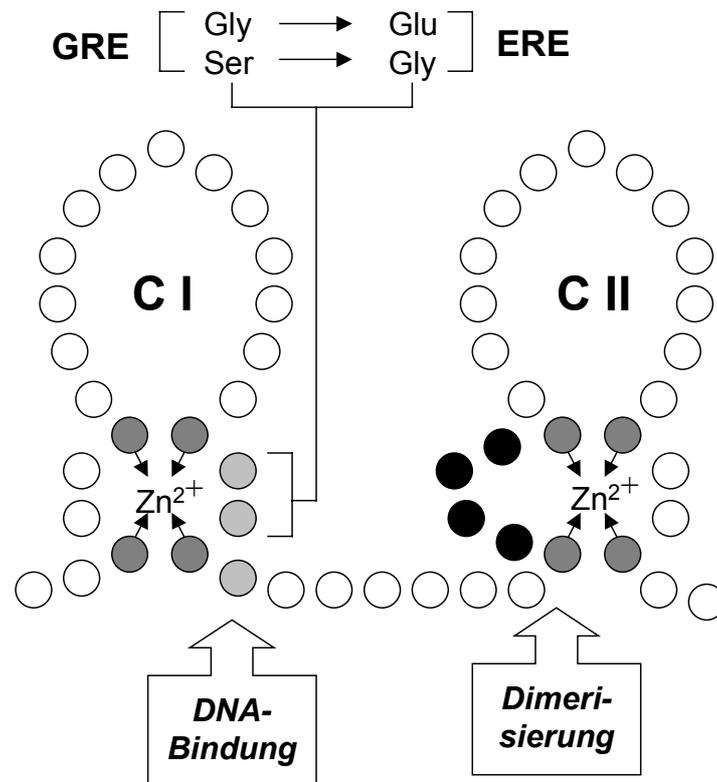
Die carboxyterminale hormonbindende Domäne der Steroidhormonrezeptoren besitzt ein Molekulargewicht von 25 kDa und enthält eine Vielzahl von hydrophoben Aminosäuren. Für die Bindung des Liganden an die hydrophobe Tasche des Rezeptors ist die Vollständigkeit dieser Domäne unerlässlich. [Green und Chambon, 1988]

Weitere Funktionen dieser Region sind neben der Ligandenbindung die Dimerisierung des Rezeptors, die ligandabhängige Kern-Translokation des GR, die Interaktion mit Heat Shock Proteinen sowie die ligandabhängige Transkriptionsaktivierung (TAF II). [Gronemeyer, 1992; Carson-Jurica, 1990]

***Die DNA-bindende Domäne DBD [Region C]***

Region C des Rezeptors ist als DNA-bindende Domäne für die Aktivierung spezifischer Zielgene verantwortlich. Sie ist reich an basischen Aminosäuren und Cystein und setzt sich aus zwei Untereinheiten CI und CII zusammen: Region CI besteht aus vier konservierten Cysteinresten und hydrophoben Aminosäuren, Region CII enthält fünf konservierte Cysteine und basische Aminosäuren. Jeweils vier Cysteine einer Untereinheit bilden durch tetraedrische koordinative Bindung eines Zinkions einen sogenannten "Zinkfinger" aus (Abb. 9).

Region CI und damit der erste "Zinkfinger" spielt die entscheidende Rolle bei der Interaktion mit spezifischen Zielgenen. Region CII wirkt bei der Dimerisierung mit und hat die Aufgabe, die Rezeptor-DNA-Bindung durch Wechselwirkung mit dem DNA-Phosphat Rückgrat zu stabilisieren. [Cude et al., 1999; Green und Chambon, 1988; Beato, 1989]



**Abb.9:** Struktur der DNA-bindenden Domäne von Steroidhormonrezeptoren  
[modifiziert nach Lewin, 1998; Green und Chambon, 1988]

### **Transaktivierungs-Domäne [Region A\B]**

Die aminoternale Region A\B der Rezeptoren ist wenig konserviert und spielt eine Rolle bei der Aktivierung der Transkription. Sie beinhaltet den ligandunabhängigen Transkriptionsfaktor (TAF 1), der die Affinität des Rezeptors zur DNA beeinflusst. Der genaue Wirkmechanismus ist noch unbekannt. Postuliert wird, daß die Transaktivierungs-Domäne mit spezifischen Begleitproteinen interagiert und dadurch eine für die DNA-Interaktion benötigte Struktur erreicht wird. Die Diversität und

unterschiedliche Länge der Domäne bei den verschiedenen Rezeptoren weist darauf hin, daß sie eine Rolle für die Spezifität der Genaktivierung spielt. [Cude et al., 1998; Kumar und Thompson, 1999; Beato, 1989; Green und Chambon, 1988]

### **2.3.2. Rezeptor-assoziierte Proteine**

Die Ligandenbindung führt, wie heute allgemein angenommen wird, zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die die DNA-bindende Domäne des Rezeptors enthüllt. Obwohl die Art und Weise dieser Änderung noch unklar erscheint, ist die Beteiligung von Rezeptor-assoziierten Proteinen (RAPs) gesichert. [Church-Landel et al., 1995]

Mindestens drei Mitglieder der Heat Shock Protein Familie sind bisher als RAPs identifiziert worden: Hsp 90, Hsp 70 und Hsp 56. Heat Shock Proteine (HSP) sind Chaperone, die in allen eukaryontischen Zellen vorkommen. Sie besitzen ATPase Aktivität und wirken bei der Proteinfaltung mit. [Cude et al., 1999]

Hsp 90 bindet an die hormonbindende Domäne der Steroidhormonrezeptoren, induziert dadurch eine zur Ligandbindung fähige Konformation und schützt gleichzeitig vor proteolytischen Enzymen. Nach der Hormonbindung kommt es zur Abdissoziation. Verknüpfung mit anderen Signaltransduktionswegen könnte durch eine Kinasefunktion oder Modulation von Kinasen durch Hsp 90 möglich sein. [Caamano et al., 1998; Church-Landel et al., 1995; Pratt, 1993]

Hsp 70 und Hsp 56 sind ebenfalls Teil des an den inaktiven Rezeptor gebundenen Hsp-Komplexes. Hsp 56 bindet durch Molybdat stabilisiert an Hsp 90. Im Gegensatz zu Hsp 90 findet sich Hsp 70 bei den meisten Steroidhormonrezeptoren (GR, ER, AR) auch assoziiert mit den Rezeptor-DNA-Komplexen im Zellkern. Dies deutet auf eine regulatorische Rolle bei der Rezeptor-DNA-Bindung hin.

[Cude et al., 1999; Church-Landel et al., 1994; Church-Landel et al., 1995; Smith et al., 1993]

### **2.3.3. Lokalisierung in der Zelle**

Damit Steroidhormonrezeptoren ihre Funktion als ligandinduzierbare Transkriptionsfaktoren erfüllen können, müssen sie die Kernmembran passieren. Proteine mit einem Molekulargewicht unter 60 kDa können passiv durch Kernporen diffundieren. Größere Proteine benötigen spezifische Kern-Lokalisierungssignale (NLS) für einen aktiven Transport in den Kern. [Jenster et al., 1993; Ylikomi und Gronemeyer, 1992]

Ein Modell postuliert den Kernimport und -export als kontinuierlichen bidirektionalen Prozeß, bei dem der Rezeptor aus dem Kern diffundiert und aktiv wieder zurücktransportiert wird. Durch diese Transport-/Diffusionsrate wird die zelluläre Verteilung der Rezeptoren sowie das Gleichgewicht zwischen der Bindung an Kern- und Cytoplasmastrukturen wie Heat Shock Proteinen und Cytoskelett beeinflusst. Die Regulation des Kerntransports erfolgt nicht direkt durch die Ligandbindung. Über zwei Mechanismen könnte der Ligand den Transport aber dennoch indirekt beeinflussen. Eine Phosphorylierung in oder in der Nähe der NLS Region, möglicherweise induziert durch den Liganden, könnte an NLS-Kernporen-Wechselwirkungen und am Kernimport beteiligt sein. Der Rezeptor könnte auch durch eine Maskierung der NLS Region im Cytoplasma zurückgehalten werden, z.B. durch Wechselwirkung des Heat Shock Protein 90 mit der hormonbindenden Domäne. Ligandinduzierte Konformationsänderungen oder Dissoziation des Heterokomplexes könnten das NLS freilegen und zur Translokation führen. [DeFranco, 1999; Jenster et al., 1993; Cadepond et al., 1992]

Die bevorzugte Lokalisierung der verschiedenen Steroidhormonrezeptoren ist nicht einheitlich. Sie ergibt sich aus dem Verhältnis des Kernimports zum Kernexport, das sich aus der Summe vieler, kinetisch unterschiedlicher Schritte zusammensetzt. [DeFranco, 1999]

Progesteronrezeptor und Estrogenrezeptor sind im Kern lokalisiert. In Abwesenheit von Hormon liegen sie lose an Kernstrukturen assoziiert vor. Durch die Ligandenbindung verstärkt sich die Assoziation. [Cadepond et al., 1992; Simental et al., 1991]

Ein in Kulturzellen transient überexprimierter Androgenrezeptor ist in Abwesenheit von Hormon im Cytoplasma lokalisiert [Simental et al., 1991] oder zwischen Cytoplasma

und Kern verteilt [Jenster et al., 1991]. Bei Anwesenheit von Hormon liegt der AR ausschließlich im Kern vor.

Der Glucocorticoidrezeptor liegt ungebunden cytoplasmatisch vor, bei Hormonzugabe findet man eine Lokalisierung im Kern. Cytoplasmatische Rezeptorlokalisierung wurde ebenfalls für den Mineralcorticoid- und den Vitamin D<sub>3</sub> - Rezeptor gefunden. [Cadepond et al., 1992; Picard und Yammamoto, 1987]

In einer Modellvorstellung für die Translokation wirkt der Hsp-Komplex als Transportpartikel oder „Transportosom“ für den Rezeptor. Es ist bekannt, daß sich Partikel entlang von Mikrotubuli durch das Cytoplasma zum Kern bewegen. Für die Assoziation des Rezeptor-Heterokomplexes mit den Mikrotubuli ist vermutlich das Hsp 56 verantwortlich. In verschiedenen Zelltypen wurde es assoziiert mit filamentösen cytosolischen Strukturen gefunden. Weiterhin bestimmt Hsp 56 vermutlich die Richtung der Heterokomplexbewegung. Eine konservierte negative Sequenz des hsp 56 verbindet die ersten beiden Domänen und hat das Potential zur direkten Interaktion mit dem kationischen Kern-Lokalisierungssignal (NLS) der Steroidhormonrezeptoren sowie vieler anderer Proteine.

Durch die Ligandenbindung wird die Assoziation des Rezeptors an die Heat-Shock Proteine gelockert, so daß der Rezeptor-Heterokomplex nicht länger fest an das Transportsystem andockt ist, sondern lose assoziiert entlang des Cytoskelett-Systems wandern kann. [Pratt, 1993; Pratt et al., 1994]

#### **2.3.4. Steroidhormonrezeptor-kontrollierte regulatorische DNA-Sequenzen**

##### **2.3.4.1. Hormone Responsive Elements**

Als Hormone Responsive Elements (HRE) werden die spezifischen DNA-Sequenzen bezeichnet, an die Steroidhormonrezeptoren mittels ihrer DNA-bindenden Domäne binden. Sie sind auf der DNA meist innerhalb der Promotoren für hormonkontrollierte Zielgene lokalisiert.

Die HREs können entsprechend den Untergruppen der Rezeptoren in zwei Gruppen eingeteilt werden: An ein gemeinsames HRE binden der GR, AR, MR und PR, das

Estrogen Responsive Element (ERE) wird vom ER, TR, Vitamin D<sub>3</sub>- und Retinolsäurerezeptor erkannt. [Beato, 1991]

### CONSENSUS RESPONSIVE ELEMENTS FOR NUCLEAR RECEPTORS

<b>ER</b>	
<b>TR</b>	GGTACAnnnTGTTCT
<b>RR</b>	
<b>GR</b>	
<b>PR</b>	AGGTCAnnnTGACCT
<b>AR</b>	
<b>MR</b>	

**Abb.10:** Responsive Elements der Steroidhormonrezeptoren [modifiziert nach Beato, 1991]

Die "Consensus" Sequenzen der HREs weisen eine palindromische Struktur bestehend aus 15 Basenpaaren auf. Sie setzen sich aus zwei jeweils sechs bp langen Armen getrennt durch einen drei bp langen "Spacer" zusammen. Der symmetrische Aufbau ermöglicht die Bindung des aktivierten Rezeptor-Dimers. [Green und Chambon, 1988; Mußler, 1999]

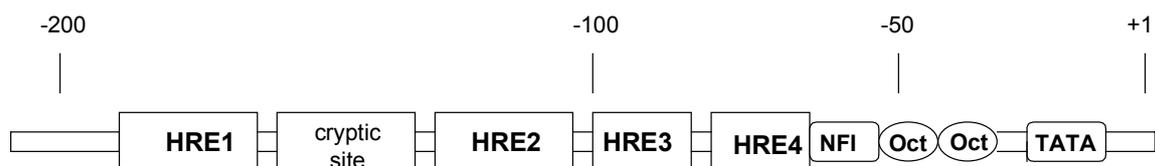
### 2.3.4.2. Androgenabhängige Promotoren

Genregulation bei Eukaryonten erfolgt durch die Kombination vieler regulatorischer Proteine und Transkriptionsfaktoren, die miteinander und mit weiteren cis-regulatorischen Elementen in Promotor- und Enhancer-Regionen wechselwirken. Die Chromatinstruktur kann vermutlich direkt in diesen Prozeß eingreifen, wie das folgende Beispiel zeigt. [Beato, 1995]

#### 2.3.4.2.1. Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) Promotor

Das Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) gehört zur Gruppe der Tumorroretroviren und verursacht Mammakarzinome in der Maus.

Der Mouse Mammary Tumor Virus Promotor gehört zu den hormonregulierten Promotoren, die bereits am besten untersucht sind. Die Regulation der Transkription kann durch Liganden des GR, PR und AR erfolgen. Diese Hormone stellen aber nicht die einzigen Kontrollfaktoren für die Expression des MMTV dar, die weiteren vielfältigen, komplexen Mechanismen unterliegt. [Günzburg und Salomons, 1992]



**Abb.11:** Schematische Darstellung der Lokalisation der regulatorischen Sequenzen im MMTV-LTR [nach Beato, 1996]

Die Sequenzen, die an der durch Hormonrezeptoren vermittelten Stimulation der MMTV Transkription beteiligt sind, liegen im MMTV Promotor in der U<sub>3</sub> Region des

Long Terminal Repeat (LTR). *In vivo* ist die LTR des MMTV auf sechs Nukleosomen (A-F) gewunden. Ein Nukleosom besteht aus einem Histonkern (je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen Oktamerkomplex), um den ein DNA-Doppelstrang von jeweils etwa 146 Basenpaaren in eindreiviertel Windungen sehr fest gebunden ist. Ein 20 bis 100 bp langer, an Histon 1 gebundener "Linker"-DNA-Abschnitt verbindet die Nukleosomen. [Hörz, 1994; Wolffe, 1994]

Die MMTV-LTR enthält eine Hormone Responsive Region mit vier HREs, die im Nukleosom unterschiedlich orientiert sind: Die große Furche zweier HREs ist auf den Histonkern gerichtet, während die große Furche der anderen beiden Rezeptorbindungsstellen entgegengesetzt, d.h. nach außen zur umgebenden Lösung, orientiert und somit zugänglich für die Rezeptorbindung ist. [Beato, 1995]

Eine Nuclear Faktor 1 (NF1) Bindungsstelle, die mit dem nächsten HRE überlappt, ist ebenfalls in der MMTV-LTR Region lokalisiert. NF1 ist sowohl an der Kontrolle der basalen als auch der hormoninduzierten Transkription des MMTV beteiligt.

Weiterhin enthält die MMTV-LTR zwei Oktamer-Motive, an die der Transkriptionsfaktor OTF1 bindet. Die Bindung von OTF1 wird durch Rezeptoranlagerung erleichtert und ist für die hormonelle Transkriptionsaktivierung ebenfalls von Bedeutung.

Wie die meisten Promotoren, die durch die RNA-Polymerase II erkannt werden, hat der MMTV Promotor ein TATA-Motiv, an das der Transkriptionsfaktor TFIID bindet. [Günzburg und Solomons, 1992]

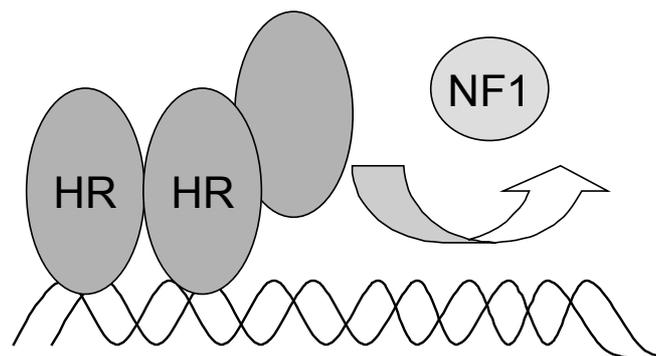
Der MMTV Promotor ist ein Beispiel für die Notwendigkeit einer spezifischen nukleosomalen Organisation. Nukleosom B enthält die vier HREs, die Oktamer-Motive sowie die Bindungsstelle für NF1.

Hormonrezeptor (HR) und NF1 können auf nackter DNA nicht gleichzeitig an ihre Sequenzelemente binden (Abb. 12 A).

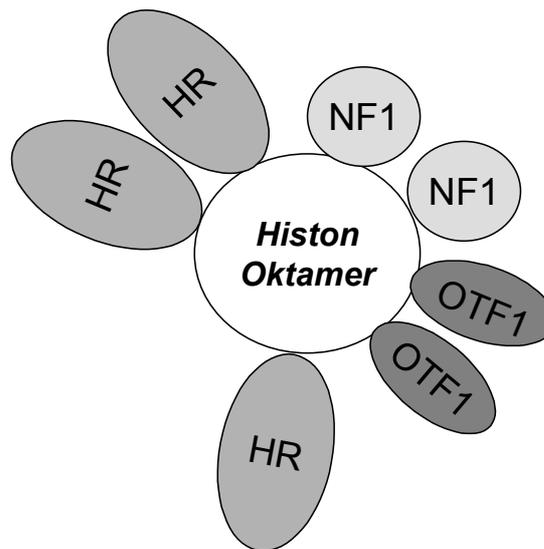
In neueren Studien an nukleosomaler DNA zeigte sich, daß nach Hormonzugabe eine gleichzeitige Bindung des Rezeptors, NF1 und OTF1 an den MMTV Promotor auftrat. Die Rotationsposition der DNA im Nukleosom B erlaubt die Bindung des Hormonrezeptors an die zwei äußeren HREs I und IV, während die zwei zentralen HREs II und III, die NF1 Bindungsstelle und das Oktamer-Motiv nicht zugänglich sind. Eine nach der Rezeptorbindung an die HREs I und IV auftretende Neuordnung erleichtert dann die Besetzung der zwei zentralen HREs. Durch die volle Besetzung

der vier HREs mit Hormonrezeptoren könnte wiederum der Zugang für NF1 und OTF1 ermöglicht werden. [Beato, 1995]

Durch die Windung der DNA in einem Nukleosom kommt es zu einer radialen Orientierung der gebundenen Proteine, wodurch die sterische Hinderung reduziert wird. Die nukleosomale Struktur verhindert also nicht nur die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA vor der Hormoninduktion, sondern erleichtert auch die gleichzeitige Wechselwirkung von Rezeptoren, NF1 und OTF1 auf dem neuangeordneten Nukleosom. Dies erklärt, warum sich das Nukleosom nicht wie früher angenommen auflöst, da die nukleosomale Struktur die Voraussetzung für die Bindung der Transkriptionsfaktoren an benachbarte Bindungsstellen ist (Abb.12 B). [Beato, 1995]



**Abb.12A:** Lineare Anordnung des MMTV-Promotors: Der Hormonrezeptor und NF1 können nicht gleichzeitig an die DNA binden



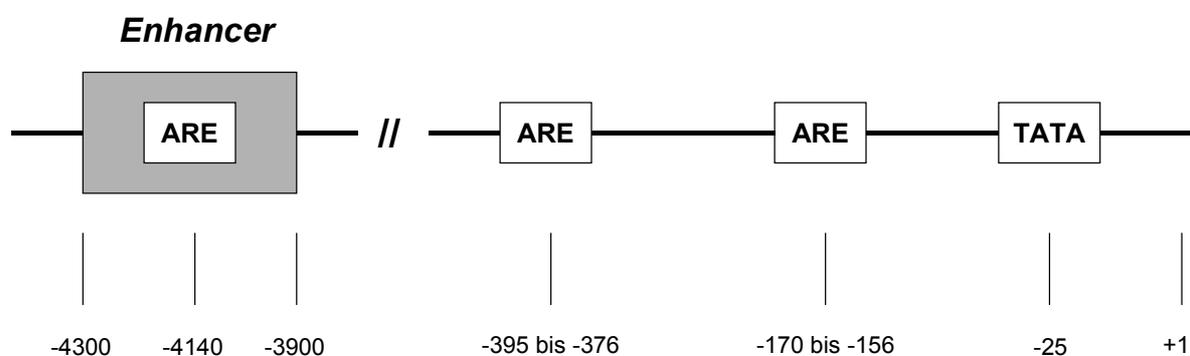
**Abb.12B:** Um ein Histonoktamer gebundene Nukleotidsequenz: Die sterische Behinderung, die in Abb. A dargestellt ist, wird durch die Bindung an die Nukleosomenoberfläche überwunden.

**Abb.12:** Schematische Darstellung der Interaktion des Hormonrezeptors, sowie der Faktoren NF-1 und OTF-1 mit den Promotorsequenzen der freien DNA (Abb. A) und des Nukleosoms B (Abb. B) [nach Beato, 1995; Lewin, 1998]

#### **2.3.4.2.2. PSA (Prostata Spezifisches Antigen) Promotor**

Prostata Spezifisches Antigen (PSA) ist ein 33 kDa Glykoprotein, das in den Epithelzellen der Prostata und in den Brustdrüsen produziert wird. PSA wird in die Samenflüssigkeit sekretiert oder von den Brustwarzen abgesondert. Es handelt sich um eine Serinprotease, deren physiologische Rolle die Verflüssigung des Samens durch Fragmentierung von Proteinen ist. Im Serum liegt PSA zu einem kleinen Teil in freier Form vor, der Rest bildet Komplexe mit Serinproteaseinhibitoren ( z.B.  $\alpha$ 1- Antichymotrypsin). [Herrala et al., 1998]

Klinisch eingesetzt wird PSA als Tumormarker bei der Behandlung und Prognose von Prostatakrebs. Die Regulation der Transkription ist androgenkontrolliert und nimmt nach einer Kastration stark ab. Bis zu 5824 Basenpaaren stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts befindet sich die Promotor und Enhancer Region. Sie beinhaltet neben der TATA Box zwei Androgen Responsive Elements (AREs) (-170 bis -156; -4148 bis -4134) und eine Androgen Responsive Region (ARR) (-395 bis -376). [Sadar, 1999]



**Abb.13:** Schematische Darstellung der regulatorischen Elemente des PSA Promotors  
[nach Sadar, 1999; Cleutjens et al., 1997]

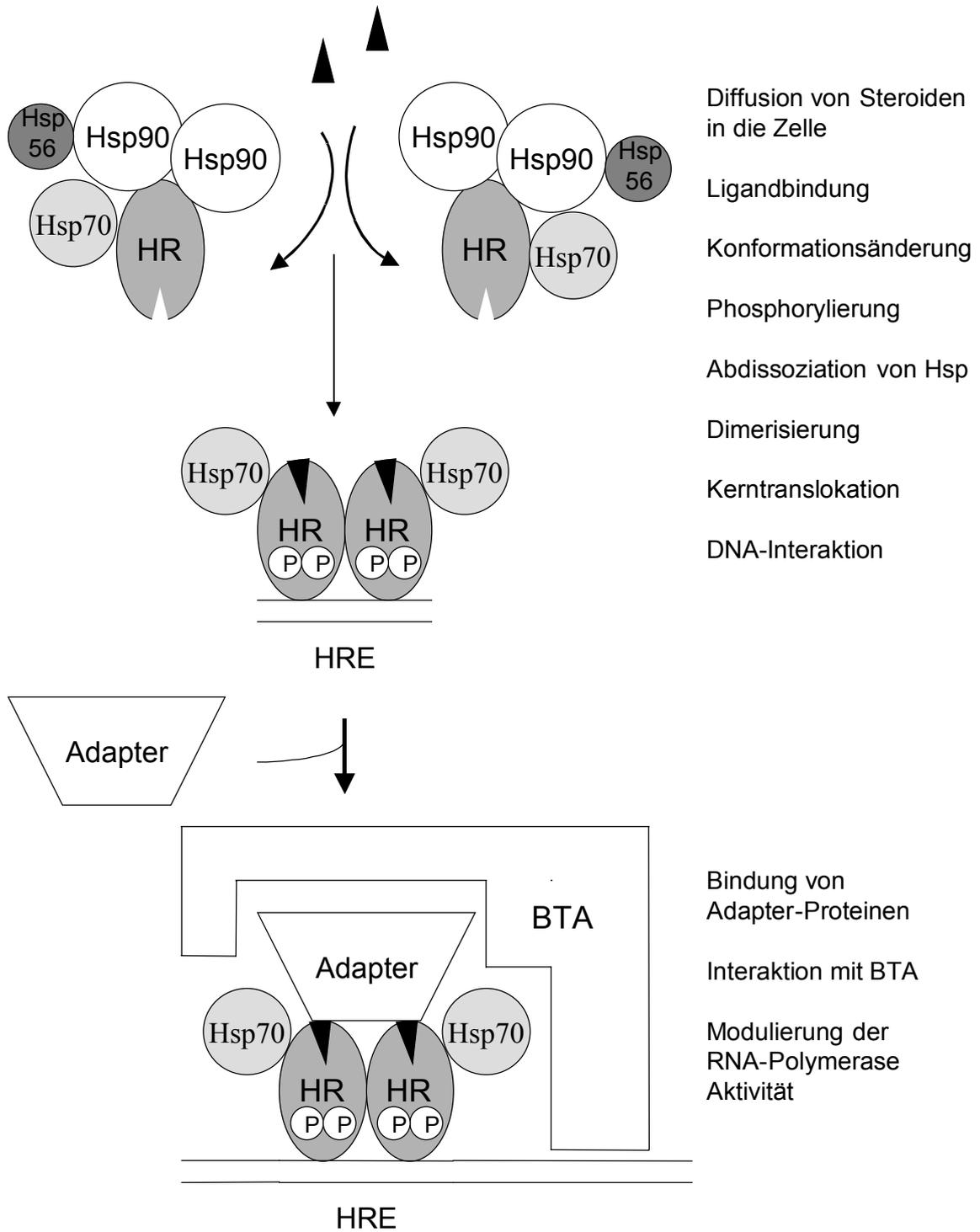
### **2.3.5. Mechanismus der Transkriptionsaktivierung**

Die Interaktion von Steroidhormonrezeptor-Komplexen mit REs *in vivo* kann abhängig von Zielgen und -gewebe zur Induktion bzw. Suppression der Transkription führen. Durch die Bildung der Rezeptor-DNA-Komplexe wird der Zusammenschluß mit anderen Transkriptionsfaktoren erleichtert, so daß ein funktionaler Transkriptionskomplex entsteht. Dieser Prozeß beinhaltet Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor und anderen Faktoren, die entweder allgemein (z.B. TFIIB), gewebespezifisch (verschiedene Kofaktoren) oder rezeptorspezifisch (z.B. für die N-terminale Domäne des PR) sein können. Häufig sind Promotorsequenzen und HREs in verschiedenen DNA-Abschnitten lokalisiert. Einige der oben erwähnten Wechselwirkungen könnten zur Bildung von DNA-Schleifen beitragen, um lange Strecken zwischen Promotor und HREs zu überwinden.

[Church-Landel, 1995]

Steroidhormonrezeptoren vermitteln ihre biologischen Wirkungen in Zielzellen über ähnliche Mechanismen:

Die Steroidhormone gelangen durch passive Diffusion in die Zelle, wo sie auf den entsprechenden Rezeptor-Heat-Shock-Protein-Heterokomplex treffen. Durch die Bindung des Hormons an den Rezeptor-Heterokomplex wird eine Reaktionskaskade in Gang gesetzt. Ligandinduzierte Konformationsänderung und Phosphorylierung führen zur Abdissoziation von Heat-Shock Proteinen (Hsp 90) und zur Dimerisierung des Rezeptors. In der Folge kommt es je nach Rezeptortyp zur Kerntranslokation des Rezeptors oder bei schon vorliegender Kernlokalisierung zur stärkeren Assoziation mit Kernstrukturen. Dies ermöglicht die Interaktion mit spezifischen HREs. Über die Wechselwirkung des Rezeptordimers mit verschiedenen Adapterproteinen kommt es zu einer Interaktion mit dem basalen Transkriptionsapparat (BTA). Die Transkription wird nach Bindung der RNA Polymerase II an die TATA Box induziert. [McDonnell, 1995]



**Abb.14:** Transkriptionsaktivierung durch Steroidhormone [modifiziert nach McDonnell, 1995]

### **2.3.6. Antihormonelle Wirkung**

Durch Bindung eines Antagonisten an einen Steroidhormonrezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung, die sich von einer durch einen Agonisten induzierten Konformationsänderung unterscheidet. Daher kann die Stabilität des Rezeptors, die DNA-Bindung, die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, Begleitproteinen und Kofaktoren sowie die Phosphorylierung durch Antagonisten auf andere Weise beeinflusst werden als durch einen Agonisten. [Church-Landel et al., 1995; Kelce und Wilson, 1997]

Zwei Mechanismen antihormoneller Inhibierung der Transkription sind denkbar:

Typ I Antagonisten binden an den Rezeptor, verhindern aber die Bindung an die DNA.

Typ II Antagonisten induzieren dagegen die DNA-Bindung, verhindern aber die Initiation der Transkription. [Kelce und Wilson, 1997]

Die identifizierten Antiandrogene p,p'-DDE und Vinclozolin Metabolit 2 gehören zu den Typ I Antagonisten. Mehrere Mechanismen, die u.a. eine DNA-Bindung verhindern, sind denkbar:

- a) geringere Stabilität der gebildeten Rezeptor-Konformation und ein daraus resultierender verstärkter Abbau des AR
- b) Verhinderung der Dimerisierung
- c) Bildung von AR Dimeren mit gemischten Liganden, die nicht zur DNA-Bindung in der Lage sind
- d) Verhinderung der für eine DNA-Bindung notwendigen Abdissoziation von Rezeptor-assoziierten Proteinen

[Kelce und Wilson, 1997]

## **2.4. Testsysteme zur Erfassung hormoneller Aktivität**

### **2.4.1. In vivo Testsysteme**

*In vivo* kann hormonelle/antihormonelle Aktivität z.B. durch Organgewichtsbestimmungen erfaßt werden. Das Uterusgewicht von juvenilen Ratten/Mäusen nach Injektion von Testsubstanzen („uterotropher Assay“) gibt Auskunft über die estrogene/antiestrogene Aktivität. Durch Prostata- bzw. Hodengewichtsbestimmungen an kastrierten Tieren kann die androgene/antiandrogene Aktivität bestimmt werden.

Die Einwirkung von hormonell aktiven Verbindungen während Entwicklung und Geschlechtsdifferenzierung kann mittels Mehrgenerationenstudien untersucht werden.

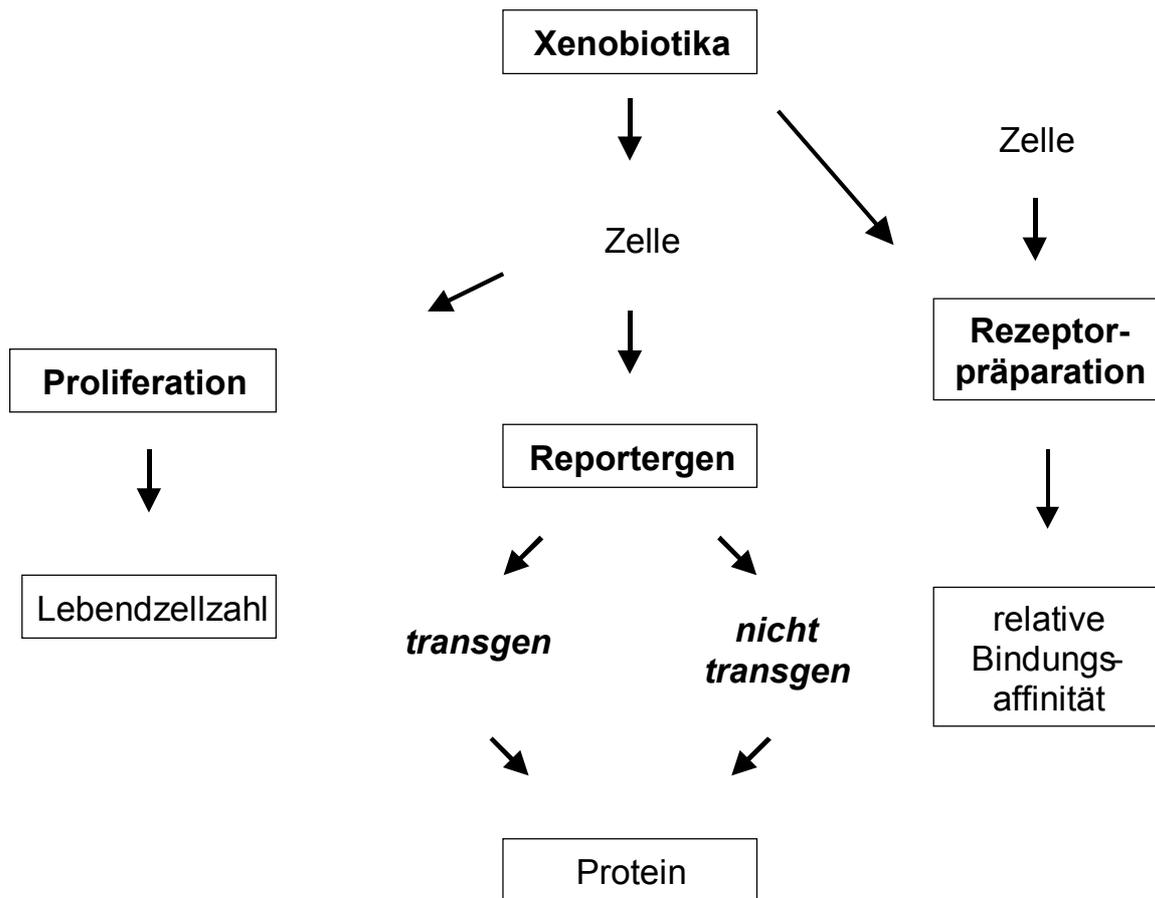
*In vivo* Untersuchungen berücksichtigen im Gegensatz zu *in vitro* Ansätzen auch den Metabolismus, die Verteilung und den Transport von Substanzen im Organismus.

Sie sind allerdings sehr aufwendig und teuer und erfordern eine große Tierzahl. Daher eignen sie sich nicht für ein breites Screening potentieller endokriner Disruptoren. Um eine Vorauswahl der zu testenden Verbindungen zu treffen, sind geeignete *in vitro* Testsysteme nötig.

### **2.4.2. In vitro Testsysteme**

Es gibt mehrere Möglichkeiten, hormonelle/antihormonelle Aktivität *in vitro* zu erfassen (Abb.15):

Erstens über die Bestimmung der Proliferationsrate von hormonabhängig wachsenden Zelllinien, zweitens über die Bestimmung einer Steroidhormonrezeptor -kontrollierten transgenen oder nicht transgenen Reporterogenaktivität und drittens über die Bestimmung der relativen Bindungsaffinität am Hormonrezeptor.



**Abb.15:** Schematische Darstellung möglicher *in vitro* Ansätze

Beim Proliferationsassay kommt es durch Einwirkung von Steroidhormonen auf hormonabhängig wachsende Zelllinien zu einer vermehrten Expression von wachstumsstimulierenden Faktoren. Hormonbehandelte Zellen zeigen daher eine erhöhte Proliferationsrate, die anhand der Lebendzellzahl bestimmt werden kann. Ein Proliferationsassay zur Prüfung auf estrogene/antiestrogene Aktivität (der sogenannte E-Screen-Assay) auf Basis der estrogenabhängig wachsenden Brustkrebszelllinie MCF-7 ist bereits etabliert. [Soto und Sonnenschein, 1995].

Der Vorteil dieses Assays ist, daß es sich um ein natürliches und kein artifizielles System handelt. Die Transfektion von fremdem genetischem Material ist nicht erforderlich. Ein Nachteil ist, daß das Wachstum von Zellen nicht nur auf den Einfluß

von Steroidhormonrezeptoren zurückzuführen ist. Weitere Signaltransduktionswege können ebenfalls an der Regulation beteiligt sein.

Beim Reporteragenassay muß zwischen transgenen und nicht transgenen Versuchsansätzen unterschieden werden.

Der transgene Ansatz beruht auf der Transfektion geeigneter Zelllinien mit einem Steroidhormonrezeptor-kontrollierten Promotor-Reporteragen-Konstrukt und gegebenenfalls einem Steroidhormonrezeptor-Expressionplasmid. Bei Induktion mit dem entsprechenden Steroidhormon kommt es zur konzentrationsabhängigen Expression des Reporteragens. Der Nachweis des Reporteragenprodukts, meist handelt es sich um Enzyme, erfolgt z.B. über geeignete Chemolumineszenzreaktionen.

Endogene Steroidhormonrezeptor-kontrollierte Gene als Reporter macht sich der nicht transgene Ansatz zunutze. Bei Induktion mit dem entsprechenden Steroidhormon wird das endogene Reporteragen wiederum konzentrationsabhängig exprimiert. Der Nachweis einer Induktion kann entweder auf m-RNA Ebene über RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) oder Northern-Blotting erfolgen, oder aber auf Protein Ebene über einem immunochemischen Nachweis (z.B. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay oder RIA = Radio Immuno Assay).

Nachteil des transgenen Reporteragenassays ist der durch die Transfektion artifizielle Ansatz. Dieser Nachteil entfällt beim nicht transgenen Ansatz. Vorteil beider Ansätze ist die erhaltene direkte Auskunft über die Transkriptionsaktivierung.

Die Bestimmung der relativen Bindungsaffinität (sogenannter RBA-Wert) erfolgt mittels isolierter Rezeptorpräparationen. Es wird die Verdrängung von radioaktiv markiertem Hormon vom Rezeptor durch die Testsubstanzen gemessen. Nachteil ist, daß keine Aussage über die Transkriptionsaktivierung sondern lediglich über die Rezeptorbindung getroffen werden kann. Die relative Bindungsaffinität wird daher heute nur noch selten herangezogen.

Eine Möglichkeit zur Aufklärung mechanistischer Fragestellungen ist der Gel-Mobility-Shift-Assay (Band-Shift-Assay). Er gibt Auskunft über die Ligand-Rezeptor-DNA-Interaktion.

Um endokrine Aktivität hinreichend zu beschreiben, sind die Ergebnisse einzelner *in vivo* oder *in vitro* Untersuchungen nicht ausreichend. So werden z.B. bei einem *in vitro* Screening Verbindungen nicht identifiziert, die über einen anderen

Steroidhormonrezeptor wirken, oder die Einfluß auf die Steroidhormon Biosynthese, den Transport und Abbau nehmen bzw. metabolisch aktiviert werden müssen.

Es sollten daher verschiedene *in vitro* und *in vivo* Teststrategien kombiniert werden:

Mittels *in vivo* Tests könnten endokrine Disruptoren identifiziert und Einflüsse während der Entwicklung aufgezeigt werden. *In vitro* Tests dagegen könnten bei der Suche nach der effektiven Verbindung oder dem effektiven Metaboliten sowie bei der mechanistischen Aufklärung helfen. [Kelce et al., 1997]

### 2.4.3. Auswerteverfahren

Die zu untersuchenden Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen laufen nicht linear ab. Nach halblogarithmischer Auftragung läßt sich der typische sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurvenverlauf durch die sogenannte logistische Gleichung allgemein beschreiben (Abb. 16):

$$Y = \frac{A1 - A2}{1 + (X/X_0)^P} + A2$$

A1: unteres Plateau (nicht aktivierter Rezeptor)

A2: oberes Plateau (Sättigungsbereich des Rezeptors)

P : Exponent oder Power; Steigung im Übergangsbereich

X<sub>0</sub>: x-Wert bei 50% Aktivierung; Wendepunkt der Kurve

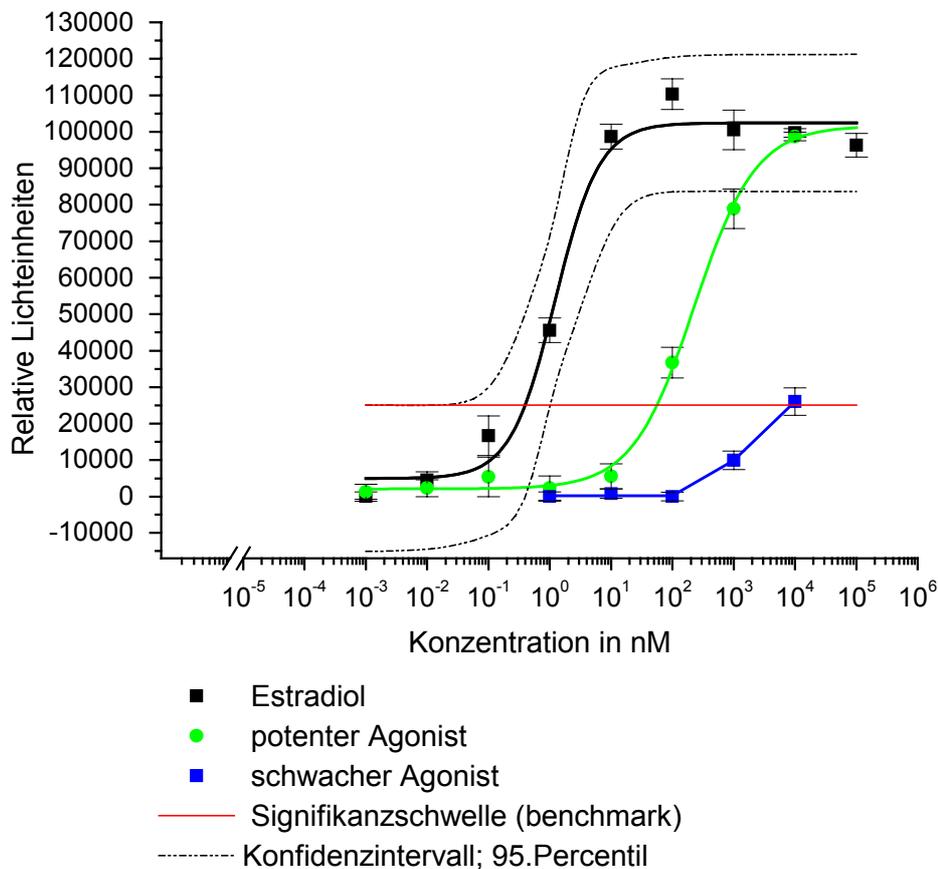
= Dissoziationskonstante (K<sub>D</sub>)

Aus einem Datensatz lassen sich so die Parameter, die den Kurvenverlauf bestimmen, mittels nichtlinearer Regression berechnen. Dabei entspricht X<sub>0</sub> im Falle einer agonistischen Wirkung dem EC<sub>50</sub>-Wert, der die Konzentration der halbmaximalen Wirkung angibt. [Mußler, 1999]

Zur Auswertung agonistischer Aktivitäten wird eine sogenannte Signifikanzschwelle eingeführt. Sie ergibt sich aus dem oberen 95. Percentil (Konfidenzintervall) des unteren Plateaus A1. Verbindungen, deren agonistische Wirkungen den Wert der

Signifikanzschwelle überschreiten, können als aktiv bezeichnet werden (Abb. 16).

[Mußler, 1999]



**Abb.16:** Auswerteverfahren: Logistischer Fit und 95. Percentil der Daten des physiologischen Liganden (Estradiol); Angabe einer Signifikanzschwelle

## 2.5. Zelllinien

### 2.5.1. CV-1

Die Zelllinie CV-1 wurde aus der Niere eines männlichen erwachsenen Tieres einer afrikanischen Affenart (african green monkey *cercopithecus aethiops*) gewonnen.

Sie eignet sich besonders für Transfektionsversuche, vor allem mit SV-40 Vektoren.

Es sind keine Steroidhormonrezeptoren endogen enthalten.

[ATCC, 1998; Couette et al., 1994]]

### **2.5.2. COS-7**

Die etablierte Affennierenzelllinie CV-1 wurde mit einer in der origin Region defekten Mutante des SV-40 transformiert. Es bildeten sich drei Zellpopulationen: COS-1, 3 und 7. Alle drei COS-Zelllinien exprimieren das SV-40 T Antigen. COS-7 Zellen entsprechen im Hinblick auf den Sicherheitsstandard etablierten Affennierenzellen, die defekte virale Genome enthalten und keine infektiösen Viruspartikel abgeben. Sie eignen sich ebenfalls vor allem für Transfektionen mit SV-40 Vektoren und enthalten endogen keine Steroidhormonrezeptoren.

[ZKBS, 1994; Gluzman, 1981; Couette et al., 1994]

### **2.5.3. MFM-223**

Die MFM-223 Zelllinie wurde aus dem pleuralen Erguß einer postmenopausalen Mammakarzinom-Patientin gewonnen. Der Primärtumor enthielt neben Androgenrezeptoren auch geringere Mengen Estrogen- und Progesteronrezeptoren. Im primären Tumorgewebe liegt der Gehalt bei 94, 63 und 6 fmol/mg Protein [Hackenberg, 1991a]. In der etablierten Zelllinie wird der Androgenrezeptor (ca. 160 fmol/mg Protein) bei gleichzeitiger Abnahme des Estrogenrezeptor- bzw. Progesteronrezeptorgehaltes (8 bzw. 18 fmol/mg Protein) verstärkt exprimiert [Hackenberg, 1991b].

### **2.5.4. T47D**

Die als T47D bezeichnete Zelllinie wurde aus pleuralen Effusionen einer an einem inoperablen Mammakarzinom erkrankten, 54-jährigen Patientin gewonnen. [Horwitz, 1978; Keydar, 1979]

Der Steroidhormonrezeptorgehalt kann sich in Permanentkultur verändern. Nach Keydar et al., 1979, enthalten T47D Zellen 254 fmol/mg Protein Progesteronrezeptor, 29 fmol/mg Protein Glucocorticoidrezeptor, 17 fmol/mg Protein Estrogenrezeptor und 3 fmol/mg Protein Androgenrezeptor.

### **2.5.5. SaOS-2**

Die SaOS-2 ist eine humane Osteosarkoma Zelllinie. Sie wurde 1973 aus einem primären Osteosarkom einer elfjährigen kaukasischen Frau gewonnen. Es sind endogen Androgen- und Progesteronrezeptoren enthalten. [Orwoll et al., 1991; DSMZ, 1998]

### **3. Problemstellung**

Um ein umfassendes Konzept zur Beurteilung hormonell aktiver Stoffe in Umwelt und Lebensmitteln zu entwickeln, müssen auch Erkenntnisse über die bisher vernachlässigten androgenen/antiandrogenen Wirkungen miteinbezogen werden. Zur Erfassung dieser Wirkungen ist die Etablierung von geeigneten *in vitro* Testsystemen notwendig. Dadurch kann eine Vorauswahl aus der Vielzahl der in Frage kommenden Verbindungen getroffen werden. Relevante Ergebnisse können dann mittels der aufwendigeren *in vivo* Untersuchungen verifiziert werden.

Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Etablierung und Validierung funktioneller transgener Reportergensysteme sein. Für ein schnelles, effizientes Screening besonders geeignet ist ein stabil transfiziertes Testsystem, bei dem ein Reporter-genvektor mit Androgenrezeptor-kontrolliertem Promotor und, wenn nicht endogen enthalten, ein Androgenrezeptor-Expressionsplasmid stabil in das Genom der Zellen integriert werden. Während der dazu erforderlichen zeitaufwendigen Selektionsphase sollte gleichzeitig ein Testsystem auf Basis einer transienten Transfektion etabliert werden.

Zum Vergleich sollte ein weiteres *in vitro* Testsystem unter Verwendung eines endogenen Reporters sowie nach Möglichkeit ein Proliferationsassay aufgebaut werden.

In den etablierten und validierten *in vitro* Testsystemen sollten dann verschiedene, über online Strukturdatenbank-Recherche (Beilstein-crossfire) anhand von zwei potentiellen Leitstrukturen ausgewählte Verbindungen auf androgene/antiandrogene Aktivität untersucht werden.

Die ermittelten biologischen Daten sollten zum Abschluß der Arbeit zum Aufstellen von Struktur-Aktivitätsuntersuchungen herangezogen werden. Eine Vorhersage der androgenen/antiandrogenen Wirkung weiterer, noch nicht untersuchter Verbindungen sollte anhand der erhaltenen Modelle ermöglicht und so das Screeningverfahren systematisiert werden.

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

### **4.1. Etablierung von *in vitro* Testsystemen zur Erfassung androgener/antiandrogener Aktivität**

Um ein schnelles, effizientes Screening potentieller endokriner Disruptoren zu ermöglichen, sind etablierte *in vitro* Testsysteme nötig. Testsysteme zur Prüfung von estrogenaktiven/antiestrogenaktiven Verbindungen sind bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Zur Prüfung auf androgene/antiandrogene Aktivität standen bislang keine geeigneten *in vitro* Testsysteme zur Verfügung. Die Etablierung verschiedener Testansätze war daher Hauptziel dieser Arbeit.

#### **4.1.1. Reporterassays**

##### **4.1.1.1. Transgene Reporterassays**

Reportergene sind Gene oder Genfragmente, die in einer Wirtszelle endogen nicht vorkommen und deren Genprodukte sich nach einem Gentransfer spezifisch im intra- und extrazellulären Proteingemisch nachweisen lassen.

Eingesetzt werden Reportergene zum einen zur funktionellen Analyse regulatorischer DNA-Sequenzen, die potentielle Promotor-/Enhancer-Regionen enthalten. Die zu untersuchende Sequenz wird in einem Vektor vor die kodierende Sequenz des Reportergens kloniert. Über den spezifischen Nachweis des Reportergens können die regulatorischen Sequenzen identifiziert werden. Zum anderen können Reportergene zum Nachweis einer ligandinduzierten Transkriptionsaktivierung herangezogen werden. Vor das Reportergen wird in diesem Fall eine geeignete, durch den zu untersuchenden Liganden kontrollierte Promotor-Region kloniert. [Hartmann, 1991; Alam und Cook, 1990]

Dieses Prinzip kam auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung. Es wurde der Reportervektor pMamneoLuc verwendet, bei dem die Expression des Reportergens Luciferase durch den Androgenrezeptor-kontrollierten MMTV Promotor gesteuert wird (Abb.17).

Luciferasen sind Enzyme, die eine Biolumineszenz-Reaktion katalysieren. Sie wurden u.a. in marinen Organismen wie Fischen, Bakterien, Muscheln sowie in Glühwürmchen und Leuchtkäfern identifiziert. [Hartmann, 1991; Wood, 1990]

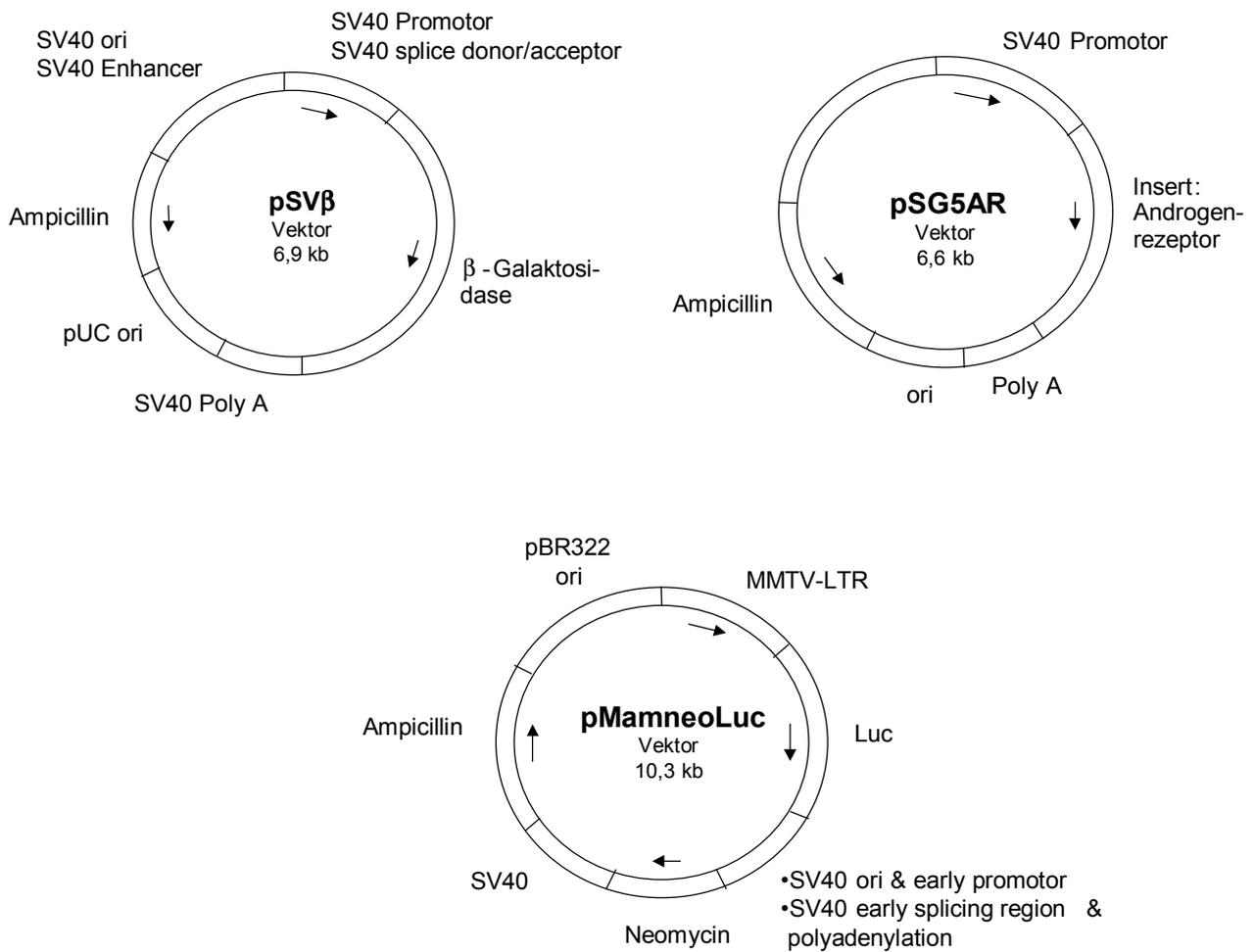
In dieser Arbeit wurde die Luciferase aus der nordamerikanischen Feuerfliege *photinus pyralis* eingesetzt. Es handelt sich um eine Oxygenase, die die heteropolycyclische organische Säure Luciferin oxidiert. In einer von Magnesium- und ATP abhängigen Reaktion wird eine Acyl-AMP-Zwischenstufe des Luciferins gebildet, die unter Sauerstoffeinwirkung zu Oxyluciferin umgewandelt wird. Das sich im angeregten Zustand befindende Oxyluciferin emittiert nach Decarboxylierung Photonen, die luminometrisch vermessen werden können. Die Halbwertszeit der Reaktion ist sehr kurz, kann aber durch Zugabe von Coenzym A deutlich erhöht werden.

Vorteile eines Reporterassays auf Basis der Luciferase sind:

- eine hohe Sensitivität und ein großer Linearitätsbereich (8 Zehnerpotenzen)
- kein Hintergrundsignal aus endogener Enzymaktivität
- schnell und kostengünstig

Erforderlich für die Isolierung der Luciferase ist allerdings eine Lyse der Zellen. [Promega, 1998; Hartmann, 1991]

Zum Aufbau eines transgenen Reporterassays zur Erfassung androgener/anti-androgener Aktivität in Zelllinien ohne endogenen Androgenrezeptor-Gehalt wird weiterhin ein Androgenrezeptor-Expressionsplasmid benötigt. Eingesetzt wurde hier der Vektor pSG5AR, bei dem der humane Androgenrezeptor unter der Kontrolle des Simian Virus 40 (SV-40) Promotors exprimiert wird (Abb. 17).



**Abb.17:** Schematische Darstellung der Plasmide pMamneoLuc, pSG5AR und pSV $\beta$

Der Gentransfer in geeignete Wirtszellen kann mittels unterschiedlichster Methoden erfolgen. Am häufigsten werden die Calcium-Phosphat-Methode und die Elektroporation verwendet. Bei einer transienten Transfektion wird die Fremd-DNA nur vorübergehend aufgenommen und nicht stabil in das Wirtszellgenom integriert. Ein stabiler Einbau findet nur in 0,001-1% der Fälle statt. Zur Identifizierung und Isolierung stabil transfizierter Zellen sind Selektionsmarker wie Antibiotikaresistenzgene erforderlich. In der Selektionsphase überleben nur stabil transfizierte Zellen die Antibiotikabehandlung. [Koch-Brandt, 1993]

Vorteil eines stabilen Testsystems ist, daß die Zellen ohne erneute Transfektion über einen längeren Zeitraum kultiviert und für Experimente eingesetzt werden können. Nachteil ist der geringe Anteil des stabilen Einbaus und die aufwendige, mehrere Wochen andauernde Selektionsphase.

Ein transienter Transaktivierungsassay kann ohne Selektionsphase etabliert werden. Es muß aber vor jedem Testansatz eine erneute Transfektion erfolgen. Dies beeinträchtigt die Reproduzierbarkeit, so daß zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein Kontrollplasmid kotransfiziert werden muß. Das in dieser Arbeit verwendete Kontrollplasmid pSV- $\beta$  enthält das Reporterogen  $\beta$ -Galaktosidase, das unter der Kontrolle des SV-40 Promotors konstitutiv exprimiert wird (Abb. 17).

Es handelt sich um ein hitzeempfindliches Enzym, das in der Lage ist,  $\beta$ -Galaktoside zu hydrolysieren. Bei der Hydrolyse eines Chemolumineszenz-Substrates entstehen wiederum Photonen, die im Luminometer erfaßt werden können. Diese Reaktion ist sehr sensitiv (Nachweisgrenze  $10^{-13}$ g Protein) und hat einen Linearitätsbereich über mehrere Zehnerpotenzen. Eine Isolierung der  $\beta$ -Galaktosidase setzt ebenfalls eine Zellyse voraus. [Clontech, 1996; Alam und Cook, 1990]

Die drei verwendeten Plasmide wurden zunächst in E.coli transformiert, amplifiziert und mittels Maxipräparation in größeren Mengen in reiner Form gewonnen.

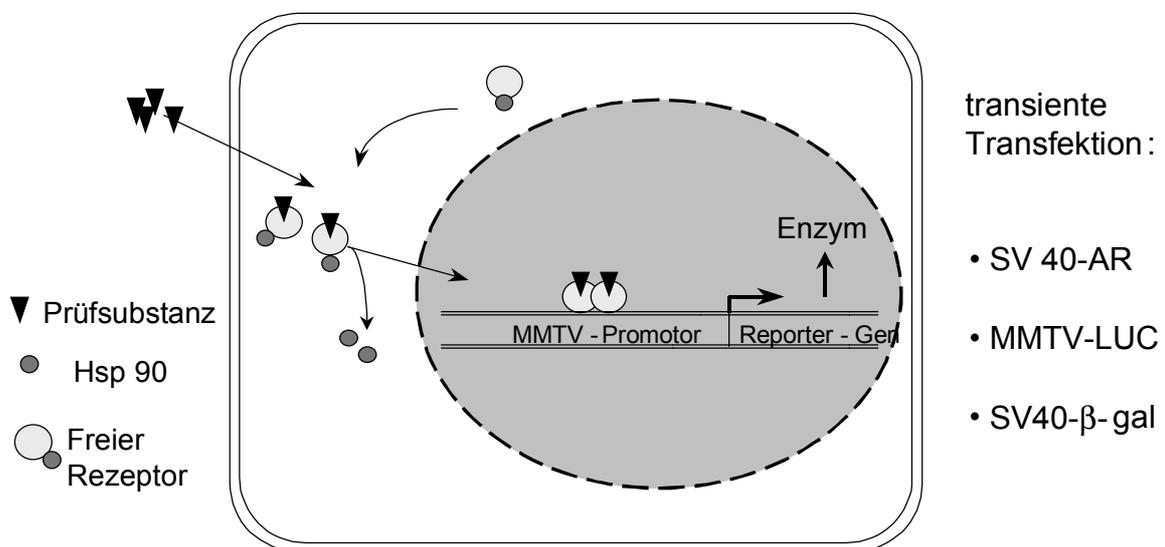
Zunächst wurde ein transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen etabliert und damit eine Untersuchung auf androgene/antiandrogene Aktivität überhaupt ermöglicht. Aufgrund der oben genannten Nachteile transienter Systeme wurde gleichzeitig mit der aufwendigen Etablierung stabiler transgener Testsysteme in verschiedenen Zelllinien begonnen.

#### **4.1.1.1.1. Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen**

COS-7 Zellen, die mit einer in der origin Region defekten Mutante des SV-40 transformiert sind, eignen sich bevorzugt für die Transfektion mit SV-40 abgeleiteten Plasmiden. Es kommt dabei nicht zu einem stabilen Einbau der Fremd-DNA, sondern durch spezifische, in den COS-7 Zellen enthaltene Faktoren zu einer verstärkten Replikation von Plasmiden, die den SV-40 origin of replication enthalten. Nach 72 Stunden führt die hohe extrachromosomale Plasmidkonzentration (bis zu  $10^5$  Kopien) zum Zelltod. [Maniatis et al., 1989]

Daher wurden COS-7 Zellen in dieser Arbeit zur Etablierung eines transienten Transaktivierungsassays herangezogen.

Die drei Plasmide pMamneoLuc, pSG5AR und pSV- $\beta$  wurden mittels Elektroporation in die Zellen transfiziert (Abb.18). Teurere und aufwendigere chemische Transfektionsmethoden waren nicht wesentlich effektiver. 18 h nach der Transfektion wurde für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert, weitere 24 h nachinkubiert und eine Zellyse durchgeführt. Im Lysat wurden sowohl die Luciferaseaktivität als auch die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität vermessen. Die normierte relative Luciferaseaktivität wurde durch Abgleichen mit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt.

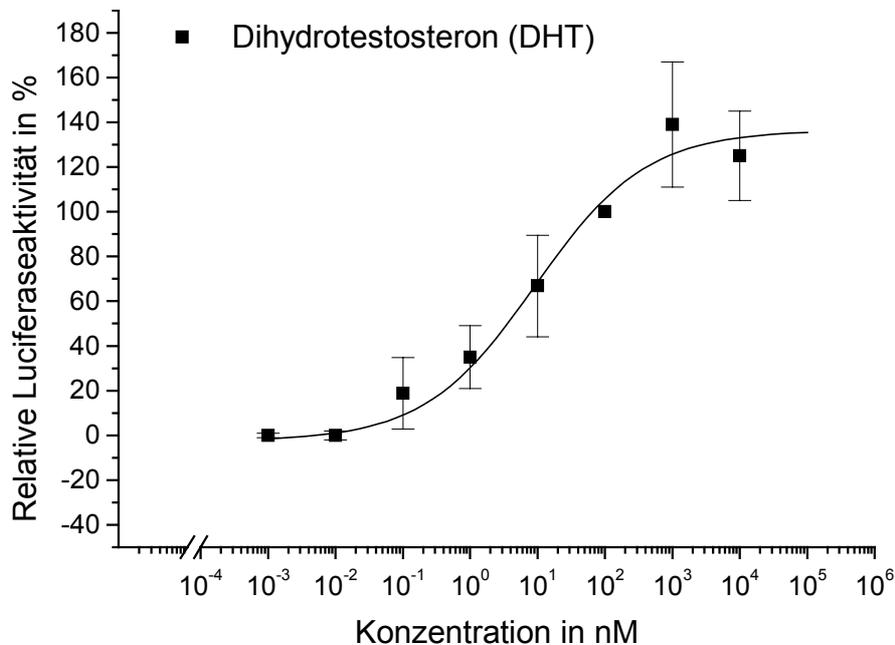


**Abb.18:** Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen

### Validierung

Nach Inkubation mit dem physiologischen Hormon Dihydrotestosteron (DHT) zeigte sich die erwartete Dosis-Wirkungsbeziehung über einen mehrere Größenordnungen umfassenden Dosisbereich. Bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergibt sich ein für rezeptorvermittelte Prozesse typischer sigmoidaler Kurvenverlauf vom subphysiologischen Bereich (1 pM) bis zum Sättigungsbereich des Rezeptors (100  $\mu$ M) (Abb.19). Der  $EC_{50}$ -Wert (effective concentration), bei dem die

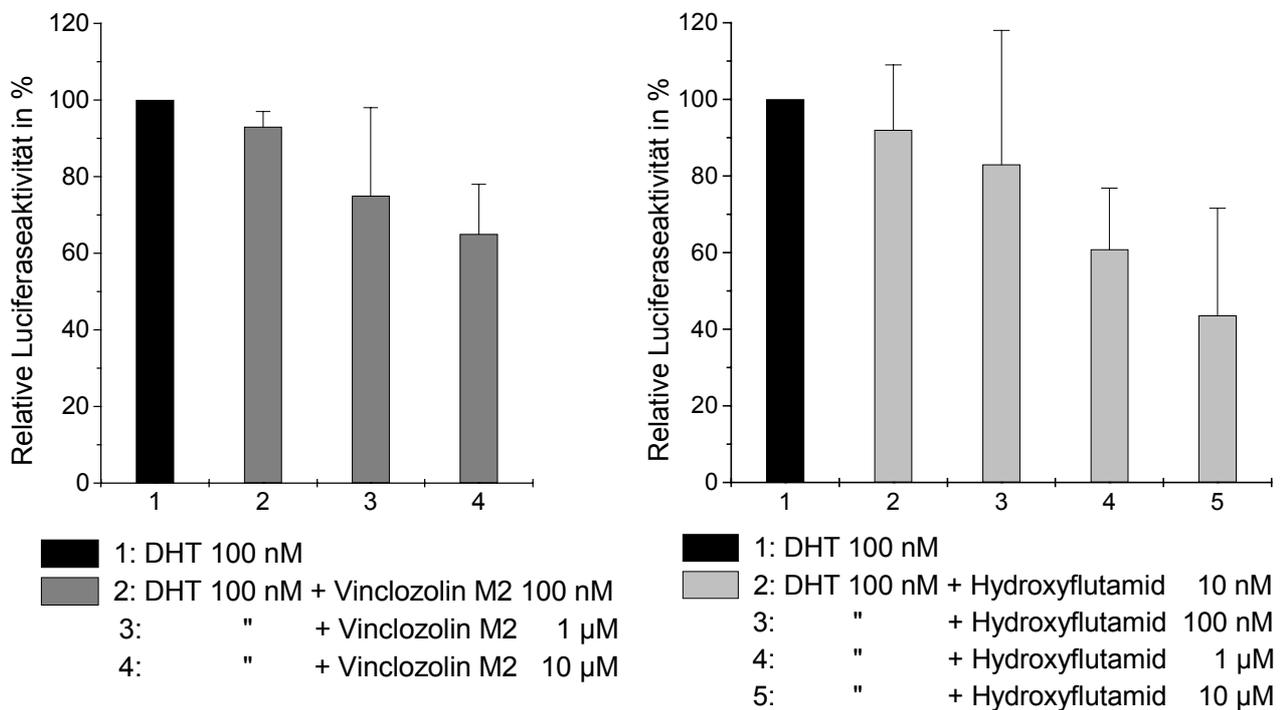
rezeptorvermittelte Induktion des promotorkontrollierten Reportergens halbmaximal ist, entspricht dem Wendepunkt der Kurve. Er liegt etwa im Bereich der physiologischen DHT Konzentration von 10 nM.



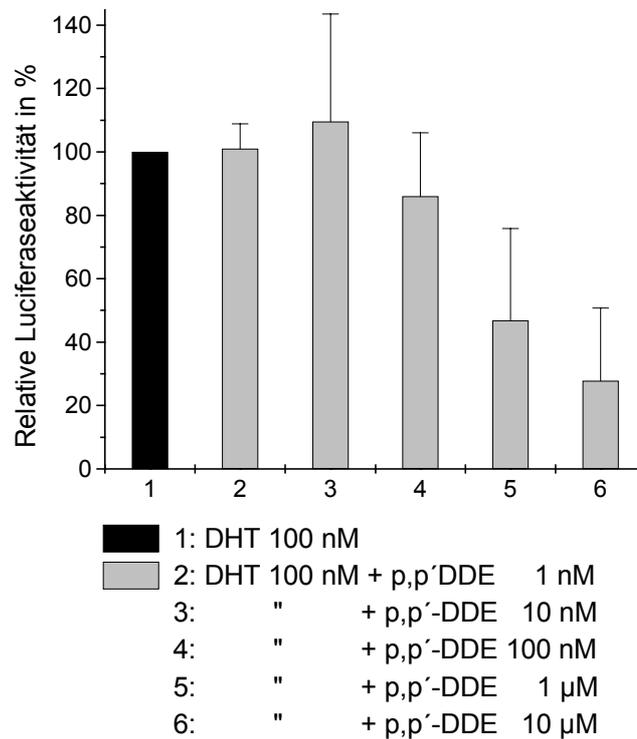
**Abb.19:** Validierung des transienten Transaktivierungsassays in COS-7 Zellen mittels des physiologischen Agonisten Dihydrotestosteron (DHT)

Eine weitergehende Validierung des transienten Reportersystems erfolgte durch Konkurrenzexperimente mit etablierten Antagonisten. Die zu hemmende DHT Konzentration wurde mit Hilfe des Kurvenverlaufs ausgewählt: Erforderlich ist eine Konzentration, bei der die rezeptorvermittelte Induktion genügend hoch, gleichzeitig aber der Sättigungsbereich des Rezeptors noch nicht erreicht ist. Eingesetzt wurde daher eine DHT Konzentration von 100 nM. Sie stellt jeweils bei allen Messungen den Bezugspunkt dar (100%) und kann daher nur ohne relative Abweichung der Meßwerte (Fehlerbalken) angegeben werden. Bei allen Meßreihen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der einzelnen Meßpunkte berechnet. Die durch DHT induzierte Luciferaseaktivität konnte durch das etablierte Antiandrogen Hydroxyflutamid sowie durch die antiandrogenen Pestizidmetaboliten p,p'-DDE und Vinclozolin Metabolit 2 im transienten Transaktivierungsassay

signifikant gehemmt werden (Abb. 20 und 21). Die stärkste antiandrogene Aktivität bei der höchsten eingesetzten Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) zeigte p,p'-DDE (Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität um ca. 70%), gefolgt von Hydroxyflutamid (Hemmung um ca. 60%). Deutlich schwächer aktiv war der Vinclozolin Metabolit 2 (Hemmung um ca 35%).



**Abb.20:** Validierung des transienten Transaktivierungsassays: Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität durch Vinclozolin Metabolit 2 und Hydroxyflutamid



**Abb.21:** Validierung: Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität durch p,p'-DDE

Die Validierung des transienten Transaktivierungsassays in COS-7 Zellen mit bekannten Agonisten und Antagonisten war somit erfolgreich. Das Testsystem kann als etabliert angesehen werden und steht für die Überprüfung potentieller Androgene/Antiandrogene zur Verfügung.

#### **4.1.1.1.2. Etablierung eines stabil transfizierten Testsystems**

Zum effizienteren Screening von Substanzen wird eine stabile transgene Zelllinie benötigt. Bei der Auswahl der Zelllinien gibt es mehrere Möglichkeiten: Einmal können Zelllinien verwendet werden, die endogenen Steroidhormonrezeptoren enthalten wie z.B. Brustkrebszelllinien. Es muß dann nur ein entsprechendes Reportergenplasmid mit steroidhormonrezeptorkontrolliertem Promotor (z.B.

pMamneoLuc) in die Zellen transfiziert werden. Dadurch wird der stabile Einbau der Fremd-DNA in das Genom und die Selektion erleichtert. Nachteil ist, daß häufig mehrere unterschiedliche Steroidhormonrezeptoren gleichzeitig in der Zelle exprimiert werden. Bei einer Zelllinie ohne endogene Steroidhormonrezeptor-ausstattung muß dagegen zusätzlich eine Kotransfektion mit einem Steroidhormonrezeptor-Expressionsplasmid erfolgen. Durch die Verwendung von zwei Plasmiden sinkt die Wahrscheinlichkeit eines kompletten stabilen Einbaus aller benötigten Informationen. Es kann aber in diesem Fall spezifischer getestet werden, da lediglich der gewünschte zu untersuchende Steroidhormonrezeptor in der Zelle exprimiert wird.

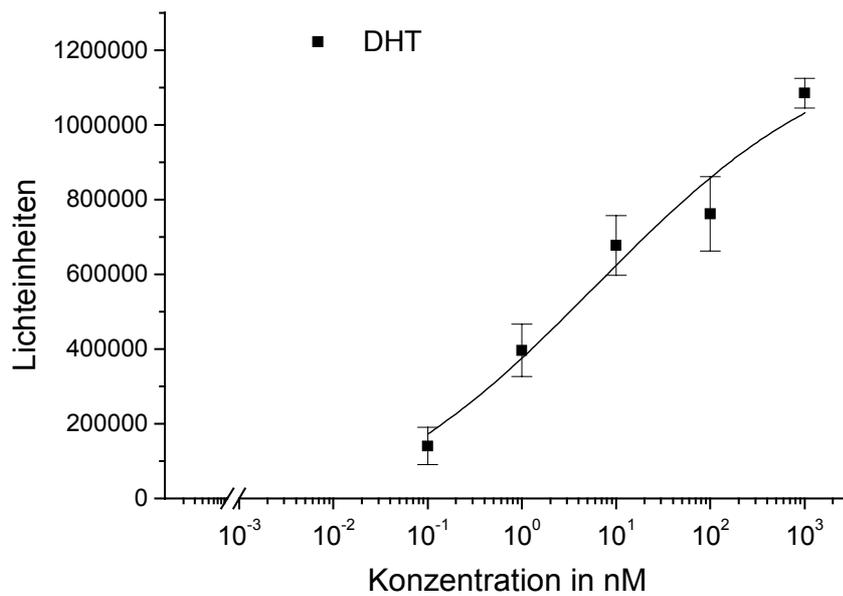
Beide Ansätze wurden in dieser Arbeit parallel herangezogen.

#### **4.1.1.1.2.1. CV-AR-Luc**

Als Vertreter einer Zelllinie ohne endogene Steroidhormonrezeptoren wurde die Affennieren-Zelllinie CV-1 ausgewählt. Sie ist nicht SV-40 transformiert wie ihre Tochterzelllinie COS-7. Daher eignet sie sich auch für die Etablierung einer stabilen Zelllinie, da es hier nicht zur verstärkten Replikation SV-40 abgeleiteter Plasmide und zum Zelltod kommt.

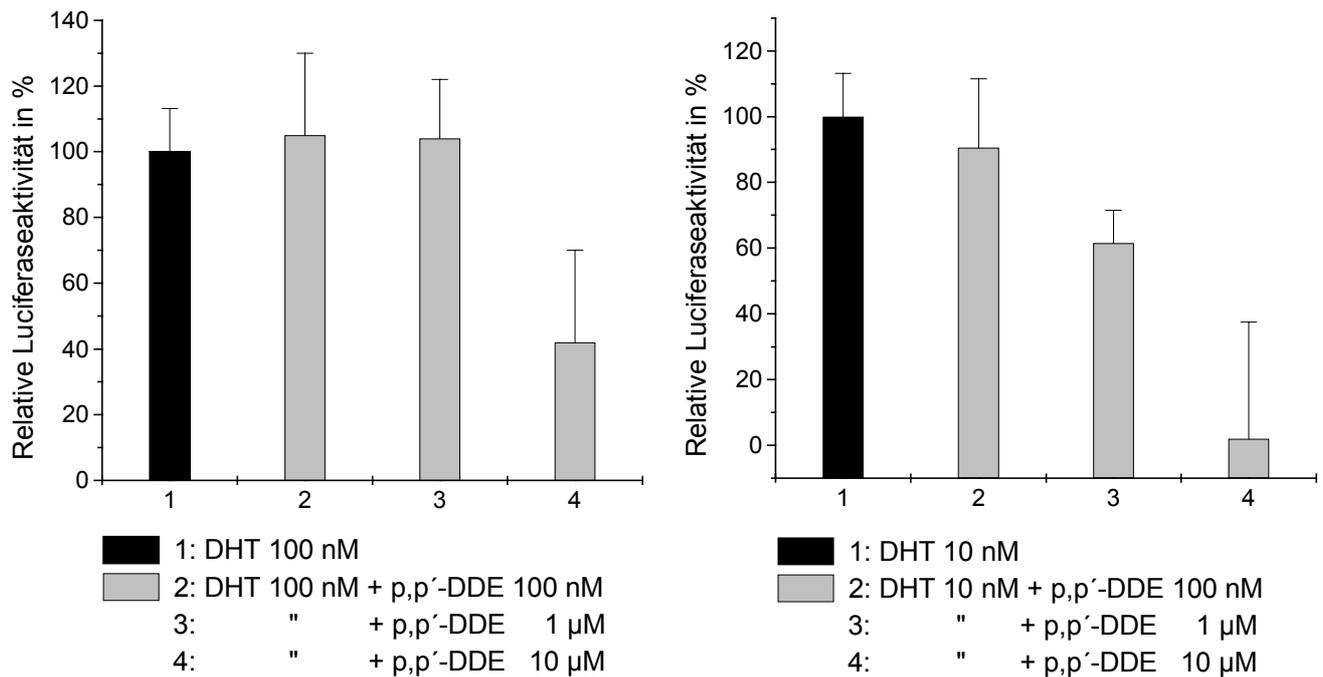
Mittels Elektroporation wurden das Androgenrezeptor-Expressionplasmid pSG5AR und das Reporterplasmid pMamneoLuc in die CV-1 Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde die Selektionsphase mit dem Antibiotikum G 418 (Geneticin) eingeleitet. Ein Neomycin-Resistenzgen (vermittelt die Resistenz gegen Geneticin) ist allerdings lediglich auf dem Plasmid pMamneoLuc enthalten. Daher kann das zweite Plasmid pSG5AR im Laufe der Selektionsphase von den Zellen wieder ausgeschleust werden.

Nach einigen Wochen Selektion wurde der erhaltene aktive Zellklon zur Validierung mit DHT inkubiert. Nach halblogarithmischer Auftragung der Ergebnisse wurde eine sehr flache sigmoidale Dosis-Wirkungskurve erhalten. Das Testsystem ist also weniger präzise als der transiente Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen. Der Wendepunkt liegt wiederum etwa im physiologischen DHT-Bereich bei ca. 10 nM (Abb. 22).

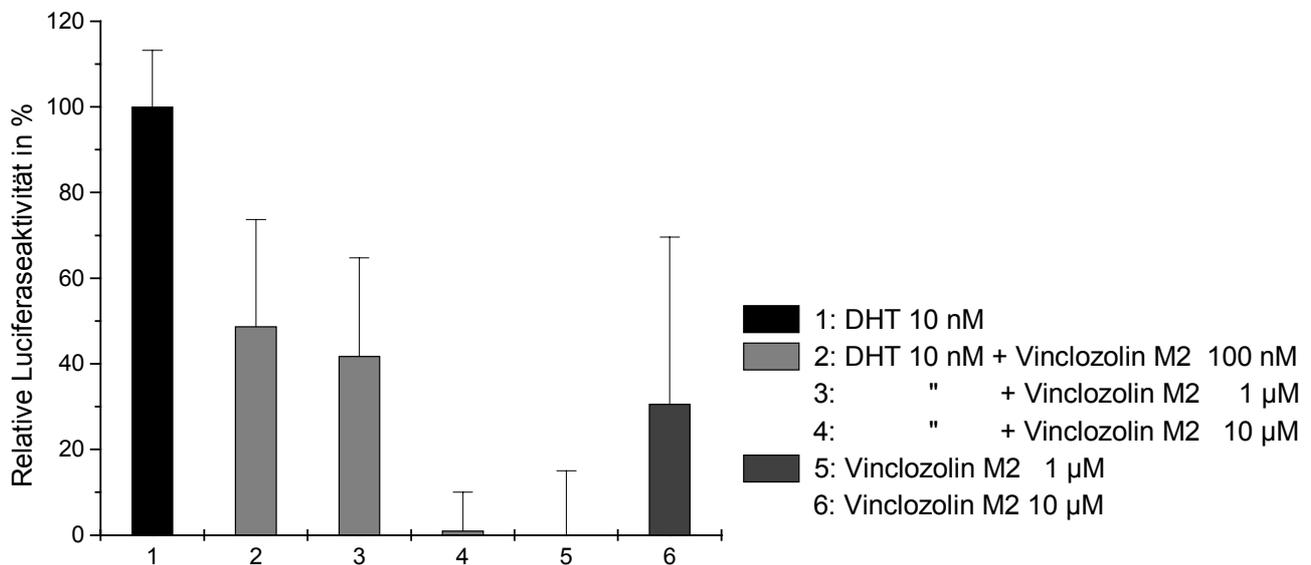


**Abb.22:** Validierung des Testsystems CV-AR-Luc mit DHT

Die Validierung des erhaltenen Testsystems war noch erfolgreich. Vinclozolin Metabolit 2 und p,p'-DDE konnten die durch DHT (100 nM und 10 nM) induzierte Luciferaseaktivität hemmen (Abb. 23 und 24). Vinclozolin M2 selbst zeigte bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M ca. 40% der durch 10 nM DHT induzierten agonistischen Aktivität. Bei der anschließenden Untersuchung von potentiellen Androgenrezeptor-Antagonisten nahm die Aktivität des selektionierten Zellklons aber immer mehr ab. Mit steigender Kultivierungsdauer in Genitacin-haltigem Medium und steigender Passagenzahl der CV-AR-Luc Zellen erhöhte sich vermutlich die Anzahl der Zellen, die pSG5AR schon ausgeschleust hatten und nur noch pMamneoLuc enthielten. Es konnte also kein auf Dauer stabiles Testsystem generiert werden.



**Abb.23:** Validierung des CV-AR-Luc Zellsystems: Hemmung der durch DHT induzierten Luciferaseaktivität durch p,p'-DDE



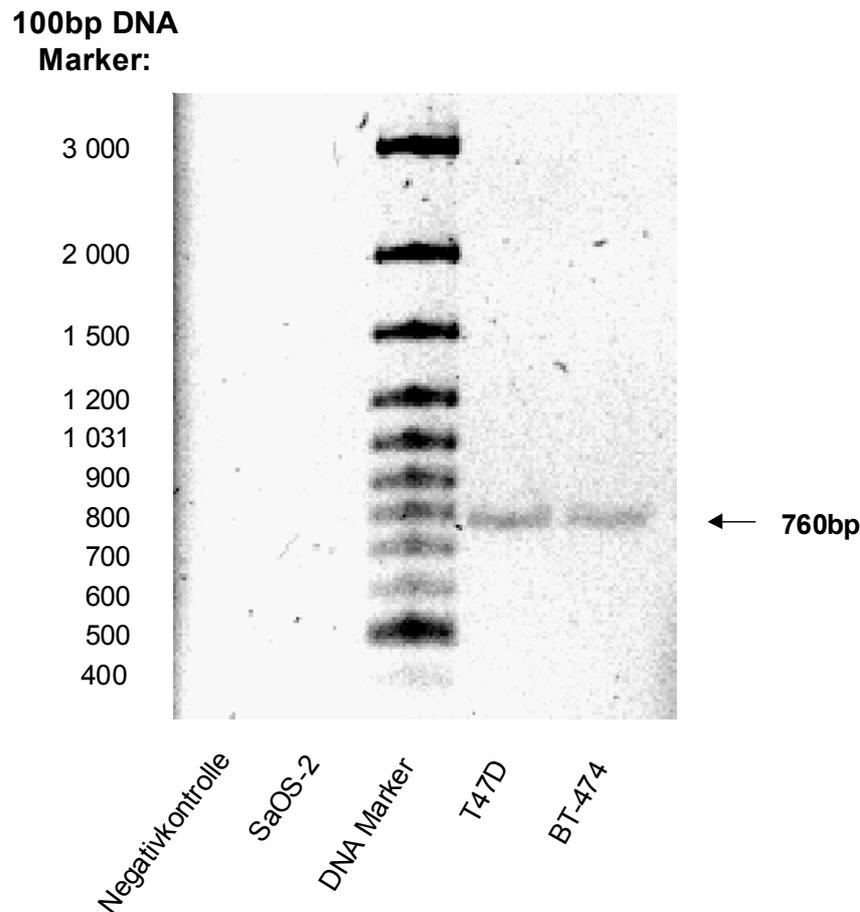
**Abb.24:** Validierung des CV-AR-Luc Zellsystems: Hemmung der durch DHT induzierten Luciferaseaktivität durch Vinclozolin M2; agonistische Aktivität von Vinclozolin M2

#### **4.1.1.1.2.2. SaOS-2-Luc**

Eine Zelllinie, die laut Literatur endogene Androgenrezeptorexpression aufweist, ist die humane Osteosarkomazelllinie SaOS-2. Wieren et al., 1997, konnten mit SaOS-2 Zellen einen transienten Transaktivierungsassay zur Erfassung antiandrogener Aktivität etablieren. Diese Zelllinie schien also prinzipiell zur Etablierung eines stabilen Testsystems zur Erfassung antiandrogener Aktivität geeignet zu sein.

Nach wiederholter transienter Transfektion mittels Elektroporation (bei unterschiedlichen Elektroporationsbedingungen) mit dem Reporter-genplasmid pMamneoLuc konnte allerdings keine durch DHT induzierbare Luciferaseaktivität gemessen werden. Da die Transfektionsrate eventuell zu gering war, um meßbare Luciferaseaktivität zu erhalten, wurde nach der Transfektion eine Selektionsphase mit Genitacin angeschlossen. Die selektionierten Zellklone waren ebenfalls nicht aktiv, d.h. bei Inkubation mit DHT kam es nicht zur Expression der Luciferase. Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Einmal könnten die Zellen während der Selektionsphase unempfindlich gegenüber Genitacin geworden sein und das Plasmid schon ausgeschleust haben. Zweitens könnte der endogene Androgenrezeptorgehalt zu gering für eine Transkriptionsaktivierung sein.

Um die der Literatur widersprechenden Ergebnisse aufzuklären, wurde daher eine RT-PCR mit spezifischen Primern für ein 760 bp langes Fragment der ligandbindenden Domäne des Androgenrezeptors [Lin et al., 1998] durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Zelllinie SaOS-2 in der verwendeten Passagenzahl eine nicht detektierbare Menge an Androgenrezeptor m-RNA enthielt. Bei den zum Vergleich mitgeführten Brustkrebs-Zelllinien T47D und BT-474 dagegen war AR m-RNA enthalten (Abb. 25).



**Abb.25:** Nachweis von Androgenrezeptor m-RNA in SaOS-2, T47D und BT-474 Zellen

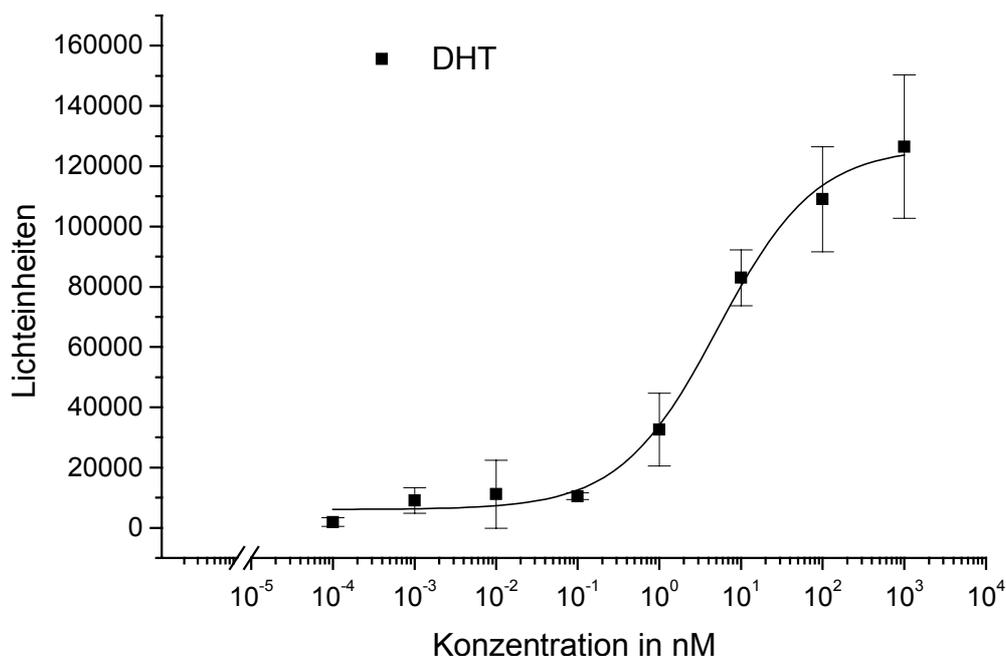
#### **4.1.1.1.2.3. T47D-Luc**

Eine weitere Zelllinie mit endogenem Steroidhormonrezeptorgehalt ist die Brustkrebszelllinie T47D. Neben ausreichenden Mengen an Androgenrezeptor (siehe Abb. 25) sind auch Progesteron-, Glucocorticoid- und Estrogenrezeptoren enthalten. [Keydar, 1979]

Dies muß bei der Etablierung eines Testsystems berücksichtigt werden, da sowohl ligandaktivierter AR, als auch ligandaktivierter PR und GR an den MMTV Promotor binden. So können auch Verbindungen, die über den PR und GR wirken, zur Expression der Luciferase führen. Ein nach Transfektion mit dem Reporterplasmid pMamneoLuc erhaltenes Testsystem eignet sich daher nicht

ohne weiteres zur Prüfung auf agonistische Aktivität am AR. Lediglich antagonistisches Verhalten lässt sich durch eine Hemmung der durch die physiologischen Hormone induzierten Reporterogenaktivität direkt feststellen. Um agonistische Wirkung am AR zu untersuchen, müssten PR und GR vor dem Experiment durch pure Antagonisten geblockt werden.

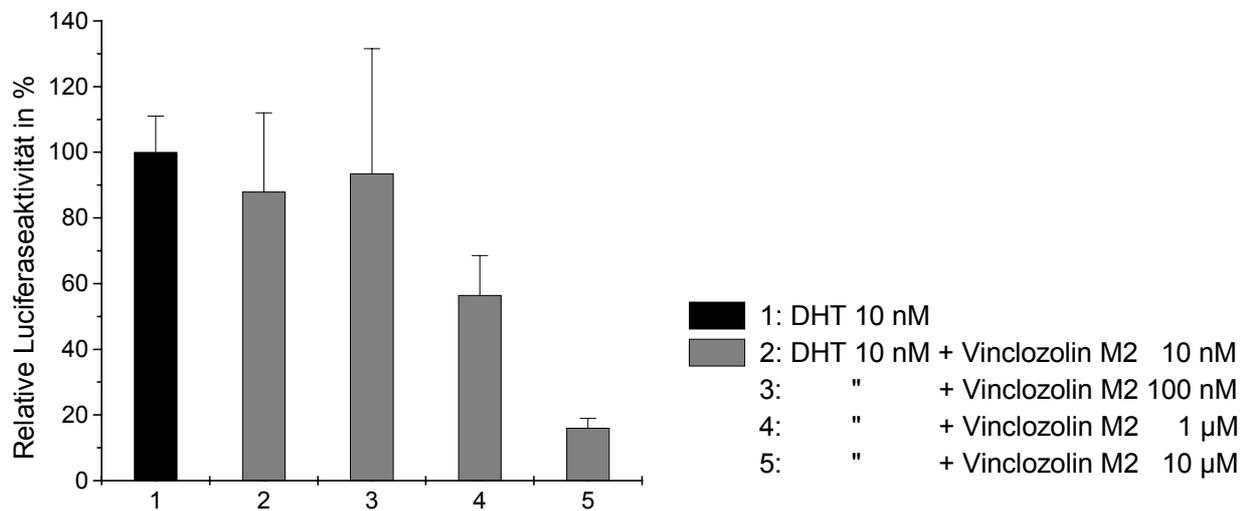
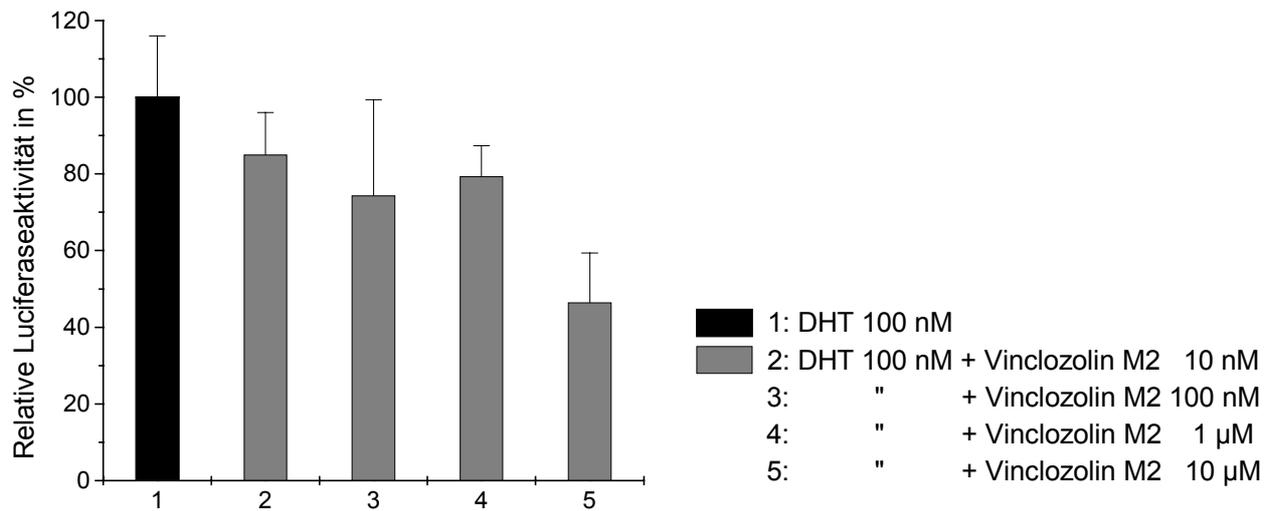
Ein nach Transfektion mit pMamneoLuc und entsprechender Selektion erhaltener Zellklon zeigte eine durch DHT konzentrationsabhängig induzierbare Luciferaseaktivität. Wiederum konnte bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit die typische sigmoidale Kurve dargestellt werden. Der Wendepunkt der Kurve liegt hier etwas unterhalb des physiologischen DHT-Bereichs bei ca. 5 nM. (Abb. 26)



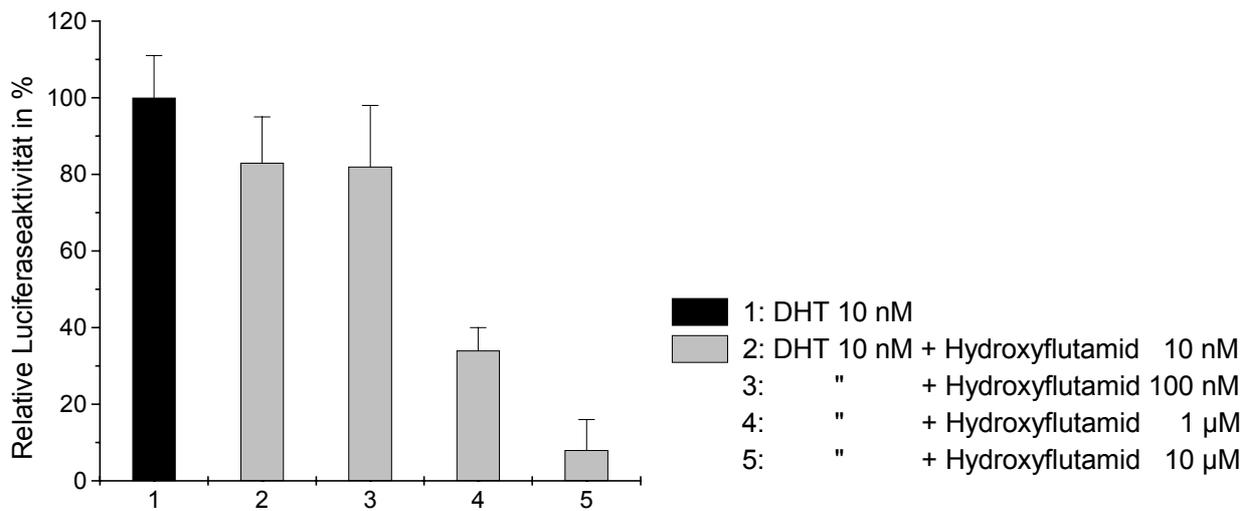
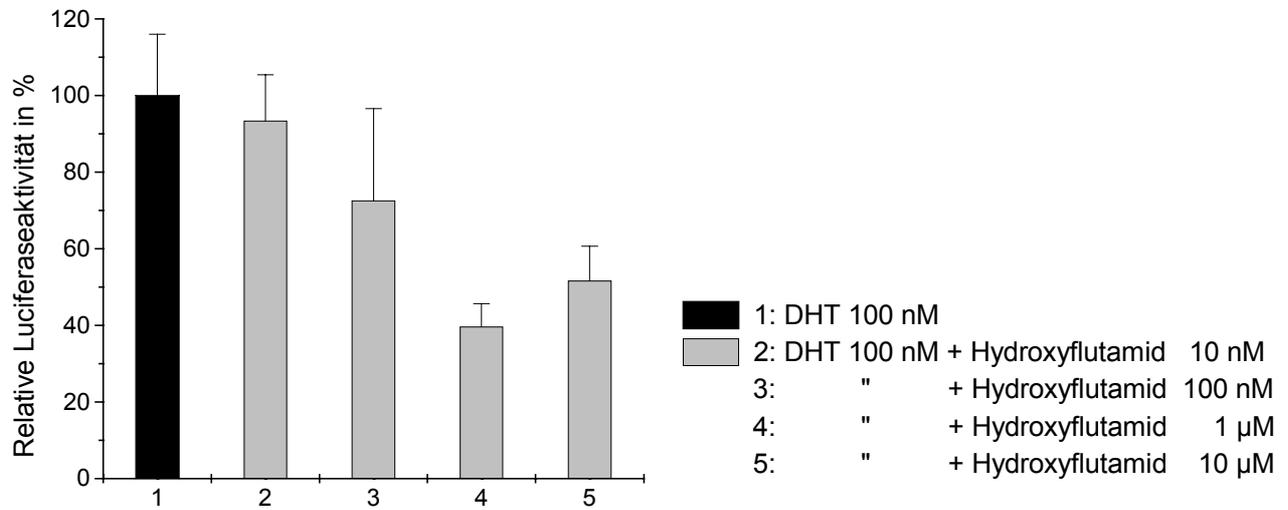
**Abb.26:** Validierung des T47D-Luc Testsystems mit DHT

Die endgültige Validierung erfolgte mittels der bekannten Antagonisten Hydroxyflutamid, Vinclozolin M2 und p,p'-DDE. Für die Konkurrenzexperimente zur Validierung wurden die beiden DHT Konzentrationen 100 nM und 10 nM gewählt, um die für eine spätere Substanztestung geeigneteste zu ermitteln. Bei einer Konzentration von 100 nM DHT befindet sich auf der sigmoidalen Kurve etwa der

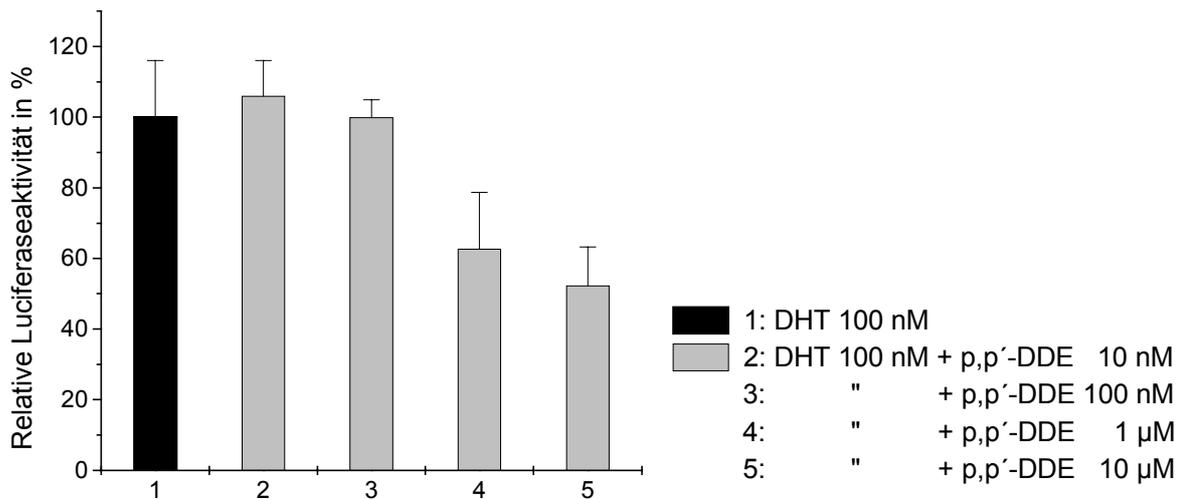
Übergang zum Sättigungsbereich des Rezeptors. Schwach antagonistische Verbindungen lassen sich hier eventuell schlechter nachweisen, als bei einer Kombination mit der zwischen Wendepunkt und Sättigungsbereich liegenden DHT Konzentration von 10 nM.



**Abb.27:** Validierung des T47D-Luc Testsystems mittels Vinclozolin M2



**Abb.28:** Validierung des T47D-Luc Testsystems mittels Hydroxyflutamid



**Abb.29:** Validierung des T47D-Luc Reportergensystems mit p,p'-DDE

In den Abbildungen ist zu erkennen, daß alle drei Antagonisten die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität in der höchsten eingesetzten Konzentration (10 µM) um ca. 50 % reduzieren. Stärkere Effekte wurden in Kombination mit 10 nM DHT beobachtet: Die durch DHT induzierte Luciferaseaktivität ließ sich um 80 % (Vinclozolin M2) oder sogar 90% (Hydroxyflutamid) bei der höchsten eingesetzten Konzentration (10 µM) hemmen. Die potentielle antiandrogene Wirkung verschiedener Verbindungen wurde daher im folgenden in Kombination mit 10 nM DHT untersucht.

Die Validierung des Testsystems T47D-Luc war hiermit erfolgreich abgeschlossen. Das Testsystem ist über einen längeren Zeitraum der Kultivierung stabil, d.h. das Reportergenplasmid wurde bisher nicht wieder von den Zellen ausgeschleust.

#### **4.1.1.2. Nicht transgene Reporterassays**

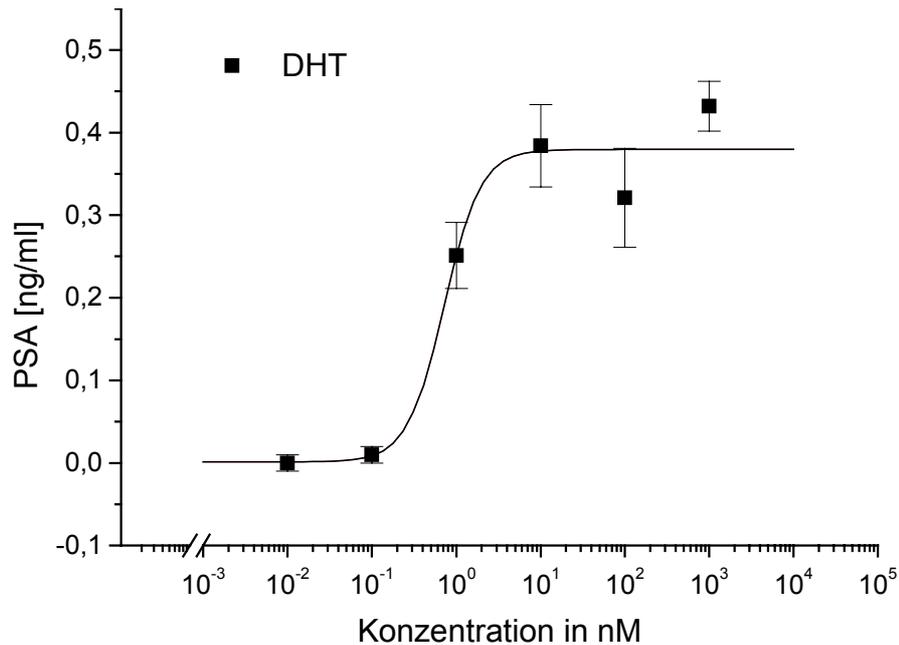
Im Gegensatz zu den bisher besprochenen transgenen Reporterassays ist es bei der Durchführung eines nicht transgenen Reporterassays nicht erforderlich, Zellen genetisch zu verändern. In der Zelle vorhandene Steroidhormonrezeptor-kontrollierte Gene werden als endogene Reporter herangezogen. Die zeitaufwendige wiederholte Transfektion und Selektion entfällt also.

##### **4.1.1.2.1. PSA-Assay**

Als endogener Reporter für die Untersuchung antiandrogener Aktivität bietet sich das Prostata spezifische Antigen (PSA) an. PSA wird von den schon bei der Etablierung eines stabilen transgenen Transaktivierungsassays verwendeten T47D Zellen unter Einwirkung von Androgenen und Progestinen gebildet. [Rosenberg et al., 1998]

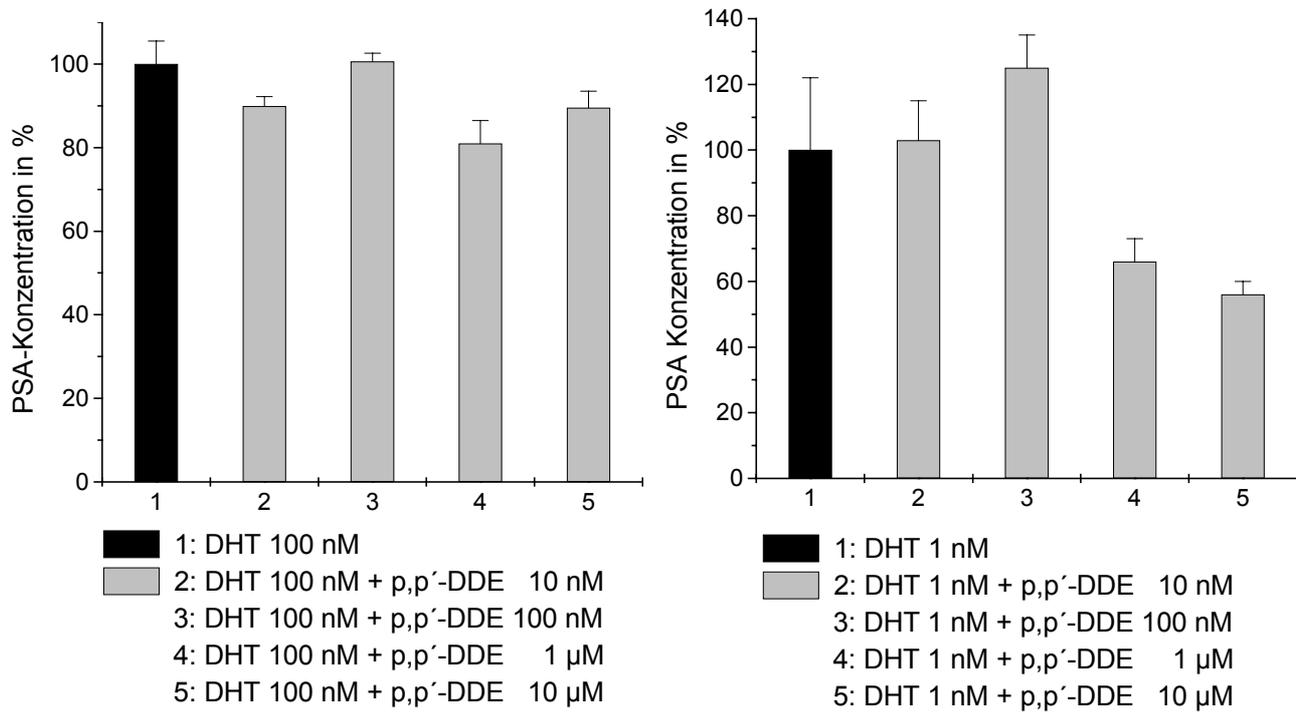
Es ist daher wiederum nur die direkte Untersuchung von antiandrogenem, nicht aber von androgenem Potential möglich.

Nach Inkubation mit DHT in steigenden Konzentrationen exprimieren die Zellen konzentrationsabhängig PSA, das mittels ELISA nachgewiesen werden kann. In Abwesenheit von DHT ist kein PSA detektierbar. Die erhaltene Kurve zeigt nach halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit die erwartete sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung. Der Übergang vom unteren zum oberen Plateau ist im Vergleich zu den etablierten transgenen Reporterassays steiler, der Wendepunkt ist um eine Größenordnung nach links verschoben (Abb. 30). Daher ist der PSA-Assay sensitiver und präziser.



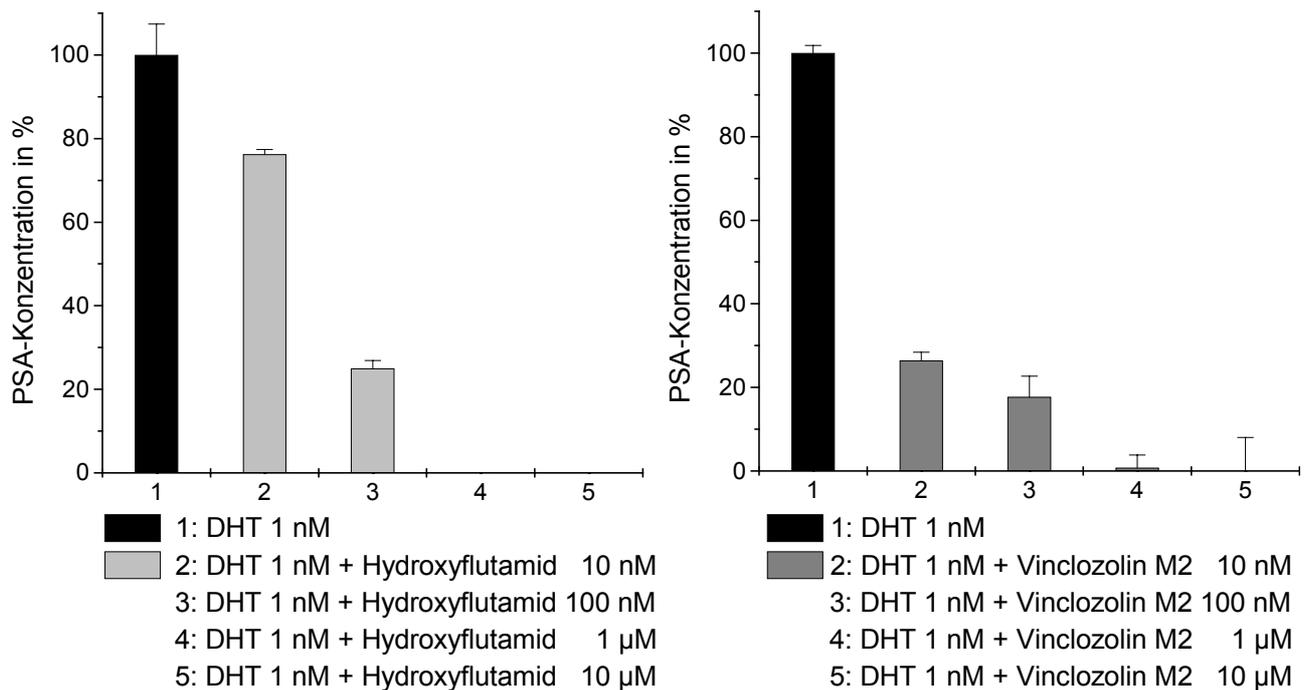
**Abb.30:** Validerung des PSA-Assays in T47D Zellen mit DHT

Die abschließende Validierung erfolgte wie im vorhergehenden mittels der drei bekannten Antiandrogene Hydroxyflutamid, Vinclozolin M2 und p,p'-DDE. Als für die Antagonisierungsexperimente am geeignetesten erwies sich eine DHT Konzentration von 1 nM. Höhere DHT Konzentrationen befinden sich bereits im Sättigungsbereich der Kurve (Abb. 30). Daher konnte auch bei einer DHT Konzentration von 10 nM oder 100 nM (Abb. 31) keine nennenswerte Antagonisierung der induzierten PSA Konzentration durch p,p'-DDE gezeigt werden. Erst die bei einer DHT Konzentration von 1 nM induzierte PSA Konzentration ließ sich durch p,p'-DDE in der höchsten eingesetzten Konzentration (10 µM) um ca. 50% reduzieren (Abb.31).



**Abb.31:** Validierung des PSA-Assays: Antagonisierung von 100 nM und 1 nM DHT durch p,p'-DDE

Die beiden strukturell ähnlichen Verbindungen Hydroxyflutamid und Vinclozolin M2 waren im PSA-Assay deutlich aktiver als p,p'-DDE. Bereits bei einer Konzentration von 1 µM wurde die durch DHT (1 nM) induzierte PSA Konzentration zu ca. 100% gehemmt (Abb.32).



**Abb.32:** Validierung des PSA-Assays: Antagonisierung von 1 nM DHT durch Hydroxyflutamid und Vinclozolin M2

Ein nicht transgenes Testsystem auf Basis des endogenen Reporters PSA konnte somit etabliert und validiert werden und steht für die Untersuchung von potentiellen Antiandrogenen zur Verfügung.

#### **4.1.2. Proliferationsassay**

Steroidhormone beeinflussen die Zellproliferation von verschiedenen Brustkrebs- und Prostatakrebs-Zelllinien. Ein 1995 von Soto und Sonnenschein etablierter Proliferationsassay zur Erfassung estrogener Aktivität ist der sogenannte E-Screen Assay mit MCF-7 Brustkrebszellen. Dieser wurde lange Zeit unter den *in vitro* Methoden favorisiert, hat aber den Nachteil, daß das Wachstum der Zellen auch über andere Signaltransduktionswege reguliert wird. Heute wird daher im allgemeinen der Transkriptionsaktivierungsassay bevorzugt. [Mußler, 1999]

Um ein breiteres *in vitro* Testspektrum abzudecken und bessere Vergleichsmöglichkeiten zu erhalten, sollte dennoch in dieser Arbeit ein Proliferationsassay zur Erfassung androgener/antiandrogener Aktivität etabliert werden.

Dazu können keine Prostatakrebs-Zelllinien herangezogen werden, da diese ein sehr langsames Wachstumsverhalten zeigen und schwierig zu kultivieren sind. Hinzu kommt, daß viele Prostatakrebs-Zelllinien, wie z.B. die Zelllinie LNCaP, eine mutierte Form des Androgenrezeptors exprimieren. Dadurch ändert sich das Verhalten bekannter Antiandrogene. Hydroxyflutamid wirkt hier z.B. als Androgen und nicht als Antiandrogen. [Veldscholte et al., 1992]

Für die Etablierung eines Proliferationsassays kommen androgenabhängige Brustkrebszelllinien (MFM-223) oder Osteosarkomazelllinien (SaOS-2) in Frage. Die in den vorangegangenen Untersuchungen eingesetzten T47D Zellen können hingegen nicht genutzt werden, da sie hormonunabhängig wachsen.

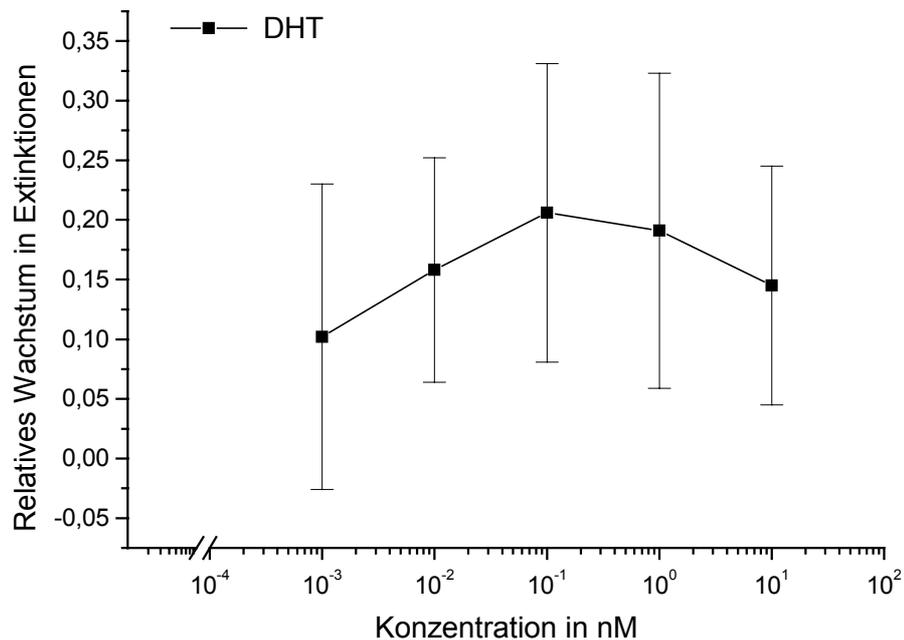
#### **4.1.2.1. Proliferationsassay mit MFM-223 Zellen**

Hackenberg et al. etablierten 1991 einen Proliferationsassay zur Erfassung androgener/antiandrogener Verbindungen mit der Brustkrebszelllinie MFM-223. Durch Einwirkung von Androgenen wurde das Wachstum dieser Zelllinie dosisabhängig reduziert, bei gleichzeitiger Gabe eines Antiandrogens wurde dieser Effekt ebenfalls dosisabhängig aufgehoben. [Hackenberg, 1991]

Nach fünftägiger Inkubation von MFM-223 Zellen mit DHT als Positivkontrolle und Kultur-Medium als Negativkontrolle wurde die Lebendzellzahl durch Sulforhodamin-B Färbung bestimmt und verglichen. Im Gegensatz zu den in der Literatur dargestellten Ergebnissen wurde das Wachstum der MFM-223 Zellen durch DHT in Konzentrationen von 1 pM bis 10 nM nicht gehemmt, sondern stimuliert. Dabei konnte allerdings -wie auch schon in früheren Arbeiten [Herrou, 1997]- kein eindeutiger Dosis-Wirkungs-Zusammenhang hergestellt werden (Abb. 33). Durch Kombination von DHT mit bekannten Antiandrogenen konnte der durch DHT induzierte Wachstumsstimulus reduziert werden, jedoch zum Teil ohne erkennbare Dosisabhängigkeit.

Ein Proliferationsassay mit MFM-223 Zellen, der sich zur Untersuchung potentieller Androgene/Antiandrogene nutzen lässt, konnte daher nicht etabliert werden.

Möglicherweise hat während der längeren Kultivierungsdauer und erhöhter Passagenzahl eine Veränderung der MFM-223 Zellen, z.B. in Bezug auf die Steroidhormonrezeptorausstattung, stattgefunden. Dies könnte die von der Literatur abweichenden Ergebnisse erklären.

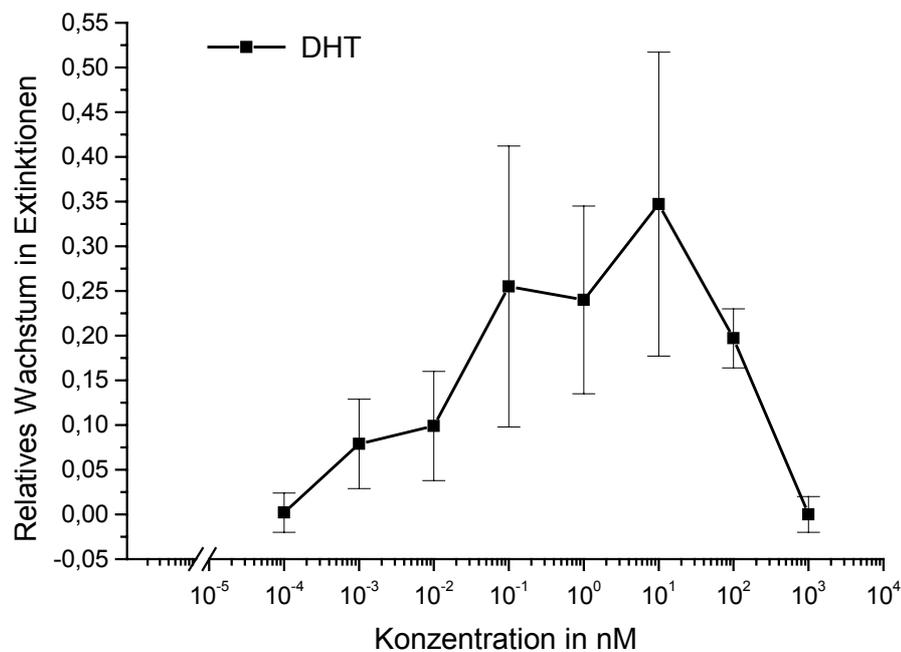


**Abb.33:** Validierung des MFM-Proliferationsassays: Induktion des Wachstums durch DHT

#### **4.1.2.2. Proliferationsassay mit SaOS-2 Zellen**

In der Literatur ist das androgenabhängige Wachstum von Osteosarkomazellen wie der Zelllinie SaOS-2 beschrieben [Kasperek et al., 1989; Wiren et al., 1997]. Die Etablierung eines androgenen/antiandrogenen Proliferationsassays sollte also mit diesen Zellen möglich sein. DHT als Positivkontrolle stimulierte das Wachstum der SaOS-2 Zellen. Die erhaltene Dosis-Wirkungskurve fiel bei hohen DHT Konzentrationen (100 nM und 1 µM) wieder ab. Bei solchen Konzentrationen wurden

in dieser Zelllinie cytotoxische Effekte beobachtet, die sich auf die Lebendzellzahl auswirkten. Zieht man die cytotoxischen hohen Konzentrationen nicht in Betracht, kann eine in etwa sigmoide Kurve beobachtet werden (Abb. 34).



**Abb.34:** Validierung des SaOS-2-Proliferationsassays: Induktion der Proliferation durch DHT

Nicht wie erwartet verliefen allerdings die Hemmexperimente mit bekannten Antiandrogenen. Mit steigender Konzentration des Antiandrogens verschlechterte sich die Hemmwirkung.

Eine nachträglich durchgeführte RT-PCR konnte keine Androgenrezeptor m-RNA nachweisen (siehe 4.1.1.1.2.2.; Abb. 25). Daher sind die beobachteten Effekte vermutlich nicht Androgenrezeptor-vermittelt, sondern laufen über andere Signalwege ab.

Ein Proliferationsassay gibt in diesem Fall keine Auskunft über die androgene/ antiandrogene Aktivität einer Verbindung und lässt sich als *in vitro* Testmethode nicht einsetzen.

### **4.1.3. Zusammenfassung: Etablierung von *in vitro* Testsystemen**

Es gelang in dieser Arbeit, drei *in vitro* Testsysteme zur Erfassung antiandrogener Aktivität zu etablieren und mittels der bekannten Antiandrogene p,p'-DDE, Hydroxyflutamid und Vinclozolin Metabolit 2 zu validieren:

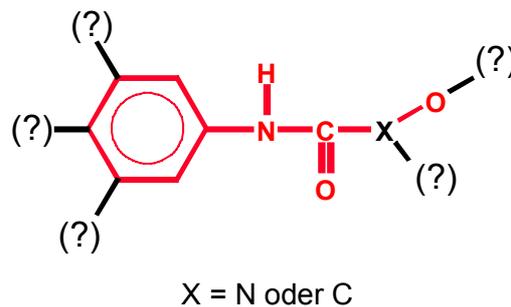
- 1. Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen**
- 2. Transaktivierungsassay in stabil transfizierten T47D-Luc Zellen**
- 3. PSA Assay in T47D Zellen**

Am sensitivsten und präzisesten ist der PSA Assay. Der EC<sub>50</sub>-Wert der sehr steilen DHT Dosis-Wirkungskurve liegt bei 0,7 nM. Die DHT Dosis-Wirkungskurven der beiden transgenen Reporterassays sind dagegen um ca. eine Größenordnung nach rechts verschoben und somit weniger sensitiv. Beim transienten Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen liegt der EC<sub>50</sub>-Wert bei 9,7 nM, beim stabilen T47D-Luc Reporterassay bei 5,2 nM. Die Kurven sind um einiges flacher und damit weniger präzise.

#### 4.2. Substanzauswahl: Identifizierung potentiell androgener/antiandrogener Verbindungen

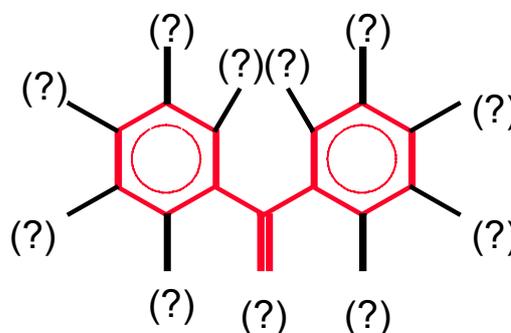
Bisher identifizierte Antiandrogene können aufgrund ihrer Struktur prinzipiell zwei Gruppen zugeordnet werden.

Mußler entwickelte 1999 entsprechend eine mögliche antiandrogene Consensus-Struktur nicht-steroidaler Antiandrogene. Sie wurde anhand der Phenylharnstoff-Analoga Hydroxyflutamid, Vinclozolin Metabolit M2 und Casodex verifiziert (Abb. 35).



**Abb.35:** Erste Leitstruktur nicht-steroidaler Antiandrogene [Mußler, 1999]

Ausgehend von p,p'-DDE, dem antiandrogenen Phytobenzophenon (*dalbergia cochinchinensis*) und den mittels Molecular Modelling Berechnungen über eine Fit Option ermittelten strukturanalogen Benzophenonen Oxybenzon und p,p'-Dihydroxybenzophenon [Mußler, 1999] konnte eine mögliche zweite Consensus-Struktur nicht-steroidaler Antiandrogene ermittelt werden (Abb. 36).



**Abb.36:** Zweite Leitstruktur nicht-steroidaler Antiandrogene

Anhand dieser beiden Leitstrukturen wurden über die online Strukturdatenbank Beilstein-Crossfire weitere strukturell ähnliche Verbindungen identifiziert. Diese sollten zur Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen auf ihr androgenes/antiandrogenes Potential untersucht werden. Daher wurden Verbindungen mit möglichst unterschiedlichen Substituenten sowie unsubstituierte Analoga wie Phenylharnstoff und Benzophenon in Betracht gezogen (Tabelle 1).

	<b>Phenylharnstoff-Analoga</b>	<b>Benzophenon-Analoga</b>
<b>Leitverbindungen</b>	Hydroxyflutamid Vinclozolin M2 Casodex	p,p'-DDE Phytobenzophenon ( <i>dalbergia cochinchinensis</i> )
<b>Weitere potentielle Struktur-Analoga</b>	Linuron Monolinuron Metobromuron Diuron Fluometuron Phenylharnstoff	Oxybenzon p,p'-Dihydroxybenzophenon p,p'-Dichlorbenzophenon p,p'-Dibrombenzophenon p,p'-Dimethoxybenzophenon Benzophenon Xanthon

**Tabelle 1:** Überblick über die durch online Strukturdatenbanksuche ausgewählten Struktur-Analoga

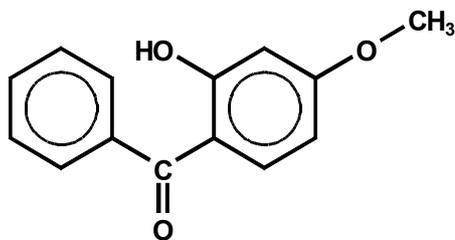
Die Gruppe der Phenylharnstoff-Analoga umfaßt Vertreter mit Chlor-, Brom- oder CF<sub>3</sub>-Substituenten, bei denen sich entweder eine Hydroxy- bzw. Methoxygruppe am terminalen Stickstoffatom befindet (Linuron, Monolinuron, Metobromuron) oder nicht

(Diuron, Fluometuron). Dadurch sollte die Bedeutung einer Hydroxygruppe in dieser Position für die Rezeptorbindung untersucht werden. Bekannt ist z.B., daß Flutamid erst nach Hydroxylierung in dieser Position zu Hydroxyflutamid antiandrogen wirkt [Mußler, 1999]. Die bekannten Antiandrogene Vinclozolin Metabolit 2 und Casodex<sup>®</sup> sind ebenfalls in dieser Position hydroxyliert.

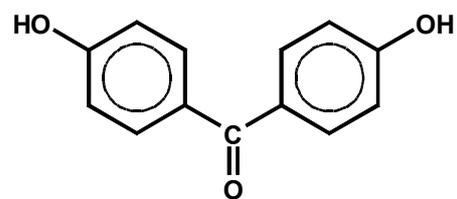
Bei den Benzophenon-Analoga wurden chlorierte, bromierte, hydroxylierte und methoxylierte Derivate sowie das durch eine Sauerstoffbrücke verbundene Xanthon herangezogen.

### Überblick über die Strukturen der untersuchten Verbindungen

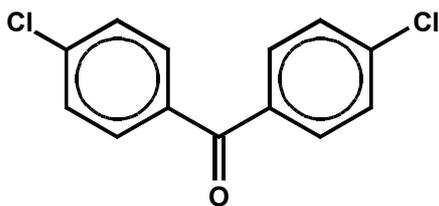
#### Benzophenon-Derivate



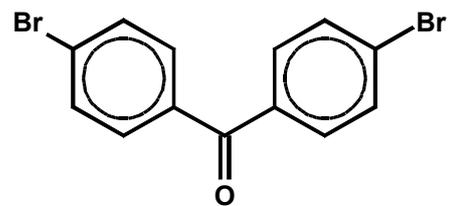
Oxybenzon



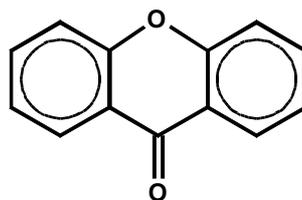
p,p'-Dihydroxybenzophenon



p,p'-Dichlorbenzophenon

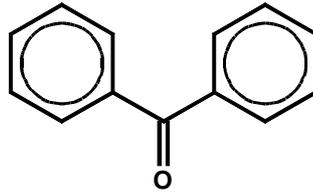


p,p'-Dibrombenzophenon



Xanthon

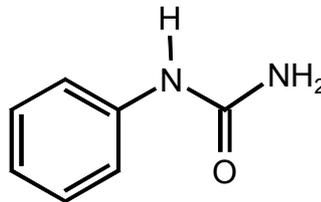
unsubstituiert:



Benzophenon

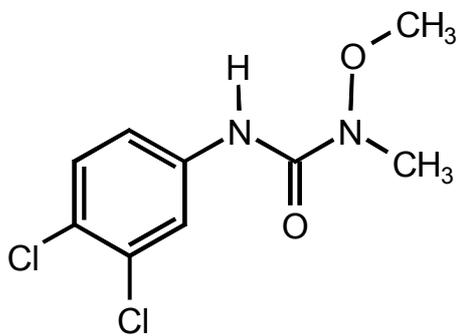
### Phenylharnstoff-Analoga

unsubstituiert:

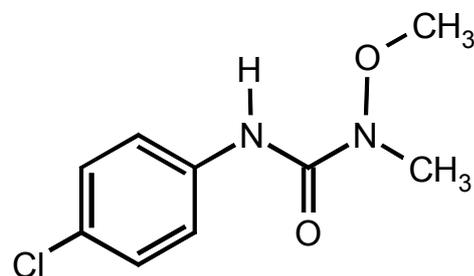


Phenylharnstoff

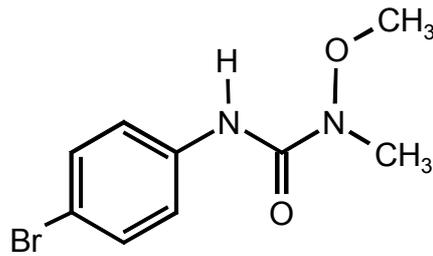
*N*-hydroxyliert bzw. *N*-methoxyliert:



Linuron

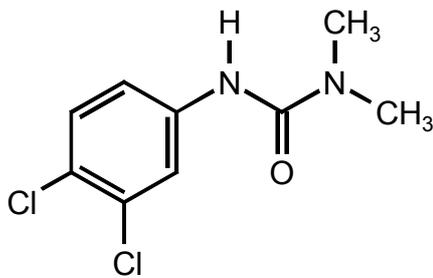


Monolinuron

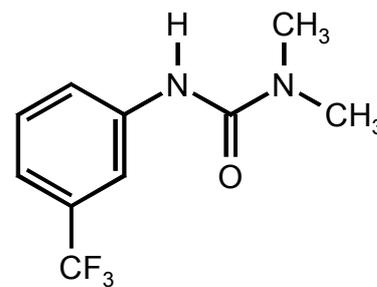


Metobromuron

nicht N-hydroxyliert:



Diuron



Fluometuron

#### **4.3. Untersuchung von ausgewählten Verbindungen auf androgene/antiandrogene Aktivität in den etablierten in vitro Testsystemen**

Die unter 4.2. mittels online Strukturdatenbanksuche ermittelten Benzophenon- und Phenylharnstoff-Strukturanaloga wurden in den etablierten *in vitro* Testsystemen (siehe 4.1.: Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen, Transaktivierungsassay in stabil transfizierten T47D-Luc Zellen und PSA Assay in T47D Zellen) auf androgene/antiandrogene Aktivität untersucht. Der transiente Transaktivierungsassay war aufgrund der zeitaufwendigen Versuchsdurchführung auf die Gruppe der Benzophenon-Analoga sowie Linuron und Monolinuron beschränkt. Im erst gegen Ende der Arbeit restlos etablierten stabilen Reporterassay wurde dagegen die

Gruppe der Phenylharnstoff-Analoga vollständig untersucht. Der einfacher und schneller, da ohne Transfektion und Selektion, durchzuführende PSA Assay erlaubte die Überprüfung beider Gruppen.

### **4.3.1. Benzophenon-Analoga**

#### **4.3.1.1. Oxybenzon**

Oxybenzon (2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenon) wird als UV-Filtersubstanz in Sonnenschutz- und anderen Kosmetikprodukten, sowie in Kunststoffpolymeren eingesetzt. Das Absorptionsspektrum befindet sich im Bereich von 200 bis 350 nm und bietet Schutz vor UVA und UVB Strahlen. [Obereke et al., 1994; Kadry et al., 1995].

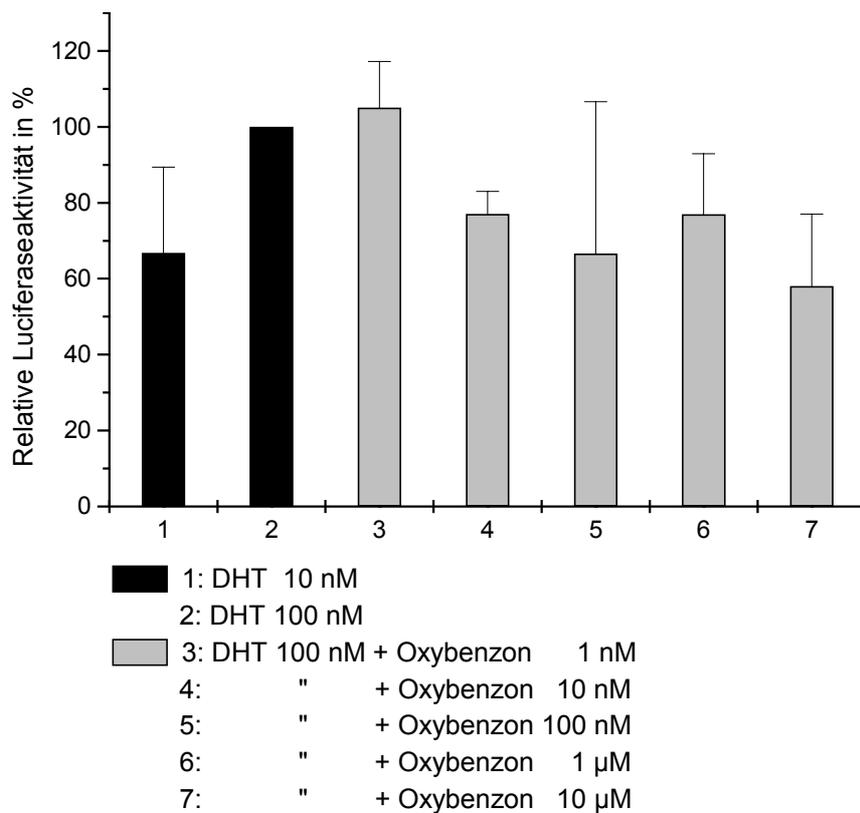
Oxybenzon wird dermal resorbiert und findet sich auch in der Muttermilch. In stark belasteten Badegewässern wird eine Bioakkumulation in Fischen beobachtet [Nagel, 1996]. Die Absorption nach dermalen Applikation findet sehr schnell statt. Im Plasma sind die Hauptmetaboliten 2,4-Dihydroxybenzophenon und 2,2'-Dihydroxy-4-Methoxybenzophenon. Im Gewebe (vor allem in Leber, Niere, Milz und Hoden) findet sich 2,3,4-Trihydroxybenzophenon. [Obereke et al., 1994]

In einer *in vivo* Studie des National Toxicological Programms der USA (NTP-Studie TOX-21,1992) weisen Befunde bereits auf eine potentielle antiandrogene Aktivität von Oxybenzon hin. Bei oraler Aufnahme über das Futter von 50 000 ppm Oxybenzon über 13 Wochen war die Spermiedichte bei männlichen Ratten reduziert, bei weiblichen Tieren trat ein verlängerter Zyklus auf. Eine dermale Studie an B6C3F1 Mäusen zeigte ebenfalls Auswirkungen: Bei 13-wöchiger topischer Applikation von 22,75 , 91 und 200 mg/kg/d Oxybenzon war die Spermienzahl bei allen getesteten Dosen reduziert. Ein NOAEL für die Beeinträchtigung der Spermienzahl konnte in dieser Studie nicht bestimmt werden.

Hingegen wurden bei einer 1993 durchgeführten Studie [Daston et al., 1993] an B6C3F1 Mäusen nach topischer Applikation von bis zu 400 mg/kg/d Oxybenzon keine Effekte am männlichen Reproduktionstrakt beobachtet.

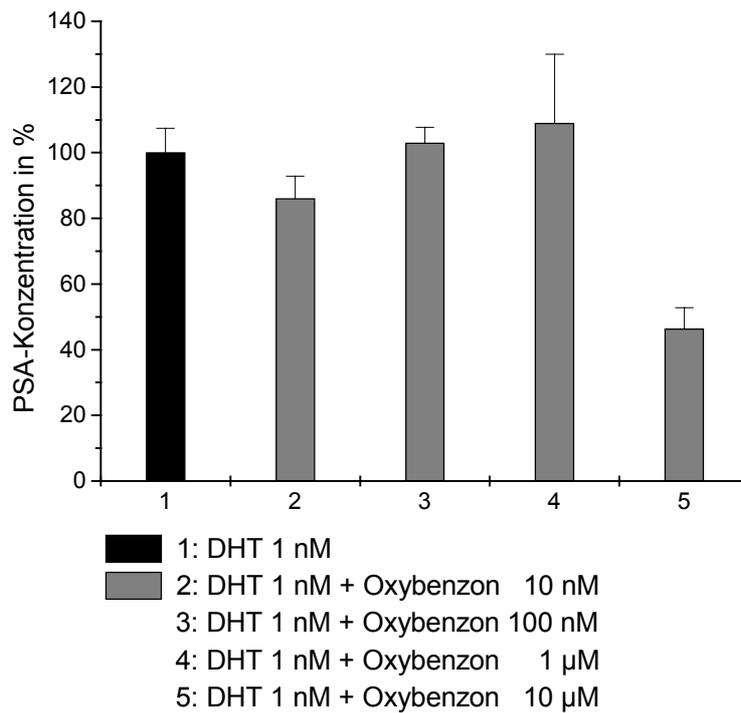
Der Nachweis eines potentiellen antiandrogenen Wirkmechanismus in den etablierten *in vitro* Testsystemen war daher von Interesse.

Im transienten Transaktivierungsassay und im PSA Assay zeigte sich antiandrogene Wirkung. Mit der höchsten eingesetzten Oxybenzon Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) ließ sich die im transienten Transaktivierungsassay durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität um 42% hemmen (Abb. 37), im PSA Assay die durch 1 nM DHT induzierte PSA Konzentration um 54% (Abb. 38).

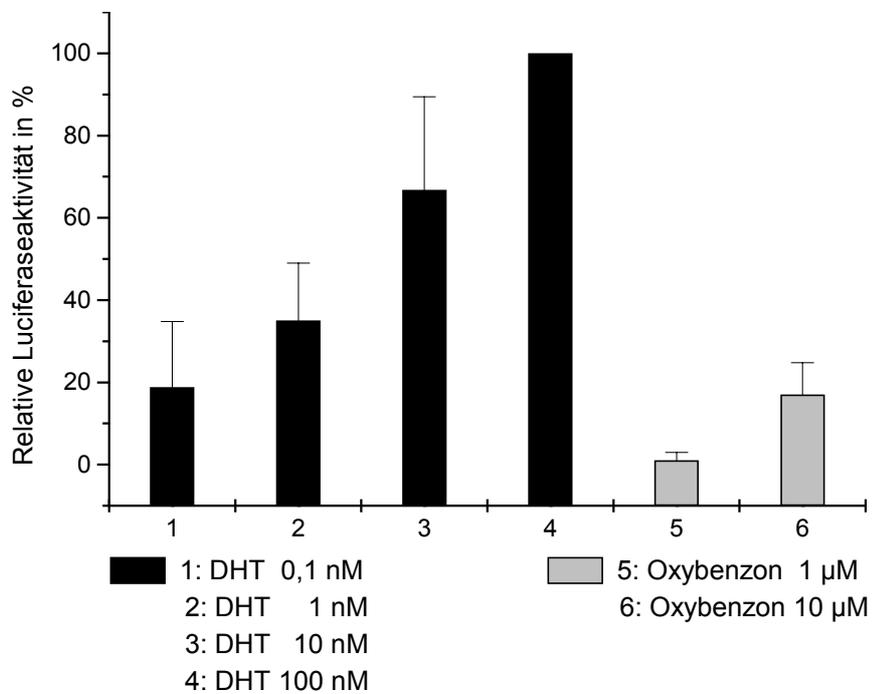


**Abb.37:** Antiandrogene Aktivität von Oxybenzon im transienten Transaktivierungsassay

Eine mögliche agonistische Aktivität von Oxybenzon konnte lediglich im transienten Transaktivierungsassay untersucht werden. Die Wirkung der höchsten eingesetzten Oxybenzon Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) entsprach etwa einem durch 0,1 nM DHT ausgelösten androgenen Effekt (Abb. 39).



**Abb.38:** Antiandrogene Aktivität von Oxybenzon im PSA Assay



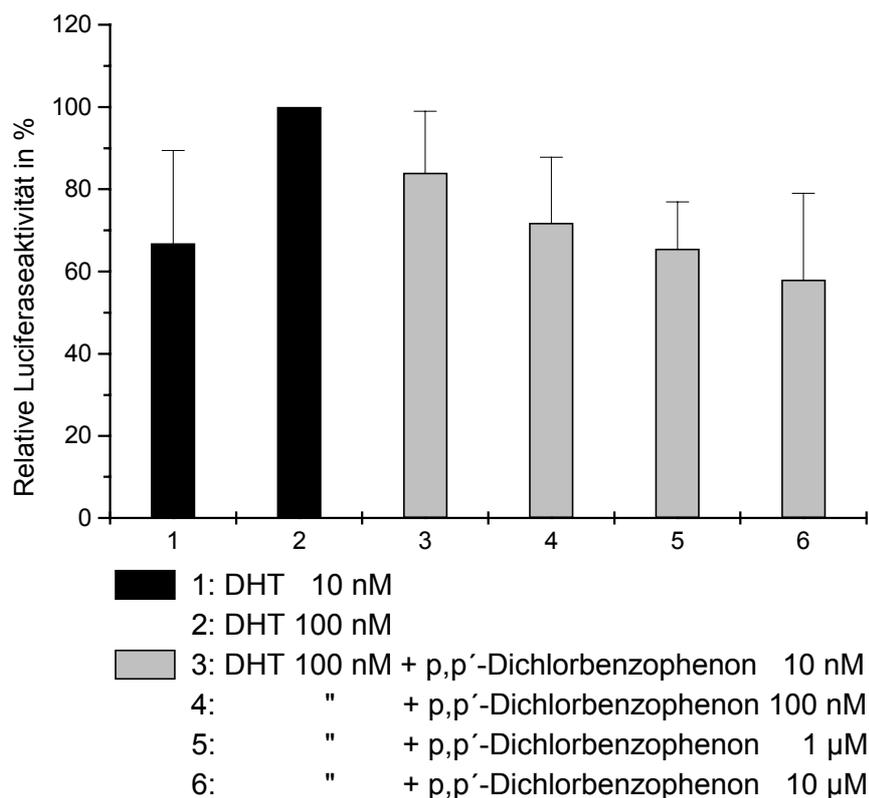
**Abb.39:** Androgene Wirkung von Oxybenzon im transienten Transaktivierungsassay

#### 4.3.1.2. p,p'-Dichlorbenzophenon

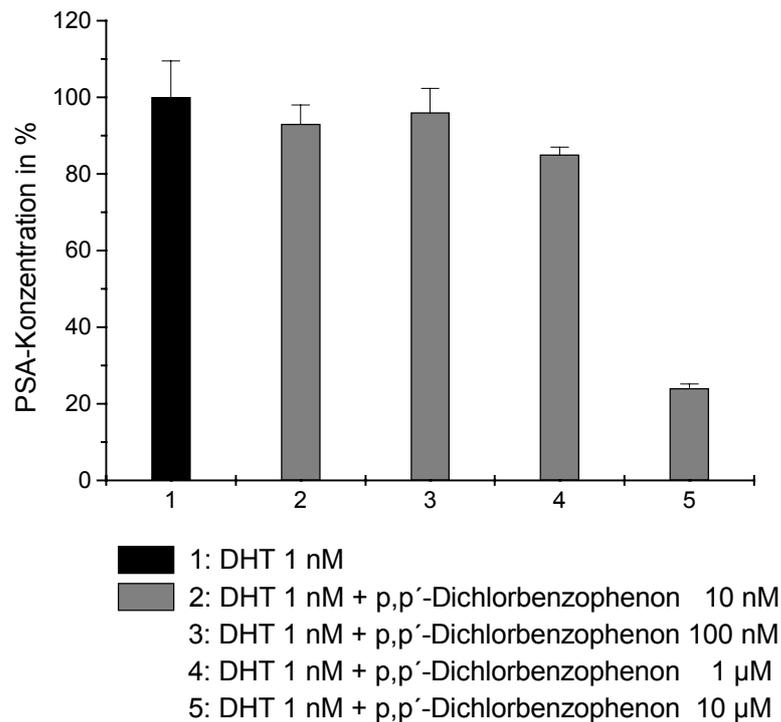
Untersuchungen zur Chlorierung von Sonnenschutzfiltern in gechlortem Badewasser zeigten, daß Oxybenzon in Wasser mit einer Chlorkonzentration von 5 und 10 ppm bei Zimmertemperatur innerhalb von 30 min chloriert wird. Bei 5 ppm wurden unter diesen Bedingungen 5% der Ausgangssubstanz, bei 10 ppm 10% chloriert. Die Chlorierung erfolgte in 2- und/oder 5-Position. [BgVV, pers. Mitteilung, 1999]

Bei der Metabolisierung des Pestizids Dicofol in Ratten kommt es u.a. auch zur Bildung von p,p'-Dichlorbenzophenon. [ US Government Printing Office, 1978]

Die Untersuchung von chlosubstituierten Benzophenonen auf androgene/antiandrogene Aktivität ist also ebenfalls von Interesse. Ausgewählt wurde in Hinblick auf spätere Struktur-Wirkungsuntersuchungen die in p,p'-Position substituierte Verbindung.



**Abb.40:** Antiandrogene Wirkung von p,p'-Dichlorbenzophenon im transienten Transaktivierungsassay



**Abb.41:** Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dichlorbenzophenon im PSA Assay

Die androgene/antiandrogene Wirkung wurde auch hier im transienten Transaktivierungsassay sowie im PSA Assay untersucht.

Im transienten Transaktivierungsassay konnte die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität von der höchsten eingesetzten p,p'-Dichlorbenzophenon Konzentration (10 µM) um ca. 40% gehemmt werden (Abb. 40).

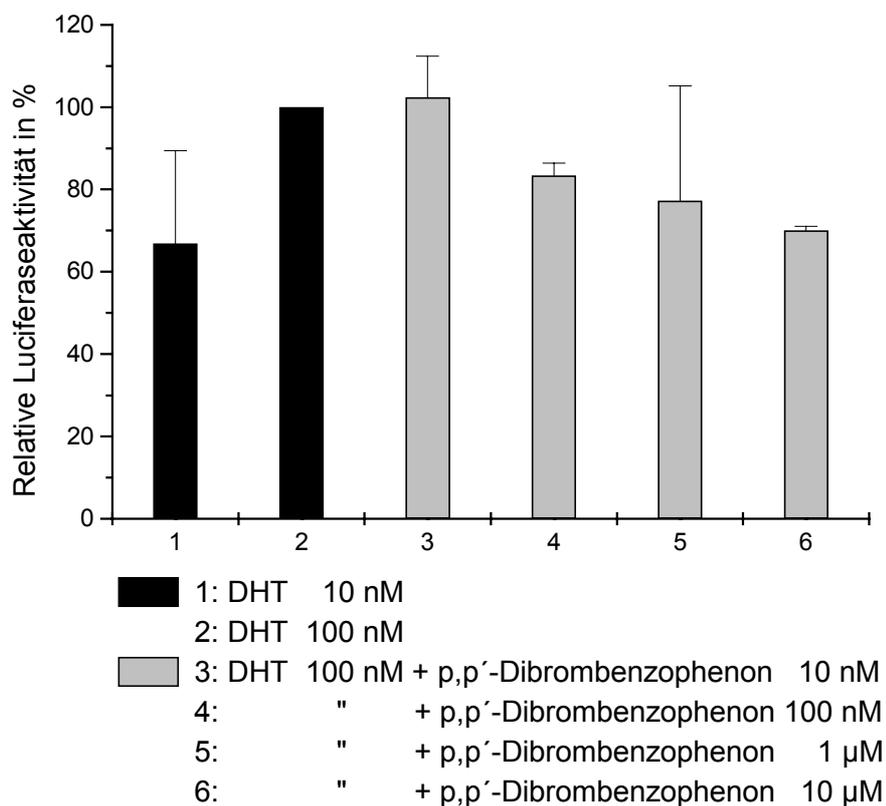
Im PSA Assay betrug die Hemmung der durch 1 nM DHT induzierten PSA Konzentration durch 10 µM p,p'-Dichlorbenzophenon sogar ca. 75% (Abb. 41).

Androgene Aktivität konnte dagegen im transienten Transaktivierungsassay auch bei 10 µM p,p'-Dichlorbenzophenon nicht festgestellt werden.

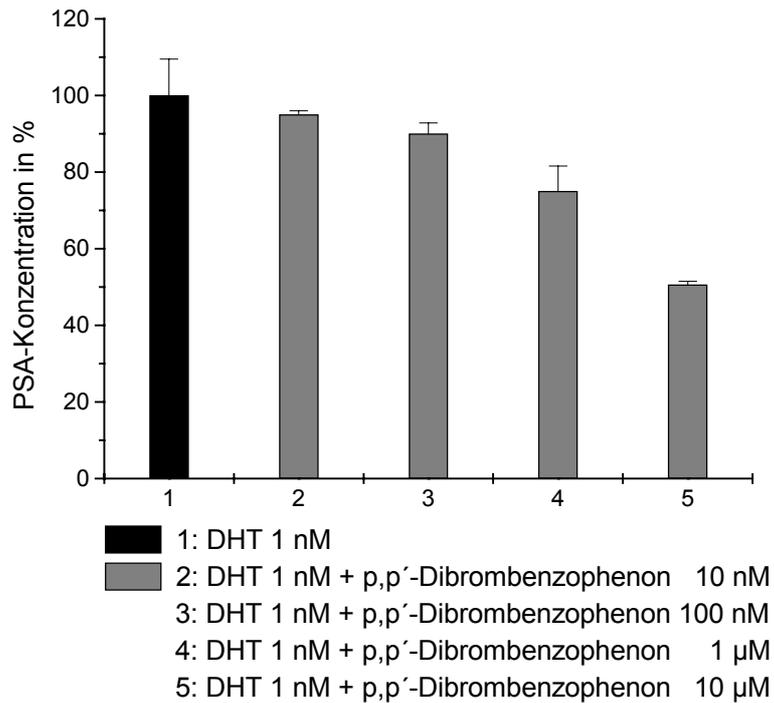
#### 4.3.1.3. p,p'-Dibrombenzophenon

Zum Aufstellen von Struktur-Wirkungsbeziehungen ist der Einfluß von verschiedenen Halogensubstituenten von Interesse. Daher wurde auch das p,p'-Dibrom-Derivat des Benzophenons untersucht.

Antiandrogene Aktivität konnte sowohl im transienten Transaktivierungsassay als auch im PSA Assay festgestellt werden. Die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität wurde von 10 µM p,p'-Dibrombenzophenon um ca. 30% (Abb. 42), die durch 1 nM DHT induzierte PSA Konzentration um ca. 50% gehemmt (Abb. 43).

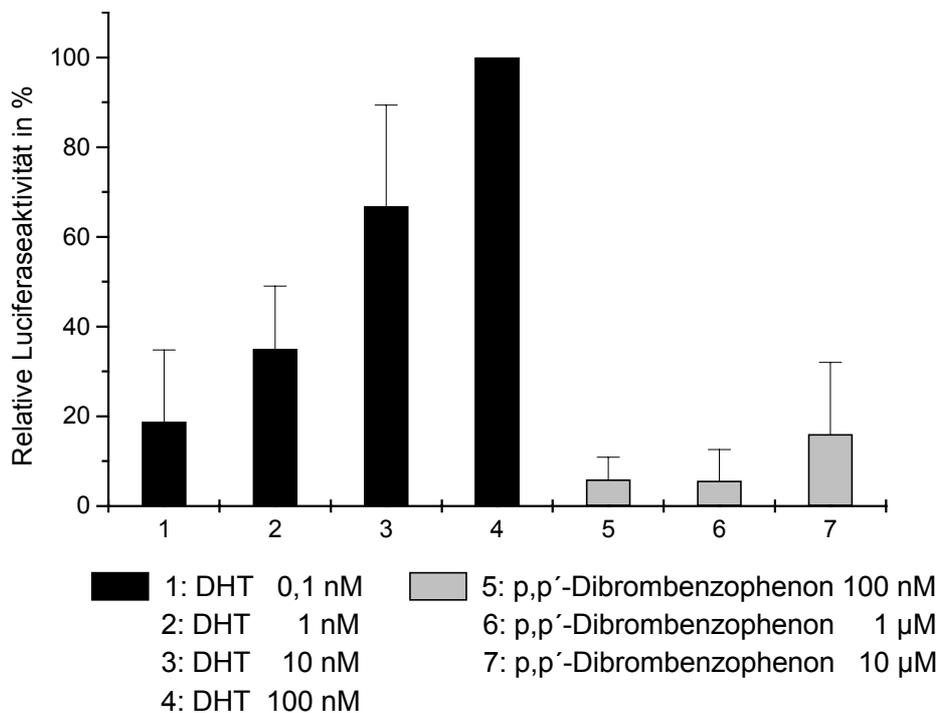


**Abb.42:** Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dibrombenzophenon im transienten Transaktivierungsassay



**Abb.43:** Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dibrombenzophenon im PSA Assay

Im transienten Transaktivierungsassay wurde auf androgene Aktivität untersucht. 10 µM p,p'-Dibrombenzophenon führte zu etwa vergleichbaren Effekten wie 0,1 nM DHT (Abb. 44).



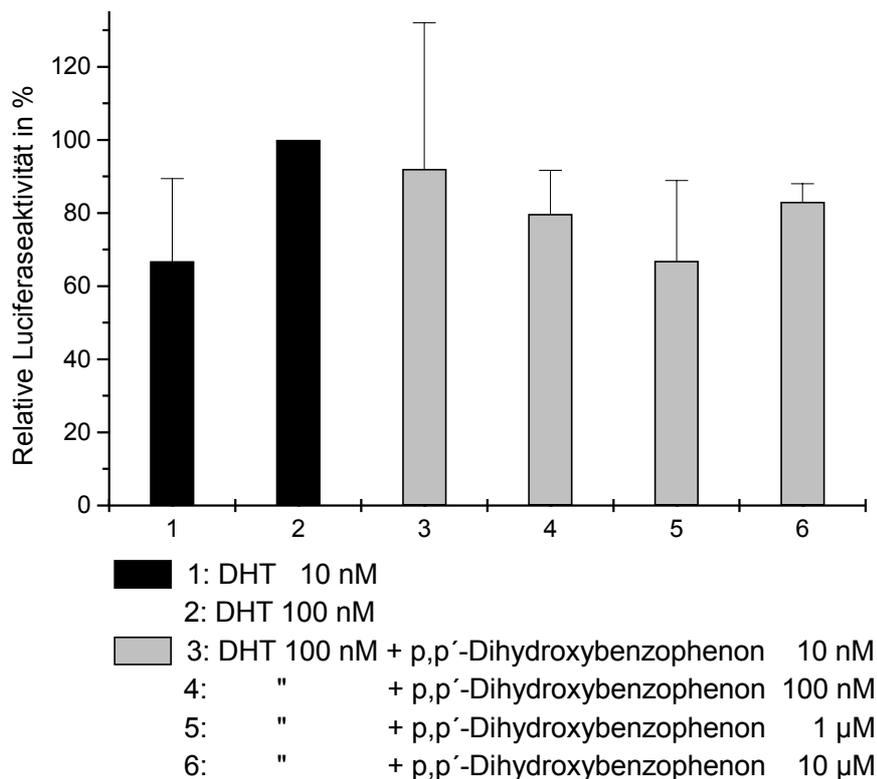
**Abb.44:** Androgene Aktivität von p,p'-Dibrombenzophenon

#### 4.3.1.4. p,p'-Dihydroxybenzophenon

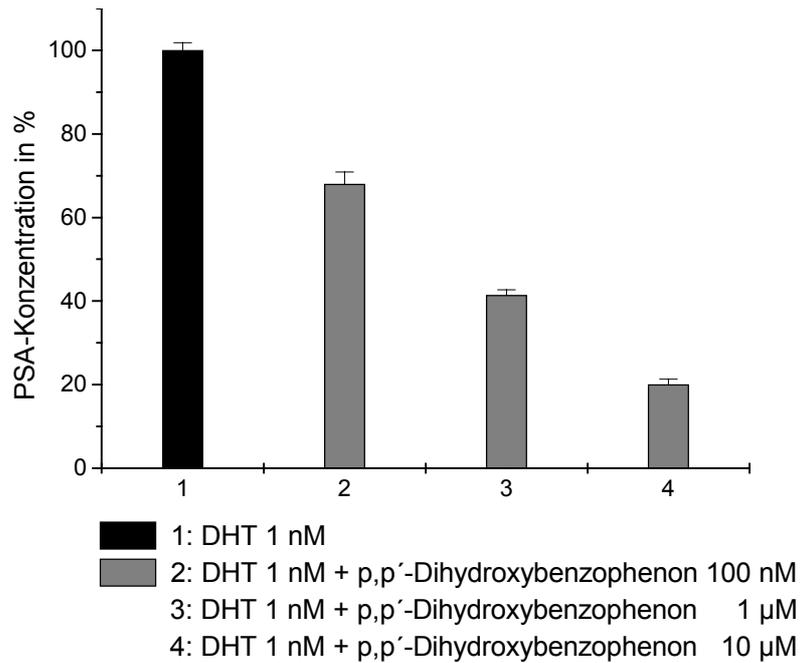
Das in p,p'-Stellung hydroxylierte Benzophenon Derivat wird als Kopolymer bei der Kunststoffproduktion eingesetzt.

Die Metaboliten der Benzophenone, wie z. B. von Oxybenzon (siehe 4.3.1.1.), im Körper sind hydroxylierte Derivate. Auswirkungen von Hydroxygruppen auf die Ligand-Androgenrezeptor-Interaktion sind also ebenfalls von Interesse.

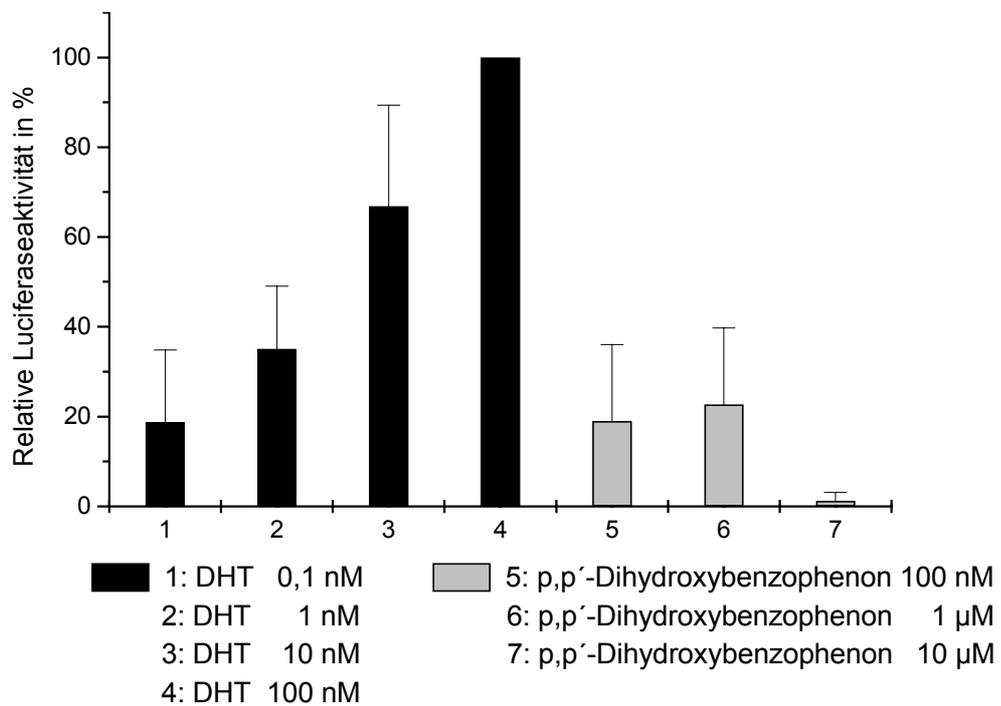
In beiden Testsystemen waren antiandrogene Effekte von p,p'-Dihydroxybenzophenon erkennbar. Im transienten Transaktivierungsassay wurde die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität um ca. 33% in Anwesenheit von 1  $\mu$ M p,p'-Dihydroxybenzophenon gehemmt. Die höhere Konzentration (10  $\mu$ M) zeigte dagegen schwächere Effekte (Abb. 45). Im PSA Assay ließ sich die durch 1 nM DHT induzierte PSA Konzentration durch 1  $\mu$ M p,p'-Dihydroxybenzophenon um ca 60%, durch 10  $\mu$ M sogar um ca. 80% hemmen (Abb. 46).



**Abb.45:** Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dihydroxybenzophenon im transienten Transaktivierungsassay



**Abb.46:** Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dihydroxybenzophenon im PSA Assay



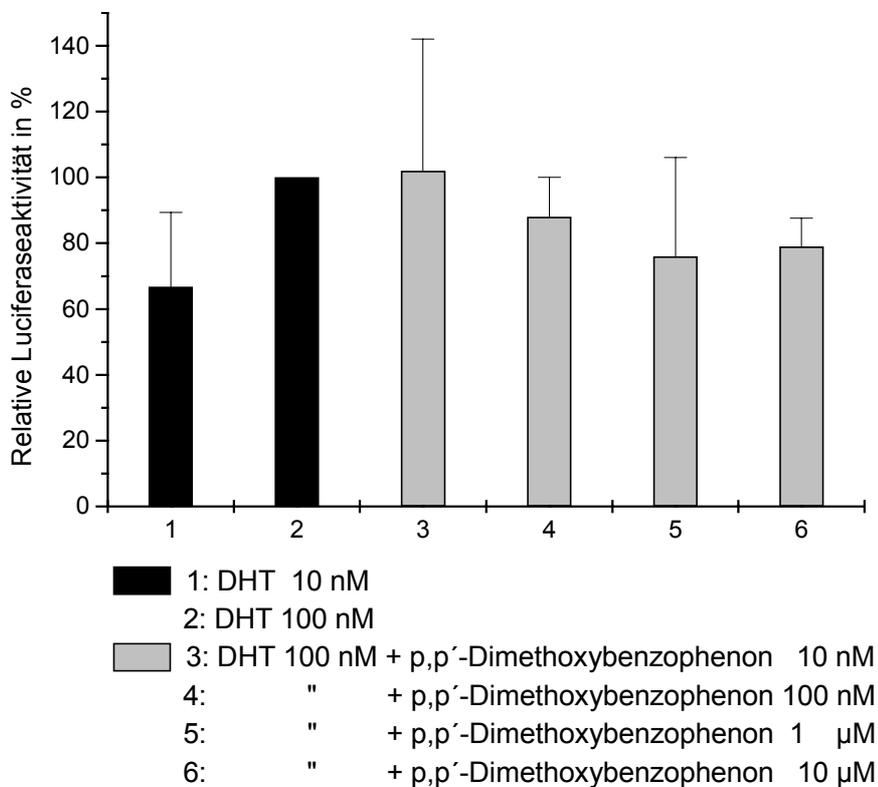
**Abb.47:** Androgene Aktivität von p,p'-Dihydroxybenzophenon im transienten Transaktivierungsassay

Die agonistische Wirkung im transienten Transaktivierungsassay war bei 100 nM und 1  $\mu$ M p,p'-Dihydroxybenzophenon in etwa vergleichbar mit der durch 0,1 nM DHT induzierten Aktivität. Eine höhere Konzentration von 10  $\mu$ M zeigte dagegen keinen agonistischen Effekt (Abb. 47).

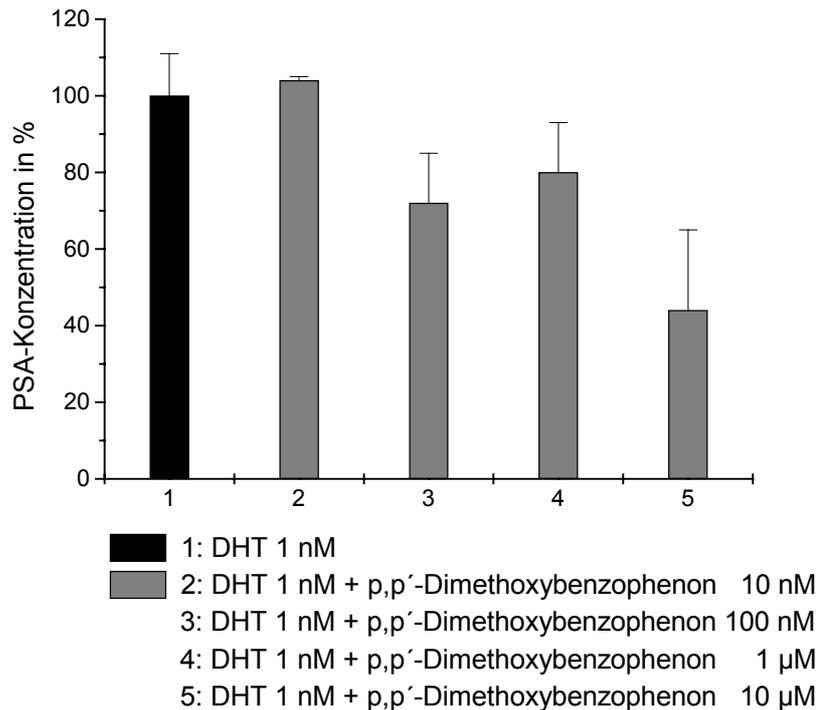
#### **4.3.1.5. p,p'-Dimethoxybenzophenon**

Oxybenzon weist neben einer Hydroxy- auch eine Methoxygruppe auf. Im Hinblick auf Struktur-Wirkungsbeziehungen ist daher auch ein p,p'-Dimethoxy-Derivat des Benzophenons interessant.

Antiandrogene Effekte von p,p'-Dimethoxybenzophenon traten in beiden eingesetzten Testsystemen auf. Im transienten Transaktivierungsassay konnte eine Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität um ca. 30% (Abb. 48), im PSA Assay eine Hemmung der durch 1 nM DHT induzierten PSA Konzentration um ca. 50% bei 10  $\mu$ M p,p'-Dimethoxybenzophenon gezeigt werden (Abb. 49).



**Abb.48:** Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dimethoxybenzophenon im transienten Transaktivierungsassay



**Abb.49:** Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dimethoxybenzophenon im PSA Assay

Agonistische Aktivität am AR zeigte p,p'-Dimethoxybenzophenon im transienten Transaktivierungsassay nicht.

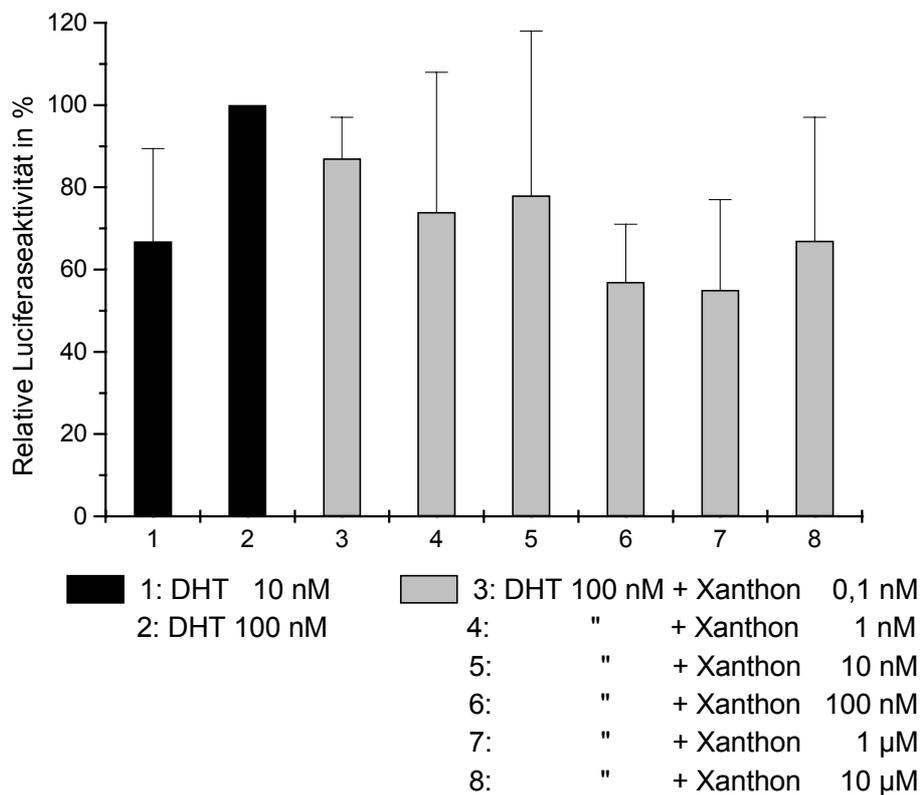
#### **4.3.1.6. Xanthon**

Xanthone sind in der Pflanzenwelt weit verbreitete gelbe Farbstoffe. Derivate kommen z.B. in *Garcinia mangostana*, *Mammea siamensis* und der Wurzel des gelben Enzians vor. Das Xanthon Grundgerüst kommt dabei selber nicht in Pflanzen vor [Täufel, 1993]. Die Untersuchung von Xanthon kann aber wichtige Hinweise auf die Aktivität von Benzophenon Derivaten mit Sauerstoffbrücke geben.

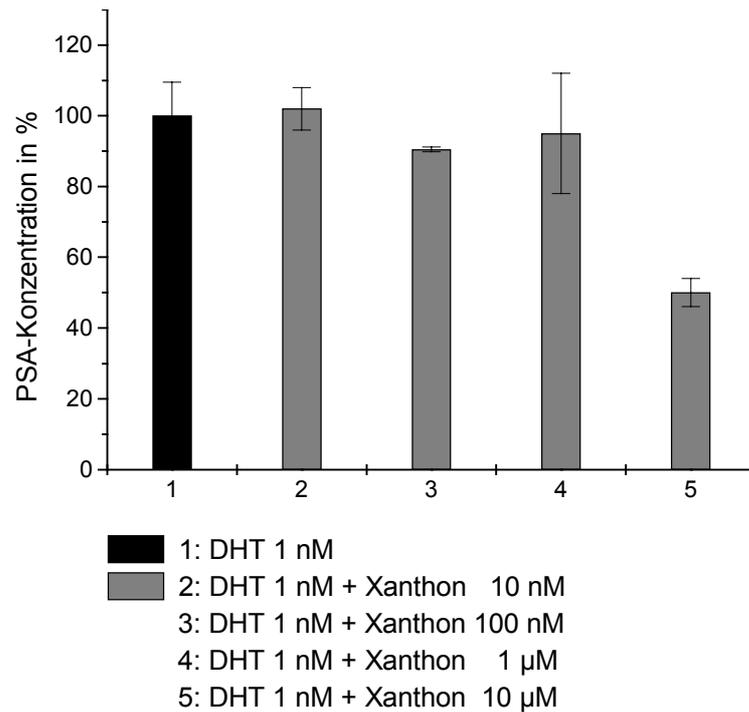
In den beiden eingesetzten Testsystemen konnte eine antiandrogene Aktivität von Xanthon ermittelt werden. Die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität konnte im transienten Transaktivierungsassay durch 100 nM und 1 µM Xanthon um ca 40% gehemmt werden. Bei der höchsten Konzentration (10 µM) nahm die Hemmwirkung auf ca. 30% ab (Abb. 50). Im PSA Assay konnte die durch 1 nM DHT

induzierte PSA Konzentration in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Xanthon um ca. 50 % gehemmt werden (Abb. 51).

Androgene Aktivität im transienten Transaktivierungsassay war nicht festzustellen.



**Abb.50:** Antiandrogene Aktivität von Xanthon im transienten Transaktivierungsassay

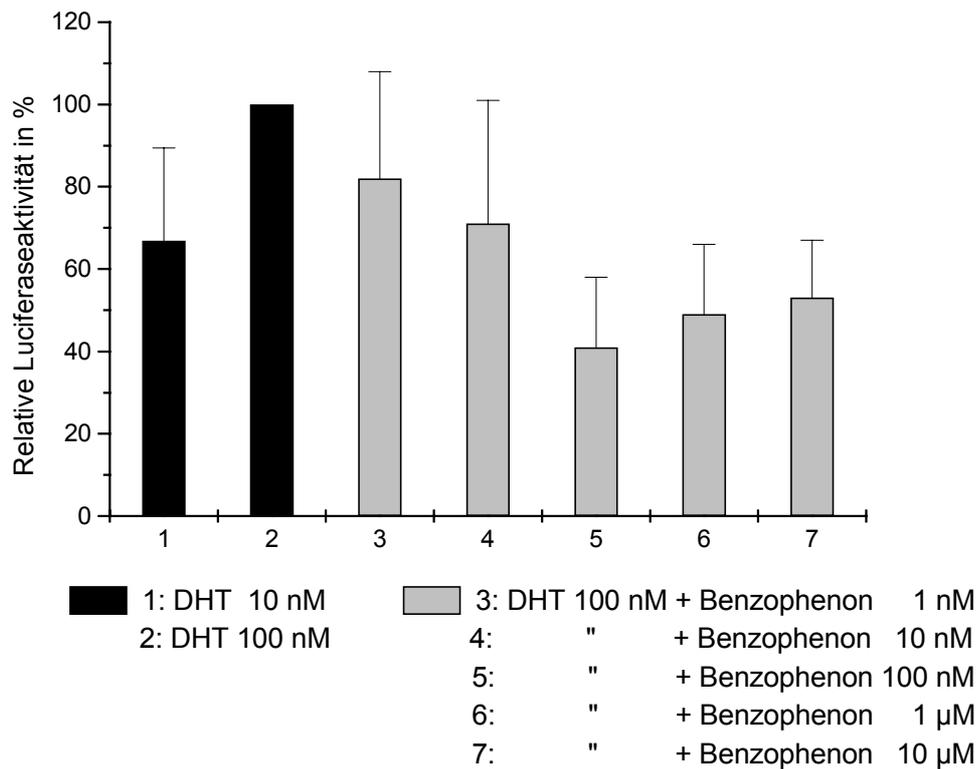


**Abb.51:** Antiandrogene Aktivität von Xanthon im PSA Assay

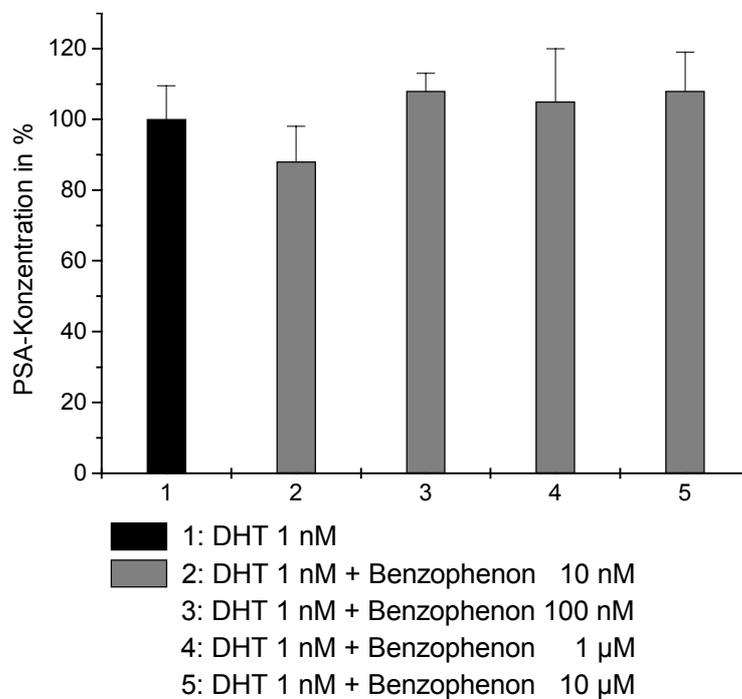
#### **4.3.1.7. Benzophenon**

Um festzustellen, ob Substituenten für eine Ligand-Rezeptor-Interaktion überhaupt notwendig sind, wurde auch das unsubstituierte Benzophenon untersucht.

Die Ergebnisse der beiden Testsysteme waren hier nicht einheitlich. Im transienten Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen zeigte Benzophenon antiandrogene, nicht aber androgene Wirkung. Die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität konnte schon bei 100 nM Benzophenon um ca. 60% gehemmt werden (Abb. 52). Im PSA Assay dagegen war keine antiandrogene Aktivität festzustellen (Abb. 53).



**Abb.52:** Antiandrogene Aktivität von Benzophenon im transienten Transaktivierungsassay

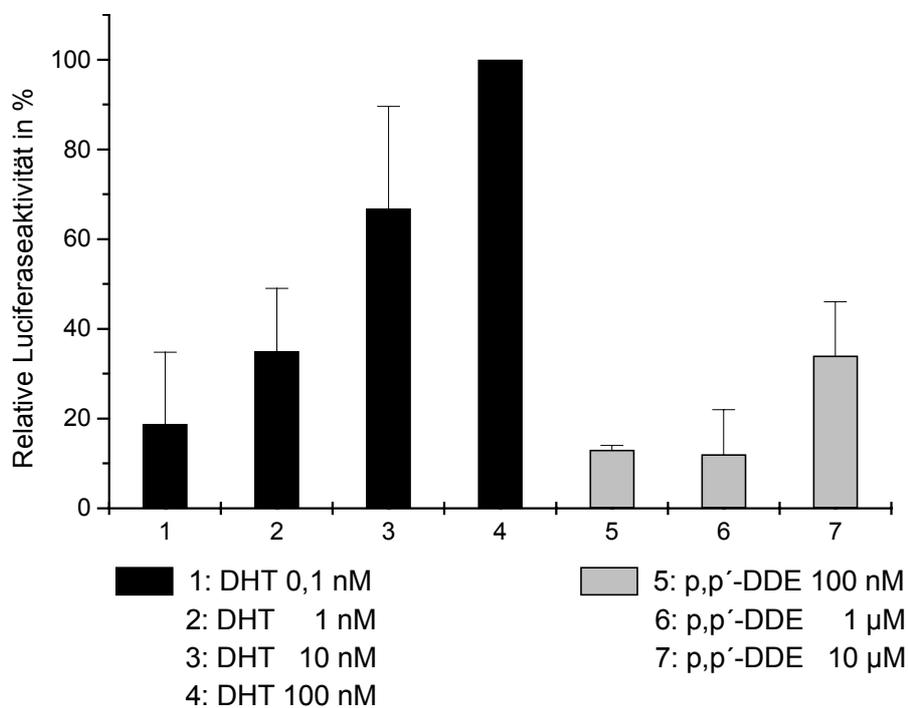


**Abb.53:** Untersuchung der antiandrogenen Aktivität von Benzophenon im PSA Assay

#### 4.3.1.8. p,p'-DDE

Das bekannte und bereits zur Validierung der Testsysteme eingesetzte Antiandrogen p,p'-DDE (siehe 4.1.1.) wurde zur Vervollständigung der Datenlage im transienten Transaktivierungsassay auch auf androgene Aktivität untersucht.

10  $\mu\text{M}$  p,p'-DDE zeigte dabei in etwa die gleiche agonistische Wirkung wie 1 nM DHT (Abb. 54).



**Abb.54:** Androgene Aktivität von p,p'-DDE im transienten Transaktivierungsassay

### **4.3.2. Phenylharnstoff-Analoga**

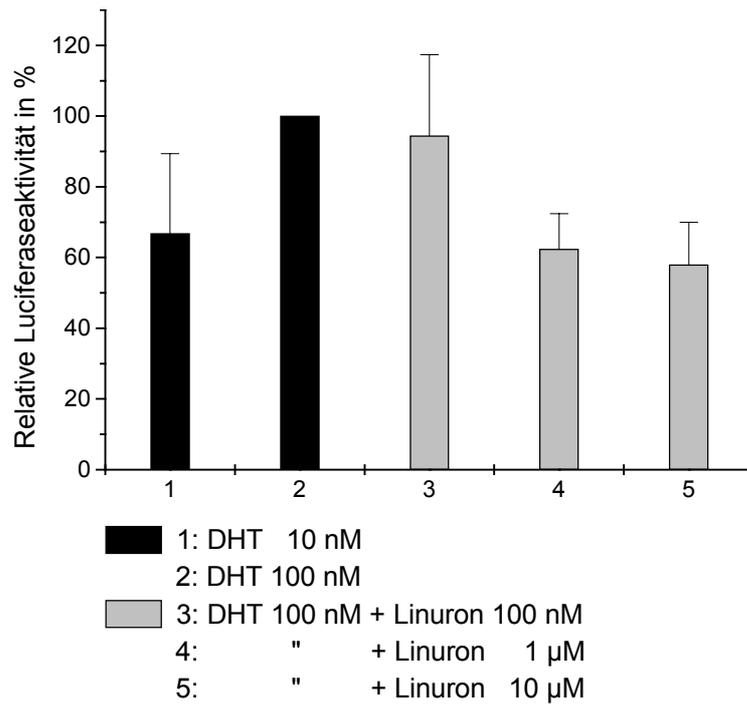
#### **4.3.2.1. Linuron**

Linuron findet breiten Einsatz als selektives Herbizid im Getreide- und Gemüseanbau. Untersuchungen zeigten, daß es den Reproduktionstrakt von männlichen Ratten beeinflußt. Behandlung von nicht geschlechtsreifen Tieren führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Gewichts der Epididymis (Nebenhoden) und anderer Geschlechtsorgane. Die Spiegel an Testosteron und Luteinisierendem Hormon (LH) waren dagegen vermutlich durch eine gestörte negative Rückkopplung von Testosteron auf Hypothalamus und Hypophyse in behandelten geschlechtsreifen Tieren erhöht und führten zu Leydigzell-Tumoren. Da die beobachteten Veränderungen den durch Flutamid ausgelösten glichen, wurden sie vermutlich ebenfalls durch einen antiandrogenen Wirkmechanismus verursacht. Bindungsstudien zeigten eine Hemmung der [<sup>3</sup>H] Testosteron-Androgenrezeptor-Bindung durch Linuron. [Cook et al., 1993; Danzo, 1998]

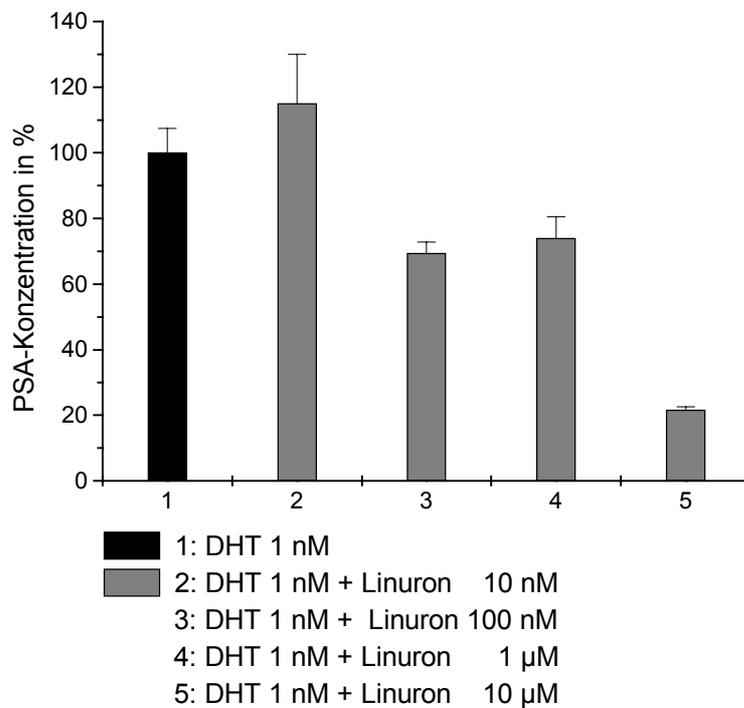
Diese Hinweise auf eine potentielle antiandrogene Wirkung von Linuron sollten in den drei etablierten funktionellen *in vitro* Testsystemen überprüft werden.

Die Ergebnisse zeigten übereinstimmend eine antiandrogene Aktivität von Linuron. Im transienten Transaktivierungsassay wurde die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität bei 1 µM und 10 µM Linuron um ca. 40% gehemmt (Abb. 55). Im PSA Assay konnte eine Hemmung der durch 1 nM DHT induzierten PSA Konzentration um ca. 80% durch 10 µM Linuron gezeigt werden (Abb. 56).

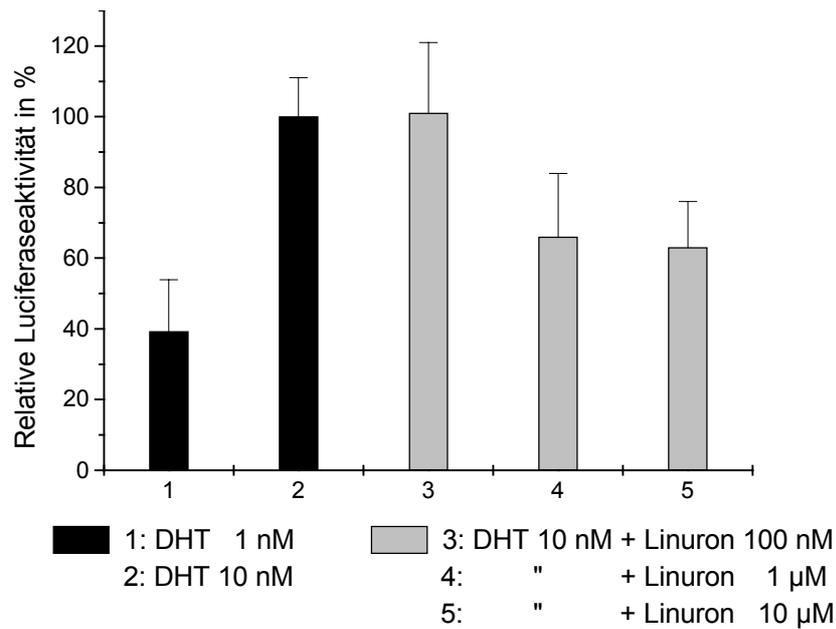
Im stabilen Transaktivierungsassay mit T47D-Luc Zellen wurde die durch 10 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität bei 1 nM und 10 µM Linuron um ca. 35% gehemmt (Abb. 57).



**Abb.55:** Antiandrogene Aktivität von Linuron im transienten Transaktivierungsassay

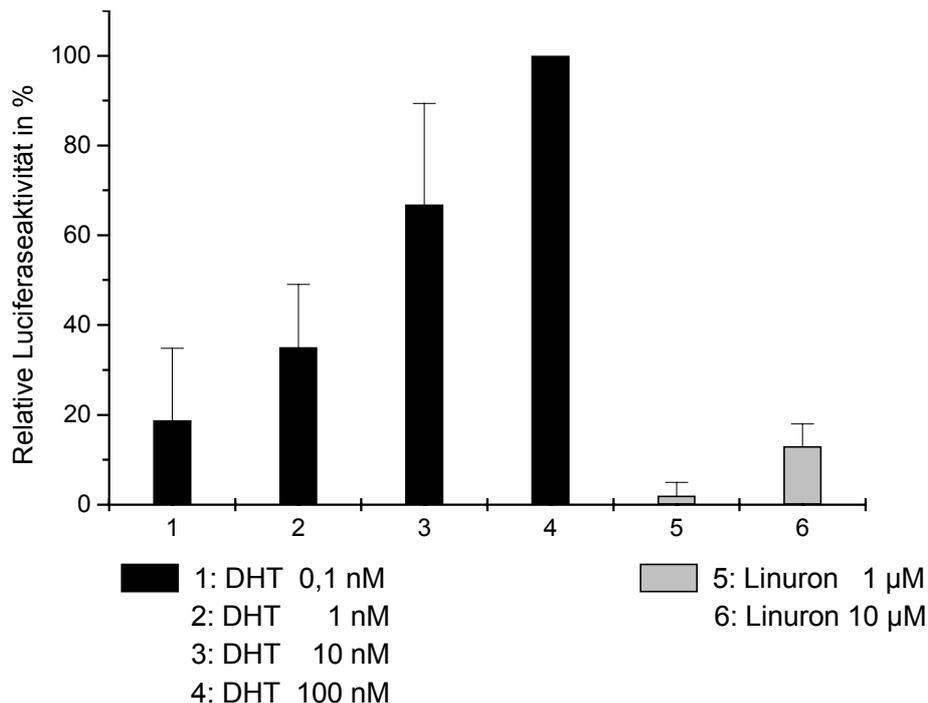


**Abb.56:** Antiandrogene Aktivität von Linuron im PSA Assay



**Abb.57:** Antiandrogene Aktivität von Linuron im stabilen T47D-Luc Reporterassay

Die potentielle androgene Wirkung von Linuron wurde im transienten Transaktivierungsassay untersucht. Durch die höchste eingesetzte Linuronkonzentration (10 µM) wurde etwas weniger Reporter gen induziert als durch 0,1 nM DHT (Abb. 58).



**Abb.58:** Untersuchung der androgenen Aktivität von Linuron im transienten Transaktivierungsassay

#### 4.3.2.2. Monolinuron

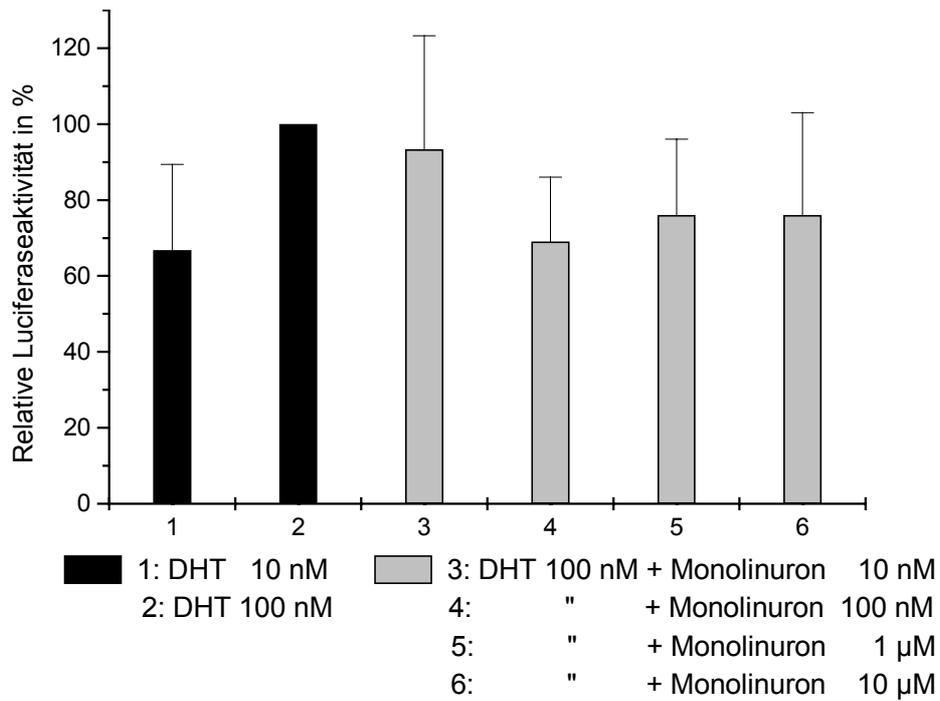
Monolinuron wird ebenso wie Linuron als Herbizid eingesetzt. Strukturell unterscheidet es sich lediglich durch einen fehlenden Chlorsubstituenten am Phenylring von Linuron. Der Einfluß dieses Substituenten auf die Rezeptorbindung kann anhand von Monolinuron untersucht werden.

In allen drei Testsystemen konnte antiandrogene Aktivität festgestellt werden.

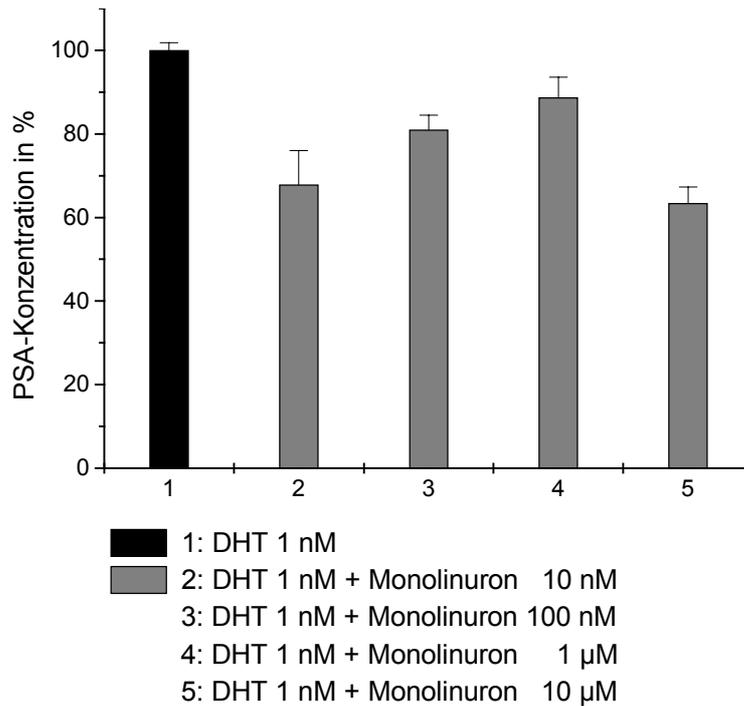
Im transienten Transaktivierungsassay konnte die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität bereits bei 100 nM Monolinuron um ca. 30% gehemmt werden (Abb. 59). Im PSA Assay wurde die durch 1 nM DHT induzierte PSA Konzentration durch die höchste (10 µM) und die niedrigste (10 nM) Monolinuron Konzentration um ca. 35% gehemmt. Die beiden mittleren Konzentrationen zeigten eine schwächere Hemmung (Abb. 60).

Im stabilen T47D-Luc Transaktivierungsassay konnte die durch 10 nM DHT induzierte Reporterogenaktivität bei 10  $\mu$ M Monolinuron um ca. 40% gehemmt werden (Abb. 61).

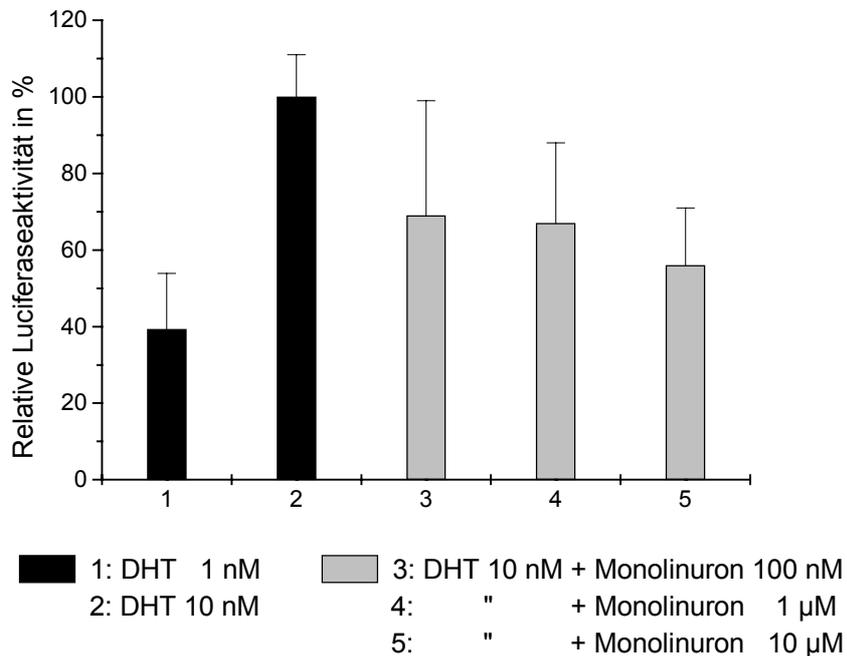
Androgene Wirkung im transienten Transaktivierungsassay zeigte Monolinuron nicht.



**Abb.59:** Antiandrogene Aktivität von Monolinuron im transienten Transaktivierungsassay



**Abb.60:** Antiandrogene Aktivität von Monolinuron im PSA Assay



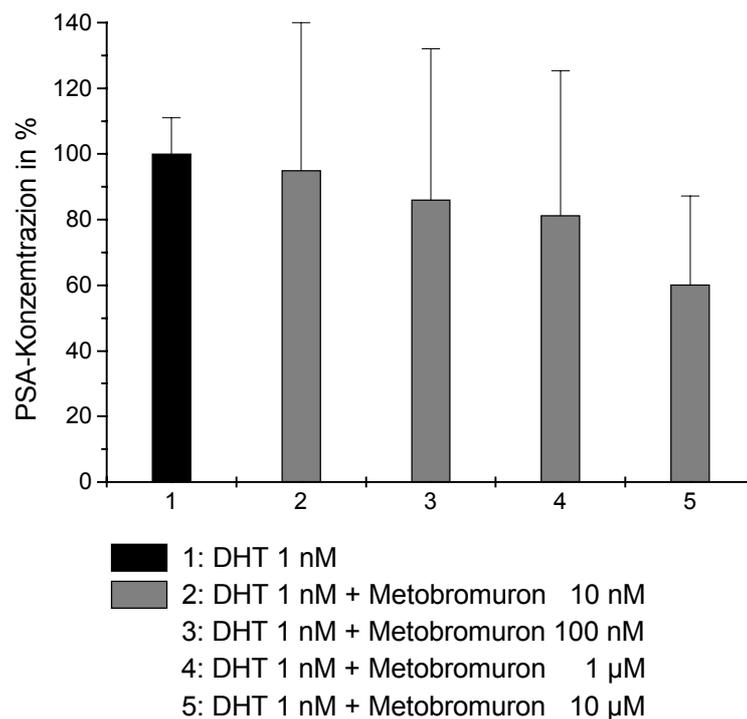
**Abb.61:** Antiandrogene Aktivität von Monolinuron im stabilen T47D-Luc Reporterassay

### 4.3.2.3. Metobromuron

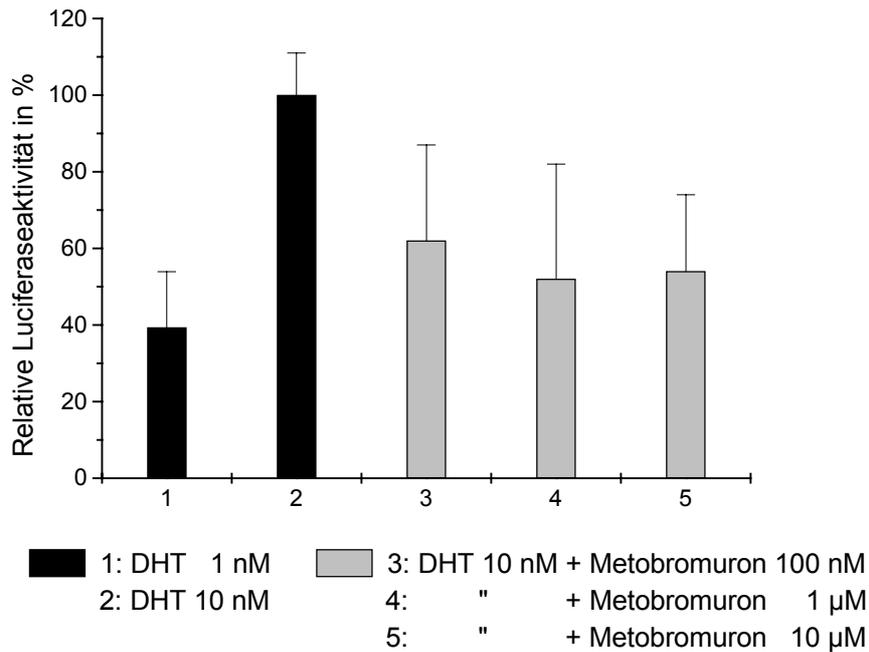
Metobromuron ist mit Ausnahme eines Brom- statt Chlorsubstituenten am Phenylring strukturell identisch mit Monolinuron. Es handelt sich ebenfalls um ein Herbizid. Für die Struktur-Wirkungsuntersuchungen ist ein bromiertes Phenylharnstoff-Analogon ebenfalls von Interesse. Die Untersuchung von Metobromuron erfolgte daher im PSA Assay und im stabilen Transaktivierungsassay.

Im PSA Assay konnte durch 10  $\mu\text{M}$  Metobromuron die bei 1 nM DHT produzierte PSA Konzentration um ca. 40% gehemmt werden (Abb. 62).

Die durch 10 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität im stabilen T47D-Luc Transaktivierungsassay ließ sich bei 10  $\mu\text{M}$  Metobromuron um ca. 50% hemmen (Abb. 63).



**Abb.62:** Antiandrogene Aktivität von Metobromuron im PSA Assay



**Abb.63:** Antiandrogene Aktivität von Metobromuron im stabilen T47D-Luc Reporterassay

#### **4.3.2.4. Diuron**

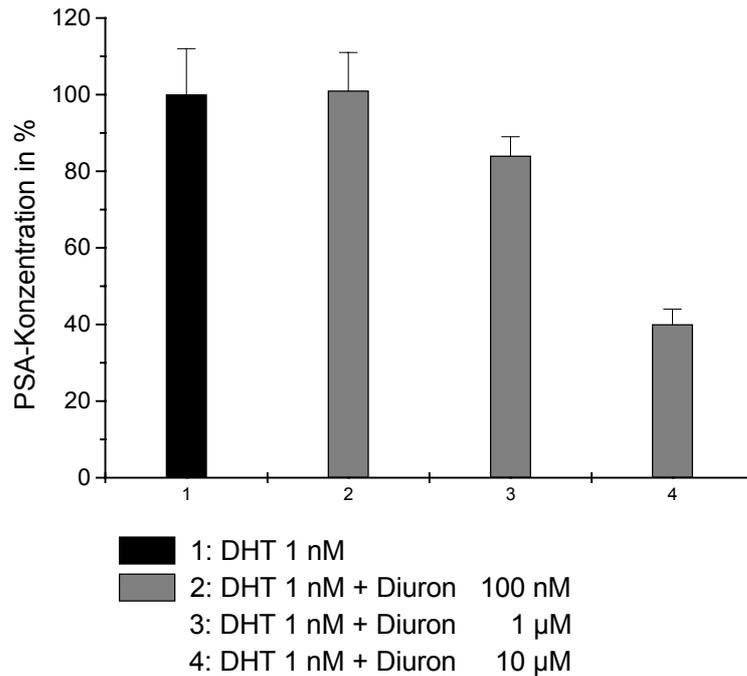
Diuron gehört ebenfalls zur Gruppe der Phenylharnstoff-Herbizide.

Die relative Bindungsaffinität von Diuron am Androgenrezeptor wurde bereits untersucht. Diuron ist in der Lage, radioaktiv markiertes DHT vom Rezeptor zu verdrängen, weist allerdings eine schwächere Affinität auf als Linuron und Flutamid. [Bauer et al.; 1998]

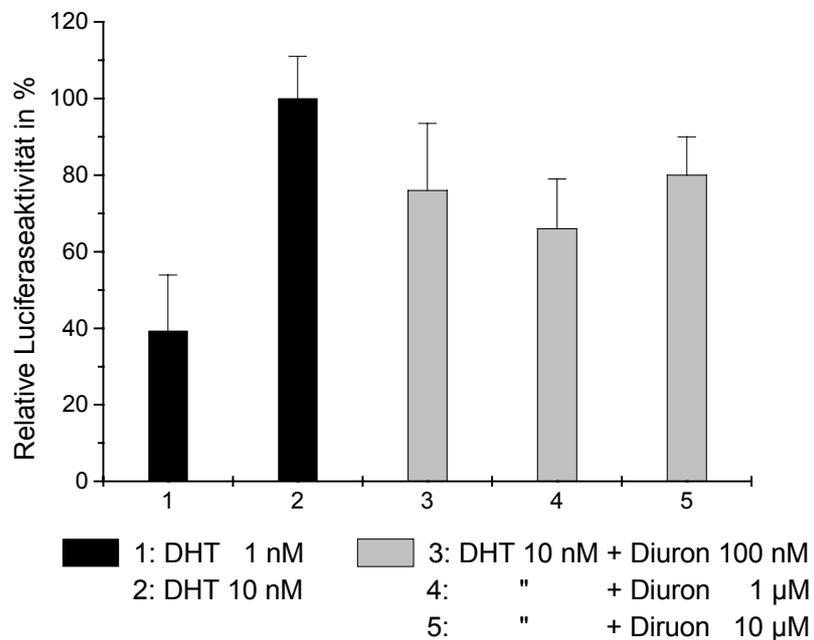
Auskunft über eine mögliche Hemmung der durch DHT induzierten Transkriptionsaktivierung konnte mittels der etablierten *in vitro* Testsysteme erhalten werden.

Im PSA Assay konnte eine ca. 60%ige Hemmung der durch 1 nM DHT hervorgerufenen PSA Konzentration bei 10 µM Diuron gezeigt werden (Abb. 64).

Die durch 10 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität im stabilen T47D-Luc Transaktivierungsassay konnte bei 1 µM Diuron um ca. 30% gehemmt werden (Abb. 65).



**Abb.64:** Antiandrogene Aktivität von Diuron im PSA Assay



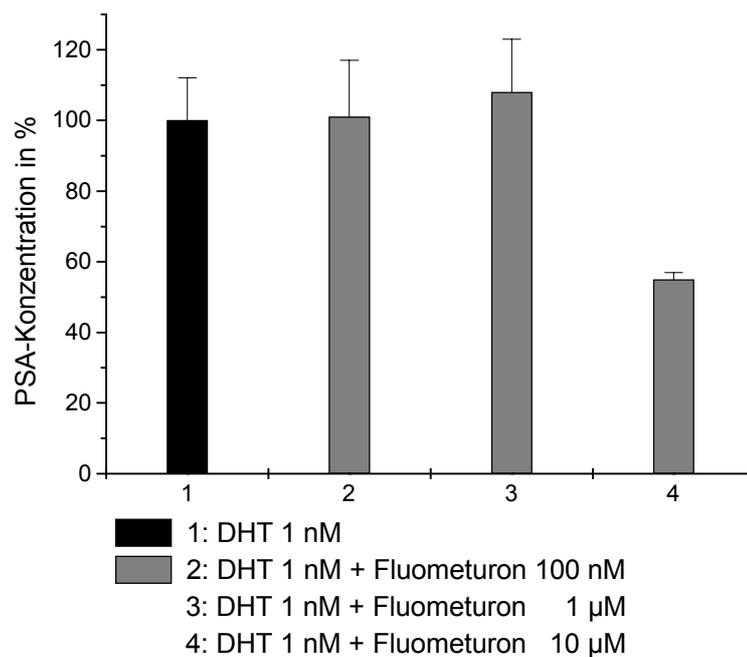
**Abb.65:** Antiandrogene Aktivität von Diuron im stabilen T47D-Luc Reporterassay

#### **4.3.2.5. Fluometuron**

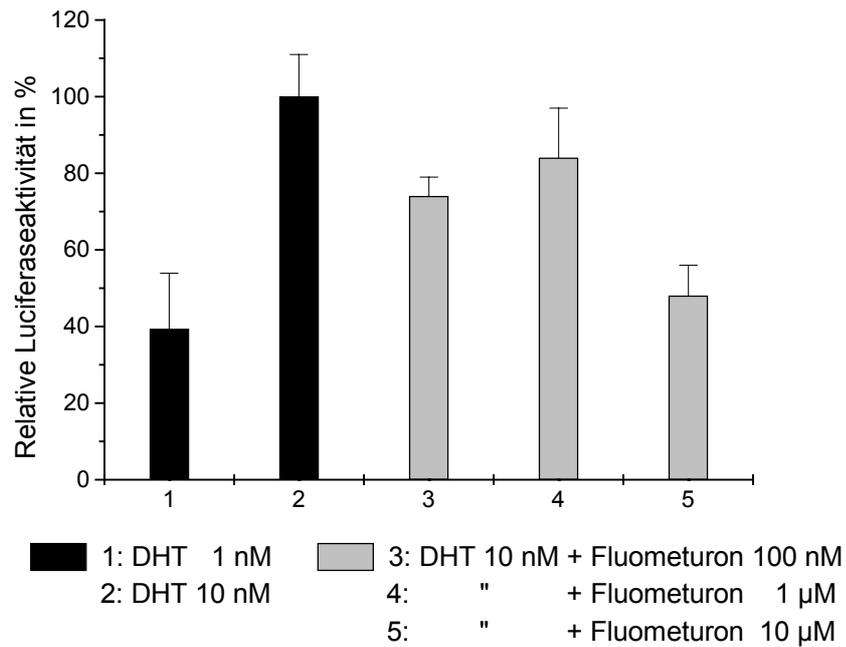
Das Phenylharnstoff-Herbizid Fluometuron weist wie das bekannte Antiandrogen Hydroxyflutamid am Phenylring eine CF<sub>3</sub>-Gruppe auf und könnte daher ebenfalls antiandrogene Wirkung zeigen.

In den etablierten Testsystemen bestätigte sich diese Vermutung. Im PSA Assay konnte die durch 1 nM DHT erreichte PSA Konzentration bei 10 µM Fluometuron um ca. 50% reduziert werden (Abb. 66).

Die durch 10 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität konnte im stabilen T47D-Luc Transaktivierungsassay bei 10 µM Fluometuron ebenfalls um ca. 50% gehemmt werden (Abb. 67).



**Abb.66:** Antiandrogene Aktivität von Fluometuron im PSA Assay

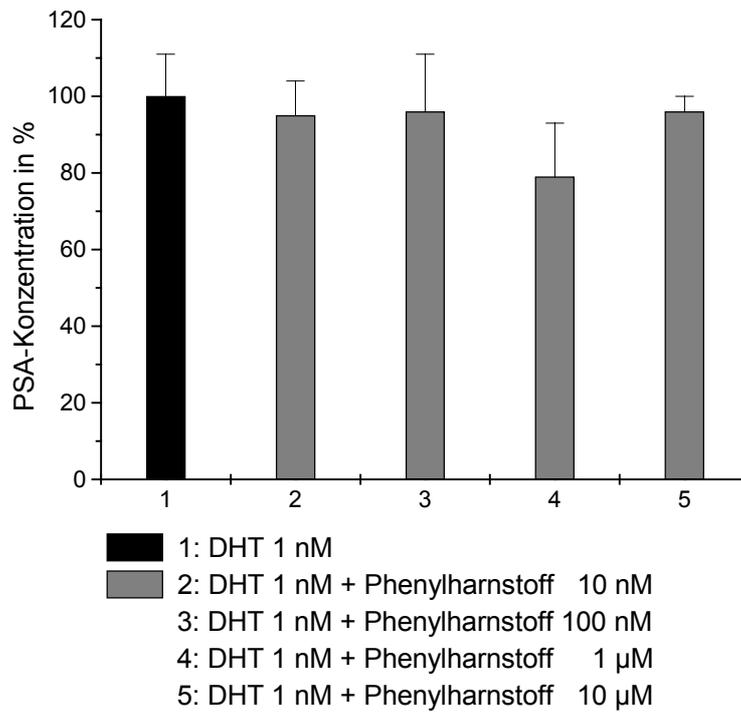


**Abb.67:** Antiandrogene Aktivität von Fluometuron im stabilen T47D-Luc Reporterassay

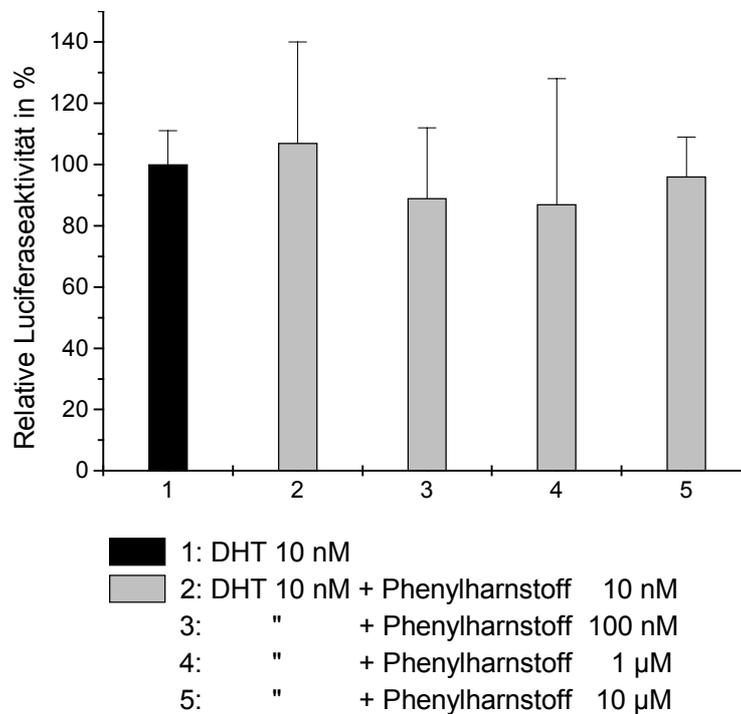
#### **4.3.2.6. Phenylharnstoff**

Zur Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen ist auch die Untersuchung des unsubstituierten Phenylharnstoffs von Bedeutung.

In beiden eingesetzten *in vitro* Testsystemen (PSA Assay und stabiler Transaktivierungsassay) zeigte Phenylharnstoff keine signifikanten, konzentrationsabhängigen antiandrogenen Effekte (Abb. 68 und 69).



**Abb.68:** Untersuchung der antiandrogenen Aktivität von Phenylharnstoff im PSA Assay

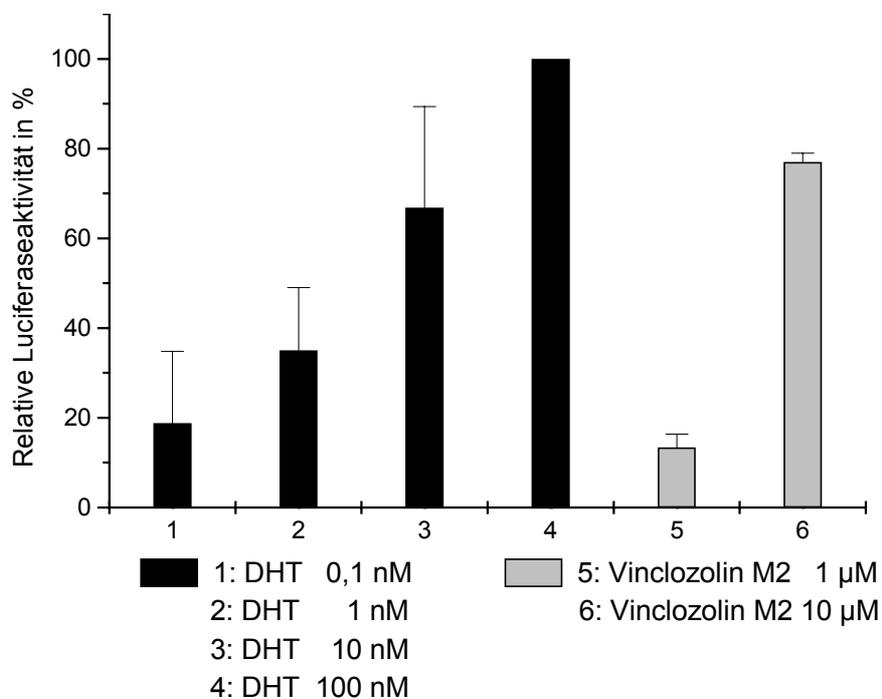


**Abb.69:** Untersuchung der antiandrogenen Aktivität von Phenylharnstoff im stabilen T47D-Luc Reprotergensystem

#### 4.3.2.7. Vinclozolin M2

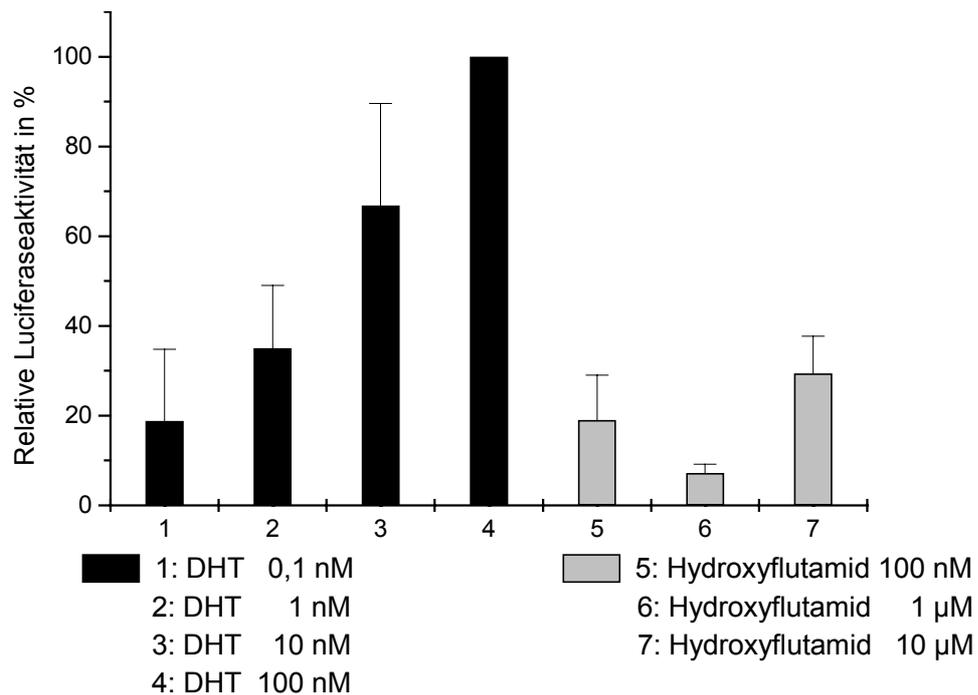
Das bekannte Antiandrogen Vinclozolin M2 wurde bereits zur Validierung der etablierten *in vitro* Testsysteme herangezogen. Interessant ist weiterhin die androgene Aktivität, die im transienten Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen untersucht wurde.

Durch 10  $\mu\text{M}$  Vinclozolin M2 konnte hier ein etwas stärkerer androgener Effekt erzielt werden als durch 10 nM DHT (Abb. 70).



**Abb.70:** Androgene Aktivität von Vinclozolin M2 im transienten Transaktivierungsassay

#### 4.3.2.8. Hydroxyflutamid



**Abb.71:** Androgene Aktivität von Hydroxyflutamid im transienten Transaktivierungsassay

Auch das etablierte Antiandrogen Hydroxyflutamid wurde auf androgene Aktivität im transienten Transaktivierungsassay untersucht. 10 µM Hydroxyflutamid induzierte eine etwas geringere androgene Wirkung als 1 nM DHT (Abb. 71).

#### **4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion**

Die im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Ergebnisse sollen im folgenden zusammengefaßt und diskutiert werden.

Zum Erarbeiten von Struktur-Wirkungsbeziehungen mittels Molecular Modelling (QSAR) müssen die graphischen Daten in einem Zahlenwert zusammengefaßt werden. Dieser soll Auskunft über die biologische Wirkstärke der einzelnen Verbindungen geben.

Die Reduktion auf einen einzigen Parameter gestaltet sich aus mehreren Gründen problematisch. Um eine Dosis-Wirkungskurve korrekt zu beschreiben, muß ein logistischer Fit durchgeführt werden. Dadurch werden die Werte für das obere und untere Plateau ( $A_1$  und  $A_2$ ), Power ( $p$ ) und Wendepunkt (entspricht dem  $IC_{50}$ -Wert) ermittelt. Alle vier Werte sind nötig, um die Kurve ausreichend zu beschreiben. Wenn lediglich der  $IC_{50}$ -Wert angegeben wird, erhält man zwar eine Aussage über die relative Potenz (Verschiebung des  $IC_{50}$ -Wertes), nicht aber über die relative Effizienz (maximale Hemmwirkung).

Problematisch ist auch, daß die bei den Hemmexperimenten gemessenen Werte bis auf wenige Einzelfälle nicht den gesamten sigmoidalen Dosis-Wirkungsverlauf, sondern lediglich den annähernd linearen Teilbereich zwischen oberem und unterem Plateau wiedergeben. Grund dafür ist, daß der getestete Konzentrationsbereich limitiert war. Höhere Konzentrationen ( $> 10 \mu\text{M}$ ) konnten wegen auftretender Cytotoxizität und Löslichkeitsproblemen, geringere Konzentrationen aus Zeitgründen nicht untersucht werden. Dies bedeutet, daß ein korrekter logistischer Fit und die Bestimmung von oberem und unterem Plateau, Power sowie dem  $IC_{50}$ -Wert nicht möglich ist. Daher konnte ein  $IC_{50}$ -Wert für die einzelnen Kurven nur über eine lineare Regression zwischen den beiden Meßwerten, die eine 50%ige Hemmung einrahmen, durchgeführt werden. Dieses Verfahren ist zwar mit einem relativ großen Fehler behaftet, stellt aber in diesem Fall die einzige Möglichkeit dar, den für die QSAR benötigten Zahlenwert zu berechnen. Für andere Präsentationen ist die graphische Darstellung vorzuziehen.

Beim transienten und stabilen Transaktivierungsassay konnte durch die höchsten eingesetzten Substanzkonzentrationen ( $10 \mu\text{M}$ ) keine 50%ige Hemmung der durch  $100 \text{ nM}$  (COS-AR-Luc) bzw.  $10 \text{ nM}$  (T47D-Luc) DHT induzierten Reporterogenaktivität

erreicht werden. Daher wurden hier IC<sub>30</sub>-Werte, d.h. die Substanzkonzentrationen, bei denen eine 30%ige Hemmung beobachtet wurde, ermittelt.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse aller Versuche zusammenfassend dargestellt. Substanzkonzentrationen größer 10 µM wurden nicht getestet:

	<b>Antiandrogene Aktivität</b>			<b>Androgene Aktivität</b>
	<b><u>Transaktivierungsassay</u></b>		<b>PSA Assay</b> (-log IC <sub>50</sub> )	<b>Transaktivierungsassay</b> (COS-AR-Luc)
	<b>transient</b> <b>COS-AR-Luc</b> (-log IC <sub>30</sub> )	<b>stabil</b> <b>T47D-Luc</b> (-log IC <sub>30</sub> )		
<b><i>Benzophenone</i></b>				
p,p'-DDE	6,33	/	4,81	positiv
Oxybenzon	5,37	/	5,02	negativ
p,p'-Dihydroxy- benzophenon	6,11	/	6,15	negativ
p,p'-Dichlor- benzophenon	6,44	/	5,2	negativ
p,p'-Dibrom- benzophenon	5,0	/	4,99	negativ
p,p'-Dimethoxy- benzophenon	4,92	/	5,07	negativ
Xanthon	7,36	/	5,0	negativ
Benzophenon	7,89	/	negativ	negativ
<b><i>Phenylharnstoff- Analoga</i></b>				
Hydroxyflutamid	6,21	6,48	7,22	positiv
Vinclozolin M2	5,25	6,17	8,0	positiv
Linuron	6,1	6,05	5,28	negativ
Monolinuron	7,0	7,0	4,83	negativ

Metobromuron	/	>7,0	4,84	/
Diuron	/	6,19	5,01	/
Fluometuron	/	5,35	4,97	/
Phenylharnstoff	/	negativ	negativ	/

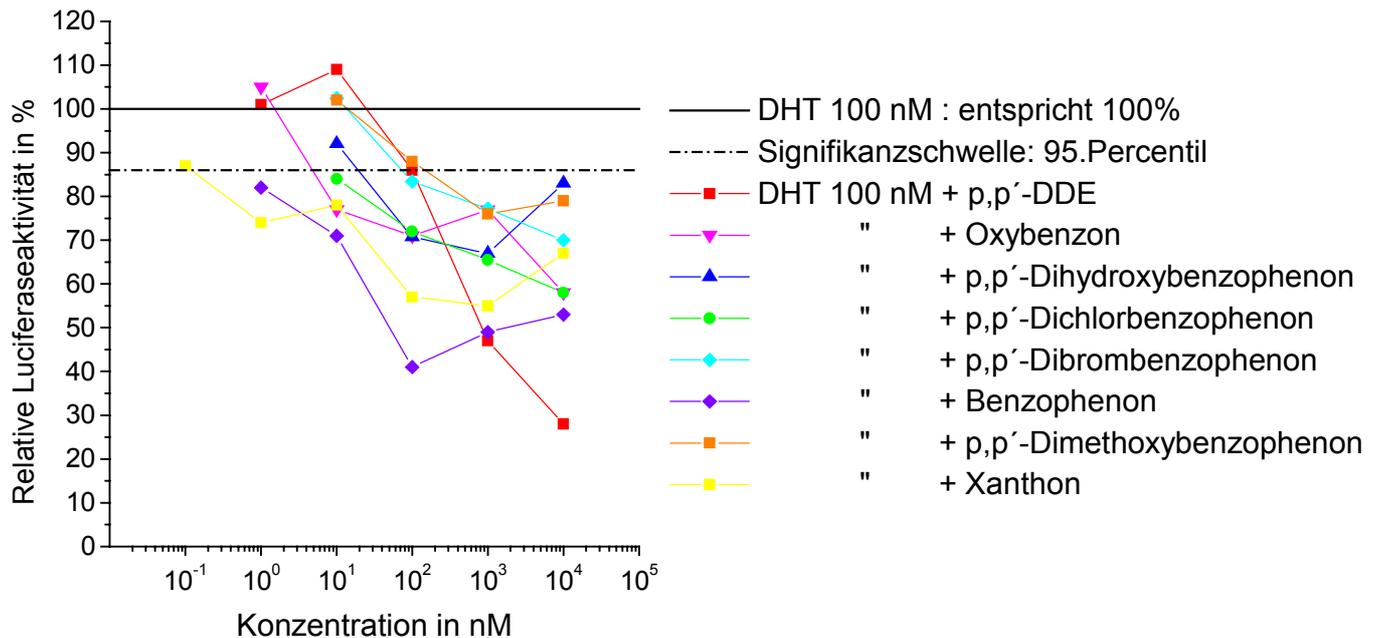
**Tabelle 2:** Übersicht über die in den etablierten *in vitro* Testsystemen erhaltenen Ergebnisse

Ein Vergleich der antiandrogenen Aktivität der einzelnen Benzophenon-Derivate und Phenylharnstoff-Analoga relativ zueinander wird durch die Darstellung der Kurven in einer Gesamtgraphik ermöglicht. Auf die Angabe von Fehlerbalken wurde in diesem Fall zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit verzichtet. Sie können den Einzelgraphiken (siehe 4.3.) entnommen werden.

Zunächst sollen die Ergebnisse des transienten Transaktivierungsassays diskutiert werden. Anhand der  $IC_{30}$ -Werte (-log) lassen sich Reihen mit steigender antiandrogenen Aktivität aufstellen. Bei den Benzophenonen steigt die Aktivität folgendermaßen an: p,p'-Dimethoxybenzophenon < p,p'-Dibrombenzophenon < Oxybenzon < p,p'-Dihydroxybenzophenon < p,p'-Dichlorbenzophenon < p,p'-DDE < Xanthon < Benzophenon. In Abb. 72 ist zu erkennen, daß sich diese Reihe auch in etwa im Vergleich der Kurvenverläufe widerspiegelt. Die unsubstituierten Derivate Benzophenon und Xanthon zeigen schon bei einer Konzentration von 100 nM signifikante Hemmwirkung, die allerdings bei höheren Konzentrationen nicht mehr zunimmt. Bei p,p'-DDE dagegen setzt die Hemmwirkung erst bei 1  $\mu$ M ein, nimmt aber bei 10  $\mu$ M noch zu. In dieser hohen Konzentration zeigt daher p,p'-DDE die beste Inhibierung. Dies verdeutlicht die Bedeutung der kompletten Kurveninformation.

Die Kurvenverläufe des p,p'-Dihydroxy- und p,p'-Dichlor-Derivats ähneln sich bis 1  $\mu$ M. Bei 10  $\mu$ M nimmt aber die Hemmwirkung des p,p'-Dihydroxy-Derivats wieder ab, wohingegen die des p,p'-Dichlor-Derivats weiter zunimmt. Oxybenzon bewirkt im Vergleich dazu eine Inhibierung um 30% erst bei höherer Konzentration, die maximale Hemmwirkung bei 10  $\mu$ M gleicht aber der von p,p'-Dichlorbenzophenon. Deutlich schwächere antiandrogene Aktivität weisen die beiden Derivate mit den räumlich größten Substituenten (Brom- und Methoxygruppe) auf. Dabei ist das Dibrom-Derivat noch in der Lage, die durch DHT induzierte Luciferaseaktivität bei 10

$\mu\text{M}$  signifikant ( Wert plus Fehlerbalken liegt unterhalb der Signifikanzschwelle) zu inhibieren. Das Dimethoxy-Derivat bewirkt lediglich die Hemmung bis zur Signifikanzschwelle und kann daher als gerade noch schwach antiandrogen bezeichnet werden.

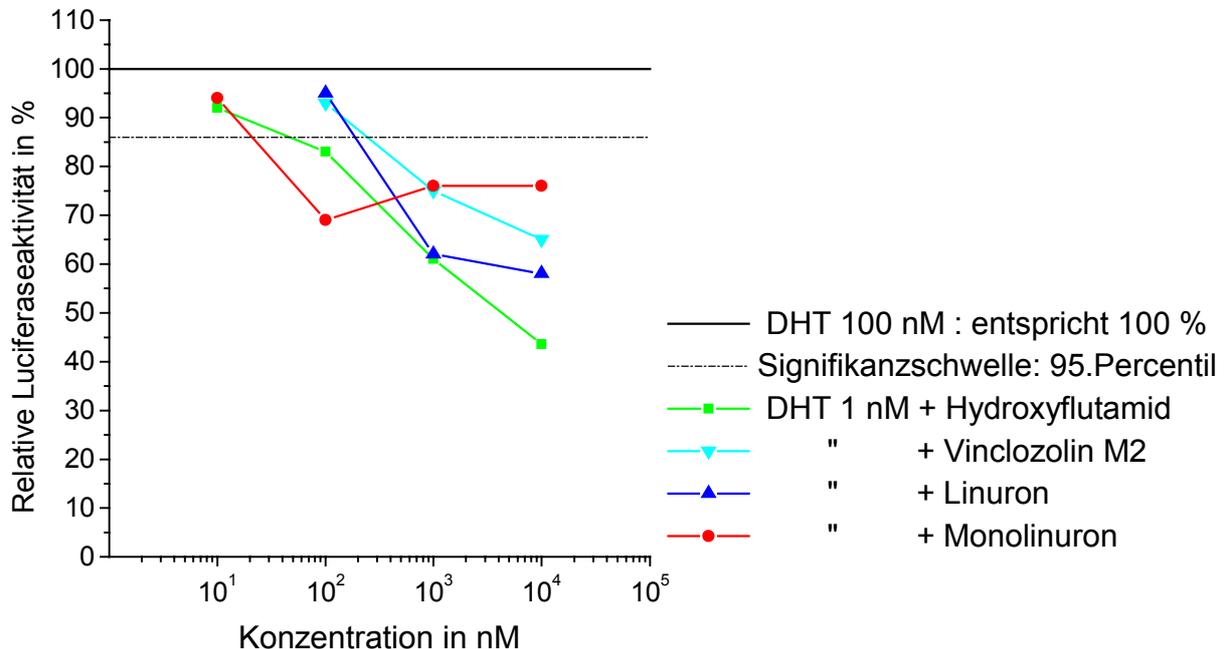


**Abb.72:** Antiandrogene Aktivität der Benzophenone im Überblick: transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen

Die vier im transienten Transaktivierungsassay untersuchten Phenylharnstoff-Analoga sind vergleichend in Abb. 73 dargestellt.

Geordnet nach den  $\text{IC}_{30}$ -Werten (-log) lautet die Reihe mit abnehmender Hemmwirkung: Monolinuron > Hydroxyflutamid > Linuron > Vinclozolin M2. Anhand der Kurvenverläufe ist aber zu erkennen, daß Monolinuron lediglich bei 100 nM eine 30%ige Inhibierung bewirkt. Bei höheren Konzentrationen ist die Hemmwirkung wieder schwächer und liegt nur noch knapp unterhalb der Signifikanzschwelle. Die Hemmwirkung von Hydroxyflutamid nimmt dagegen konzentrationsabhängig zu.

Beim Vergleich der Kurven erweist sich also Hydroxyflutamid im transienten Transaktivierungsassay als das stärkste antiandrogene „Phenylharnstoff“-Analogon.



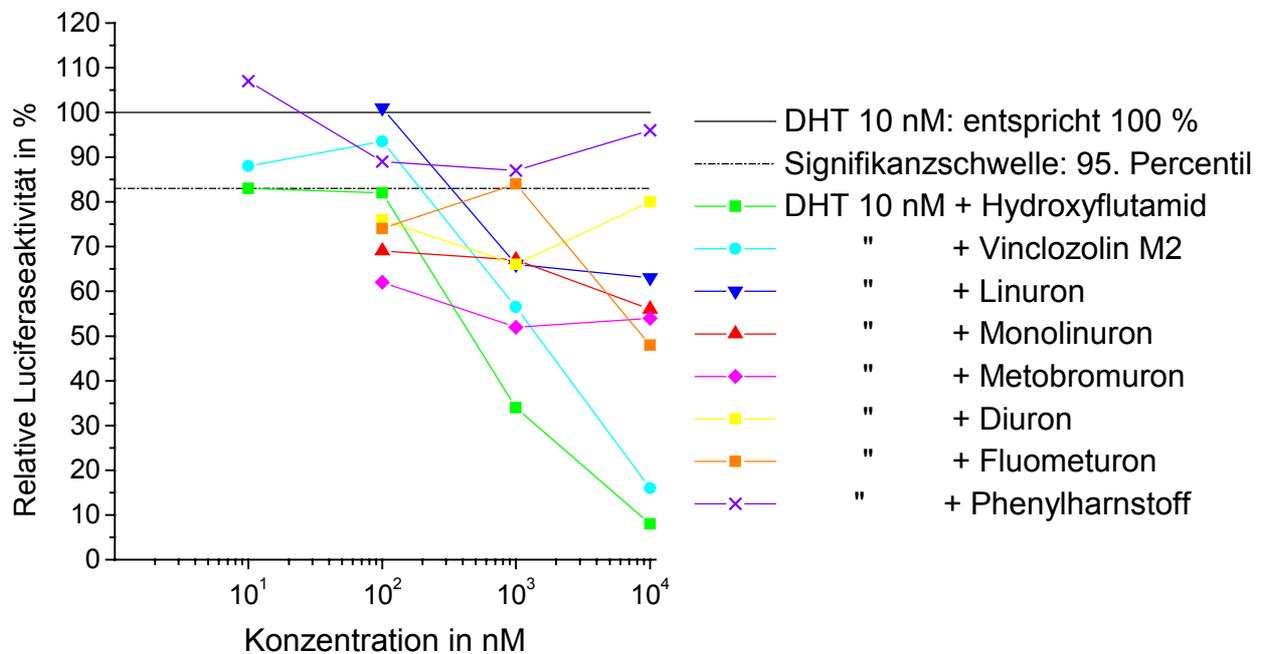
**Abb.73:** Antiandrogene Aktivität der getesteten Phenylharnstoff-Analoga im Überblick: transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen

Im stabilen Transaktivierungsassay in T47D-Luc Zellen weichen die Ergebnisse bei Beurteilung der Hemmwirkung anhand der IC<sub>30</sub>-Werte (-log) oder anhand der Kurven ebenfalls voneinander ab. Durch einen Vergleich der IC<sub>30</sub>-Werte kann folgende Reihe mit abfallender Hemmwirkung aufgestellt werden: Metobromuron > Monolinuron > Hydroxyflutamid > Diuron > Vinclozolin M2 > Linuron > Fluometuron. Phenylharnstoff zeigte auch bei 10 µM keine Hemmwirkung.

Die Kurvendarstellung (Abb. 74) zeigt aber, daß Monolinuron, Metobromuron und Diuron zwar schon bei niedrigen Konzentrationen eine 30%ige Inhibierung bewirken. Mit steigender Konzentration nimmt aber die Hemmwirkung nicht mehr zu. Eventuell spielen hier auch nicht rezeptorvermittelte Prozesse eine Rolle. Hydroxyflutamid und Vinclozolin M2 hemmen dagegen -wie für Ligand-Rezeptor-Interaktionen typisch- die durch DHT induzierte Reporterogenaktivität konzentrationsabhängig. Bei 10 µM ist

sogar eine Inhibierung um ca. 90% zu beobachten. Beide bekannten Antiandrogene sind also im stabilen T47D-Luc Transaktivierungsassay als die am stärksten antiandrogenen Phenylharnstoff-Analoga einzuordnen. Fluometuron und Linuron zeigen eine schwache konzentrationsabhängige Hemmwirkung, die die Signifikanzschwelle unterschreitet. Phenylharnstoff dagegen ist nicht in der Lage, die durch DHT induzierte Reporterogenaktivität auf einen Wert unterhalb der Signifikanzschwelle zu hemmen.

Insgesamt weichen im stabilen Transaktivierungsassay die anhand der  $IC_{30}$ -Werte gewonnenen Ergebnisse stärker von den Kurvendarstellungen ab und werden somit nicht zu QSAR Studien herangezogen.



**Abb.74:** Antiandrogene Aktivität der Phenylharnstoff-Analoga im Überblick: stabiler Transaktivierungsassay (T47D-Luc)

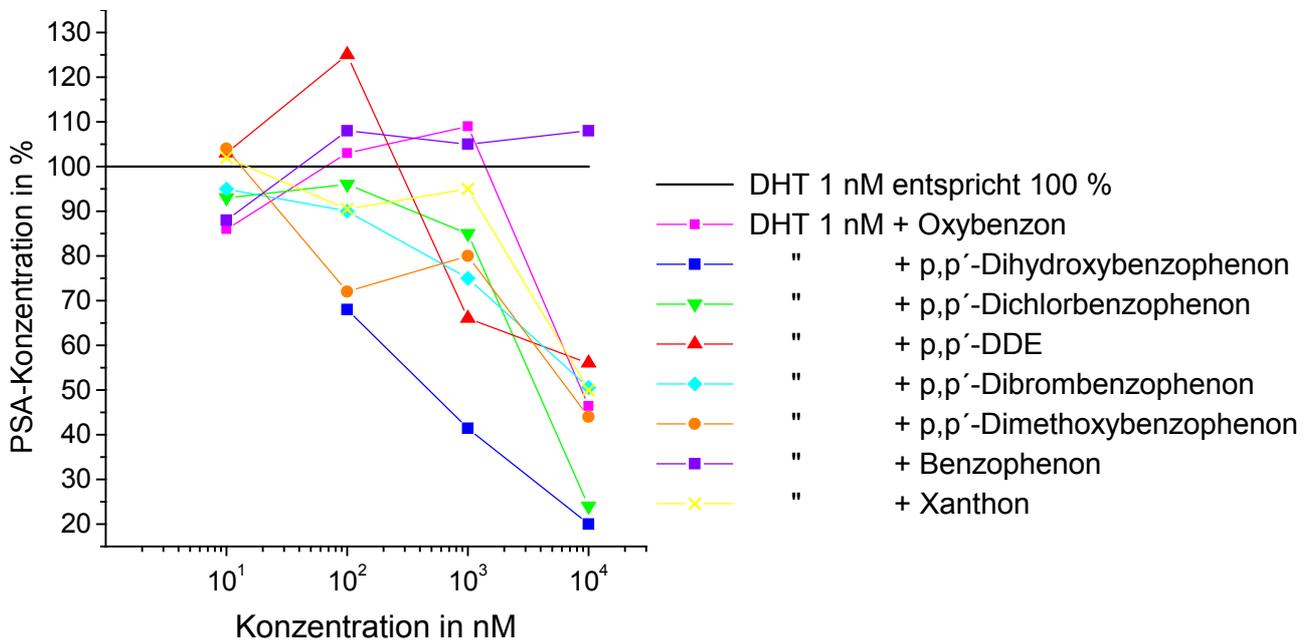
Im PSA Assay konnten beide Substanzgruppen untersucht werden. Da der Assay sensitiver und präziser ist, konnten in diesem Fall  $IC_{50}$ -Werte bestimmt werden. Das Einführen einer Signifikanzschwelle war nicht erforderlich, da die antiandrogene Aktivität eindeutig bestimmbar war.

Die Benzophenon-Derivate lassen sich anhand der  $IC_{50}$ -Werte in eine Reihe mit abnehmender Hemmwirkung gliedern: p,p'-Dihydroxybenzophenon > p,p'-Dichlorbenzophenon > p,p'-Dimethoxybenzophenon > Oxybenzon > Xanthon > p,p'-Dibrombenzophenon > p,p'-DDE. Benzophenon zeigt auch bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M keine Hemmwirkung im PSA Assay.

Dieses Ergebnis unterscheidet sich erheblich von dem mittels transientem Transaktivierungsassay gefundenen Resultat. Benzophenon gehört dort mit zu den stärksten Antiandrogenen. Deutlich stärkere Inhibierung als im transienten Transaktivierungsassay zeigt p,p'-Dihydroxybenzophenon, schwächer hemmt dagegen das bekannte Antiandrogen p,p'-DDE. Oxybenzon, Xanthon, p,p'-Dimethoxybenzophenon und p,p'-Dibrombenzophenon weisen in etwa ähnliche Hemmwirkung auf (Abb. 75).

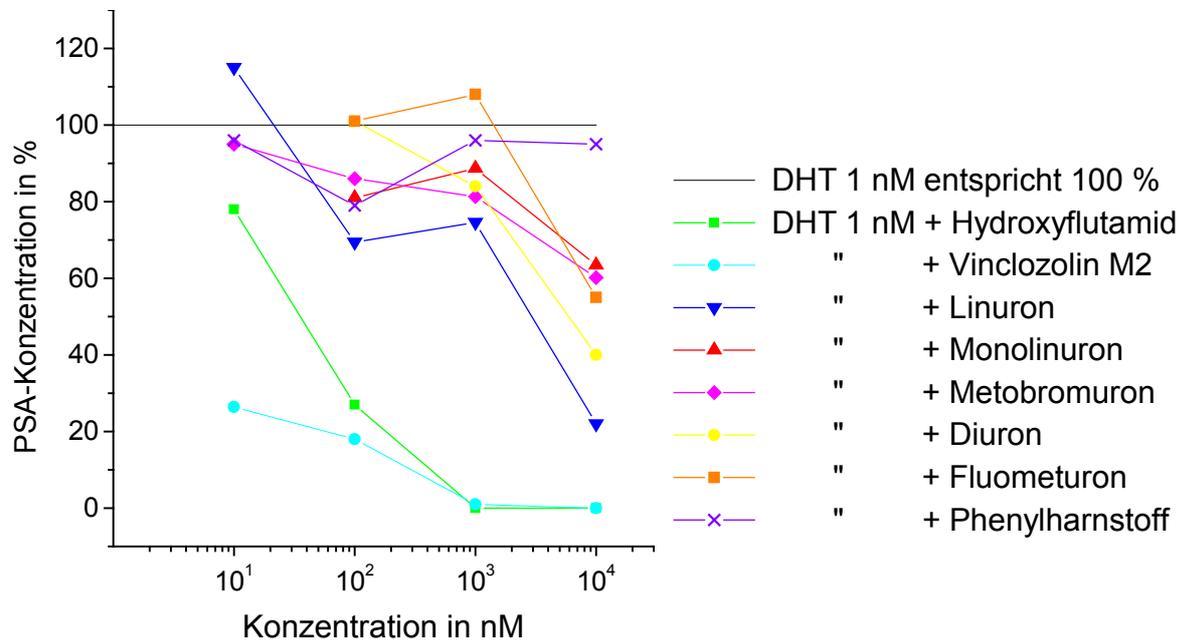
Dieses abweichende Ergebnis läßt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Voraussetzungen von transientem Transaktivierungsassay und PSA Assay erklären. Der im PSA Assay verwendete androgenabhängige Promotor ist der endogen in den Zellen vorkommende PSA Promotor. Dieser enthält zwar drei AREs, ist aber noch nicht vollständig charakterisiert (siehe 2.3.4.2.2.), so daß weitere regulierende Elemente eine Rolle spielen können. Zweitens exprimieren die eingesetzten T47D Zellen auch größere Mengen an Progesteron- und Glucocorticoidrezeptor, die ebenfalls neben dem Androgenrezeptor mit den untersuchten Verbindungen wechselwirken und so erheblichen Einfluß auf die Reportergeninduktion bzw. -hemmung haben könnten. Beim transienten Transaktivierungsassay exprimieren die COS-7 Zellen nach Transfektion dagegen lediglich den Androgenrezeptor. [Keydar, 1979; Couette et al., 1994]

Mit welchem der beiden Ergebnisse sich ein verlässlicheres QSAR Modell berechnen läßt, wird in 4.5. näher erläutert.



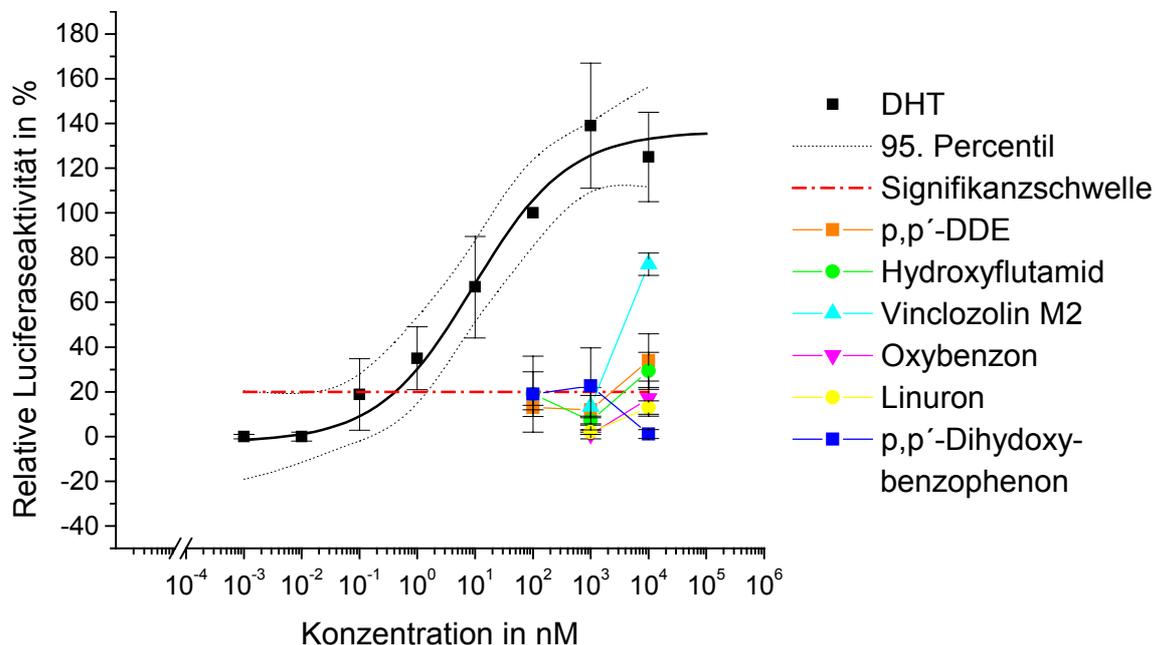
**Abb.75:** Antiandrogene Aktivität der Benzophenon Derivate im Überblick: PSA Assay (T47D Zellen)

Auch bei den Phenylharnstoff-Derivaten weicht das Ergebnis des PSA Assays von dem des transienten Transaktivierungsassays ab. Nach den  $IC_{50}$ -Werten geordnet nimmt die Hemmwirkung von Vinclozolin M2 über Hydroxyflutamid, Linuron, Diuron, Fluometuron, Metobromuron und Monolinuron ab. Monolinuron zeigt also im PSA Assay im Gegensatz zum transienten Transaktivierungsassay die schwächste antiandrogene Aktivität. Die stärkste Hemmwirkung weisen die beiden bekannten Antiandrogene Vinclozolin M2 und Hydroxyflutamid auf. Phenylharnstoff zeigt wie auch im stabilen Transaktivierungsassay bei 10  $\mu$ M keine antiandrogene Wirkung (Abb. 76).



**Abb.76:** Antiandrogene Aktivität der Phenylharnstoff-Analoga im Überblick: PSA Assay (T47D Zellen)

Die im transienten Transaktivierungsassay gefundenen androgenen Aktivitäten waren zum großen Teil sehr schwach. Um falsch positive Aussagen zu vermeiden, wurde eine Signifikanzschwelle eingeführt. Sie gibt das obere 95. Percentil des unteren Plateaus A1 der logistischen Dosis-Wirkungskurve an. Verbindungen, deren androgene Wirkung über die Signifikanzschwelle reicht, können als androgen aktiv bezeichnet werden. In Abb. 77 ist zu erkennen, daß lediglich der Vinclozolin Metabolit 2 deutlich sowie p,p'-DDE und Hydroxyflutamid knapp über der Signifikanzschwelle liegen. Oxybenzon und p,p'-Dihydroxybenzophenon erreichen sie gerade, Linuron liegt etwas darunter. Eindeutig als Verbindungen mit androgener Wirkung können daher lediglich Vinclozolin M2, p,p'-DDE und Hydroxyflutamid eingestuft werden (Abb. 77).



**Abb.77:** Androgene Aktivität der untersuchten Verbindungen im Überblick: transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Wong et al., 1995, erhaltenen. In einem transienten Transaktivierungsassay in CV-1 Zellen (Reportergenplasmid: MMTV-Luc, hAR Expressionsplasmid) induzierten sowohl Hydroxyflutamid als auch Vinclozolin M2 bei Konzentrationen von 10  $\mu$ M und 50  $\mu$ M die AR-vermittelte Transkriptionsaktivierung.

Eine agonistische Aktivität von Hydroxyflutamid ist dabei besonders im Hinblick auf die Prostatakrebs-Therapie bedenklich. Eine hohe Dosis von Flutamid könnte sich sogar nachteilig für Patienten auswirken, da sich die erreichten Plasmaspiegel des Metaboliten Hydroxyflutamid bei 78 ng/l (8  $\mu$ M) im agonistischen Bereich befinden. Weiterhin könnten Mutationen im AR, wie bei 25% der Prostatakrebspatienten und in der Prostatakrebs-Zelllinie LNCaP beobachtet, die agonistischen Effekte bestimmter

Antiandrogene durch eine erhöhte Bindungsaffinität noch verstärken. [Wong et al., 1995]

Hinweise, daß Verbindungen mit einem Phenylharnstoff ähnlichen Grundgerüst auch androgen aktiv sein können, liefert weiterhin die von Dalton et al., 1998, gefundene androgene Wirkung von Bicatulamid ähnlichen Verbindungen.

Eine umfassende Risikoabschätzung der durch endokrine Disruptoren ausgelösten möglichen Gefahren für den Menschen ist zum bisherigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Ausführliche kinetische Daten und die konkrete Rückstands- bzw. Expositionssituation sind wenn überhaupt nur für wenige endokrine Disruptoren bekannt. Bisher wurden meist lediglich die Einzeleffekte von Verbindungen mit estrogenen Wirkung herangezogen. Dabei wurde ein mögliches Zusammenspiel verschiedener Verbindungen, die ihre hormonellen Wirkungen auch über andere Rezeptoren wie z.B. den Androgenrezeptor entfalten können, nicht in Betracht gezogen.

Zwei unterschiedliche Sichtweisen stehen sich in der wissenschaftlichen Diskussion gegenüber:

Die eine Seite stützt sich auf Denkansätze von Safe, 1995, der beim Vergleich der Expositionskonzentration von Medikamenten (Anti-Baby Pille; Osteoporose Therapie) und Phytoestrogenen mit der Konzentration an Umweltestrogenen einen Differenzfaktor von  $10^{11}$  berechnete. Daraus wurde von einigen Autoren gefolgert (Greim, 1998), daß selbst bei einem Fehler um den Faktor 1 000 für Mensch und Umwelt kein nennenswertes Risiko durch endokrine Disruptoren entstehen könne.

Eine andere Sichtweise, vertreten z.B. durch deutsche Behörden wie das BgVV (Bundesministerium für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin), fordert eine detailliertere Betrachtungsweise. Gerade im Falle des auch in dieser Arbeit anhand von *in vitro* Testsystemen identifizierten Antiandrogens Oxybenzon wird dies deutlich.

Oxybenzon wird, wie auch weitere strukturell ähnliche Benzophenonderivate, in größeren Mengen Kosmetikprodukten als UV-Filtersubstanz zugesetzt. In Lippenpflegeprodukten sind u.a. bis zu 3% Oxybenzon bei einem Gesamt-UV-Filteranteil von ca. 10% enthalten. In einer „worst case“ Rechnung (vgl. SCCNFP-

Guidelines 3<sup>rd</sup> Rev.) geht man bei einer produktbezogenen Exposition von 40 mg/Tag (4 Anwendungen mit 10 mg) von einer stoffbezogenen Exposition von 4 mg/Tag (10% UV-Filteranteil) aus. Für einen Erwachsenen (60 kg KG) wäre die Dosis der systemischen Exposition 67 µg/kg/KG, bei Kindern (10 kg KG) läge sie mit 400 µg/kg/KG deutlich höher.

In einer 13-wöchigen dermalen Studie an Mäusen konnte kein NOAEL für die durch Oxybenzon verursachte Abnahme der Spermindichte bestimmt werden, da selbst die niedrigste Dosis von 22,75 mg/kg/d noch Effekte auslöste [NTP, 1992]. Die von Kindern im „worst case“ Fall aufgenommene Menge (0,4 mg/kg/d) unterschreitet diese Dosis zwar, es ist aber nicht gesichert, daß in diesem Versuch bei dieser Dosis kein Effekt auftreten würde.

Dagegen konnte eine weitere Studie keine Einflüsse von Oxybenzon auf den Reproduktionstrakt nachweisen [Daston, 1993].

Auch wenn ein direkter Vergleich von *in vivo* Ergebnissen mit der Situation beim Menschen aufgrund zum Teil unterschiedlicher Anfälligkeiten nicht möglich ist, bedarf es der endgültigen Aufklärung der endokrinen Wirkungen von Oxybenzon und anderer Struktur-Analoga.

Die in dieser Arbeit in verschiedenen *in vitro* Testsystemen gefundene antiandrogene Aktivität von Oxybenzon, bzw. die 1999 von Mußler ebenfalls *in vitro* nachgewiesene estrogenische Aktivität unterstützen die Befunde des National Toxicological Programms von 1992 und können die Diskussion neu anregen. Dennoch können keine Rückschlüsse aus den in dieser Arbeit erhaltenen *in vitro* Ergebnissen auf mögliche Auswirkungen auf den Menschen gezogen werden. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse sollte das Thema endokrine Disruptoren aber weiterhin untersucht werden.

#### **4.5. Molecular Modelling: 3D-QSAR**

Bei der dreidimensionalen QSAR Methode werden mittels CoMFA abgeleitete dreidimensionale Eigenschaften der Moleküle mit den erhaltenen biologischen Daten wie z.B. IC<sub>50</sub>- bzw IC<sub>30</sub>-Werten korreliert. Voraussetzung ist ein Datensatz von mindestens 15 strukturell ähnlichen Verbindungen, deren biologische Daten sich über mehrere Zehnerpotenzen erstrecken (siehe auch 2.2.4.). Dies war im

begrenzten Rahmen dieser Arbeit nur teilweise erreichbar. Zwar konnten 16 Verbindungen im PSA Assay untersucht werden. Es handelt sich dabei aber strukturell um zwei Verbindungsklassen, die je acht Einzelsubstanzen beinhalten.

Im transienten und stabilen Transaktivierungsassay konnte jeweils nur eine Verbindungsklasse mit acht Vertretern untersucht werden.

Alle Verbindungen wurden mittels des Standard Kraftfelds von Tripos energieminiert [Burkert und Allinger, 1982] und einer Konformationsanalyse unterzogen. Die Konformere mit der geringsten Energie wurden überlagert. Als Template diente Hydroxyflutamid: Über den Phenylring des Hydroxyflutamids wurden die Phenylringe der Phenylharnstoff-Analoga sowie je ein Phenylring der Benzophenon-Derivate gelegt. Die Orientierung wurde so gewählt, daß sich die restlichen Gruppen möglichst gut überlappen.

Zunächst wurden die überlagerten Phenylharnstoff- und Benzophenon-Analoga getrennt einer CoMFA-Analyse unterzogen.

Die biologischen Daten wurden als  $-\log$  der  $IC_{50}$ - bzw.  $IC_{30}$ -Werte eingegeben. Für die beiden nicht antiandrogen aktiven unsubstituierten Verbindungen Phenylharnstoff und Benzophenon war die Angabe eines Wertes schwierig. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  war noch keine antiandrogene Aktivität zu erkennen. Verwendet wurden daher verschiedene  $IC_{50}$ - bzw.  $IC_{30}$ -Werte von 100 bis 10 000  $\mu\text{M}$  ( $-\log$ : 4,0; 3,0; 2,0).

Eine statistische Auswertung erfolgte mittels Partial Least Squares (PLS) Analyse. Die kreuzvalidierten Werte  $q^2$  sind in Tabelle 3 dargestellt. Um an einen  $q^2$ -Wert von 0,4 heranzukommen und damit ein signifikantes Modell zu erhalten, mußte für Phenylharnstoff bzw. Benzophenon ein  $IC_{50}$ - bzw.  $IC_{30}$ -Werte von 100  $\mu\text{M}$  ( $-\log$ : 4,0) herangezogen werden. Die anderen Werte verschlechterten das Modell.

	<i>Biologische Daten:</i> <b>PSA Assay</b>	<i>Biologische Daten:</i> <b>Transienter Transaktivierungsassay</b>
<b>Phenylharnstoff-Analoga</b>	$q^2 = 0,36$	
<b>Benzophenon-Derivate</b>	$q^2 = -0,15$	$q^2 = 0,47$
<b>Kombination Phenylharnstoff-Analoga + Benzophenon-Derivate</b>	$q^2 = 0,037$	

**Tabelle 3:** Ergebnisse der statistischen Auswertung der errechneten QSAR-Modelle

Unter Verwendung der biologischen Daten der Phenylharnstoff-Analoga aus dem PSA Assay wurde ein  $q^2$ -Wert von 0,36 und somit ein gerade noch signifikantes Modell erhalten. Dagegen konnte mit den Daten der Benzophenon-Derivate aus dem PSA Assay lediglich ein Modell, das schlechter ist als kein Modell, entwickelt werden, da der  $q^2$ -Wert negativ war. Eine Kombination der beiden Modelle ergibt daher ebenfalls kein zuverlässiges, signifikantes Modell ( $q^2$ -Wert: 0,037). Das zuverlässigste Modell konnte mit den biologischen Daten aus dem transienten Transaktivierungsassay für die Benzophenon-Derivate aufgestellt werden. Hier lag der  $q^2$ -Wert bei 0,47. (Tabelle 3)

Ein Grund für die geringe Signifikanz der berechneten Modelle ist die zu geringe Substanzanzahl in einem Datensatz. Um aussagekräftige Modelle zu erhalten, müssen die Daten in den einzelnen Testsystemen vervollständigt und vor allem erweitert werden. Dennoch können die beiden zuverlässigeren Modelle mit  $q^2$ -Werten von 0,36 und 0,47 dazu genutzt werden, die biologische Aktivität neuer, noch

nicht getesteter Verbindungen vorherzusagen. Die grundsätzliche Strukturvariation müßte allerdings im Rahmen des Struktur-Modells bleiben.

Bei den Benzophenon-Derivaten hat sich also gezeigt, daß die mittels transientem Transaktivierungsassay gewonnenen Daten eine höhere Signifikanz aufweisen als die mittels PSA Assay gewonnenen. Ein Grund könnte sein, daß die  $IC_{30}$ -Werte aus dem transienten Transaktivierungsassay gut mit den Kurvenverläufen übereinstimmen. Weiterhin scheint es so, daß die dort ermittelte antiandrogene Aktivität von Benzophenon sich mit den sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen vereinbaren läßt.

Es konnten abschließend -trotz der bei der Ermittlung der  $IC_{50}$  – bzw.  $IC_{30}$ -Werte getroffenen Kompromisse und der relativ geringen Datenanzahl- zwei brauchbare Modelle zur Vorhersage antiandrogener Aktivität entwickelt werden.

## **5. Zusammenfassung**

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von *in vitro* Testsystemen zur Erfassung androgener und vor allem antiandrogener Aktivität. Es gelang, drei in der Gruppe neue, unterschiedliche *in vitro* Testsysteme zu etablieren und mittels der bekannten Antiandrogene zu validieren. Zunächst konnte ein transienter Transaktivierungsassay unter Verwendung des Androgenrezeptor-Expressionsplasmids pSG5AR, des Reportergenplasmids pMamneoLuc und des Kontrollplasmids pSV $\beta$  in COS-7 Affennierenzellen aufgebaut werden. Dadurch wurde eine erste Untersuchung potentieller Androgene/Antiandrogene ermöglicht. Ein für ein effizienteres Screening benötigtes stabil transfiziertes Testsystem konnte gleichzeitig in T47D Brustkrebszellen nach stabiler Transfektion des Reportergenplasmids pMamneoLuc und entsprechender Selektion gewonnen werden. Dagegen war ein nach Transfektion von CV-1 Affennierenzellen mit pMamneoLuc und pSG5AR gewonnenes Testsystem nicht über einen längeren Zeitraum stabil. Das Plasmid pSG5AR enthält keinen Selektionsmarker und wurde daher vermutlich im Laufe der Selektionsphase von den Zellen wieder ausgeschleust. Ein transgenes Reporteragentestsystem in den Osteosarkomazellen SaOS-2, wie von Wiren et al. 1997 entwickelt, konnte aufgrund des mittels RT-PCR nachgewiesenen zu geringen Androgenrezeptorgehaltes nicht nachvollzogen werden.

Die beiden etablierten transgenen Reporteragenassays (transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen; Transaktivierungsassay in stabilen T47D-Luc Zellen) wiesen in etwa vergleichbare Sensitivität und Präzision auf. Der zum Vergleich erfolgreich etablierte und validierte nicht transgene Reporteragenassay auf Basis des endogenen Reporters PSA war dagegen deutlich sensitiver und präziser. Ein Proliferationsassay konnte weder in MFM-223 Brustkrebszellen noch in SaOS-2 Zellen etabliert werden. Dies ist im Falle der SaOS-2 Zellen auf eine veränderte Steroidhormonrezeptorausstattung zurückzuführen.

In den drei etablierten *in vitro* Testsystemen wurden mittels online Strukturdatenbank-Recherche ausgehend von zwei vorselektierten Leitstrukturen identifizierte Verbindungen untersucht. Bei den Benzophenon-Analoga wurden Oxybenzon, p,p'-Dihydroxybenzophenon, p,p'-Dichlorbenzophenon, p,p'-Dibrombenzophenon, p,p'-Dimethoxybenzophenon, Benzophenon und Xanthon stellvertretend herausgegriffen, bei den Phenylharnstoff-Analoga Linuron,

Monolinuron, Metobromuron, Diuron, Fluometuron und Phenylharnstoff. Die Benzophenon-Analoga wurden im transienten Transaktivierungsassay und im PSA Assay, die Phenylharnstoff-Analoga im stabilen T47D-Luc Transaktivierungsassay und im PSA Assay untersucht.

Im transienten Transaktivierungsassay zeigten alle untersuchten Benzophenone eindeutig antiandrogene Aktivität. Dies bestätigte sich im PSA Assay mit einer Ausnahme. Für das unsubstituierte Benzophenon konnte in diesem Testsystem auch bei hoher Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) keine antiandrogene Aktivität nachgewiesen werden.

Die untersuchten Phenylharnstoff-Analoga zeigten ebenfalls in den eingesetzten Testsystemen, PSA Assay und stabiler Transaktivierungsassay, eindeutig antiandrogene Wirkung, die aber im Vergleich zu den etablierten Verbindungen Hydroxyflutamid und Vinclozolin M2 schwächer ausfiel. Der unsubstituierte Phenylharnstoff war in beiden Testsystemen auch bei 10  $\mu\text{M}$  nicht antiandrogen aktiv.

Androgene Effekte wurden im transienten Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen untersucht. Anhand einer Signifikanzschwelle wurden lediglich Vinclozolin M2, p,p'-DDE und Hydroxyflutamid als eindeutig androgen aktiv identifiziert.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden zum Aufstellen von dreidimensionalen Struktur-Aktivitätsbeziehungen (3D-QSAR) herangezogen. Zur Generierung des dazu benötigten einzelnen Zahlenwertes wurden die  $\text{IC}_{50}$  – bzw.  $\text{IC}_{30}$  –Werte der gemessenen Dosis-Wirkungskurven errechnet. Dabei mußte ein erheblicher Fehler in Kauf genommen werden. Unter Verwendung der Daten aus dem PSA Assay konnte für die Phenylharnstoff-Analoga dennoch ein signifikantes Modell mit einem kreuzvalidierten  $q^2$ -Wert von 0,36 erhalten werden. Für die Benzophenon-Analoga dagegen war aufgrund eines negativen  $q^2$ -Wertes das erhaltene Modell nicht zuverlässig. In diesem Fall ergaben die Daten aus dem transienten Transaktivierungsassay aber ein aussagefähiges Modell mit einem  $q^2$ -Wert von 0,47. Die beiden signifikanten Modelle können zur Vorhersage der antiandrogenen Aktivität von bisher nicht getesteten, strukturell ähnlichen Verbindungen herangezogen werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein wichtiger Beitrag zur Identifizierung endokriner Disruptoren geleistet werden. Mit Hilfe der validierten *in vitro* Testsysteme konnten die ausgewählten Leitstrukturen bestätigt und ein QSAR Ansatz zur schnellen theoretischen Prüfung von Antiandrogenen entwickelt werden.

## **6. Material und Methoden**

### **6.1. Zellkultur**

#### ***Materialien***

- **FKS**

Fötale Kälberserum (Gibco)

- **CDFKS**

0,5 % Norrit A (Serva) und 0,05 % Dextran (Sigma) werden in einer 0,14 M NaCl-Lösung gelöst. 50 ml hiervon werden zu 500 ml FKS gegeben und 45 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (800 g, 20 min) wird der Überstand bei -20 °C gelagert.

- **Penicillin/Streptomycin (Gibco)**

10000 I.E./ml Penicillin; 10000 µg/ml Streptomycin

- **L-Glutamin (Gibco)**

200 mM Lösung von L-Glutamin

- **Kulturmedien für COS-7, CV-1, MFM-223 und T47 D Zellen**

#### **serumhaltig:**

- RPMI 1640 (Gibco) mit Phenolrot und L-Glutamin  
500 ml Kulturmedium; 50 ml FKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin
- Dulbecco's (Gibco) ohne Phenolrot und L-Glutamin

500 ml Kulturmedium; 50 ml CDFKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin; 3,6 ml L-Glutamin

- **Kulturmedium für SaOS-2 Zellen**

- McCoy's 5A (Gibco)

500 ml Kulturmedium; 50 ml FKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin

- Dulbecco's (Gibco) ohne Phenolrot und L-Glutamin

500 ml Kulturmedium; 50 ml CDFKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin; 3,6 ml L-Glutamin

- **Phosphate Buffer Saline (PBS)**

5 g NaCl; 0,72 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,25 g KCl; 0,125  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,3-7,4  
mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen, autoklavieren

- **Trypsin-Lösung**

125 mg Trypsin (Serva); 62,5 mg EDTA; mit PBS auf 250 ml auffüllen; über Nacht gekühlt rühren; sterilfiltrieren

- **DMSO Dimethylsulfoxid für die Spektroskopie (Merck, Darmstadt)**

- **Trypanblau-Lösung**

0,4 g Trypanblau (Serva); 0,81 g NaCl; 0,06 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2; mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen

**Geräte**

Lamin-Air (Heraeus)  
Brutschrank (Heraeus)  
Biofuge (Heraeus)  
Umkehrmikroskop (Zeiss)  
Vakuumsaugpumpe (KNF-Neuburger)  
automatische Pipettierhilfe (Pipetus)  
Bunsenbrenner

**Material**

Kulturflaschen 25, 75 und 175 cm<sup>2</sup> (Greiner, Sarstedt)  
Petrischalen 60 und 140 mm (Nunc, Sarstedt, Greiner)  
sterile Einwegröhrchen 10, 15 und 50 ml (Greiner, Sarstedt)  
sterile Einwegspritzen  
sterile Einwegkanülen  
sterile Pipetten  
Neubauerzählkammer

**Kultivierungsbedingungen**

Die verwendeten Zelllinien wachsen adhärent und werden unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen oder Petrischalen bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90% kultiviert. [Lindl, 1987]

In der Regel wird serumhaltiges Medium verwendet. Dem Medium wird nach Temperieren auf 37°C Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Pen/Strep dient zur Kontaminationsprophylaxe gegen Prokaryonten. [Lindl, 1987]

### ***Mediumwechsel***

Alle 3 - 4 Tage wird das Medium gewechselt, um eine Übersäuerung des Milieus zu vermeiden. Als Indikator hierfür kann bei phenolrothaltigen Medien der Farbumschlag von rot nach orange-gelb verwendet werden.

Nach dem Abgießen oder Absaugen des alten Mediums wird mit PBS gewaschen und frisches Medium auf die Zellen gegeben.

### ***Passagieren***

Ist eine Kulturflasche konfluent bewachsen, werden die Zellen in eine oder mehrere größere Flaschen überführt. Der Boden der Kulturflasche wird nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS mit Trypsinlösung bedeckt. Nach wenigen Minuten Inkubation im Brutschrank kommt es zum Ablösen der Zellen. Das Trypsin wird durch Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert.

Sollen die Zellen in CDFKS Medium kultiviert werden, werden sie steril abzentrifugiert (200 g, 10 min) und im entsprechenden Medium aufgenommen. Nach der Überführung in neue Flaschen wird mit Medium aufgefüllt.

### ***Einfrieren von Zellen***

Zellen sind in flüssigem Stickstoff lange lagerfähig. Es werden ca.  $10^6$  abzentrifugierte Zellen in 1 ml Kulturmedium, das 10% DMSO enthält, stufenweise eingefroren (-20 °C, -70 °C, flüssiger Stickstoff).

Das Auftauen muß schnell erfolgen, da sonst Zellen durch Kristallbildung zerstört werden können.

### ***Auftauen von Zellen***

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellsuspensionen werden im Wasserbad bei 37°C möglichst schnell aufgetaut, zu FKS-haltigem Medium dazugegeben und bei

200g eine Minute zentrifugiert, um das cytotoxische DMSO zu entfernen. Das in FKS-haltigem Medium resuspendierte Zellsediment wird zur Kultivierung eingesetzt. [Lindl, 1987]

### ***Auszählen von Zellen***

Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer sterilen Pipette lassen sich die Zellen vereinzeln. Die Zellen werden mit Trypanblaulösung angefärbt. Lebende Zellen färben sich hellgelb, tote Zellen erscheinen blau gefärbt.

Unter dem Mikroskop wird mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei ein Feld einem Volumen von 0,1 µl entspricht (Verdünnung durch Färbelösung berücksichtigen!).

[Lindl, 1987]

## **6.2. Transformation prokaryontischer Zellen**

Als Transformation bezeichnet man die Einführung fremden genetischen Materials (beispielsweise Plasmide) in eine intakte Wirtszelle [Koch-Brandt, 1993].

### **6.2.1. Herstellung von transformationskompetenten E.coli-Zellen**

#### ***Materialien***

- **LB-Medium**

10 g Caseinhydrolysat (Gibco); 5 g Bactohefeextract (Gibco); 10 g NaCl; pH 7,5; bidest. Wasser ad. 1000 ml; autoklavieren

- **LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin**

7,5 g Agar (Gibco); LB-Medium ad. 500 ml; autoklavieren, auf ca. 40 °C abkühlen, Ampicillin (Sigma) zugeben; jeweils ca 20 ml in 10 cm Petrischalen geben; bei 4 °C lagern

- **CaCl<sub>2</sub>-Lösung**

50 mM CaCl<sub>2</sub>; autoklavieren

- **Glycerolstock E.coli sure**

- **250 ml Erlenmeyer-Kolben (steril)**

### ***Methode***

#### **1. Herstellung einer Übernachtskultur**

5 µl Bakterienglycerolstocklösung in 5 ml LB-Medium (Übernachtskultur-Röhrchen) suspendieren. Zellen unter Schütteln über Nacht bis zu einer Zelldichte von 1-2 x 10<sup>8</sup>/ml kultivieren.

#### **2. Herstellung von kompetenten Zellen**

30 ml LB-Medium mit 300 µl Übernachtskultur in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben animpfen (Medium auf 37°C vorwärmen). Zellen für 2,5 Stunden bis zu einer Dichte von 4-7 x 10<sup>7</sup> /ml bei 37 °C unter Schütteln (160rpm/min) kultivieren.

Ab diesem Zeitpunkt alle Arbeiten auf Eis und mit vorgekühlten (4°C) Materialien und Lösungen durchführen.

Kultur in steriles SS-34-Zentrifugenröhrchen überführen und im SS-34-Rotor einer Sorvallzentrifuge bei 5000 rpm/min und 4°C für 10 min sedimentieren. Überstand dekantieren und Zellpellet in 12,5 ml kaltem CaCl<sub>2</sub> (4°C) resuspendieren. Suspension

15 min auf Eis inkubieren. Danach wie oben zentrifugieren.  $\text{CaCl}_2$ -Überstand vorsichtig abgießen und Bakterien in 2,5 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung suspendieren. Die kompetenten Zellen können direkt zur Transformation verwendet werden.

### **6.2.2. Transformation von kompetenten E.coli-Zellen**

Pro Plasmidansatz je 200  $\mu\text{l}$  kompetente E.coli in  $\text{CaCl}_2$  in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen. 1 bis 30 ng des jeweiligen Plasmids zugeben und vorsichtig mischen. Ein Kontrolltube (200  $\mu\text{l}$  kompetente E.coli ohne Plasmidzugabe) mitführen. Transformations- und Kontrollansätze für 30 min auf Eis inkubieren. Durchführung eines Hitze-Schocks: Inkubation der Ansätze für 2 min bei 42 °C (ohne Schütteln) mit anschließender Kühlung für 5 min auf Eis.

Je 1 ml LB-Medium zugeben und 30 min bei 37 °C inkubieren. Je Ansatz 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin (zur Kontrolle auch 100  $\mu\text{l}$  auf einer LB-Agarplatte ohne Ampicillin) ausplattieren. Bei 37 °C über Nacht inkubieren.

Aus den auf den LB-Agarplatten mit Ampicillin gewachsenen Kolonien wird die Plasmid DNA isoliert (Mini-Präparation bzw. Maxi-Präparation, siehe 6.3.) und analysiert (siehe 6.4.).

## **6.3. Isolierung von Plasmiden**

### **6.3.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Die Mini-Präparation ermöglicht die schnelle Gewinnung kleinerer Plasmidmengen und ist vor allem für analytische Reihenuntersuchungen (Restriktionsanalysen) vieler Plasmide geeignet [Gassen, 1991].

Diese Methode dient somit der schnellen qualitativen Überprüfung der Transformation der E.coli.

Prinzip: siehe Maxipräparation (6.3.2.)

**Materialien**

Lösungen I,II und III am Vortag ansetzen ; Lösung I und III autoklavieren

- **Lösung I:**

83 ml 0,3 M Glucose; 12,5 ml 1M TrisHCl (pH 8,0); 10 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0);  
bidest Wasser ad. 500 ML

- **Lösung II :**

2 ml 10 M NaOH; 10 ml 10% SDS; bidest Wasser ad. 100 ml

- **Lösung III:**

60 ml 5 M Kaliumacetatlösung; 11,5 ml Essigsäure (p.A.); bidest Wasser ad.  
100 ml

- **TE-Puffer**

10 mM Tris; pH 8.0; 1 mM EDTA; autoklavieren

1,5 ml transformierte Bakteriensuspension in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und 30 s bei 13 000 rpm zentrifugieren.

Überstand verwerfen und Pellet in 100 µl Lösung I resuspendieren. 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. 200 µl Lösung II zugeben, kurz vortexen und direkt für 5 min auf Eis stellen. Es bildet sich ein weißer Niederschlag, der für 10 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert wird.

Den plasmidhaltigen Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen und mit 2,5 Vol Ethanol (100%; ungekühlt) versetzen. Die DNA bei – 20 °C für mindestens 1 h fällen. DNA bei 13 000 rpm für 10 min abzentrifugieren. Pellet mit 100 µl vorgekühltem 70%igem Ethanol waschen (Zentrifugation bei 13 000 rpm für 5 min).

Überstand vorsichtig entfernen, Pellet im Exsiccator vakuumtrocknen und anschließend in 30 µl TE Puffer lösen.

### **6.3.2. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA**

#### ***Prinzip***

Die Großpräparation erlaubt die Gewinnung größerer Plasmidmengen in relativ reiner Form, die für zahlreiche Zwecke (Sequenzierung, Klonierung, Transfektion) geeignet ist.

Die Bakterienzellen werden einer zeitlich limitierten alkalischen Lyse mit NaOH-SDS unterzogen. SDS solubilisiert die Phospholipid und Protein Komponenten der Zellmembran, NaOH denaturiert Proteine sowie die chromosomale und Plasmid-DNA. Nach genau einzuhaltender Lysedauer erfolgt die Neutralisation mit einem Kalium-Acetat-Puffer. Durch die hohe Salzkonzentration kommt es zur Ausbildung von SDS Präzipitaten, in die denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zellbruchstücke eingeschlossen sind. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert und verbleibt in Lösung. Über eine Anionen-Austauschersäule erfolgt die Aufreinigung der Plasmid-DNA bei spezifischen Salz- und pH-Konditionen. Nach der Elution mit einem Hochsalz-Puffer kann die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt werden.

[Qiagen,1997]

#### ***Materialien und Methode***

Qiagen Plasmid Maxi Kit

#### **6.4. Restriktionsverdau der präparierten Plasmide und elektrophoretische Auftrennung**

##### ***Prinzip***

Die isolierte Plasmid-DNA wird durch zweistündige analytische Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen überprüft. Die durch den enzymatischen Verdau linearisierte Plasmid-DNA kann in einem 0,7%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch einen Längenvergleich mit einem mitgeführten Marker kann eine Prüfung des nach der Transformation gewonnenen Plasmids erfolgen.

##### ***Materialien***

- **DNA-Probe** in TE-Puffer gelöst
- **DNA-Längenstandard:**  $\lambda$ -DNA, Hind III geschnitten (MBI Fermentas); Gene ruler 100 bp ladder plus (MBI Fermentas)
- **Restriktionsendonukleasen** mit All-for-one-buffer (10x) (Pharmacia)
- **Agarose** (Gibco)
- **50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-Puffer) :**

242 g Tris-Base; 57,1 ml Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); bidest.  
Wasser ad. 1000 ml

- **Gelladepuffer:**

0,2% Bromphenolblau; 60% Glycerin; 60 mM EDTA

- **Ethidiumbromidbad**

2,5 µg Ethidiumbromid/ml

- **Ethidiumbromidstocklösung**

10 mg Ethidiumbromid/ml

- **Mini-bzw. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA**

### ***Methode***

Für den Restriktionsverdau wird je ein Ansatz mit 5 µl Plasmidlösung, 1 µl All-for-one-buffer (10x), 1 µl Restriktionsenzym mit bidest. Wasser auf 10 µl aufgefüllt und ca. 2 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Herstellung des 0,7 bis 1%igen Agarose-Gels wird eine entsprechende Menge Agarose mit 1xTAE-Puffer versetzt, unter Rühren aufgeköcht und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Die Polymerisation erfolgt mit dem Abkühlen innerhalb von 45 Minuten.

Zur Probenvorbereitung werden Proben und Marker mit 1 µl Ladepuffer versetzt und in die Ladungstaschen des auspolymerisierten Gels pipettiert. Das Gel wird vollständig mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgt bei konstanter Voltzahl zwischen 10 und 50 V. Zur Detektion wird das Gel in einem ethidiumbromidhaltigen Bad inkubiert und die Banden im UV-Licht (Transilluminator oder Lumi-Imager) identifiziert.

## **6.5. Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch die Bestimmung der UV-Absorption bei 260 nm ermittelt werden. Dabei entspricht

1 A <sub>260</sub> -Einheit	50 µg/ml doppelsträngige DNA
	40 µg/ml einzelsträngige RNA

Die Proben werden mit Wasser so verdünnt, daß der Extinktionsunterschied gegen Wasser mindestens 0,15 beträgt. Zur Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration gilt dann für

DNA: Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] =  $A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

RNA: Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] =  $A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

[Maniatis, 1989]

## **6.6. RT-PCR auf Androgenrezeptor**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren eingesetzt und beruht auf den Prinzipien der DNA-Replikation. Zu einer vorhandenen DNA-Matrize wird durch eine DNA-Polymerase (thermostabil) ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Dazu werden Primer benötigt, die in den flankierenden Bereichen der Matrize hybridisieren und als Startpunkt dienen.

Auch RNA-Sequenzen können als Matrizen eingesetzt werden. Der RNA-Strang muß dabei mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in einen cDNA-Strang übersetzt werden. Die RT-PCR eignet sich zur Untersuchung der Genexpression auf der Stufe der m-RNA. [Gassen, 1994]

### **6.6.1. Isolierung der Gesamt-RNA**

Die Gesamt-RNA wird mit Hilfe eines RNeasy Mini Kits (Qiagen) isoliert.

SaOS-2 bzw. T47D Zellen werden in 58 mm Petrischalen in FKS-Medium ausgestreut und bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen mit einem Guanidiniumisothiocyanat-haltigen Puffer versetzt, der RNasen inaktiviert und so den Abbau der RNA verhindert. Die Zellen werden abgeschabt und zur Homogenisierung und Verringerung der Viskosität der Probe auf eine Qiashredder Säule gegeben und abzentrifugiert. Nach Zugabe von 70%igem Ethanol wird die Probe auf eine RNeasy Spin Säule übertragen, abzentrifugiert und die RNA dabei an das Silikagel-Säulenmaterial adsorbiert. Durch Zentrifugieren mit verschiedenen Puffern wird die RNA von Kontaminanten befreit und schließlich mit

Wasser eluiert. Nähere Einzelheiten zur Handhabung sind dem RNeasy Handbuch zu entnehmen. [Qiagen, 1997]

### ***Materialien***

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

#### **6.6.2. DNase-Verdau**

Die zur RT-PCR einzusetzende Menge an RNA (1µg) und Wasser wird mit DNase versetzt, 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und weitere 10 Minuten zur Denaturierung bei 80 °C belassen. Dieser Ansatz wird direkt zur RT-PCR eingesetzt.

### ***Materialien***

DNase (Pharmacia)                      10 000 units/ml

#### **6.6.3. Durchführung der RT-PCR**

Die folgenden Pipettierschritte werden zur Vermeidung von Kontamination mit RNase mit sterilen, DNase und RNase-freien Filterspitzen durchgeführt. Desweiteren wird ausschließlich DEPC-behandeltes und somit RNase-freies Wasser eingesetzt.

Die zur RT-PCR benötigten Komponenten werden aufgetaut, gemixt, abzentrifugiert und im folgenden auf Eis gehalten. Gemäß dem Pipettierschema werden alle Komponenten der Reihe nach in sterile, DNase- und RNase-freie PCR-Gefäße pipettiert. Anschließend wird ein Mastermix erstellt, der erst unmittelbar vor dem Beginn der RT-Reaktion zu den übrigen Komponenten gegeben wird. Die RT-Reaktion und die PCR erfolgt nach dem angegebenen Protokoll. Nach RNase Verdau werden die Proben in einem 1,3%-igen Agarose-Gel analysiert oder bei -20 °C gelagert.

**Pipettierschema:**

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>	<i>Endkonzentration</i>
H <sub>2</sub> O (DEPC-behandelt)	variabel	1 µg total RNA
Template RNA	variabel	
DNase	1 µl	
→Verdau der DNA; 10 min; 37°C; →Inaktivierung der DNase; 10 min; 80°C		
Nukleotidmix (je 10 mM)	1 µl	0,4 mM
Primer forward (5 µM)	3 µl	0,6 µM
Primer reverse (5 µM)	3 µl	0,6 µM
DTT (100 mM)	2,5 µl	5 mM
RNase-Inhibitor(40U/µl)	0,5 µl	20 U
Total	25 µl	
Mastermix	25 µl	

**Mastermix:**

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>	<i>Endkonzentration</i>
H <sub>2</sub> O (DEPC-behandelt)	14 µl	2 x
5 x RT-PCR Puffer	10 µl	
Enzym-Mix	1 µl	
Total	25 µl	

**Temperaturprotokoll:**

1x	RT-Reaktion bei 50 °C 30 min
1x	Denaturierung des Templates bei 94 °C 2 min
10x	Denaturierung bei 94 °C 30 s



#### **6.6.4. RNase Verdau**

Die zur Agarose-Gelelektrophorese einzusetzende Probe wird mit einer adäquaten Menge an RNase versetzt und eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Gelladungspuffer kann diese Lösung direkt zur Elektrophorese eingesetzt werden (siehe 6.4.).

#### **6.7. Wachstumstest (modifizierter Sulforhodamin-B-Assay)**

##### ***Prinzip***

Beim Sulforhodamin-B-Assay werden die mit Trichloressigsäure am Boden der Kulturplatten fixierten Zellen mit dem anionischen Farbstoff Sulforhodamin-B angefärbt. Sulforhodamin-B bindet unter milden sauren Bedingungen durch seine anionischen Sulfitgruppen an basische Aminosäuren in Proteinen. Im schwach basischen wird der Farbstoff quantitativ von den Proteinen extrahiert. Die Extinktion der Farbstofflösung, die proportional der Zellzahl ist, wird photometrisch quantifiziert. [Skehan et al., 1990]

##### ***Materialien***

- **Sulforhodamin-B** (Sigma)
- **Sulforhodamin-B Lösung:** 0,4% Sulforhodamin-B in 1%iger Essigsäure (aus Eisessig, Roth)
- **50 %ige Trichloressigsäure** (TCA, Acros)
- **Tris-Base**, 10 mM, pH-Wert 10,5 (Roche)
- **24-Loch-Titerplatten** (Greiner)
- **Einwegküvetten**

### **Methode**

In jedes Loch der 24-Lochplatten werden 7000 (SaOS-2, T47D) Zellen bzw. 6000 (MFM-223) Zellen unter kreisenden Bewegungen ausgestreut. Nach 48-stündiger Kultivierung in CDFKS-Medium erfolgt die Inkubation mit unterschiedlichen Testsubstanzen (je Konzentration vier Einzelbestimmungen), die in CDFKS Medium (0,1% DMSO) gelöst sind. Aufgrund der langen Inkubationszeit der Zellen mit den Substanzen müssen die einzelnen Inkubationsansätze (auch das Kontrollmedium) direkt vor der Inkubation steril filtriert werden. Als Negativ-Kontrolle dienen Zellen, die nur mit CDFKS-Medium (0,1% DMSO) inkubiert werden, als Positiv-Kontrolle Zellen, die mit verschiedenen Dihydrotestosteron-Konzentrationen (0,1% DMSO) behandelt werden. Jeden zweiten Tag erfolgt ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen, in der Regel über 5-7 Tage.

Zum Abbruch des Testansatzes werden die lebenden Zellen am Boden der Titerplatten durch Zugabe von 250 µl 4°C kalter 50%iger TCA (10% TCA Endkonzentration) und 60 min Inkubation bei 4°C fixiert und die Zellproteine ausgefällt. Nach vier- bis fünfmaligem Waschen mit kaltem Leitungswasser werden die Platten an der Luft getrocknet.

Die Platten werden mit jeweils 250 µl 0,4 %iger Sulforhodamin-B-Lösung in 1%iger Essigsäure pro Loch angefärbt. Nach 30 min wird der überschüssige Farbstoff abgegossen und die Platten vier bis fünfmal mit 1 %iger Essigsäure gewaschen, bis kein Farbstoff mehr an das Waschwasser abgegeben wird. Der proteingebundene Farbstoff wird nach erneutem Trocknen in 1 ml 4°C kaltem Tris-Puffer (pH 10,5) pro Well solubilisiert und innerhalb von 15 min bei 564 nm photometrisch vermessen. Überschreiten die Extinktionen einen Wert von 1,2 wird entsprechend mit Tris-Puffer verdünnt, bis die gemessenen Extinktionen im linearen Bereich des Photometers liegen.

Die erhaltenen Extinktionen sind der Proteinmenge und somit der Lebendzellzahl proportional.

### **6.8. Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Elektroporation**

### **Prinzip**

Die Elektroporation ist ein rein physikalisches Verfahren zur Einbringung von DNA in eine Wirtszelle. Durch einen kurzen elektrischen Impuls oberhalb der kritischen Feldstärke wird die Permeabilität der Zellmembran kurzzeitig so erhöht, daß auch DNA Moleküle in die Zelle eindringen können.

Es wird zwischen stabiler und transienter Transfektion unterschieden. Bei der stabilen Transfektion kommt es zu einem Einbau der genetischen Information in das Wirtszell-Genom, während bei der transienten das Plasmid frei im Cytosol vorliegt und nach einer gewissen Zeit von der Wirtszelle wieder ausgeschleust werden kann.

Die Plasmide, die zur Transfektion verwendet werden, enthalten häufig Resistenzgene gegen verschiedene Antibiotika, um eine Selektion der transfizierten Zellen zu ermöglichen. [Gassen, 1991; Koch-Brandt, 1993]

### **Materialien**

- **Plasmide:**

pMamneoLuc (Clontech)

pSG5AR (Stratagene)

pSV $\beta$  (Clontech)

- **Elektroporationsküvetten** (Invitrogen)

### **Methode: Transfektion von COS-7 , CV-1, T47D und SaOS-2 Zellen**

80% konfluent gewachsene Zellen werden abtrypsiniert und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4°C), mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden in PBS zu einer Zelldichte von 4 Millionen Zellen/500  $\mu$ l PBS aufgenommen und in einer Elektroporationsküvette (Invitrogen) vorgelegt. Nach Zugabe von je 5  $\mu$ g

der einzusetzenden Plasmide (COS-7: pMamneo-Luc, pSG5AR, pSV $\beta$ ; CV-1: pMamneo-Luc, pSG5AR; T47D: pMamneo-Luc; SaOS-2: pMamneo-Luc) wird die Kuvette 10 min auf Eis inkubiert. Danach wird die Elektroporation durchgeführt (Elektroporationsbedingungen: COS-7, CV-1: 1000  $\mu$ F, 330 V, 25 mA, 25 W; T47D: 500  $\mu$ F; 330 V, 25 mA, 25 W; SaOs-2: verschiedene Kombinationen, 500 - 1000  $\mu$ F, 200 -300 V, 25 mA, 25 W). Es folgt wiederum eine Inkubation für 10 min auf Eis. Die Zellsuspension wird in 1 ml serumhaltigem Medium aufgenommen, auf Petrischalen (58 mm) ausplattiert und für einen Tag im Brutschrank inkubiert. Im Falle einer transienten Transfektion kann jetzt direkt mit den Testsubstanzen inkubiert werden (siehe 5.9. Luciferase-Assay). Zur Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie kann jetzt mit der Selektion mit Genitacin (G418, Sigma) begonnen werden. CV-1 und T47D Zellen wurden mit 500  $\mu$ g/ml Genitacin selektioniert, SaOS-2 Zellen mit 200  $\mu$ g/ml Genitacin. [Invitrogen Electroporator II Manual]

## **6.9. Luciferase-Reporterassay**

### ***Inkubation der Zellkultur***

- **T47D-Luc; CV-AR-Luc (stabiler Transaktivierungsassay):**

Stabil transfizierte T47D-Luc bzw. CV-AR-Luc Zellen werden in CDFKS Medium auf Petrischalen (58 mm) ausgestreut und 24 h kultiviert.

- **COS-AR-Luc (transienter Transaktivierungsassay):**

Vier Elektroporationsansätze werden gemischt, auf 15 Petrischalen mit FKS-Medium verteilt und 18-24 h inkubiert.

Danach werden die jeweiligen COS-AR-Luc, CV-AR-Luc und T47D-Luc Ansätze für 24 h mit den Testsubstanzen in CDFKS-Medium inkubiert. Es folgt eine Nachinkubation in CDFKS-Medium für weitere 24 h. Danach wird eine Zellyse durchgeführt.

### ***Herstellung der Zellextrakte***

Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 250 µl (T47D-Luc, CV-AR-Luc) bzw. 150 µl (COS-AR-LUC) Lysepuffer versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die lysierten Zellen werden abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Suspension wird 1 min bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält die cytosolische Luciferase, die entweder direkt zur Messung eingesetzt oder bei -80°C gelagert werden kann. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

### ***Messung der Luciferase Aktivität***

60 µl des Zellysats werden in eine weiße 96-Lochplatte (Nunc) pipettiert. Die Zugabe von 180 µl Luciferase-Substrat erfolgt automatisch im Luminometer. Über einen Zeitraum von 250 s erfolgt die Messung der emittierten Lichtintensität in 50 Meßintervallen.

### ***Materialien***

- **Lysis-Puffer 5x (Promega):**

- 125 mM Tris-Phosphat pH 7,8
- 10 mM Dithiothreitol (DTT)
- 10 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
- 10 % Glycerin
- 1 % Triton X-100

- **Luciferase Assay Puffer (Promega):**

- 20 mM Tricine
- 1,07 mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 2,67 mM  $\text{MgSO}_4$
- 0,1 mM EDTA

33,3 mM DTT  
270  $\mu$ M Coenzym A  
470  $\mu$ M Luciferin  
530  $\mu$ M ATP  
pH 7,8

- **Luciferase Assay Substrat (Promega)**
- **Luminometer (BMG)**

### ***Messung der $\beta$ -Galaktosidase Aktivität***

Beim transienten Testsystem COS-AR-Luc wird die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle des konstitutiven SV-40 Promotors als interne Kontrolle herangezogen. Dadurch können Unterschiede in Transfektionseffizienz und Zellaufarbeitung ausgeglichen werden.

### ***Methode***

Die wie oben angegeben präparierten Zell-Lysate der inkubierten COS-AR-Luc Zellen werden für die Messung eingesetzt:

Je 30  $\mu$ l des Lysats werden in eine weiße 96-Lochplatte pipettiert und mit 200  $\mu$ l Reaktionspuffer versetzt. Nach einer 60 min Inkubation bei Raumtemperatur können die produzierten Lichtsignale im Luminometer vermessen werden. Das Signal ist nach der Inkubation für ca. eine Stunde stabil. [Clontech, 1996]

Zur Normalisierung der erhaltenen Luciferase-Werte gilt:

$$\text{Normalisierte Luciferase} = \frac{\text{Gemessene Luciferase Aktivität}}{\beta\text{-Galaktosidase Aktivität}}$$

**Materialien**

- **Luminescent  $\beta$ -galactosidase Detection Kit II (Clontech):**

- **Reaktionspuffer**

0,2 mM Galacton-Star Substrat; 1 mg/ml Sapphire-II Enhancer

- **Zell-Lysate**

**6.10. PSA-Assay****Prinzip**

PSA (Prostata spezifisches Antigen) wird von der Brustkrebszelllinie T47D in Anwesenheit von Androgenen und Progestinen produziert und ins Medium abgegeben. Ohne Hormonzugabe kommt es dagegen nicht zur Expression. PSA ist somit ein geeigneter endogener Reporter zum Nachweis AR- bzw. PR-agonistischer und antagonistischer Wirkungen. Die Quantifizierung der PSA-Konzentration im Kulturmedium erfolgt mittels ELISA.

**Materialien**

- **PSA- Immulite-3. Generation-Assay (DPC Biermann):**

**PSA Teströhrchen** (beschichtet mit monoklonalem Anti-PSA Antikörper)

**Reagenz 1:** Protein Puffer

**Reagenz 2:** polyklonaler Anti-PSA Antikörper (Ziege) konjugiert mit Alkalischer Phosphatase

## PSA-Kalibratoren

## Waschpuffer

**Chemilumineszenz-Substrat:** LUMIGEN<sup>®</sup> PPD: 4-methoxy-4-(3-phosphatophenyl)-spiro-(1,2-dioxetane-3,2'-adamantane)

- **Tumormarker-Kontrollen (DPC Biermann)**
- **Immulate-Analyser (DPC Biermann)**
- **24-Loch-Kulturplatten**

## ***Methode***

T47D Zellen werden in 24-Lochplatten in CDFKS Medium, 50 000 Zellen pro Loch, ausplattiert. Nach 24h erfolgt die Inkubation mit den Testsubstanzen:

- a) Inkubation mit DHT in DMSO aus Stammlösungen verschiedener Konzentrationen (DMSO Konzentration pro Loch: 0,1%); DHT Konzentrationen im Medium: 0,01 nM bis 1 µM
- b) Inkubation mit potentiellen Hemmstoffen ohne DMSO (gelöst in Ethanol, abrotiert) für 4h (Hemmstoffkonzentrationen: 10 nM bis 10 µM); danach Inkubation mit DHT in 1 nM Konzentration (DHT in DMSO gelöst; DMSO Konzentration pro Loch: 0,1%)

Bei jedem Versuchsansatz werden mehrere Negativkontrollen (Inkubation nur mit 0,1% DMSO) und Positivkontrollen (DHT) mitgeführt.

Nach 5 Tagen wird das Medium abgenommen und die PSA Konzentration im unverdünnten Medium mittels des PSA-Immulate-3.Generation-Assays an einem Immulate-Analyser vermessen.

Um cytotoxische Effekte auszuschließen wurden die Zellen mit Sulforhodamin B nach dem in 6.7. beschriebenen Verfahren gefärbt und quantifiziert.

## **6.11. Molecular Modelling**

### ***Prinzip***

Mittels Molecular Modelling Verfahren können realistische dreidimensionale Molekülstrukturen und ihre physikochemischen Eigenschaften berechnet werden. Durch Anwendung von Rechenverfahren wie z.B. der Kraftfeldmethode können unter Berücksichtigung von van-der-Waals-Wechselwirkungen, Bindungsstreckung, Winkeldeformation und Verdrehung des Diederwinkels energetisch günstige dreidimensionale Strukturen ermittelt werden.

Eine Konformationsanalyse kann zur Bestimmung des globalen Minimums herangezogen werden: Die drehbaren Bindungen werden systematisch gedreht, die jeweiligen Konformere mittels Kraftfeldmethode minimiert.

Durch Aufstellen eines Pharmakophormodells mit anschließendem Molekülvergleich (Überlagerung der Moleküle nach bestimmten Kriterien) können die Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung mittels CoMFA-Methode erfaßt und quantifiziert werden. [Böhm et al., 1996]

### ***Methode***

Für alle Schritte der Analyse wird das Programm Sybyl 6.5 der Firma Tripos eingesetzt.

Die Moleküle werden gezeichnet und mit Hilfe von Standard Tripos Force Field und einem Conjugate-Gradient-Minimizer unter folgenden Bedingungen minimiert:

- Energiegradient: 0,001 kcal/mol
- Methode: Powell
- distanzabhängige dielektrische Funktion
- Ladungen: Gasteiger-Hückel
- Iterationen: 1000

Die so energieminierten Moleküle werden einer Konformationsanalyse mittels der Grid Search Option von Sybyl unterzogen. Alle drehbaren Bindungen werden mit 10° Inkrement über einen Bereich von 0° bis 359° gedreht und die verschiedenen

Konformere mittels Kraftfeldmethode wie oben angegeben minimiert. Das Konformer mit der jeweils geringsten Energie wird für die weiteren Berechnungen ausgewählt.

Anhand eines Template Moleküls werden die einzelnen energieminierten Strukturen überlagert und so die Orientierung für die folgende **CoMFA-Analyse** vorgegeben:

Die überlagerten Moleküle werden in ein Gitternetz (4 Angström Abstand) eingebettet. Sterische und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem Molekül und einer Sonde (Kohlenstoff  $sp^3$  hybridisiert) relativ zu allen anderen überlagerten Verbindungen werden berechnet:

- Berechnung der sterischen (van-der-Waals) Wechselwirkungen: Lennard-Jones Potential; Grenzwerte: + 30,0 und – 30,0 kcal/mol
- Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen: Coulomb Potential; Grenzwerte: + 30,0 und –30,0 kcal/mol; distanzabhängige Dielektrik

Die gemessenen Wechselwirkungsenergien werden in ein QSAR Datenblatt (MSS = Molecular Spread Sheet) transferiert. In eine eigene Spalte werden die in den in vitro Testsystemen (PSA-Assay bzw. COS-Transaktivierungsassay) gemessenen biologischen Daten eingetragen (-log  $IC_{50}$  bzw.  $IC_{30}$  [M]).

### **Statistische Analyse**

Eine statistische Analyse der erhaltenen Ergebnisse wird mittels Partial Least-Squares (PLS) Methode vorgenommen. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und Signifikanz des gefundenen Modells wird eine Kreuzvalidierung (leave-one-out Technik) mit 6 CoMFA Grundkomponenten durchgeführt. Nicht miteinbezogen werden Spalten mit einer Standardabweichung kleiner 2,0 kcal/mol („Column Filtering“ Technik). Der erhaltene Wert  $q^2$  gibt Auskunft über die Güte der Vorhersagen.

Für die nicht kreuzvalidierte Analyse werden alle Spalten einbezogen. Die Ergebnisse dieser Analyse können für Vorhersagen der biologischen Aktivität herangezogen werden.

[Waller et al., 1996; Sybyl Ligand Based Design Manual, 1996; Sybyl Theory Manual, 1997]

---

## **7.Literatur**

Alam, J., Cook, J.L.: Reportergenes: Application to the study of mammalian gene transcription; *Analytical Biochemistry* 188, 245-254 (1990)

Agarwal, M.K.: Steroidreceptor domain conformation and hormone antagonism, *Naturwissenschaft* 81, 115-122 (1994)

Arnold, S.F.: Synergistic Activation of Estrogen Receptor with Combinations of Environmental Chemicals; *Science* 272; 1489-1492 (1996)

ATCC, American Type Culture Collection (1998)

Barquet, A.; Morgade, C.; Pfaffenberger, C.D.: Determination of organochlorine pesticides and metabolites in drinking water, human blood serum, and adipose tissue; *J Toxicol Environ Health* 7; 469-479 (1981)

Bauer, E.R.; Meyer, H.H.; Stahlschmidt-Allner, P.; Sauerwein, H.: Application of an androgen receptor assay for the characterization of the androgenic or antiandrogenic activity of various phenylurea herbicides and their derivatives; *Analyst*; 123 (12); 2485-2487 (1998)

Beato, M.: Gene regulation by steroidhormones; *Cell* 56, 335-344 (1989)

Beato, M.: Transcriptional control by nuclear receptors; *The FASEB Journal* 5, 2044-2051 (1991)

Beato, M.: Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo; *The EMBO Journal* 14; 1737-1751 (1995)

Beato, M. : Chromatin structure and the regulation of gene expression: remodeling at the MMTV promoter; *J Mol Med* 74; 711-724 (1996)

- 
- Böhm, H.J.; Klebe, G.; Kubinyi, H.: Wirkstoffdesign; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- Burkert, U. und Allinger, N.L.: Molecular Mechanics; ACS Monograph; 177; American Chemical Society; Washington (1982)
- Caamano, C.A. et al.: A conserved proline in the binding region of the glucocorticoid receptor is required for hsp90 heterocomplex stabilization and receptor signaling; J Biol Chem 273; 20473-20480 (1998)
- Cadepond, F. et al.: Hormonal regulation of the nuclear localisation signals of the human glucocorticosteroid receptor; Experimental Research 201; 99-108 (1992)
- Carlsen, E.; Giwerman, A.; Keiding, N.; Skakkebaek, N.E.: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years; Br. Med. J. 305; 609-613 (1992)
- Carson-Jurica, M. et al.: Steroid receptor family: structure and functions; Endocrine Reviews 11(2); 201-220 (1990)
- Cassidy, A.: Risks and benefit of phytoestrogen-rich diets; Hormonally active agents in food: symposium / DFG; Ed.: Eisenbrand, G., Weinheim, Wiley-VCH, 91-117 (1998)
- Cleutjens, K.B. et al.: An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter; Molecular Endocrinology 11(2); 148-161 (1997)
- Church-Landel, C. et al.: The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins; Molecular Endocrinology 8 (10); 1407-1418 (1994)

- 
- Church-Landel, C. et al.: Estrogen receptor accessory proteins: Effects on receptor-DNA interactions; *Environmental Health Perspectives* 103 (Suppl 7); 23-28 (1995)
- Clontech; Luminescent  $\beta$ -galactosidase Genetic Reporter System II; User Manual (1996)
- Colborn, T. und Clement, C. (Ess.): Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection; Princeton Scientific Publishing Co.; Princeton, New Jersey (1992)
- Colborn, T.; vom Saal, F. S.; Soto, A. M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans; *Environmental Health Perspectives* 101(3); 378-384 (1993)
- Couette, B.; Le Ricousse, S.; Fortin, D.; Rafestin-Obelin, M.E.; Richard-Foy, H.: The establishment of the long terminal repeat of the mouse mammary tumor virus into CV-1 cells allows a functional analysis of steroid receptors; *Biochem Biophys Acta* 1219 (3); 607-12 (1994)
- Cude, K.J. et al.: The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer; *J Mol Med* 77, 419-426 (1999)
- Dalton, J.T.; Mukherjee, A.; Zhu, Z.; Kirkovsky, L.; Miller, D.D.: Discovery of nonsteroidal androgens; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244; 1-4 (1998)
- Danzo, B.J.: The effects of environmental hormones on reproduction; *Cellular and Molecular Life Sciences* 54; 1249-1264 (1998)

- 
- Daston, G.P.; Gettings, S.D.; Carlton, B.D.; Chudkowski, M.; Davis, R.A.; Kraus, A.L.; Luke, C.F.; Ouelette, R.E.; Re, T.A.; Hoberman, A.M.; Sambuko, C.P.: Assessment of the reproductive toxic potential of dermally applied 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone to male B6C3F1 mice; *Fundam. Appl. Toxicol.* 20; 120-124 (1993)
- Davis, D.L. et al.: Medical Hypothesis: Xenoestrogens as Preventable Causes of Breast Cancer; *Environmental Health Perspective* 101(5); 372-377 (1993)
- DeFranco, D.B.: Regulation of steroid receptor subcellular trafficking; *Cell Biochemistry and Biophysics* 30; 1-24 (1999)
- DPC Biermann; Immulite<sup>®</sup>, Third Generation PSA (1997)
- DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (1998)
- Eisenbrand, G., Schreier, P.: *Römpf Lexikon, Lebensmittelchemie*; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York (1995)
- Fail, P.A.; Pearce, S.W.; Anderson, S.A.; Tyl, R.W.; Gray, L.E.: Endocrine and reproductive toxicity of vinclozolin (vin) in male Long-Evans Hooded rats; *Fund Appl Toxicol* 15; 293 (1995)
- Farrow, S.: Falling sperm quality: fact or fiction?; *Br. Med. J.*; 309; 1-2 (1994)
- Gassen, H.G., Bertram, S.: *Gentechnische Methoden*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991)
- Gassen, H.G.; Sachse, G.E.; Schulte, A.: *PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion*; Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1994)
- Gluzman, Y.: SV-40-transformed simian cells support the replication of early SV-40 mutants; *Cell* 23; 175-182 (1981)

- 
- Green, S., Chambon, P.: Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation; Trends in Genetic (TIG) 4, 309-314 (1988)
- Green, S.; Chambon, P. : The estrogen receptor: From perception to mechanism; in: Parker M(ed); Nuclear hormone receptors; Academic Press, London; 15-38 (1991)
- Greim, H.: Environmental estrogens and human health; IUTOX NEWSLETTER; 21(1998)
- Gronemeyer, H. : Control of transcription activation by steroid hormone receptors; The FASEB Journal 6; 2524-2529 (1992)
- Günzburg, W.; Salomons; B. : Factors controlling the expression of mouse mammary tumor virus; Biochemical Journal 283; 625-632 (1992)
- Hackenberg, R. et al.: Autoregulation of androgen receptor level in the new human breast cancer cell line MFM-223; 6<sup>th</sup> SEK-Meeting; Heidelberg; Abstract Z18 (1991a)
- Hackenberg, R. et al.: Androgen Sensivity of the Human Breast Cancer Cell Line MFM-223; Cancer Res. 51; 5722-5727 (1991b)
- Hartmann, A.: Luciferasen als Reportergene der genetischen Regulation; Bio Tec Biotechnologie; 5; Sonderdruck (1991)
- Herrala, A. et al.: Androgen-sensitive human prostate cancer cells, LNCaP, produce both N-terminally mature and truncated prostate-specific antigen isoforms; Eur. J.Biochem. 255; 329-335 (1998)
- Herrou, N.: Forschungsarbeit; Universität Kaiserslautern (1997)
- Horwitz, K.; Zava, D.; Thilagar, A.; Jensen, E.; McGuire, W.: Steroid receptor breast cancer cell lines; Cancer research;38; 2434-2437 (1978)

---

Hörz, W. : Chromatinstruktur und Genregulation; Naturwissenschaften 81, 74-78 (1994)

Invitrogen Elektroporator II Manual, Version 3.1

Jenster, G. et al. : Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation and subcellular localisation; Molecular Endocrinology 5 (10); 1396-1404 (1991)

Jenster, G. et al. : Nuclear import of the human androgen receptor; Biochemical Journal 293; 761-768 (1993)

Jobling, S. und Sumpter, J.P.: Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout hepatocytes; Aquat. Toxicol. 27; 361 (1993)

John Radcliffe Hospital Study Group: Cryptorchidism: an apparent substantial increase since 1960; Br. Med. J. ; 293; 1401-1404 (1986)

Kadry, A.M.; Obereke, C.S.; Abdel-Rahman, M.S.; Friedmann, M.A.; Davis, R.A.: Pharmakokinetics of benzophenone-3 after oral exposure in male rats; Journal of Applied Toxicology 15 (2); 97-102 (1995)

Kasperek, C.H.; Wergedal, J.E.; Farley, J.R.; Linkhart, T.A.; Turner, R.T.; Baylink, D.J.: Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro; Endocrinology 124; 1576 (1989)

Kelce, W.R.; Stone, C.S.; Laws, S.C. Gray, L.E. Kemppainen, J.A.; Wilson, E.M.: Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist; Nature 375, 581-585 (1995)

Keydar, I.; Chen, L.; Karby, S.; Weiss, F.R.; Delarea, J.; Radu, M.; Chaitciks, S.; Brenners, H.J.: Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin; Europ. J. Cancer 15; 659-670 (1979)

- 
- Klebe, G.: Structural Alignment of Molecules, in: 3D-QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications, H. Kubinyi, Hrsg., ESCOM, Leiden, S. 173-199 (1993)
- Klebe, G. und Mietzner, T.: A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations; J. Comput.-Aided Mol. Design 8; 583-606 (1994)
- Koch-Brandt, C.: Gentransfer: Prinzipien-Experimente-Anwendungen bei Säugern; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York (1993)
- Kubinyi, H.; Hrsg.: 3D-QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications; ESCOM; Leiden (1993)
- Kumar, R. und Thompson, E.B.: The structure of the nuclear hormone receptors; Steroids 64; 310-319 (1999)
- Lewin, B.: Molekularbiologie der Gene; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin (1998)
- Lin, M.-F.; Meng, T.-C.; Rao, P.S.; Chang, C.; Schönthal, A.H.; Lin, F.-F.: Expression of human prostatic acid phosphatase correlates with androgen-stimulated cell proliferation in prostate cancer cell lines; Journal of Biological Chemistry 273 (10); 5939-5947 (1998)
- Lindl, T., Bauer, J.: Zell-und Gewebekultur; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1987)
- Manaitis, T. ; Sambrook, J.; Fritsch, E.: Molecular Cloning; 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press; Plainview (1989)
- McDonnell, P. et al. (1995): Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor; Annals of the New York Academy of Sciences 761; 121-137

- 
- McLachlan, J.A.: Functional toxicology : An Approach to detect biologically active xenobiotics; Environmental Health Perspectives 101; 386-387 (1993)
- Mußler, B.: Etablierung von in vitro Methoden zur Erfassung von endocrinen Disruptoren; Dissertation; Universität Kaiserslautern (1999)
- Obereke, C.S.; Abdel-Rhaman, M.S.; Friedmann, M.A.: Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats; Toxicology letters 73; 113-122 (1994)
- OECD: European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife; Report of Proceedings 2-4 December; Weybridge UK (1996)
- Olea-Serrano, M.F. et al. : Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans; Environmental Health Perspectives 103; 608-612 (1995)
- Orwoll, E.S.; Stribrska, L.; Ramsey, E.E.; Keenan, E.J.: Androgen receptors in osteoblast-like cell lines; Calcif Tissue Int 49; 183-187 (1991)
- Ostby, J.; Kelce, W.R.; Lambright, C.; Wolf, C.J.; Mann, P.; Gray, L.E.: The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro; Toxicology and Industrial Health 15; 80-93 (1999)
- Pathak, V. et al.: Antiandrogenic phenolic constituents from *dalbergia cochinchinensis*; Phytochemistry 46(7); 1219-1223 (1997)
- Paulozzi, L.J.: International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism; Environmental Health Perspectives 107 (4); 297-302 (1999)
- Picard, D. und Yamamoto, K. : Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor; 6(11); 3333-3340 (1987)

- 
- Pratt, W. and Welsh, M.J. : Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors; *Cell Biology* 5; 83-93 (1994)
- Pratt, W. et al. : Interaction of the Glucocorticoid Receptor with the M<sub>R</sub> 90000 Heat Shock Protein: An evolving model of ligand-mediated receptor transformation and translocation; *Cancer Res.* 49; 2222s-2229s (1989)
- Pratt, W. : The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the Glucocorticoid Receptor; *The Journal of Biological Chemistry* 268; 21455-21458 (1993)
- Promega, Luciferase Assay System, Technical Bulletin (1998)
- Qiagen; RNeasy Mini Handbook (1997)
- Qiagen; Plasmid Purification Handbook (1997)
- Rosenberg, R.S.; Grass, L.; Jenkins, D.J.A.; Kendall, C.W.C.; Diamandis, E.P.: Modulation of androgen and progesterone receptors by phytochemicals in breast cancer cell lines; *Biochem Biophys Res Comm* 248; 935-939 (1998)
- Sadar, M.D.: Androgen-independent induction of prostate-specific antigen expression via cross-talk between androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways; *Journal of Biological Chemistry* 274 (12); 7777-7783 (1999)
- Safe, S.H.: Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?; *Environmental Health Perspectives* 103; 346-351 (1995)
- Silbernagel, S.; Despopoulos, A.: *Taschenatlas der Physiologie*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart und Deutscher Taschenbuch Verlag, München (1991)

- 
- Simental, J.A. et al.: Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor; *The Journal of the Biological Chemistry* 266 (1); 510-518 (1991)
- Skakkeback, N.E. et al.: Are estrogens involved in falling sperm counts and disorder of the male reproductive tract?; *Lancet* 341; 1392-1395 (1993)
- Skehan, P. et al.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening; *Journal of the National Cancer Institute* 82; 1107-1112 (1990)
- Smith, D.F. et al. : Steroid receptors and their associated proteins; *Molecular Endocrinology* 7 (1); 4-11 (1993)
- Soto, A.M.; Sonnenschein, C.: The E-Screen-Assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants; *Environmental Health Perspectives* 103; 113-122 (1995)
- Szokolay, A.; Rosival, L.; Uhnak, J.; Madaric, A.: Dynamics of benzene hexachloride (BHC) isomers and other chlorinated pesticides in the food chain and in human fat; *Ecotoxicol Environ Safety*; 1; 349-359 (1977)
- Täufel; Ternes; Tunger; Zobel: *Lebensmittel-Lexikon*; Bd. 2; 3., neubearbeitete und aktualisierte Auflage; Behr's Verlag (1993)
- Teutsch, G.; Goubet, F.; Battmann, T.; Bonfils, A.; Bouchoux, F.; Cerede, E.; Gofflo, D.; Gaillard-Kelly, M.; Philibert, D.: Non-steroidal antiandrogens: synthesis and biological profile of high-affinity ligands for the androgen receptor; *J. Steroid Molec. Biol.*; 48(1); 111-119 (1994)
- Toppari, J.; Larsen, J.C.; Christiansen, P.; Giwereman, A.; Grandjean, P.; Guillette, L.J. Jr. et al.: Male reproductive health and environmental xenoestrogens; *Environmental Health Perspectives*; 104; 741-803 (1996)

---

Triplos; Sybyl Ligand-Based Design; Version 6.3 (1996)

Turan, A. : Exkretion natürlicher und synthetischer Östrogene und ihrer Metabolite: Vorkommen und Verhalten im Wasser; Umweltbundesamt, März 1995 (1995)

US Government Printing Office: Metabolism of Pestizides; Update II; Department of the International Wildlife Service; Special Scientific Report-Wildlife No. 2L2.W.; 104 (1978)

Veldscholte, J.; Berrevoets, C.A.; Brinkmann, A.O.; Grootegoed, J.A.; Mulder, E.: Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaktion, and transcription activation; *Biochemistry* 31; 2393-2399 (1992)

Waller, C.L.; Booker, W.J.; Gray, L.E. JR., Kelce, W.R.: Three-dimensional quantitative structure-activity relationships for androgen receptor ligands; *Toxicology and Applied Pharmacology* 137; 219-227 (1996)

Wahli, W.; Martinez, E.: Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression; *The FASEB Journal* 5; 2243-2249 (1991)

White, R. und Parker, M.G.: Molecular mechanisms of steroid hormone action; *Endocrine-Related Cancer* 5; 1-14 (1998)

W.H.O.: Congenital malformations worldwide: A report from the international clearinghouse for birth defects monitoring systems; Elsevier; Oxford; 113-118 (1991)

Wiren, K.M.; Zhang, X.; Chang, C.; Keenan, E.; Orwoll, E.S.: Transcriptional up-regulation of the human androgen receptor by androgen in bone cells; *Endocrinology* 138 (6); 2291-2300 (1997)

- Wolffe, A.P. : Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription; Elsevier Science Ltd; 240-244 (1994)
- Wong, C., Wilson, E. : Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding; The Journal of Biological Chemistry 268; 19004-19012 (1993)
- Wong, C.; Kelce, W.R.; Sar, M.; Wilson, E.M.: Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide Vinclozolin relative to Hydroxyflutamid; The Journal of Biological Chemistry 270; 19998-20003 (1995)
- Wood, K.: Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists; Promega Notes 28 (1990)
- Ylikomi, T. and Gronemeyer, H. : Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesteron receptors; The EMBO Journal 11 (10); 3681-3694 (1992)
- ZKBS: Stellungnahme der Zentralen Kommission für die biologische Sicherheit; Bundesgesundheitsblatt 319/320 (1994)

---

## Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

B. Mußler, S. Guth, G. Eisenbrand

Identification and characterization of antiandrogens by in vitro assays and molecular modeling.

In: „Carcinogenic/anticarcinogenic factors in food: novel concepts?

(Eds. G. Eisenbrand et al), Proc. DFG-Symposium der Senate Commission of Food Safety, DFG-Publikation, Wiley-VCH (1999)

D. Seng; A. Yussuf; S. Böhm; S. Guth; B. Mußler; G. Eisenbrand

Untersuchungen zur hormonellen/ antihormonellen Aktivität verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe in funktionellen in vitro Assays

Lebensmittelchemie 52; 34 (1998)

## Dank

Mein Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Arbeitskreises Eisenbrand, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich:

Herrn Dr. Bernd Mußler für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, für die sehr gute unterstützende Betreuung und Hilfe, die interessanten anregenden fachlichen und privaten Diskussionen während der Promotionszeit, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Frau Sonja Böhm für ihre Freundschaft, die Aufmunterungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts

Frau Christiane Seus für ihre Freundschaft und die aufmunternden Worte

Meinen Laborkollegen Annette Höll, Hennieke Kamp, Daniela Seng und Akani Yussuf für die Hilfe und gute Zusammenarbeit im Labor

Meinen Kollegen Volker Glaab und Susanne Meiers für den Spaß in den Kaffeepausen und die Hilfe bei diversen Problemen

Meinen Forschungspraktikanten Karsten Müller und Hennieke Kamp und meinem Diplomanden Hennieke Kamp für ihr Engagement, die zuverlässige Mitarbeit und die Diskussionen

Herrn Dr. Eric Fabian und Herrn Dr. Matthias Baum für die freundliche Hilfe und Unterstützung bei Problemen aller Art

Frau Christine Knerr für ihre Unterstützung bei der Zellkultur und für unterhaltsame Stunden an der sterilen Werkbank

Frau Ingrid Romani, Frau Ingrid Hemm und Frau Jutta Schermer für die Erledigung der Post und Verwaltungsarbeiten

Herrn Rainer Scheuermann, Herrn Aribert Vetter und Herrn Wolfgang Petry für die gesamte apparative Hilfe während der Promotion

Herrn Cato, A. ; Karlsruhe für das zur Verfügung gestellte Plasmids pSG5AR; der Firma Schering, Berlin für die Substanz Hydroxyflutamid und der Firma BASF AG, Ludwigshafen für den Vinclozolin Metaboliten 2

Herrn Dr. Schäfer und Mitarbeitern, Klinikum Kaiserslautern, für das zur Verfügung gestellte Immulite-Meßgerät, die Proben tubes und den Waschpuffer, für die sehr nette Einführung und stetige Hilfsbereitschaft beim Durchführen der Messungen

Besonders danken möchte ich vor allem meinen Eltern, meiner Schwester und Patrick, ohne deren Aufmunterung und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **Lebenslauf**

### ***Persönliche Angaben:***

Name: Guth, Sabine Ellen  
Adresse: Bärenbrunnermühle  
66996 Schindhard  
Geburtsdatum: 22.12.1972  
Geburtsort: Bad Dürkheim  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### ***Schulbildung***

1979-1983 Grundschule Dahn  
1983-1992 Gymnasium mit Abitur in Dahn

### ***Hochschulbildung***

10/1992 – 03/1997 Studium der Lebensmittelchemie,  
Universität Kaiserslautern  
05/ 1997 – 11/ 1997 Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

### ***Promotion***

01/1998 – 7/ 2000 Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie  
im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand  
Thema: Etablierung von in vitro Testsystemen zur  
Erfassung androgener/antiandrogener Wirkungen und  
rechnergestützte Identifizierung hormonell relevanter  
Strukturelemente