Etablierung von *In-vitro*-Methoden zur Bestimmung des endokrinen Potentials von Fremdstoffen

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

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Sonja Böhm

Betreuer: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2002

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18. September 2002

Prüfungskommission:

Vorsitzender	Prof. Dr. Himbert
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Eisenbrand
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Dr. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Mai 1998 und November 2001 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.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN 3

2.1 Estrogenrezeptorliganden 3
2.1.1 Synthetische Estrogene 4
2.1.2 Phyto- und Mykoestrogene 6
2.1.3 Antiestrogene und selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren 8

2.2 Androgenrezeptorliganden 9
2.2.1 Synthetische Androgene 11
2.2.2 Antiandrogene 11
2.2.3 Phytoantiandrogene 14
2.2.4 Anabolika 15

2.3 Progesteronrezeptorliganden 16
2.3.1 Synthetische Gestagene 16
2.3.2 Antiprogestine und Progesteronrezeptor-Modulatoren 17

2.4 Glucocorticoidrezeptorliganden 18
2.4.1 Synthetische Glucocorticoide 19
2.4.2 Antiglucocorticoide 20

2.5 Signaltransduktion durch Hormone 20
2.5.1 Steroidhormonrezeptoren 20
2.5.2 Rezeptor-assoziierte Proteine (RAP) 25
2.5.3 Transkriptions-Intermediärfaktoren (TIF) 26
2.5.4 Lokalisation in der Zelle 27
2.5.5 Steroidhormonrezeptor-kontrollierte regulatorische DNA-Sequenzen 29
2.5.5.1 Hormone Responsive Elements (HRE) 29
2.5.5.2 Hormonabhängige Promotoren 30
2.5.6 Mechanismus der Transkriptionsaktivierung 39
2.5.7 Antihormonelle Wirkung 41
2.5.8 Cross-talk mit anderen Signaltransduktionswegen 42

2.6 Testsysteme zur Erfassung hormoneller Aktivität 44
2.6.1 *In-vivo*-Testsysteme 45
2.6.2 *In-vitro*-Testsysteme 46
2.6.3 Auswertverfahren 47

2.7 Zelllinien 48
2.7.1 COS-7 48
2.7.2 LNCaP 49
2.7.3 MCF-7 49
2.7.4 MCF-7-Luciferase (MVLN-C15) 50
2.7.5 T-47D 50
2.7.6 T-47D-Luciferase 50
2.7.7 *Saccharomyces cerevisiae* PKGhAR 50
2.7.8 *Saccharomyces cerevisiae* hER 51

3 PROBLEMSTELLUNG 52

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 54

4.1 Endogene Reportergenassays 54
4.1.1 Bestimmung des endogenen Reporters TRPM-2 mittels kompetitiver RT-PCR 54
4.1.1.1 Konstruktion eines internen exogenen Standards zur Quantifizierung des endogenen Reportergens TRPM-2 57
4.1.1.2 Etablierung und Validierung eines endogenen TRPM-2-Reportergenassays zur Bestimmung von androgenem/antiandrogenem Potential in T-47D-Zellen 61
4.1.1.3 Untersuchungen des androgenen/antiandrogenen Potentials ausgewählter Verbindungen mittels endogenen TRPM-2-Reportergenassays in T-47D-Zellen 69
4.1.1.4 Etablierung und Validierung eines endogenen TRPM-2-Reportergenassays zur Bestimmung von estrogenem/antiestrogenem Potential in MCF-7-Zellen 74
4.1.1.5 Untersuchungen des estrogenen/antiestrogenen Potentials ausgewählter Verbindungen mittels endogenen TRPM-2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen 81
4.1.2 Bestimmung des endogenen Reporters pS2 mittels kompetitiver RT-PCR 86
4.1.2.1 Etablierung und Validierung eines endogenen pS2-Reportergenassays zur Bestimmung von estrogenem/antiestrogenem Potential in MCF-7-Zellen 86
4.1.2.2 Untersuchungen des estrogenen/antiestrogenen Potentials ausgewählter Verbindungen mittels endogenen pS2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen 93
4.1.3 Weiterführende Validierung des PSA-Assays 95
4.1.4 Zusammenfassung: endogene Reportergenassays 102

4.2 Transgene Reportergenassays in Säugerzellen 109
4.2.1 Transienter Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen zur Identifizierung von androgenem/antiandrogenem Potential 111
4.2.2 Stabil transfizierter Transaktivierungsassay in T-47D-Zellen zur Identifizierung von antiandrogenem Potential 114
4.2.3 Stabil transfizierter Transaktivierungsassay in MCF-7-Zellen zur Identifizierung von estrogenem/antiestrogenem Potential 115

4.3 Untersuchungen ausgewählter Verbindungen auf androgene/antiandrogene Aktivität in den etablierten Testsystemen (T-47D-Luc-, COS-AR-Luc- und PSA-Assay) 117
4.3.1 Benzophenon-Analoga 120
4.3.1.1 Benzophenonimin 120
4.3.1.2 p,p`-Dimethylbenzophenon 123
4.3.1.3 Selectophor® 126
4.3.1.4 Ketoprofen 129
4.3.2 Pharmaka: Imipramin und Ketoconazol 133
4.3.2.1 Imipramin 133
4.3.2.2 Ketoconazol 136
4.3.3 Phytoandrogen/-antiandrogen aus *Stevia rebaudiana* 140
4.3.3.1 Steviosid 140
4.3.3.2 Steviol 143
4.3.4 Steroidale Androgenrezeptorliganden 146
4.3.4.1 19-Nortestosteron 146
4.3.4.2 N-(2-Chlorethyl)-N-nitroso-carbamoyl-L-alanyl-17-nortestosteron (CNC-ala-NT, E173) 148
4.3.5 Zusammenfassung der Untersuchungen ausgewählter Verbindungen auf androgene/antiandrogene Aktivität 150

4.4 *In-vitro*-Untersuchungen zur Kombinationswirkung ausgewählter Phyto- und Xenoestrogene in einem estrogensensitiven Luciferase-Reportergensystem 159
4.4.1 Zusammenfassung der *In-vitro*-Untersuchungen zur Kombinationswirkung ausgewählter Verbindungen im MCF-7-Luc-Assay 168

4.5 Transgene Hefe-Assays 169
4.5.1 Etablierung und Validierung des Hefe-Assays mit humanem AR 169
4.5.2 Untersuchungen ausgewählter Verbindungen auf androgenes/antiandrogenes Potential im Hefe-Assay mit hAR 174
4.5.3 Etablierung und Validierung des Hefe-Assays mit humanem ER 176
4.5.4 Untersuchungen ausgewählter Verbindungen auf estrogenes/antiestrogenes Potential im Hefe-Assay mit hER 180
4.5.5 Zusammenfassung: transgene Hefe-Assays 187

5 ZUSAMMENFASSUNG 193

6 MATERIAL UND METHODEN 195

6.1 Zellkultur 195

6.2 Transformation prokaryontischer Zellen 198

6.2.1 Bakterienkultur ... 199
6.2.2 Herstellung von transformationskompetenten E.coli-Zellen ... 200
6.2.3 Transformation von kompetenten Zellen ... 200

6.3 Isolierung von Plasmiden ... 201
6.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA ... 201
6.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA ... 202
6.3.3 Restriktionsverdau der präparierten Plasmide und elektrophoretische Auftrennung ... 203
6.3.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren ... 204

6.4 Transfektion eukaryontischer COS-7-Zellen mittels Elektroporation ... 205

6.5 Transgene Reportergenassays in Säugerzellen ... 207
6.5.1 Luciferase-Assay ... 207
6.5.2 β-Galactosidase-Messung ... 209

6.6 PSA-Assay ... 209

6.7 Wachstumstest (modifizierter Sulforhodamin-B-Assay) ... 211

6.8 RT-PCR ... 212
6.8.1 Isolierung der Gesamt-RNA ... 213
6.8.2 DNase-Verdau ... 214
6.8.3 Durchführung der RT-PCR ... 214
6.8.4 RNase-Verdau ... 218

6.9 Konstruktion eines Vektors als interner exogener Standard für TRPM-2 ... 218
6.9.1 Isolierung von Plasmiden ... 219
6.9.2 Restriktionsverdau ... 219
6.9.3 PCR/RT-PCR ... 219
6.9.4 Aufreinigung von DNA mittels Ethanolfällung ... 221
6.9.5 Ligation von DNA ... 222

6.10 Transgener Reportergenassay in Hefen ... 222
6.10.1 Hefekultur ... 223
6.10.2 Yeast-Screen-Assay ... 224

6.11 Glucosidaseverdau ... 226

7 LITERATUR ... 227

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACTH	Adrenocoticotropes Hormon
AF	Activation Function
AG	Aminoglycosid-Phosphotransferase
AP	Activation Protein
APO-J	Apolipoprotein J
AR	Androgenrezeptor
ARA	AR-Association Protein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BTA	basaler Transkriptionsapparat
C	Cytosin
CBP	CREB Binding Protein
CDFKS	Charcoal Dextran FKS
cDNA	komplementäre DNA
Cdx	Caudal-related Homeobox Protein
CLE	Clusterin Element
CLI	Complement Lysis Inhibitor
CNBP	Cellular Nucleic Acid Binding Protein
CoA	Coenzym A
CPA	Cyproteronacetat
CPRG	Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid
CREB	cAMP Responsive Element Binding Protein
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
CYP	Cytochrom P450
DBD	DNA-bindende Domäne
DDE	p,p`-Dichlordiphenyldichlorethen
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Diethylstilbestrol
DHEA	Dehydroepiandrosteron

DHT	5α-Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E_2	17β-Estradiol
EC_{50}	effektive Konzentration 50 %
E.coli	Escherichia coli
EDSTAC	Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen Responsive Element
FKS	fötales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FXR	Farnesoid X-activated Receptor
G	Guanin oder auch Gravitationskonstante
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
gp	Glycoprotein
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid Responsive Element
HBD	hormonbindende Domäne
hAR	humaner Androgenrezeptor
hER	humaner Estrogenrezeptor
HRE	Hormone Responsive Element
HSE	Heat-Shock-Element
Hsp	Heat-Shock-Protein
IC_{50}	inhibierende Konzentration 50 %
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LB	Luria Bertani
LBD	ligandbindende Domäne

LH	Luteinisierendes Hormon
LTR	Long Terminal Repeat
Luc	Luciferase
LXR	Liver X Receptor
MAP	Mitogen-activated Protein
MCS	Multiple Cloning Site
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MR	Mineralcorticoidrezeptor
mRNA	messenger RNA
N-CoR	Nuclear Receptor Co-Repressor
NES	Nuclear Export Signal
NF	Nuclear Factor
NLS	Nuclear Localization Signal
NSS	Nucleocytoplasmic Shuttling Signal
OTF	Octamer Transcription Factor
PBS	Phosphat Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGC-1	PPAR Gamma Coactivator-1
PGK	Phosphoglyceratkinase
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Receptor
p,p`-DClBP	p,p`-Dichlorbenzophenon
p,p`-DMBP	p,p`-Dimethylbenzophenon
PR	Progesteronrezeptor
PRM	Progesteronrezeptor-Modulator
PSA	Prostate-specific Antigen
RAP	Receptor-associated Protein
RAR	Retinolsäurerezeptor
RE	Responsive Element
RIA	Radio-Immuno-Assay
RID	Receptor Interaction Domain
RIP	Receptor Interaction Protein
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoid X Receptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERM	selektiver Estrogenrezeptor-Modulator
SGP	sulfatiertes Glycoprotein
SHBG	Steroid Hormone Binding Globulin
SMRT	Silencing Mediator for RXR and TR
SRC	Steroid Receptor Coactivator
SRE	Steroid Receptor Element
SV-40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAF	Transkriptions-Aktivierungsfaktor
TAFII30	TATA-Binding Protein Association Factor II30
TE	Tris/EDTA
TFF	Trefoil Factor
TIF	Transcription Intermediary Factor
TCA	Trichloressigsäure
TGF	Transforming Growth Factor
tk	Thymidinkinase
TR	Thyroidhormonrezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TRPM-2	Testosterone-repressed Prostate Message-2
UAS	Upstream Activation Sequenz
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin D Receptor
Vit A2	Vitellogenin A2

1 EINLEITUNG

Im Zuge der industriellen Entwicklung der letzten fünfzig Jahre wurden Substanzen anthropogenen Ursprungs in die Umwelt eingebracht, deren hormonähnliches Wirkpotential mit möglichen adversen Effekten auf Menschen und Tierwelt diskutiert wird. Zu diesen Xenobiotika zählen neben Insektiziden und Pflanzenschutzmitteln auch phenolische Industriechemikalien, die als Tenside oder bei der Synthese von Kunststoffen Anwendung finden. Äußerst heterogen in ihrer chemischen Struktur, können sie häufig aufgrund hoher Lipophilie und langer Halbwertszeiten im Körperfettgewebe akkumulieren und so eine erhöhte Konzentration sowie Bioverfügbarkeit aufweisen. (Bolt und Degen, 2000; Colborn et al., 1993)

Endokrine Aktivität von Umweltchemikalien geriet ins Interesse von Wissenschaft und Öffentlichkeit, nachdem Störungen des Reproduktionstraktes und der Embryonalentwicklung an Wildtierpopulationen xenobiotisch belasteter Lebensräume detektiert wurden. Diese äußerten sich in Form von Veränderungen primärer Geschlechtsorgane, Verschiebungen des Geschlechtergleichgewichtes und einer Beeinträchtigung der Fertilität. (Colborn and Clement, 1992; Colborn et al., 1993; Miljøproject, 1995; Toppari et al., 1996)

Inwieweit hormonähnliche Wirkungen von Umweltchemikalien, aber auch die von natürlichen Pflanzeninhaltsstoffen in der Lage sind, in die humane Embryonalentwicklung und hormonelle Homöostase Erwachsener einzugreifen, wird intensiv diskutiert. Der gegenwärtige Kenntnisstand erlaubt noch keine abschließende Bewertung.

Bis 1985 gibt es Hinweise für eine Zunahme von Anomalien des männlichen Genitaltraktes, die sich in Kryptorchismus (Hodenhochstand; Paulozzi, 1999) und Hypospadien (offenen Harnleitern; John Radcliffe Hospital Study Group, 1986) äußern. Trotz starker demographischer Schwankungen scheint die Rate von Hypospadien seither unverändert, während in jüngster Zeit sogar von einem leichten Rückgang der Fälle von Kryptorchismus berichtet wurde. (Garcia-Rodriguez et al., 1996; Safe, 2000)

Diskussionen zu Veränderungen der männlichen Fertilität in den letzten Jahrzehnten bleiben strittig. Während einige Studien keine Abnahme der Spermienzahl bzw. sogar einen Anstieg der Spermiendichte detektieren konnten (Fisch et al., 1996; Suominen and Vierula, 1993), berichten andere Autoren von einem Rückgang (Carlsen et al., 1992; Irvine et al., 1996; Swan et al., 2000; Toppari et al., 1996). Ergebnisse verschiedener Studien bestätigen große demographische Variationen von Spermienzahlen innerhalb von Ländern und Regionen.
Unumstritten ist eine gestiegene Hodenkrebsinzidenz bei Männern im Alter von 20 bis 45 Jahren. Trendraten stimmen mit denen von Kryptorchismus, der für Hodenkrebs einen signifikanten Risikofaktor darstellt, überein. (Bergstrom et al., 1996; Toppari et al., 1996)
Für Frauen wird eine erhöhte Brustkrebsinzidenz durch Xenoestrogene diskutiert. (Ardies and Dees, 1998)

Der größte Einfluss endokriner Disruptoren wird in der sensiblen Phase der Embryonalentwicklung von Organen, zentralem Nervensystem und in bestimmten neonatalen und pubertären Phasen angenommen, in denen Steroidhormone an feinregulierten Modulationen beteiligt sind. Effekte dieser Einflüsse können sich möglicherweise in Form von Reproduktionsstörungen viel später manifestieren. (Ardies and Dees, 1998; Danzo, 1998; Ferguson et al., 2000)
Endokrine Effekte von Verbindungen und deren Wirkungen auf das Reproduktionsvermögen werden mit deren Fähigkeit begründet, endogene Hormone zu imitieren, Effekte endogener Hormone zu antagonisieren, Synthese und Metabolismus endogener Hormone zu unterbrechen sowie Synthese und Metabolismus der Hormonrezeptoren zu stören (Sonnenschein and Soto, 1998). Um mechanistische Untersuchungen durchführen, unterschiedliche Wirkqualitäten erfassen und mögliche funktionelle Strukturelemente charakterisieren zu können, ist die Etablierung eines entsprechend breiten Spektrums von *In-vitro*-Testsystemen zur Detektion agonistischer/antagonistischer Effekte am Hormonrezeptor notwendig.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Die allgemeine Definition endokriner Disruptoren der „Organization for Economic Cooperation and Development“ (OECD) lautet:

Endokrine Disruptoren sind Fremdstoffe mit schädlicher Wirkung auf die Gesundheit in einem unversehrten Organismus oder seiner Nachkommenschaft, die auf Änderungen von endokrinen Funktionen zurückgeführt werden können. (OECD, 1996)

Die Komplexität des Hormonsystems bietet vielfältige Angriffspunkte für endokrine Disruptoren. Dazu zählen Agonisten und Antagonisten der entsprechenden Hormonrezeptoren sowie Substanzen, die in Synthese- oder Abbauwege von Hormonen bzw. deren Rezeptoren eingreifen.

Der ursprüngliche Schwerpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen lag bei estrogenaktiven Verbindungen. In den folgenden Jahren wurden Substanzen identifiziert, die Wirkungen von Androgenen antagonisieren können. Ein kurzer Überblick soll den derzeitigen Kenntnisstand wiedergeben.

2.1 Estrogenrezeptorliganden

Endogene Estrogene sind Steroidhormone mit achtzehn C-Atomen. Sie werden in Ovar und Plazenta, in geringerer Menge in Nebennierenrinde und Leydigschen Zwischenzellen des Hodens aus dem 17-Ketostendion Androstendion gebildet. Neben dem wichtigsten und potentesten Vertreter **17β-Estradiol** (E_2) weisen Estron (E_1) und Estriol (E_3) schwächere estrogene Wirksamkeit auf ($E_2 : E_1 : E_3 = 10 : 5 : 1$).

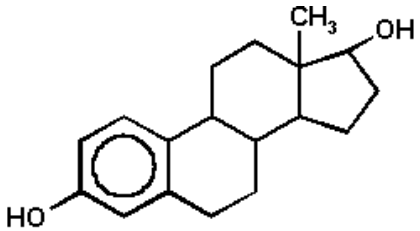
Über das Enzym Aromatase kann Testosteron in Estradiol umgewandelt werden. Die ovarielle Estrogenbiosynthese wird über einen Rückkopplungsmechanismus durch Gonadotropin reguliert.

Estrogene sind für die Ausprägung weiblicher Geschlechtsmerkmale von Bedeutung. 17β-Estradiol fördert die Proliferation der Uterusschleimhaut, verstärkt die Kontraktionen der Muskulatur im Uterus und führt in der Vagina zur Verdickung der Schleimhaut und vermehrten Abstoßung glycogenhaltiger Epithelzellen. Glycogen spielt bei der Senkung des pH-Wertes in der Scheide durch Milchsäure produzierende Bakterien eine wesentliche Rolle.

Estrogen verändert die Konsistenz des Zervixschleims, wodurch am Ovulationstermin die Wanderung der Spermien gefördert und deren Überlebenszeit erhöht wird. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Eies durch den Eileiter und die Vorbereitung der Spermien auf das Durchdringen der Eihülle wird ebenso durch 17β-Estradiol reguliert.

Zusammen mit Gestagenen wie z. B. Progesteron kontrollieren Estrogene nahezu alle Vorgänge der Reproduktion bei der Frau. Zu den zahlreichen sexualunspezifischen Wirkungen von Estrogenen zählen die Förderung der Calzifizierung und Reifung von Knochen sowie eine estrogenbedingte Wasserretention.

Der Estrogentransport im Blut erfolgt gebunden an „Steroid Hormon Binding Globulin“ (SHBG) oder Albumin. Die metabolische Inaktivierung von Estrogenen findet in der Leber statt. Hauptabbauprodukt ist Estriol. Nach Glucuronidierung und Sulfatierung werden die Metabolite über Galle und Harn ausgeschieden. (Forth et al., 1996; Silbernagel, Despopoulos, A.1991; Voet, Voet, 1994)



17β-Estradiol (E_2)

Abbildung 1: Struktur des endogenen Estrogens 17β-Estradiol (E_2)

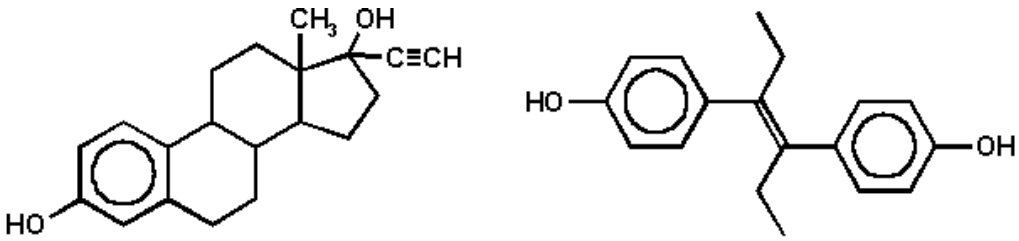
2.1.1 Synthetische Estrogene

Von einer Reihe chemisch heterogener Substanzen anthropogenen Ursprungs ist bekannt, dass sie an die gleichen Rezeptoren binden und entsprechende Wirkungen aufweisen wie endogene Estrogene.

Klinisch etablierte Verbindungen

Das strukturell vom 17β-Estradiol abgeleitete synthetische Kontrazeptivum **Ethinylestradiol** wurde in umweltrelevanten Konzentrationen in Abwässern und Kläranlagenabläufen detektiert. (Tabak et al., 1981; Stumpf et al., 1996)

Diethylstilbestrol (DES), 1945 bis 1971 in den USA zur Abortprophylaxe zugelassen, später als postkoitales Kontrazeptivum eingesetzt, zählt zu den potentesten nichtsteroidalen Estrogenen mit nachgewiesener Toxizität. Bei männlichen und vor allem weiblichen Nachfahren behandelter Mütter kam es zu Missbildungen und Karzinomen im Genitalbereich. (Forth et al., 1996; Sharpe and Skakkebœk, 1993)



Ethinylestradiol Diethylstilbestrol (DES)

Abbildung 2: Klinisch etablierte Estrogenrezeptorliganden

Umweltrelevante Industriechemikalien

Weitere Quellen anthropogener Verbindungen mit estrogenem Wirkpotential sind Detergentien, Kunststoffmonomere und -additive sowie Pflanzenschutzmittel.

Alkylphenole wie **Octylphenol** und **Nonylphenol** werden in der Kunststoffindustrie als Antioxydantien eingesetzt und entstehen durch Hydrolyse nichtionischer, oberflächenaktiver Verbindungen, der Alkylphenolethoxylate. Arbeiten von Soto et al. zeigen, dass Alkylphenole für estrogene Wirkungen in Abwässern zumindest mitverantwortlich sind. (Nimrod und Benson, 1996; Soto et al., 1991)

Bisphenol A findet als Antioxydans für Weichmacher, als Fungizid und Zwischenprodukt bei der Herstellung von Gerb- und Farbstoffen Verwendung. Bei der Produktion von Polycarbonaten, Epoxy- und Phenolharzen, Polyestern und Polyacrylaten werden jährlich weltweit 700 000 t Bisphenol A eingesetzt. Die thermisch und mechanisch sehr stabilen Epoxyharze finden als Innenbeschichtung von Konservendosen bis zu Zahnfüllmaterialien breite Anwendung. (Olea et al., 1996; Pérez et al., 1998)

Phthalsäureester sind aufgrund ihres Einsatzes als Weichmacher ubiquitär verbreitet. Die Exposition über Lebensmittel wird für Dibutylphthalat (DBP) mit 50 bis 500 µg/kg beschrieben. Aufgrund ihrer estrogenen *In-vitro*-Aktivität sind DBP und Butylbenzylphthalat (BBP) hervorzuheben. Wine et al. zeigen für DBP eine Erhöhung

adverser reproduktions- und entwicklungstoxischer Effekte in zweiter Generation. Gray et al. beschreiben nicht auf antiandrogene Effekte zurückzuführende, inhibitorische Wirkungen von Phthalsäureestern auf die fötale Testosteronsynthese. (Harris et al., 1997; Gray et al., 2001; Jobling et al., 1995; Wine et al., 1997)

Als insektizide Pflanzenschutzmittel mit estrogenem Potential sind unter anderem **o,p`-DDT**, Endosulfan, Kepone, Methoxychlor und Toxaphen beschrieben. (Colborn et al., 1993; McLachlan, 2001; Sonnenschein et al., 1998)

Obwohl für einige dieser Substanzen, wie technisches DDT und Toxaphen, inzwischen Anwendungsverbote existieren, besitzen sie und ihre Metabolite, wie z. B. p,p`-DDE, aufgrund ihrer Persistenz toxikologische Relevanz bzw. sind hinsichtlich ihrer Rückstandssituation von Bedeutung. Für DDT werden beispielsweise Halbwertszeiten von bis zu zwanzig Jahren beschrieben. (Shah et al., 2001)

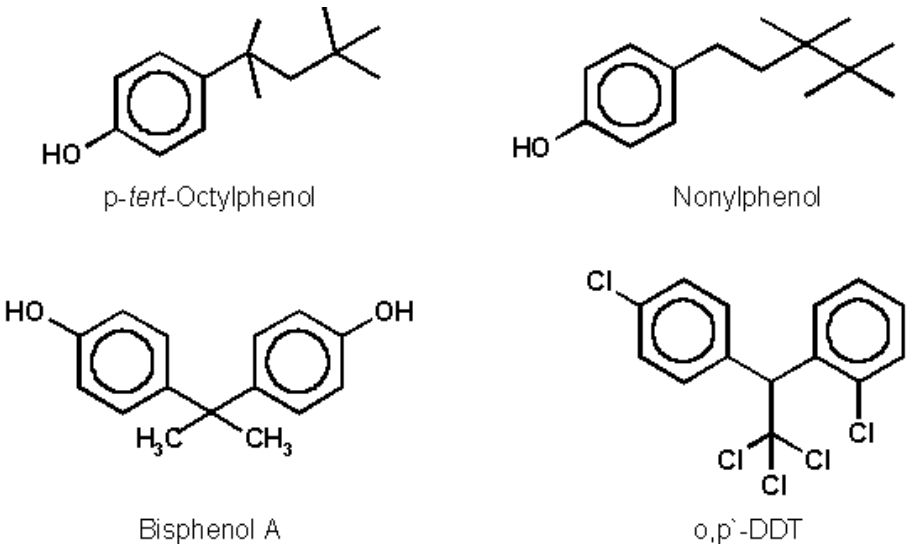


Abbildung 3: Strukturen anthropogener Verbindungen mit estrogenem Wirkpotential

2.1.2 Phyto- und Mykoestrogene

Seit Jahrhunderten werden in vielen Kulturen Pflanzen therapeutisch zur Erhöhung oder Verminderung der Fruchtbarkeit eingesetzt, ohne den Wirkmechanismus zu kennen. Aus der Tierhaltung sind estrogene Wirkungen bestimmter Kleearten beschrieben, die bis zur Unfruchtbarkeit führen können („clover-disease“). Inzwischen sind verschiedene natürliche Estrogenrezeptorliganden pflanzlichen Ursprungs bekannt, die eine mehr oder weniger ausgeprägte estrogene Wirkung entfalten. (Zimmerli und Schlatter, 1997)

Das Phytoalexin **Resveratrol** kommt in Weintrauben, Traubensaft und Wein sowie in Erdnüssen vor. Dem Estrogenrezeptoragonisten wird gesundheitsfördernde Wirkung und ein als „French Paradoxon“ bezeichnetes Phänomen zugeschrieben. Jüngere Untersuchungen beschreiben Resveratrol als gemischten Estrogenrezeptoragonisten/-antagonisten. (Ashby et al., 1999; Basley et al., 2000; Bowers et al., 2000; Kopp, 1998; Sobolev and Cole, 1999)

Ein partiell agonistisches/antagonistisches Verhalten am Estrogenrezeptor ist auch für die Isoflavonderivate **Genistein** und **Daidzein** beschrieben. (Bolt und Degen, 2000; Nikov et al., 2000; Verma et al., 1998)

Für Soja werden weitere Inhaltsstoffe als Phytoestrogene diskutiert. Die Strukturähnlichkeit einiger Phytosterole wie z. B. β-Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol mit Estradiol lässt estrogenes Potential vermuten, das bis jetzt jedoch nicht bestätigt werden konnte. Hingegen beim Coumestan Coumestrol ist estrogene Aktivität nachgewiesen. (Bolt und Degen, 2000; Baker et al., 1999)

Estrogene Aktivität von Hopfen wird vor allem dem 8-Prenylnaringenin zugeschrieben. In verschiedenen *In-vitro*-Assays konnte für 8-Prenylnaringenin höhere estrogene Aktivität detektiert werden als für die bekannten Phytoestrogene Coumestrol, Genistein und Daidzein. Sowohl Milligan et al. als auch Coldham und Sauer beobachteten im „Uterotrophen Assay“ in Mäusen nach oraler bzw. subcutaner Applikation von 8-Prenylnaringenin nur schwache estrogene Aktivität. (Coldham and Sauer, 2001; Milligan et al., 1999, Milligan et al., 2000; Milligan et al., 2002)

Estrogenes Potential ist für den ethanolischen Auszug von PC-SPES, einer kommerziell erhältlichen chinesischen Pflanzenzubereitung von acht Komponenten, beschrieben. Licochalcon A, ein Flavonoid der enthaltenen Süßholzwurzel, konnte *in vitro* als Phytoestrogen mit Antitumoraktivität identifiziert werden. (DiPaola, et al., 1998; Rafi et al., 2000)

Hohe Rezeptoraffinität und estrogenes Potential weist das von einigen Fusarienarten als Sekundärmetabolit produzierte Mykotoxin **Zearalenon** auf. (Paganetto et al., 2000; Zimmerli und Schlatter, 1997)

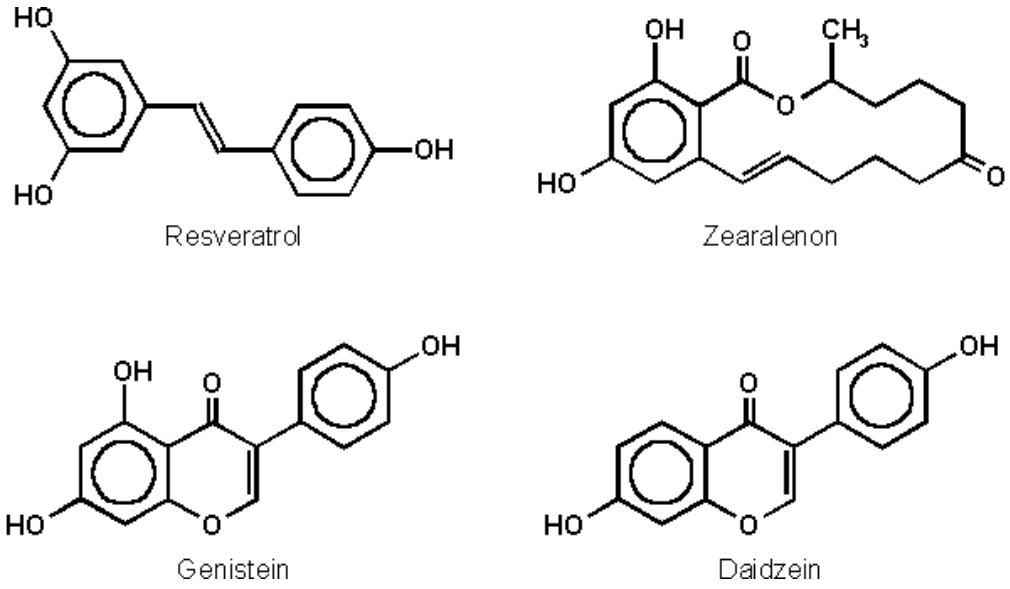


Abbildung 4: Strukturen von Estrogenrezeptorliganden natürlichen Ursprungs

2.1.3 Antiestrogene und selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren

Antiestrogene sind kompetitive Estrogenrezeptorantagonisten. **ICI 182 780** (Faslodex) ist ein Typ-II- oder „reines“ Antiestrogen ohne agonistische Eigenschaften. Es findet in Brustkrebstherapien beim Versagen von Tamoxifen-Behandlungen Anwendung. Als Derivat des Estradiols hat ICI 182 780 hohe Bindungsaffinität gegenüber dem Estrogenrezeptor. Durch die lange Seitenkette in 7α-Position des Liganden wird jedoch die Dimerisierung des Rezeptors verhindert. Zum anderen ist die Zerstörung des ER durch ICI 182 780 beschrieben. (Hedden et al., 1995; Rosenberg Zand et al., 2000)

Substanzen, die sich gewebespezifisch auf Funktionen des Estrogenrezeptors auswirken oder mit ihm interagieren, werden als „selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren“ (SERM) bezeichnet. Nichtsteroidale Antiestrogene vom Typ I wie z. B. **Tamoxifen** und Raloxifen besitzen je nach Gewebe auch partiell agonistische Eigenschaften.

Tamoxifen wird zur Brustkrebstherapie bei Frauen in der Menopause eingesetzt. Positiv wirkt sich der estrogene Effekt der Behandlung auf skelettäre Mineraldichte und cardiovasculäres System aus. Unerwünschte Nebenwirkung der estrogenen Wirkung ist ein möglicher Tumor des Endometriums.

Raloxifen, ein SERM zweiter Generation, antagonisiert die Wirkung von Estradiol in Brust- und Uterusgewebe, wirkt aber agonistisch auf skelettäre Mineraldichte und

cardiovasculäres System. Es scheint zur Prävention von Osteoporose und Gefäßerkrankungen geeignet, ohne das Risiko von Brust- und Endometriumkrebs zu erhöhen. Raloxifen weist somit den wesentlichen Nachteil von Tamoxifen nicht auf. (Hedden et al., 1995; Jordan, 1998; Whitaker, 2001)

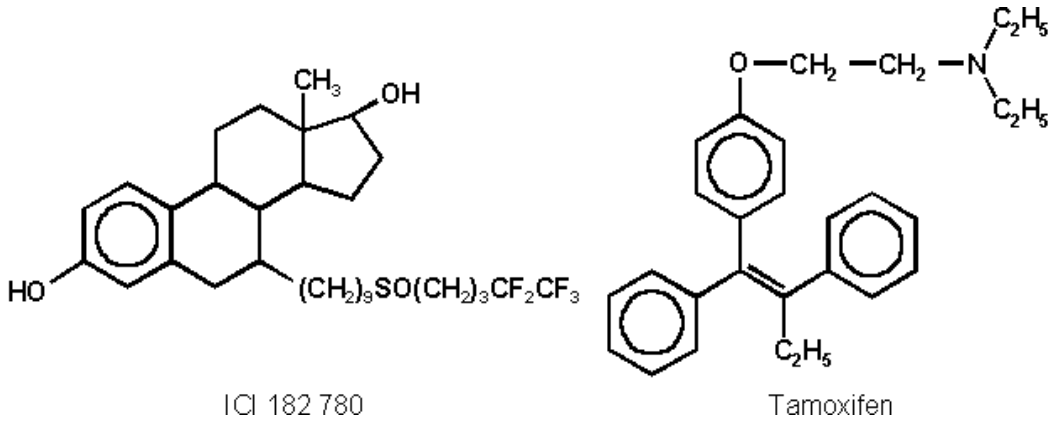


Abbildung 5: Strukturen steroidaler und nichtsteroidaler Antiestrogene

2.2 Androgenrezeptorliganden

Androgene, Steroide mit neunzehn C-Atomen, werden hauptsächlich in den Leydigschen Zwischenzellen des Hodens, daneben in Nebennieren und Ovar gebildet. Hauptvertreter ist **Testosteron**. Die Biosynthese verläuft wie bei Estrogenen und Progesteron über Squalen, Cholesterin und Pregnenolon. 5α-Reduktase reduziert Testosteron zu **5α-Dihydrotestosteron** (DHT), der biologischen Wirkform in den meisten Zielorganen. 17-Ketosteroide (DHEA u. a.) sind weniger potent.

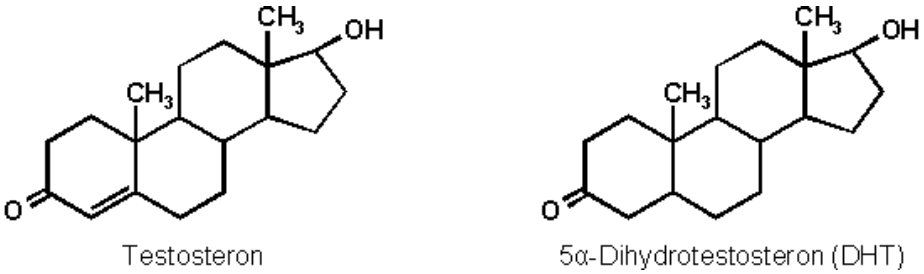


Abbildung 6: Strukturen männlicher Sexualhormone

Die Serumtestosteron-Konzentration beträgt bei Männern 10 bis 35 nmol/l. Testosteron ist im Blut zu 98 % an SHBG gebunden, bei Frauen zu 99 %. Sie produzieren etwa ein Zehntel der Testosteronmenge von Männern.

Die Androgensynthese wird durch die Hypophysenvorderlappenhormone „Luteinisierendes Hormon“ (LH) und „Folikelstimulierendes Hormon“ (FSH) reguliert. LH fördert die Testosteron-Ausschüttung aus den Leydigschen Zwischenzellen des Hodens, während FSH die Bildung des Androgenbindungsproteins in den Sertolischen Stützzellen des Hodens stimuliert. Das ihnen übergeordnete „Gonadotropin-releasing Hormon“ (GnRH) wird stoßweise ausgeschüttet und wie das LH über negative Rückkopplung durch Androgene reguliert.

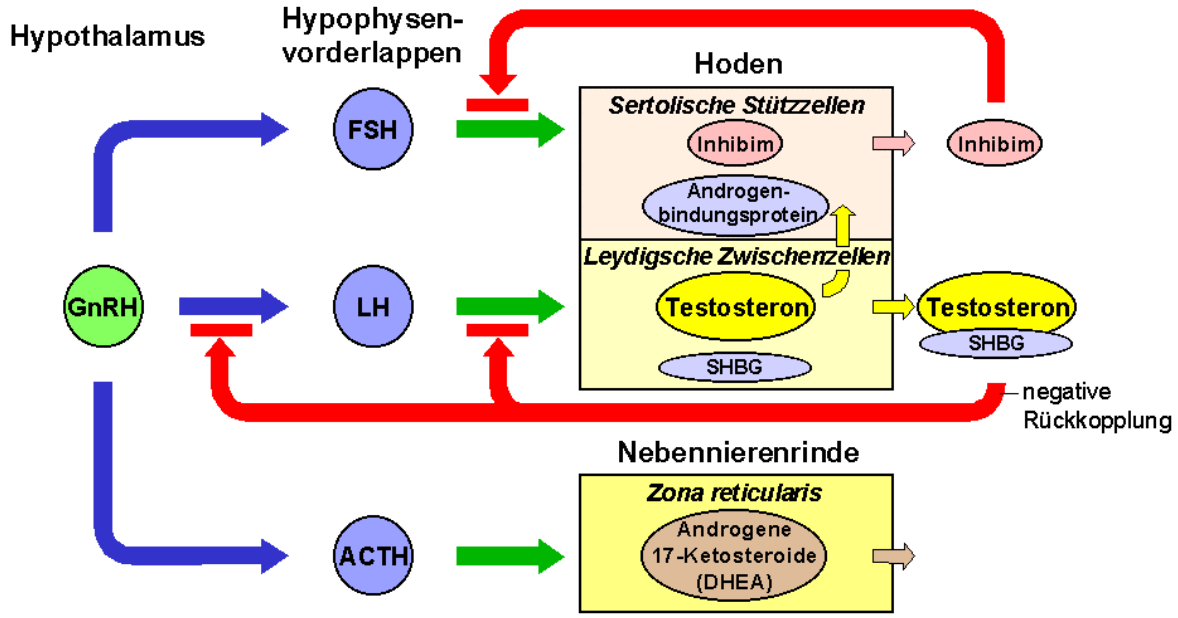


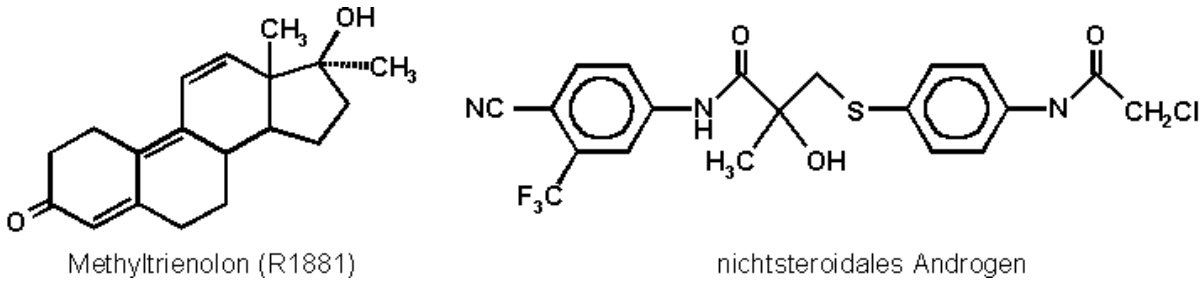
Abbildung 7: Regulation androgener Hormone beim Mann (modifiziert nach Silbernagel, Despopoulos, 1991)

Androgene bewirken die männliche Geschlechtsdifferenzierung und Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale. Sie steuern die Funktion der Geschlechtsdrüsen, die Reifung von Samenzellen und den Geschlechtstrieb beim Mann. Sexualunspezifisch sind Wirkungen auf den Stoffwechsel (anabole Wirkung) sowie auf Beschaffenheit von Muskulatur, Haut und Funktionen der Talgdrüsen.

Der Abbau des Testosterons erfolgt vorwiegend in der Leber durch Oxydation am C-17-Atom zu Androstendion, Androsteron, Etiocholanolon und Etiocholandiol. Ein geringer Anteil des Testosterons und Androstendions wird zu 17ß-Estrogen aromatisiert. (Forth et al., 1996; Silbernagel, Despopoulos, 1991)

2.2.1 Synthetische Androgene

Zu den synthetischen steroidalen Androgenen gehören Miboleron, **Methyltrienolon** (R1881) und 17α-Methyltestosteron. Bei der Therapie mit C-17-alkylierten, oral wirksamen Androgenen treten verstärkt cholestatische Wirkungen und Störungen der Leberfunktion auf. (Forth, 1996; Poujol et al., 2000; Sperry and Thomas, 1999)
Dalton et al. beschreibt eine Gruppe synthetischer **nichtsteroidaler Androgene** für eine mögliche therapeutische Anwendung beim Mann in Form einer Hormonersatz-Therapie. Modifikationen des Antiandrogens R-Bicalutamide zeigten im Transaktivierungsassay erhöhte androgene Aktivität. (Dalton et al., 1998)



Methyltrienolon (R1881) nichtsteroidales Androgen

Abbildung 8: Strukturen synthetischer steroidaler und nichtsteroidaler Androgene

2.2.2 Antiandrogene

Antiandrogene inhibieren kompetitiv die biologische Wirkung physiologischer und synthetischer Androgene am Androgenrezeptor.

Klinisch etablierte Verbindungen

Bei Prostatakrebs ist die Rolle der Androgene nicht vollständig geklärt. Der Entzug von Androgenen durch Antiandrogen-Therapie hat sich bei Behandlungen bewährt. Ein synthetischer steroidaler partieller Agonist/Antagonist am Androgenrezeptor ist **Cyproteronacetat** (CPA), das ebenfalls mit Progesteron- und Glucocorticoidrezeptoren in Wechselwirkung steht.
R-Bicalutamid, ein Strukturanalogon des Flutamids, ist partieller Androgenrezeptoragonist/-antagonist. Der aktive Metabolit des Flutamids, **Hydroxyflutamid**, wurde lange als reiner Antagonist angenommen. Neuere Untersuchungen beschreiben in Anwesenheit des Androgenrezeptor-Coaktivators ARA70 ein schwaches androgenes Potential bei hohen Hydroxyflutamid-Konzentrationen (10^{-6} und 10^{-5} mol/l) und die Aktivierung von Androgenrezeptor-

Zielgenen wie PSA und MMTV-LTR. (Dalton et al., 1998; Poujol et al., 2000; Yeh et al., 1997)

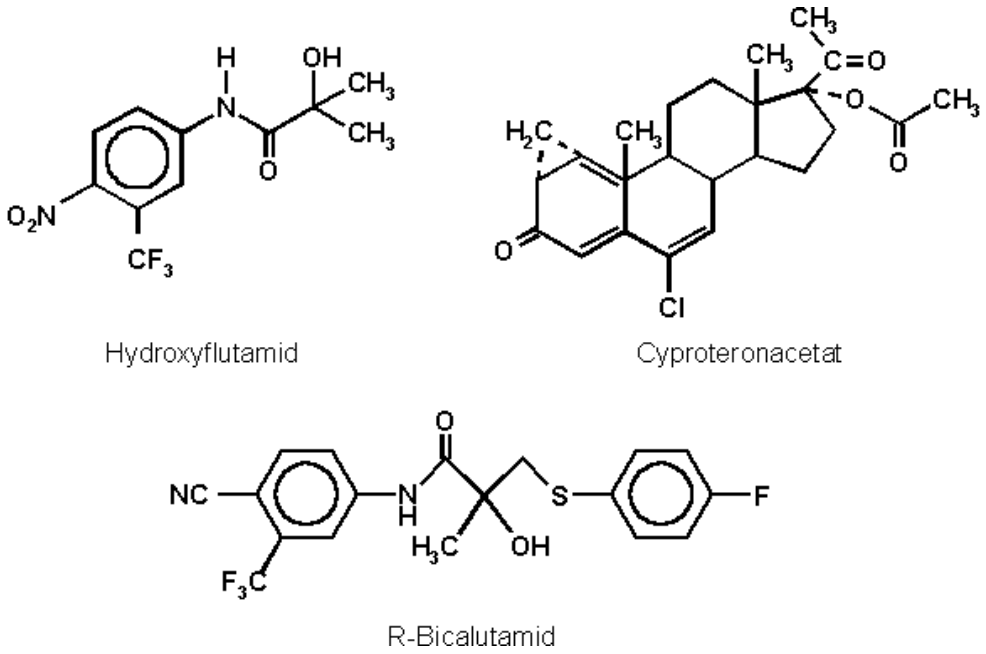


Abbildung 9: Strukturen klinisch etablierter Antiandrogene bzw. ihrer Metabolite

Umweltrelevante Industriechemikalien

Pflanzenschutzmittel und ihre Metabolite nehmen einen Großteil der Verbindungen mit antiandrogenem Potential ein.

Der Hauptmetabolit des Pestizids DDT im Warmblüter ist **p,p`-DDE**. Die lipophile Verbindung bioakkumuliert in der Umwelt, humanem Körperfettgewebe und wird beim Stillen auf den Säugling übertragen. Die Halbwertszeit in Körper und Umwelt beträgt über 65 Jahre. (Kelce and Wilson, 1997)

Unterschiedliche Studien beschreiben eine Inhibierung der DHT-induzierten Transkriptionsaktivierung durch p,p`-DDE. (Kelce et al., 1997; Kelce and Wilson, 1997)

Eine *In-utero*-Exposition mit p,p`-DDE (100 mg/kg KG/Tag; 14. bis 18. Trächtigkeitstag) ergab bei männlichen Nachkommen behandelter Ratten verringerte Anogenitalabstände und vermindertes Gewicht androgenabhängig wachsender Gewebe. Des Weiteren wurden Hypospadien induziert. (Gray et al., 2001)

Für das Fungizid **Vinclozolin** ist *in vivo* und *in vitro* die Konkurrenz mit dem Androgenrezeptor, Inhibierung der AR-DNA-Bindung und veränderte androgenabhängige Genexpression beschrieben. (Lambright, 2000)

Die männliche Fötalentwicklung ist für eine Vinclozolinexposition am sensitivsten. Hodenhochstand, Hypospadie und damit verbundene Unfruchtbarkeit bzw. reduzierte Spermienzahlen sind Symptome hoher Vinclozolinexposition (50 mg/kg KG/Tag). Weibchen erscheinen hingegen phenotypisch normal. Bei Gaben unter 12 mg/kg KG/Tag wurden verringerte Anogenitalabstände und reduziertes Prostatagewicht beobachtet. Bei erwachsenen männlichen Ratten scheinen selbst hohe Vinclozolin-Konzentrationen (100 mg/kg KG/Tag) über 25 Wochen keinen Effekt auf die Fertilität zu haben. (Gray et al., 2001; Kelce et al., 1998)

Die Vinclozolin-Metaboliten M1 und M2 besitzen Strukturähnlichkeit mit Hydroxyflutamid. Sie sind *in vivo* hauptsächlich für die beobachteten antiandrogenen Wirkungen verantwortlich. (Kelce et al., 1998)

Ebenfalls ein Strukturanalogon des Hydroxyflutamids entsteht bei der metabolischen Aktivierung von **Procymidon**. Das dem Vinclozolin ähnliche Dicarboximid-Fungizid zeigte *in vivo* bei etwas höheren Dosierungen (ab 50 mg/kg KG/Tag) Entwicklungsstörungen des männlichen Genitaltrakts, die mit denen nach Gaben von Vinclozolin vergleichbar sind. (Gray et al., 2001; Lambright, 2000)

Das Herbizid **Linuron** bindet *in vitro* an den Androgenrezeptor und inhibiert die DHT-induzierte Genexpression. Effekte antiandrogenen Potentials manifestieren sich bei Applikation während der Trächtigkeit. Beim Hershberger-Assay wird die Entwicklung androgenabhängig wachsender Gewebe wie Samenblase und Prostata durch 100 mg Linuron/kg KG/Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe kastrierter und ausschließlich mit Testosteron behandelter unreifer männlicher Ratten reduziert. Eine Multigenerationsstudie beschreibt bei Dosierungen von 40 mg Linuron/kg KG/Tag in der F1-Generation vermindertes Hodengewicht, verringerte Spermien- und Nachkommenzahl sowie die Ausbildung von Brustwarzen bei männlichen Ratten. (Gray et al., 1999; Gray et al., 2001; Lambright, 2000)

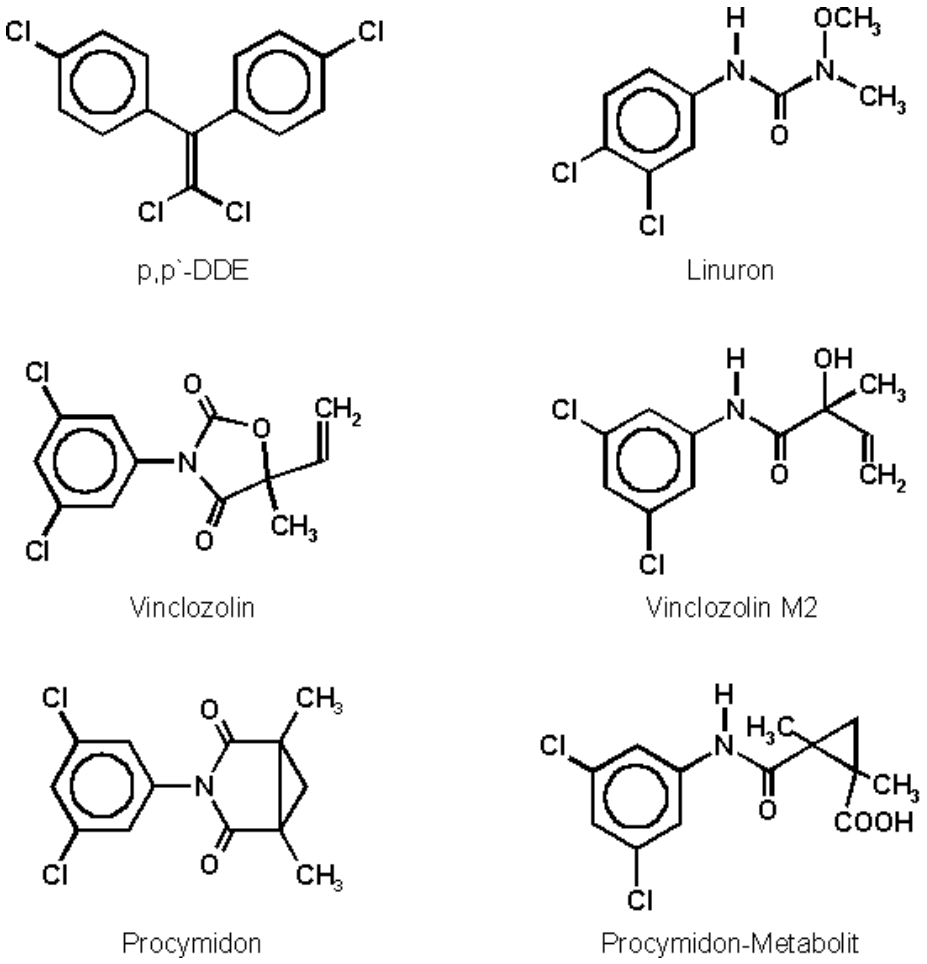


Abbildung 10: Strukturen bekannter Pflanzenschutzmittel bzw. ihrer Metabolite mit antiandrogenem Wirkpotential

2.2.3 Phytoantiandrogene

Über pflanzliche Androgenrezeptorliganden ist noch wenig bekannt.

Das aus Blättern der in Brasilien und Paraguay beheimateten *Stevia rebaudiana* gewonnene **Steviosid** besitzt die 300fache Süßkraft von Glucose und gilt als kalorienfreier Süßstoff. Die von Planas und Kuć beschriebene kontrazeptive Wirkung von ***Stevia-rebaudiana***-Extrakten wurde in den folgenden Jahren kontrovers diskutiert. Oliveira-Filho et al. zeigten *in vitro* die Verdrängung von DHT durch Steviosid am Androgenrezeptor. Auch neuere von Melis durchgeführte Untersuchungen an Ratten schließen verminderte Fertilität durch Stevia-Extrakte nicht aus. (Melis, 1999; Oliveira-Filho et al., 1989; Planas and Kuć, 1968; Yodyingyuad and Bunyawong, 1991)

Für Verbindungen der in Indonesien, im Iran und in Vietnam heimischen Leguminosenart ***Dalbergia cochinchinensis*** sind ebenfalls Interaktionen mit dem Androgenrezeptor beschrieben. Die Rezeptorliganden besitzen Benzophenon- bzw. Flavon-Grundstruktur. (Pathak et al. 1997)

Senkung des Serumspiegels von Testosteron und „Prostataspezifischem Antigen“ (PSA) sowie Proliferationshemmung von LNCaP-Zellen wurden nach Applikation eines ethanolischen Auszugs der chinesischen Pflanzenzubereitung PC-SPES beobachtet. Der Wirkmechanismus ist bis jetzt nicht vollständig verstanden, da auch Einzelverbindungen von PC-SPES noch nicht ausreichend identifiziert und charakterisiert sind. (DiPaola et al., 1998; Hsieh et al., 1997)

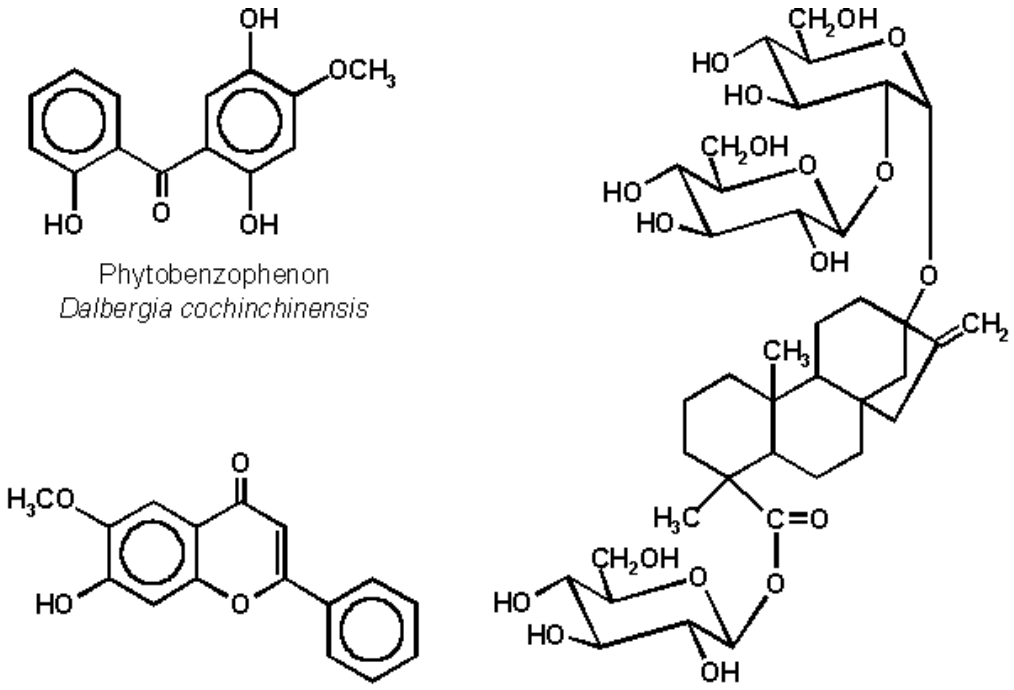


Abbildung 11: Strukturen isolierter Verbindungen aus *Dalbergia cochinchinensis* sowie des Steviosids aus *Stevia rebaudiana*

2.2.4 Anabolika

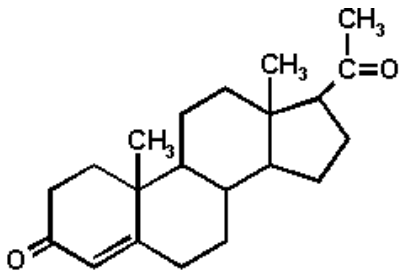
Eiweiß-anabole Hormone leiten sich von Androgenen ab. Wichtigste anabole Eigenschaft ist Positivierung der Stickstoffbilanz, die mit der Beschleunigung von Wachstumsprozessen einhergeht. **19-Nortestosteron** wird in der Human- und Veterinärmedizin als Anabolikum eingesetzt. Viele im Handel befindliche Anabolika sind vom 19-Nortestosteron abgeleitet. (Forth et al., 1996)

2.3 Progesteronrezeptorliganden

Progesteron, Steroidhormon mit einundzwanzig C-Atomen, ist das wichtigste gestagene Hormon. Bildungsorte sind Gelbkörper des Ovars, Plazenta und Nebennierenrinde. Die Biosynthese verläuft von Cholesterin über Pregnenolon zum Progesteron. Beim Mann ist es Intermediärprodukt der Testosteronsynthese.

Nahezu alle Gestageneffekte werden im Zusammenwirken mit Estrogen ausgelöst. Hauptaufgabe des Progesterons ist die Vorbereitung des Genitaltraktes der Frau zur Aufnahme und Reifung des befruchteten Eies sowie die Schwangerschaftserhaltung. Neben thermogenetischer Wirkung sind Hemmung der Gonadotropinsekretion und LH-Ausschüttung weitere Aufgaben der Gestagene. Antimineralcorticoid-ähnliche Wirkungen sind für Progesteron beschrieben. In hohen Dosen wirkt es katabol und anästhetisch. Progesteron ist im Serum an spezielle Transportproteine gebunden. Die Plasmakonzentration bei Frauen liegt zwischen 0,3 µg/l in der Proliferationsphase und 130 µg/l bei fortgeschrittener Schwangerschaft.

Der metabolische Abbau von Gestagenen in der Leber erfolgt stufenweise über die Reduktion der Doppelbindung beider Ketogruppen an C-3- und C-20-Position. Die Glucuronide bzw. Sulfatide der Pregnandiole werden vorwiegend renal eliminiert. (Silbernagel, Despopoulos, 1991; Voet, Voet, 1994)



Progesteron

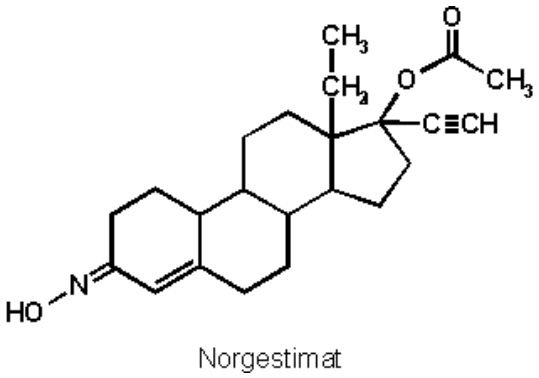
Abbildung 12: Struktur von Progesteron

2.3.1 Synthetische Gestagene

Synthetische Gestagene besitzen unterschiedliche Wirkspektren. Bei therapeutisch verwendeten Gestagenen handelt es sich um Derivate des Hydroxyprogesterons oder Derivate des Testosterons bzw. 19-Nortestosterons wie z. B. **Norgestimat**.

Zur Behandlung von Schwangerschaftsstörungen eignen sich Hydroxyprogesteron-Derivate wie das Hydroxyprogesteroncapronat. Nahezu alle 19-Nortestosteron-

Derivate und Gestagene mit antiandrogener Partialwirkung sind in der Schwangerschaftserhaltung kontrainduzierend. Bei Gestagenen hormoneller Kontrazeptiva sollte die Ovulationshemmung stark ausgeprägt sein. (Forth et al., 1996; Voet, Voet, 1994)



Norgestimat

Abbildung 13: Struktur des synthetischen Progestins Norgestimat

2.3.2 Antiprogestine und Progesteronrezeptor-Modulatoren

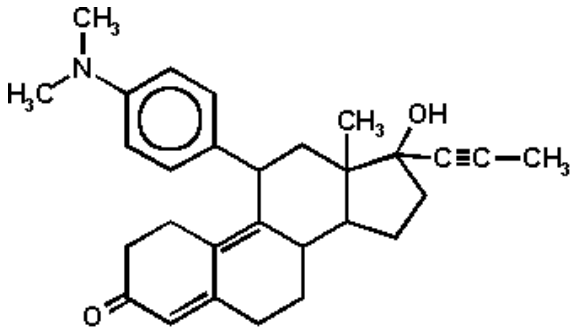
Als Antigestagene werden Steroidhormone bezeichnet, die Wirkungen des Progesterons kompetitiv hemmen. Onapristone und ZK 230 211 (Schering) sind Beispiele reiner Progesteronantagonisten. In jüngster Zeit wurde der Begriff „Progesteronrezeptor-Modulator“ (PRM) für die Kategorie gemischt agonistischer/antagonistischer Mittel eingeführt. Sie werden als neue Kategorie hormoneller Mittel zur Behandlung von Brustkrebs diskutiert. (Klijn et al., 2000; Spitz and Chwalisz, 2000)

Klinisch etablierte Verbindungen

Mifepriston (RU 486) ist ein PRM mit nur unwesentlich agonistischer Aktivität. Die Gabe von Mifepriston in Kombination mit dem Prostaglandin Misoprostol führt bei 92 bis 95 % der frühen Schwangerschaften (≤ 49 Tage) zum Abbruch.

Neben zusätzlicher Wirkung als Antiglucocorticoid schreiben Spitz und Coelingh Bennink Mifepriston physiologische Aufgaben bei der Weitung des Gebärmutterhalses, Verzögerung der Ovulation, Verlangsamung endometrialer Transformationen und unter bestimmten Umständen antiproliferative (antiestrogene) Effekte zu. Als potentielle Indikationen für PRMs zeichnen sich daher Endometriosen, Mammakarzinome und Meningiome sowie Cervixdilatationen zur

Geburtseinleitung ab. (DeHart and Morehead, 2001; Forth et al., 1996; Klijn et al., 2000; Spitz and Chwalisz, 2000; Spitz and Coelingh Bennink, 2000)



Mifepriston (RU 486)

Abbildung 14: Struktur des klinisch etablierten Antiprogestins Mifepriston (RU 486)

2.4 Glucocorticoidrezeptorliganden

Stoffe mit mineralcorticoider oder glucocorticoider Wirkung sind Derivate des Pregnans, bestehend aus einundzwanzig C-Atomen. Bildungsort ist die Nebennierenrinde. Physiologisch wichtige Glucocorticoide sind Cortisol, Corticosteron und Cortison.

Glucocorticoidrezeptoren befinden sich in Skelett-, Herz- und glatter Muskulatur, Gehirn, Magen, Niere, Leber und Lunge sowie in Lymph- und Fettgewebe. Wirkungen der Glucocorticosteroide sind vielfältig. Sie fördern die Gluconeogenese, wirken katabol. Sie wirken sich auf ZNS, cardiovasculäres System sowie Wasser- und Elektrolythaushalt aus. Glucocorticoide haben antiinflammatorisches und immunsuppressives Potential, können die Zunahme von Erythrozyten und Hämoglobin-Konzentration bewirken sowie Wachstum und Zellteilung beeinflussen.

Synthese und Sekretion der Glucocorticoide werden durch das „Adrenocorticotrope Hormon“ Corticotropin (ACTH), reguliert. Die ACTH-Ausschüttung unterliegt der Regulation des hypothalamischen „Corticotropin-releasing Hormons“ (CRH). Die CRH-Sekretion wird von übergeordneten Zentren durch Neurotransmitter reguliert. Es besteht ein negativer Rückkopplungsmechanismus, d. h., Glucocorticoide können an allen übergeordneten Zentren inhibierend wirken. In Stresssituationen nehmen die Frequenz und Höhe der zirkadianen Sekretionsspitzen von ACTH und Corticoiden zu. Der verzögerte Rückkopplungsmechanismus wird überspielt.

Bei Gesunden schwankt die Cortisol-Konzentration im Blut zwischen 138 und 690 nmol/l. Der Transport von Glucocorticosteroiden erfolgt zu über 90 % proteingebunden, davon 75 % an Transcortin, dem „Cortisol Binding Protein“ (CBP), 15 % an Albumin.

Die Inaktivierung der Glucocorticoide erfolgt vorwiegend in der Leber. Cortisolmetaboliten werden zu mehr als 99 % als Glucuronide renal ausgeschieden. (Forth et al., 1996; Silbernagel, Despopoulos, 1991; Voet, Voet, 1994)

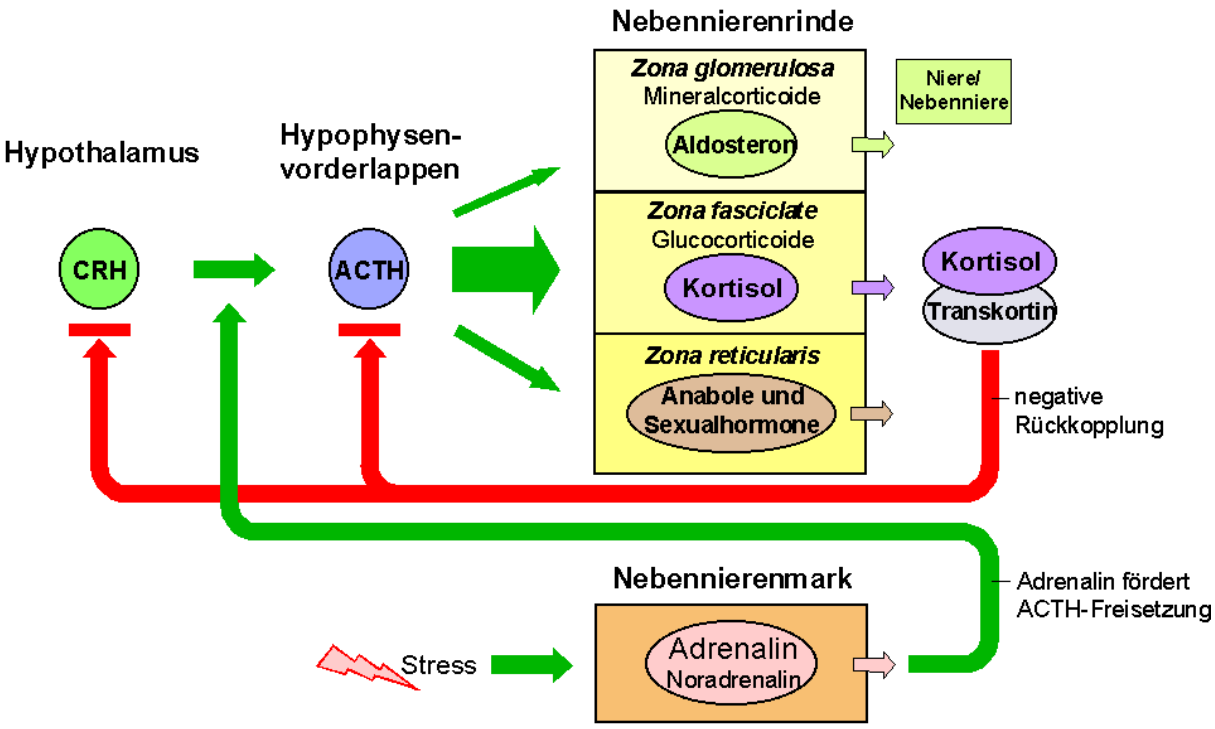
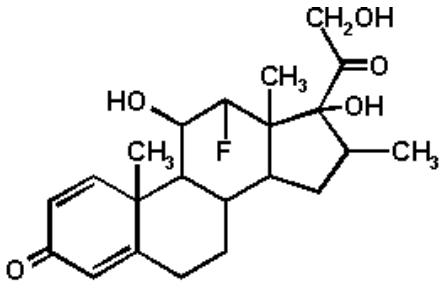


Abbildung 15: Regulierung der Glucocorticoidfreisetzung (modifiziert nach Silbernagel, Despopoulos, 1991)

2.4.1 Synthetische Glucocorticoide

Die meisten synthetischen Glucocorticoide, wie **Dexamethason**, sind von Prednisolon abgeleitet. Durch Einführung einer Hydroxyl- oder Methylgruppe an C-16 bzw. einer Methylgruppe oder eines Fluoratoms in Position 6a und 9a wurde die Glucocorticoidwirkung gesteigert. Durch wesentlich längere Halbwertszeiten synthetischer Glucocorticoide (Cortisol ca. 90 Minuten) kann die größere biologische Wirksamkeit erklärt werden. Mit Ausnahme von Prednisolon binden sie kaum an CBG, sondern zu 60 % unspezifisch an Albumin. (Forth et al., 1996; Silbernagel, Despopoulos, 1991; Voet, Voet, 1994)



Dexamethason

Abbildung 16: Struktur des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason

2.4.2 Antiglucocorticoide

Das Antiprogestin Mifepriston (RU 486) ist ein steroidaler Antagonist, der mit hoher Affinität an den Glucocorticoidrezeptor bindet. Mifepriston antagonisiert agonistisches Potential von physiologischem Cortisol sowie von synthetischem Dexamethason. Frühere Arbeiten diskutieren Mifepriston als Typ-II-Antagonist am Glucocorticoidrezeptor. RU 43044 wurde als Typ-I-Antagonist eingestuft. Belikov et al. konnten hingegen keine Unterschiede im Chromatinmuster detektieren, lediglich dass RU 486 GR-GRE-Bindungen induziert, RU 43044 nicht. (Belikov et al., 2001; Pariante et al., 2001; Wiedemann et al., 1992)

2.5 Signaltransduktion durch Hormone

2.5.1 Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren gehören der Familie der Kernrezeptoren an, die als Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Spezies, Vertebraten und Invertebraten, fungieren.

Zur Kernrezeptorfamilie gehören neben den Steroidhormonrezeptoren (Estrogen-, Progesteron-, Androgen-, Glucocorticoid- und Mineralcorticoidrezeptor) auch Thyroidhormon-, Vitamin-D_3- und Retinolsäurerezeptoren. Sie weisen Ähnlichkeiten in der Organisation von Funktionsbereichen und einer hoch konservierten Aminosäuresequenz der „DNA-bindenden Domäne“ (DBD) auf. Die enge Verwandtschaft von Aminosäuresequenz und Organisation funktioneller Domänen lässt vermuten, dass viele Aspekte des Wirkmechanismus erhalten sind.

Inklusive der so genannten „Orphan“-Rezeptoren, deren Liganden noch nicht identifiziert sind, wurden anhand von DNA-Analysen der DBD über 60 Rezeptoren der Kernrezeptorfamilie zugeordnet. Einige der einstigen Orphan-Rezeptoren wurden inzwischen als Rezeptoren für Fettsäuren und Arachidonsäuremetabolite („Peroxisome Proliferator-activated Receptor“, PPAR), Oxysterole („Liver X Receptor“, LXR) sowie Farnesol und Farnesolmetabolite („Farnisoid X-activated Receptor“, FXR) identifiziert. (Beato, 1989; White and Parker, 1998; Yamashita, 2001)

Steroidhormonrezeptoren übernehmen als ligandinduzierte Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle der endokrinen Signaltransduktion.

Von Estrogen- und Glucocorticoidrezeptoren sind die Isoformen α und β beschrieben. GR β weist einen verkürzten C-Terminus auf und besitzt keine Glucocorticoid-Bindungsaffinität. Von Progesteron- und Androgenrezeptoren sind die Isoformen A und B bekannt. Die B-Form hat eine N-terminale Verlängerung und scheint vom selben Gen transkribiert zu werden.

Eine Auswahl verschiedener Liganden bindet spezifisch an mit Begleitproteinen assoziierte Steroidhormonrezeptoren. Nach Abdissoziieren der Begleitproteine erkennt der Ligand-Rezeptor-Komplex spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte „Hormone Responsive Elements“ (HRE). Es bilden sich Transkriptionskomplexe, die in Abhängigkeit von Zielgen und -gewebe die Genexpression induzieren oder hemmen. Auf diese Weise nehmen sie Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und Homoöstase.

Kernrezeptoren sind ebenfalls in der Lage, die Transkription von Genen ohne HREs zu regulieren, indem sie über Protein-Protein-Interaktionen andere sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren, wie „Activation Protein-1“ (AP-1) und „Nuclear Factor-κB“ (NF-κB), modulieren.

Zum anderen können Steroidhormonantworten mittels Cross-talk von Steroidhormonrezeptoren mit Signaltransduktionswegen extrazellulärer Signale, wie Membranrezeptoren und Aktivierung von Protein-Kinase-Kaskaden, in die Aktivierung von Kerntranskriptionsfaktoren intrazellulärer Signalnetzwerke integriert sein. (Beato and Klug, 2000; White and Parker, 1998; Yamashita, 2001)

Aufbau von Steroidhormonrezeptoren

Mitglieder der Kernrezeptorfamilie haben eine strukturell ähnliche Organisation. Steroidhormonrezeptoren sind aus sechs Protein-Elementen, den Regionen A bis F, zusammengesetzt, die funktionelle Domänen beherbergen.

Sequenzen von Region C, der DNA-bindenden Domäne, und Region E, der hormon- bzw. ligandbindenden Domäne, sind hochgradig konserviert. Weniger signifikant konservierte Sequenzen sind für die Regionen A/B, D und F beschrieben.

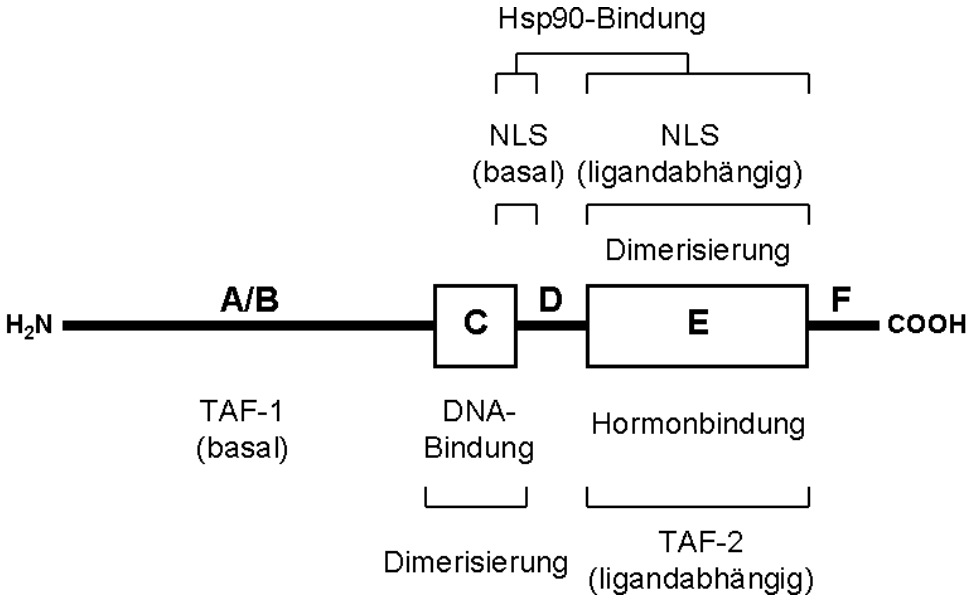


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines Steroidhormonrezeptors (modifiziert nach Gronemeyer, 1992)

Die aminoterminale Region A/B zeigt sehr große Vielfalt in der Aminosäuresequenz und spielt bei der Aktivierung der Transkription eine Rolle. Region D wird als flexible Linker-Region zwischen DNA- und ligandbindender Domäne betrachtet. Der äußerste NH_2-Terminus ist integraler Teil der DNA-bindenden Domäne und in die Dimerisierung der DBD involviert. Zusätzlich wird er für den ligandabhängigen Import des Rezeptors in den Kern verantwortlich gemacht. Region F ist für die Hormonbindung einiger Rezeptoren wie PR, GR und AR (aber nicht ERα) essentiell. Sie scheint bei der Diskriminierung zwischen agonistischen und antagonistischen Hormonliganden wichtig zu sein. (Beato and Klug, 2000; Gronemeyer, 1992; Prins, 2000; Yamashita, 2001)

Die DBD enthält zwei Zinkfingermodelle, die spezifisch an HREs der Zielgene binden. Als Enhancer fungierende HREs zeichnen sich durch

Pentanucleotidpalindrome aus. Sie werden von Homodimeren der Steroidhormonrezeptoren gebunden. (Beato and Klug, 2000; Yamashita, 2001)

Hormonbindende Domäne (HBD, Region E)

Die hormonbindende Domäne umfasst etwa 210 Aminosäuren und ist am carboxyterminalen Ende der Steroidhormonrezeptoren lokalisiert. Vollständigkeit der Domäne und Ausbildung hydrophober Taschen sind für die Ligandbindung unerlässlich. Des Weiteren ist die Region an Funktionen wie Dimerisierung, Phosphorylierung, Kerntranslokation und ligandabhängige Transkriptionsaktivierung beteiligt. Sie enthält die Bindungsstelle für das Heat-Shock-Protein Hsp90, das mit dem freien Rezeptor assoziiert, für die Faltung des Proteins verantwortlich ist und damit die Ligandbindung ermöglicht. (Buchner, 1999; Forman and Samuels, 1990; Green and Chambon, 1988; Prins, 2000; Wahli and Martinez, 1991)

DNA-bindende Domäne (DBD, Region C)

Die hoch konservierte Domäne C enthält etwa 70 Aminosäuren, die zu zwei Zinkfinger-Bindungsmotiven (CI und CII) gefaltet sind. Jeweils ein Zinkion wird von vier konservierten, tetraedrisch koordinierten Cysteinen gebunden.

Der aminoterminale Finger enthält vier Cysteine und mehrere hydrophobe Aminosäuren. Die helikale Struktur der P-Box (Aminosäuren an der Basis von CI) ist an der sequenzspezifischen Erkennung der HREs beteiligt.

Der carboxyterminale Finger besteht aus fünf Cysteinen und mehreren basischen Aminosäuren. Wechselwirkungen mit dem DNA-Phosphat-Rückgrat stabilisieren die Rezeptor-DNA-Bindung. Die D-Box erkennt Abstände der HRE-Halbpalindrome und ist über Protein-Protein-Wechselwirkungen an der Rezeptordimerisierung beteiligt. (Prins, 2000; Tsai and O`Malley, 1994; Wahli and Martinez, 1991)

Rezeptor	P-Box
ER	Cys Glu Gly Cys Lys Ala
GR, PR, AR	Cys Gly Ser Cys Lys Val

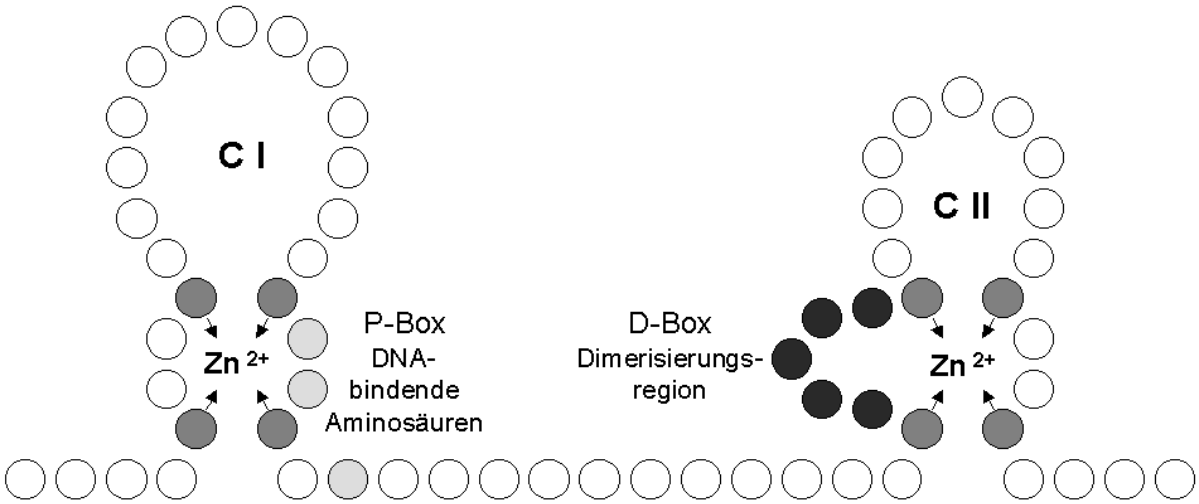


Abbildung 18: Struktur der DNA-bindenden Domäne von Steroidhormonrezeptoren (modifiziert nach Rhodes und Klug, 1993; Tsai and O`Malley, 1994)

Transaktivierungsdomäne (Region A/B)

Region A/B liegt am aminoterminalen Ende der Steroidhormonrezeptoren, ist wenig konserviert und in der Länge variabel. Sie enthält die ligandunabhängige Transaktivierungsfunktion „Activation Function-1“ (AF-1), die synergistisch mit der ligandinduzierbaren Aktivierungsfunktion der HBD „Activation Function-2“ (AF-2) agiert und den Rezeptor über direkte Interaktionen mit basalen Transkriptionsfaktoren, sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren und/oder transkriptionalen Coaktivatoren mit dem Transkriptionsapparat verbindet. Die Rolle der Transaktivierungsfunktion variiert in Abhängigkeit von Rezeptor, Promotor des Zielgens und angesprochenem Zelltyp. Zudem wird angenommen, dass sie eine wichtige Rolle im Cross-talk mit anderen Signaltransduktionswegen spielt. (Beato and Klug, 2000; Green and Chambon, 1988; Wahli and Martinez, 1991; Yamashita, 2001)

2.5.2 Rezeptor-assoziierte Proteine (RAP)

Steroidhormone liegen vor der Ligandbindung als große oligomere Komplexe, bestehend aus Rezeptormolekül und verschiedenen Rezeptor-assoziierten Proteinen („Receptor-associated Proteins“, RAP) vor. Das Heat-Shock-Protein Hsp90 wurde als erstes RAP identifiziert. Inzwischen sind weitere Begleitproteine wie z. B. Hsp70, Hop (p60), Hsp56 (p59, p56), p54, p50, Hip (p48), Hsp40, Cyp-40 und p23 dieser Komplexe bekannt.
Die hoch konservierte Gruppe der Heat-Shock-Proteine wird unter physiologischen Temperaturen kontinuierlich im Cytoplasma vieler Spezies (Eubakterien, Hefen und Mehrzellern) exprimiert. Durch Stressfaktoren wie Alkohol, giftige Metabolite und Toxine in Verbindung mit Temperaturerhöhung wird die Hsp-Expression bis um das Zehnfache erhöht. Hsps besitzen ATPase-Aktivität und übernehmen bei Stabilisierung und Faltung von Proteinen eine wichtige Rolle. (Buchner, 1999; Ylikomi et al., 1998)

Das Chaperon Hsp90 ist mit ~1 % (in Abwesenheit von Stress) das häufigste der löslichen cytosolischen Proteine in Eukaryonten. Das native Protein ist ein elongiertes Dimer, das über die carboxyterminale Region des Proteins verbunden ist. Die Assoziation der hormonbindenden Domäne des Steroidhormonrezeptors mit Hsp90 initiiert eine Konformationsänderung am Rezeptor, befähigt ihn damit zur Ligandbindung und schützt vor proteolytischen Enzymen.
Neben der Interaktion mit Steroidhormonrezeptoren ist Hsp90 an der Faltung weiterer Proteine, Transkriptionsfaktoren und Kinasen beteiligt. (Buchner, 1999; Ylikomi et al., 1998)

Ein weiteres hoch konserviertes Chaperon ist Hsp70. Es wurde gezeigt, dass Hsp70 mit seinen Cofaktoren Hsp40 und Hip als Erstes den inaktiven Steroidhormonrezeptor bindet und sich erst im Anschluss Hsp90 und Hop, das als Verbindungsfaktor für Hsp90 und Hsp70 fungiert, dem Komplex anfügen.
Neben diesen Rezeptorinteraktionen wird Hsp70 auch eine Rolle im Metabolismus von Proteinen zugeschrieben. (Buchner, 1999; Ylikomi et al., 1998)

Der ligandfreie Steroidhormonrezeptor-Komplex von Säugern enthält das Heat-Shock-responsive Protein Hsp56. Das Chaperon hat Prolylisomerasefunktion. Es gehört den Immunophilinen an, die immunosuppressive Agenzien binden.
In der oligomeren Form von ER, GR und PR wurde das Chaperon Cyp-40 identifiziert. Ebenfalls eine Prolylisomerase, weist Cyp-40 Übereinstimmungen mit Hsp56 auf und kann mit Hsp56 um die Bindung am Hsp90 konkurrieren.
Der oligomere PR bindet ein weiteres Chaperon mit Prolylisomeraseaktivität p54 und einen kinasespezifischen Cofaktor p50. (Buchner, 1999; Ylikomi et al., 1998)

Das Chaperon p23 ist hochgradig sauer und ohne Homologien zu anderen bekannten Proteinen. Es besitzt Phosphorylierungsstellen und ist in Analogie zu Hsp70 und Hop mit Hsp90 assoziiert. (Buchner, 1999; Ylikomi et al., 1998)

2.5.3 Transkriptions-Intermediärfaktoren (TIF)

Für die Gentranskription von Steroidhormonrezeptoren spielen neben dem basalen Transkriptionsapparat Transkriptions-Intermediärfaktoren („Transcription Intermediary Factors“, TIF), Coaktivatoren und Corepressoren, eine wichtige Rolle. Sie kontrollieren die rezeptorvermittelte Transkriptionsaktivierung durch Aktivierung oder Hemmung.
Eine konservierte carboxyterminale Helix der HBD, als AF-2 bezeichnet, ist für die ligandabhängige Genaktivierung erforderlich. Für einige Coaktivatoren wird die Stimulation der Gentranskription durch allosterische Änderung der helikalen Domäne von AF-2 angenommen. Inzwischen sind auch Interaktion und Stimulation der AF-1 durch Cofaktoren beschrieben.
Rezeptor-Interaktions-Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe besteht aus zwei Familien, die transkriptionsstimulierend erscheinen. Aufgrund des Proteingewichts von 160 kDa, Homologien der Rezeptor-Interaktions-Domäne („Receptor Interaction Domain“, RID) und ähnlicher funktioneller Domänen sind einige dieser Proteine zur SRC/p160-Familie (SRC = „Steroid Receptor Coactivator“) zusammengefasst. Die Rezeptor-Interaktions-Domäne dieser Proteine ist hoch konserviert und enthält drei sich wiederholende Motive der Sequenz LXXLL (L = Leucin, X = Aminosäure), die zur DNA-Bindung des ligandgebundenen Rezeptors notwendig ist.

Die zweite Familie der ersten Gruppe enthält „CREB Binding Protein“ (CBP) und p300, die ursprünglich als Coaktivatoren für „cAMP Responsive Element Binding Protein“, den Transkriptionsfaktor für Proteinkinase A, identifiziert und später als Coaktivatoren weiterer Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden. Möglicherweise spielen sie in vielen Signaltransduktionswegen eine zentrale Rolle.

Die zweite Gruppe enthält eine Anzahl unverwandter Proteine, die ebenfalls mit der HBD interagieren, deren Rolle in der Rezeptorfunktion jedoch noch weitestgehend ungeklärt ist. Diese Gruppe enthält Proteine wie das „Receptor Interaction Protein 140“ (RIP140), den „Transcription Intermediary Factor 1“ (TIF1), das „AR Association Protein 70“ (ARA70), den „TATA-Binding Protein Association Factor II30“ (TAFII30) und den „PPAR gamma Coactivator-1“ (PGC-1).

RIP140 stimuliert die rezeptorvermittelte Transkription in Hefen und enthält eine funktionelle Aktivierungsdomäne in Säugerzellen. Für TIF1 wurde die Interaktion mit Heterochromatin-assoziierten Proteinen gezeigt, während ARA70 als transkriptionsstimulierend für den AR beschrieben ist.

Alle Proteine enthalten eine von mehreren Kopien der Sequenz LXXLL. Ein kompatibles Motiv existiert in der AF-2 von Kernrezeptoren. Daher ist es denkbar, dass das Motiv LXXLL einen kritischen Modus für die Koordination vollständiger Rezeptor/Coaktivator-Komplexe bereitstellt.

Weitere Proteine interagieren mit anderen Regionen der HBD. „Nuclear Receptor Co-Repressor“ (N-CoR) und „Silencing Mediator for RXR and TR“ (SMRT) sind Beispiele verwandter Proteine, die in Abwesenheit des Liganden für RXR und AR als Repressor fungieren. Des Weiteren wurde ihre Bindung an ER und PR in Anwesenheit eines Antagonisten beschrieben. (Heery et al., 1997; Lamb et al., 2001; Torchia et al., 1997; Torchia et al., 1998; White and Parker, 1998; Yeh et al., 1999; Yeh et al., 2000; Ylikomi et al., 1998)

2.5.4 Lokalisation in der Zelle

Die Lokalisation verschiedener Steroidhormonrezeptoren ist nicht einheitlich. Estrogenrezeptoren liegen ausnahmslos im Zellkern vor. Unabhängig von der Ligandbindung sind Progesteronrezeptoren ebenfalls hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. In Abwesenheit des Hormons sind sie lose an Kernstrukturen assoziiert,

die sich durch Ligandbindung verstärken. (Guiochin-Mantel et al., 1989; Liu et al., 1999; Pratt et al., 1989; Yamashita, 2001)

Die subzellulare Verteilung des freien Androgenrezeptors wird *in vivo* und *in vitro* kontrovers diskutiert. Die *In-vivo*-Lokalisation scheint heterogen vom Zelltyp abhängig zu sein. Für transient transfizierte Kulturzellen wird der freie überexprimierte AR von cytosolisch bis hauptsächlich nuklear beschrieben. In Anwesenheit eines Liganden transloziert der Rezeptor in den Zellkern. (Jenster et al., 1991; Kemppainen et al., 1992; Yamashita, 2001)

Die Lokalisation des freien Glucocorticoidrezeptors variiert in Abhängigkeit des Zelltyps. Von Translokationen nach Ligandbindung wurde ebenso berichtet wie vom ausschließlichen Aufenthalt des GR im Zellkern und von der vom hormonellen Status unabhängige Verteilung in Plasma und Kern. (Cadepond et al., 1992; Pratt et al., 1989; Yamashita, 2001)

Für den Mineralcorticoidrezeptor wurde nukleare und cytoplasmatische Lokalisation beschrieben, während Vitamin-D_3- und Thyroidhormonrezeptor ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. (Yamashita, 2001)

Um ihre Funktion als ligandinduzierte Transkriptionsfaktoren ausüben zu können, müssen Steroidhormonrezeptoren die Kernmembran passieren. Für passive Diffusion durch Kernporen dürfen Proteine ein Molekulargewicht von 60 kDa nicht überschreiten. Größere Proteine benötigen spezifische Transportsignale für einen aktiven Transport in den Kern. Für die Passage der Kernmembran wurden drei Signale identifiziert: das „Nuclear Localization Signal“ (NLS) für den Kernimport, das „Nuclear Export Signal“ (NES) für den Export ins Cytoplasma und das „Nucleocytoplasmic Shuttling Signal“ (NSS), enthalten in Proteinen, die den Kernexport von mRNA kontrollieren.

Steroidhormone besitzen zwei funktionell unterschiedliche Kern-Lokalisationssignale. Ein ligandunabhängiges NLS, bestehend aus einer Gruppe basischer Aminosäuren, ist auf der DNA-bindenden Domäne lokalisiert. Das ligandabhängige NLS auf der ligandbindenden Domäne zeigt unabhängig vom hormonellen Status hohe Importaktivität für ER und PR.

Das ligandunabhängige NLS des GR scheint in Abwesenheit von Liganden durch die LBD maskiert, wodurch die Kerntranslokation unterdrückt wird. Hormonbindung bewirkt mit der Konformationsänderung des GR die Freilegung beider NLSs sowie

eine schnelle Kerntranslokation. Für den freien AR wird die Maskierung des ligandunabhängigen NLS durch A/B-Region und LBD angenommen.

Der Mechanismus des Kernexports ist nicht eindeutig geklärt. Für PR wird NLS ebenfalls als Exportsignal postuliert. Die Behandlung mit „Transforming Growth Factor β1“ (TGFβ1) bewirkt in einigen Zelltypen die Umverteilung des gebundenen Rezeptors vom Kern ins Cytoplasma. Für die Translokation des GR sind Zellzykluseinflüsse beschrieben.

Kontrollmechanismen und Raten des nuklearen Im- und Exports sind nicht vollständig geklärt. Mehrere Faktoren scheinen Im- und Exportrate zu beeinflussen. Z. B. besitzen Steroidhormonrezeptoren unterschiedliche Affinitäten gegenüber Bindungspartnern in Cytoplasma und Kern. Konzentration und Art der Transportproteine, die am Kernimport und -export beteiligt sind, variieren in Abhängigkeit des Zelltyps. Neuere Studien beschreiben den Cotransport einiger ligandfreier Kernrezeptorkomplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass post-transkriptionale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung/Dephosphorylierung am Steroidhormonrezeptor durch Konformationsänderungen die Maskierung oder Demaskierung von NLSs bewirken. (Cadepond et al., 1992; Jenster et al., 1993; Picard and Yamamoto, 1987; Yamashita, 2001)

2.5.5 Steroidhormonrezeptor-kontrollierte regulatorische DNA-Sequenzen

2.5.5.1 Hormone Responsive Elements (HRE)

Als „Hormone Responsive Elements“ werden Nucleotidsequenzen bezeichnet, an die Steroidhormonrezeptoren mittels DNA-bindender Domäne binden. Sie sind meist innerhalb der Promotoren für hormonell kontrollierte Zielgene lokalisiert und als palindromische Wiederholungen angeordnet, die durch drei nicht-konservierte Basenpaare getrennt sind.

HREs können in zwei Klassen eingeteilt werden. Klasse-I-Kernrezeptoren binden DNA als Homodimer. Das erstmals als „Glucocorticoid Responsive Element“ (GRE) beschriebene HRE wird auch von Androgen-, Progesteron- und Mineralcorticoidrezeptoren gebunden. Seine „Consensus“-Sequenz setzt sich aus

den Pentanucleotidhälften TGTYC zusammen. Y steht für eine Pyrimidinbase, Cytosin (C) oder Thymin (T). Das „Estrogen Responsive Element“ (ERE) enthält die Halbpalindrome TGRCC, wobei R für eine Purinbase, Adenin (A) oder Guanin (G), steht.

Klasse-II-Kernrezeptoren wie z. B. RAR, RXR, VDR, TR und PPAR binden ihre Responsive Elements als Heterodimer mit RXR. (Beato, 1991; Beato and Klug, 2000; Klinge, 2001)

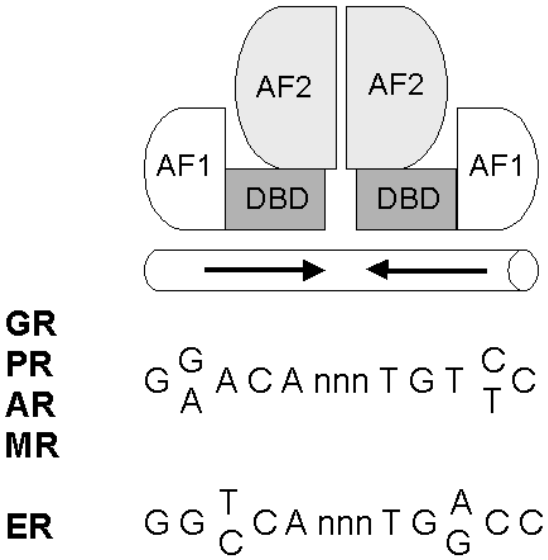


Abbildung 19: Schematische Darstellung der DNA-Bindung an Responsive Elements der Steroidhormonrezeptoren (modifiziert nach Beato and Klug, 2000; White and Parker, 1998)

2.5.5.2 Hormonabhängige Promotoren

Genregulation in Eukaryonten erfolgt durch die Kombination vieler regulatorischer Proteine und Transkriptionsfaktoren, die miteinander interagieren und auf komplexe Ansammlungen *cis*-regulatorischer Elemente in Promotor- und Enhancer- bzw. Silencer-Regionen einwirken. Es gibt Anhaltspunkte, dass die Chromatinstruktur direkt an diesem Prozess beteiligt ist, indem sie Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zur Verfügung stellt. (Truss et al., 1995)

Mouse-Mammary-Tumor-Virus-(MMTV)-Promotor

Der „Mouse Mammary Tumor Virus“ (MMTV) gehört zu den Retroviren und verursacht Mammakarzinome in der Maus.

Der „Mouse-Mammary-Tumor-Virus-Promotor“ ist ein Beispiel für ein gut beschriebenes, steroidhormonkontrolliertes Gen. Die Transkriptionsregulierung unterliegt neben Glucocorticoid-, Progesteron- und Androgenrezeptoren weiteren komplexen Mechanismen. (Beato et al., 1995; Günzburg and Salmons, 1992)

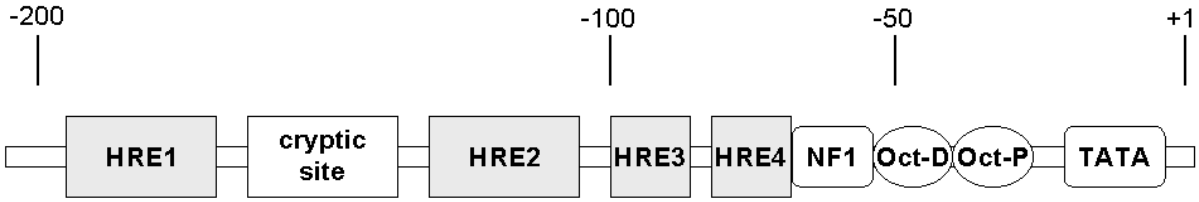


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Lokalisation regulatorischer Sequenzen in der MMTV-LTR (nach Beato, 1996)

Die Sequenz für steroidhormonvermittelte Stimulation der MMTV-Transkription ist in der U3-Region der „Long Terminal Repeat“ (LTR) des MMTV-Promotors lokalisiert. Die LTR des MMTV ist in sechs Nucleosomen (A – F) organisiert. Ein Nucleosom besteht aus einem Histon-Octamer $(H2A)_2(H2B)_2(H3)_2(H4)_2$ von 146 bp und Verbindungs-DNA, Histon H1, die als Linker in ihrer Länge zwischen 8 und 114 bp variiert. (Truss et al., 1995; Voet, Voet, 1994; Wolffe, 1994)

Die LTR enthält auf Nucleosom B eine Hormone-Responsive-Region mit zwei proximal und zwei distal angeordneten HREs. Ebenfalls auf Nucleosom B sind eine Bindungsstelle für „Nuclear Factor 1“ (NF1) und zwei Octamer-Motive für „Octamer Transcription Factor 1“ (OTF1) lokalisiert. Die Aufwindung der DNA im Nucleosom B erlaubt ausschließlich die Bindung des aktiven Rezeptors an die beiden äußeren HREs I und IV. HRE II und III, die Bindungsstelle für TF1 und die Octamer-Motive befinden sich in unzugänglicher, zentraler Lage des Nucleosoms. Rezeptorbindung an HRE I und IV bewirkt eine Änderung der Chromatinstruktur und erleichtert die Bindung der zwei zentralen HREs. Durch Besetzung der vier HREs mit Steroidhormonrezeptoren erhalten NF1 und OTF1 Zugang zu ihren Bindungsstellen. An isolierter DNA wäre eine gleichzeitige Bindung von HREs, TF1 und OTF1 nicht möglich. Die sterische Hinderung gebundener Proteine wird durch die helikale Struktur der DNA reduziert. Die Organisation der Chromatinstruktur ist für optimale Induktion des MMTV-Promotors Voraussetzung. Als Möglichkeit für hormoninduzierte nucleosomale Strukturänderung wird die rezeptorvermittelte Rekrutierung chromatinumformender Faktoren postuliert.

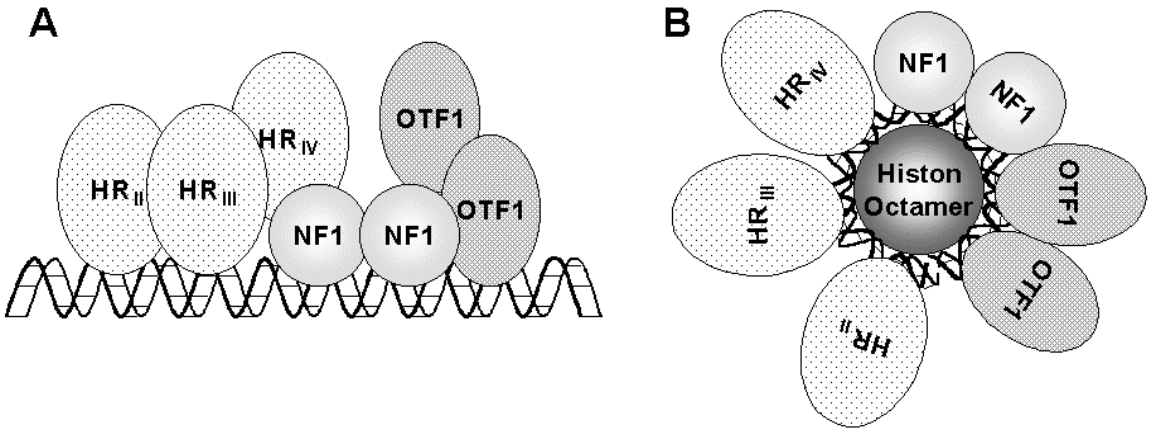


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Interaktionen von Hormonrezeptor, NF1 und OTF1 mit MMTV-Promotor-Sequenzen auf freier DNA und auf Nucleosom B. (A) Lineare Anordnung der MMTV-Promotor-Sequenz: Aufgrund sterischer Hinderung können Hormonrezeptor und NF1 nicht gleichzeitig an die DNA binden. (B) Um ein Histonoctamer gewundene Nucleotidsequenz: Die in Abb. A dargestellte sterische Hinderung wird durch Windung des Nucleosoms überwunden. (nach Truss et al., 1995)

An das TATA-Motiv des MMTV-Promotors bindet der Transkriptionsfaktor TFII. Wechselwirkungen veranlassen RNA-Polymerase II, an dieser Stelle mit der Transkription zu beginnen. (Beato, 1995; Beato et al., 1995; Günzburg and Salmons, 1992; Truss et al., 1995)

Prostate-Specific-Antigen-(PSA)-Promotor

„Prostataspezifisches Antigen“ (PSA) ist eine 33-kDa-Serinprotease der Kallikrein-Genfamilie, die in Epithelzellen der Prostata und Brustdrüsen gebildet wird. Die chymotrypsinartige Wirkung von PSA dient der Verflüssigung des Samens durch Fragmentierung von Proteinen. Im Serum liegt nur wenig PSA frei vor, der Hauptanteil ist an Serinproteaseinhibitoren wie α1-Antichymotrypsin gebunden.

Bei Frauen wurde PSA in gesundem Gebärmuttergewebe, Fruchtwasser, Muttermilch und Flüssigkeit von Brustzysten nachgewiesen. 30–60 % cytosolischer Extrakte weiblicher Brusttumoren enthalten PSA. Klinisch wird es als Monitor für die Prognose und Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt. Die Transkription von PSA ist androgenkontrolliert und nimmt nach einer Kastration stark ab. (Ferguson et al., 1996; Magklara et al., 1999; Sardar, 1999)

Bis zu 5828 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes befinden sich Promotor- und Enhancer-Regionen. In der proximalen Promotor-Region sind neben der TATA-Box ein ARE, -170/-156, und eine „Androgen Responsive Region“ (ARR), -

395/-376, lokalisiert. Als weitere regulatorische Einheiten werden drei Bindungsstellen für „Activator Protein-1“ (AP-1) und ein „cAMP Responsive Element“ (CRE) angenommen. Eine mutmaßliche AP-1-Bindungsstelle überlappt das ARE, -395/-376, der ARR. Effekte des proximalen Promotors auf Aktivierung und gewebespezifische PSA-Expression werden als gering beschrieben. Die Hauptkontrolle unterliegt der Enhancer-Region, ~4,2 kb stromaufwärts des PSA-Gens. Ein Fragment von 455 bp enthält ein ARE (ARE III), -4148/-4134, mit entsprechender Rezeptoraffinität und mehreren AREs (ARE IIIB, IIIA, IV, V und VI) mit variierenden, aber niedrigeren Affinitäten im Vergleich zum Consensus ARE. Unabhängig von den geringen Einzelaffinitäten tragen ARE IIIA, III, IV und V signifikant zur androgenabhängigen Transkriptionsaktivierung bei. Die multiplen AREs erhöhen die transkriptionale Genantwort synergistisch mit der Anzahl gebundener Aktivatoren. AREs mit niedriger Affinität in Kombination mit hohen AR-Konzentrationen sind eine mögliche Erklärung für die Zellspezifität der PSA-Expression. (Huang et al., 1999; Sadar et al., 1999)

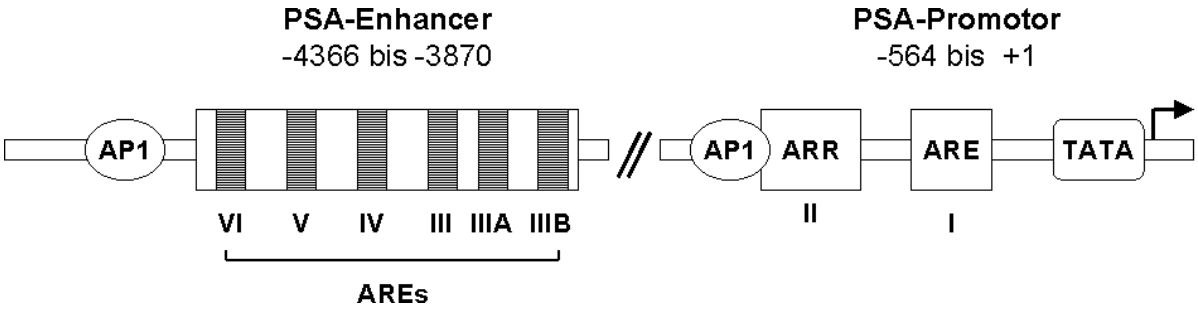


Abbildung 22: Schematische Darstellung der regulatorischen Elemente des PSA-Promotors (nach Huang et al., 1999; Sadar et al., 1999)

pS2-Promotor

Das estrogen-responsive pS2-(„Trefoil Factor 1“, TFF1)-Gen codiert ein sekretorisches Protein von 84 Aminosäuren. Charakteristisch für Vertreter der „Trefoil Factor Family“ (TFF) ist die Schlaufenstruktur, der sechs gleichmäßig angeordnete, über Disulfidbrücken verbundene Cysteinreste zugrunde liegen.

Trefoil-Peptide werden in Magen und Lumen des Gastrointestinaltrakts sekretiert. Estrogenunabhängige pS2-Expression wird unter Kontrolle des „Epidermal Growth Factor“ (EGF) vermutet. Das pS2-Gen ist essentiell für die normale Differenzierung

der Magenschleimhaut und wird als magenspezifisches Tumorsuppressorgen diskutiert.

In vitro tritt eine pS2-Expression nach 17ß-Estradiol-Inkubation von Brustkrebszellen als direkter transkriptionaler Effekt auf, der durch Antiestrogene aufgehoben werden kann. *In vivo* in Brusttumoren wird pS2 durch Estrogene induziert und korreliert mit der Anwesenheit des Estrogenrezeptors. Für einige ER-negative Tumoren werden andere Faktoren vermutet, die pS2 induzieren. Die Funktion in Brustkrebszellen ist gänzlich unbekannt. Klinisch wird pS2 als Tumormarker bei der Brustkrebsprognose eingesetzt. (Balleine and Clarke, 2001; Martin et al., 1998)

Die 5`-flankierende Region des pS2-Gens enthält neben der TATA-Box, -23/-29, ein CAAT-Element, -64/-72, eine konservierte Sequenz, deren Veränderung die Transkriptionsgeschwindigkeit des Gens stark reduziert. (Kim et al, 2000; Stack et al., 1988; Voet, 1994)

Die Promotor-Region des pS2-Gens enthält -405/-393 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes die nicht perfekt palindromische Sequenz eines 13-bp-EREs. Die Promotor-/Enhancer-Region, von Nucleotid -425 bis Nucleotid -332, spricht auf EGF, Tumorpromotor TPA und die Proto-Onkoproteine c-Ha-*ras* und c-*jun* an. Zusätzlich ist ein AP-1-Motiv in 5`-Region stromaufwärts des EREs beschrieben. (Martin et al., 1998; Ribieras et al., 1998; Rochefort, 1995)

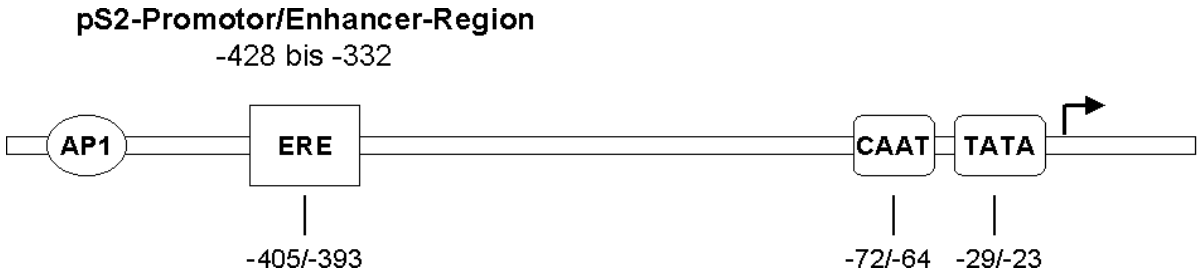


Abbildung 23: Schematische Darstellung der regulatorischen Elemente des pS2-Promotors (nach Martin et al., 1998; Ribieras et al., 1998)

Kim et al. postulieren die Bindung des ligandfreien Estrogenrezeptors mit der hypersensitiven Hälfte des EREs in Abwesenheit des Hormons und die Bindung des E_2-gebundenen Rezeptors mit beiden Palindromhälften in Anwesenheit des Liganden. Die Befunde implizieren unterschiedliche Aufgaben des EREs in Ruhephasen, Aktivierung und Aufrechterhaltung der pS2-Genexpression. (Kim et al., 2000)

Testosterone-repressed-Prostate-Message-2-(TRPM-2)-Promotor

„Testosterone-repressed Prostate Message-2“ (TRPM-2) ist ebenfalls bekannt als Clusterin, „Apolipoprotein J“ (APO-J), „Complement Lysis Inhibitor“ (CLI), „Sulfated Glycoprotein-2“ (SGP-2), „Complement-Associated Protein SP 40-40“, „Glycoprotein III“ (gpIII), gp80 und T64. Das humane Protein besteht aus 449 Aminosäuren. Fünf in ihrer Lage absolut konservierte Disulfidbrücken verbinden das Heterodimer von zwei ~40-kDa-Untereinheiten (α und β). Eine Bande von 60 kDa im Western Blot lässt auf eine zweite TRPM-2-Form schließen. Während das 60-kDa-Protein die cytoplasmatische TRPM-2-Expression darstellt, wird das 40-kDa-Protein als kernlokalisierte Form postuliert. (Pankhurst et al., 1998; Ouyang et al., 2001; Redondo et al., 2000; Tenniswood et al., 1998)

Von einer Anzahl biologischer Moleküle ist die Bindung an TRPM-2 beschrieben. Dazu zählen Komplementproteine, Apolipoprotein A-I, Immunglobuline, Alzheimer`s β-Amyloid Peptid und Streptococcenprotein SIC. TRPM-2 kommt in den meisten Körperflüssigkeiten vor und ist in eine Reihe biologischer Prozesse involviert, einschließlich Spermareifung, Lipidtransport, programmierten Zelltod (Apoptose), Regulation der Komplementkaskade (Serumbestandteil, der die spezifische Wirkung eines Antikörpers ergänzt oder aktiviert), Membranrecycling, Zelladhäsion und src-induzierte Transformation. Es ist ungeklärt, ob TRPM-2 ein multifunktionales Protein ist oder ein allgemeiner Mechanismus verschiedenen Funktionen unterliegt.

Einige Aufgaben des TRPM-2 scheinen bei der Tumorgenese relevant zu sein. Diese umfassen die gesamte Abwehrreaktion, Membranschutz und die Aufrechterhaltung von Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Kontakten.

Auch Kastration steigert die TRPM-2-Expression der Prostata deutlich.

TRPM-2 wird als Marker für Zelltod in normalem und malignem Gewebe bei Apoptose beschrieben. Während einige Autoren wie Redondo et al. von der Apoptoseinitiation durch TRPM-2 ausgehen, beschreiben andere Autoren wie Lee et al. und Ouyang et al. TRPM-2 als antiapoptotisches Protein mit einer wichtigen Rolle beim Schutz von Prostatazellen, indem die durch Androgenmangel induzierte TRPM-2-Überexpression Prostatakrebszellen gegen Apoptose schützt. (Lee et al., 2000; Pankhurst et al., 1998; Ouyang et al., 2001; Redondo et al., 2000; Tenniswood et al., 1998)

In MCF-7-Tumoren auf ovartektomierten Nacktmäusen erhöht E_2-Entzug die TGFβ- und TRPM-2-Expression, während die Expression anderer Gene wie c-*fos*, c-H-*ras*

und pS2 abnimmt und die Tumorzellen in den programmierten Zelltod gehen. (Kyprianou et al., 1991)

Auf dem TRPM-2-Gen sind zwei Transkriptionsstartpunkte, P1 und P2, beschrieben. Beide Promotoren zeigen transkriptionale Aktivität und scheinen in den meisten Fällen einer TRPM-2 Expression co-reguliert zu sein. Die TATA-Box von Promotor P1 ist um Nucleotid -29 lokalisiert. P2 enthält eine alternative Startsequenz stromaufwärts. (Michel et al. ,1995; Tenniswood et al., 1998)

Promotorregionen des TRPM-2-Gens weisen zwischen verschiedenen Spezies nur wenig Homologien auf. Hoch konserviert ist eine Region von 14 bp proximal zum Transkriptionsstartpunkt, das „Clusterin Element“ (CLE). Die Consensus-Sequenz nTTCnnGAAnnCTCn unterscheidet sich nur in einer Base von der idealisierten Sequenz des „Heat-Shock-Elements“ (HSE). Es wird angenommen, dass die TRPM-2-Induktion als „Stress Response Protein“ durch das CLE reguliert wird.

Funktionale regulatorische DNA-Elemente wurden im ersten Intron identifiziert. Sie codieren beispielsweise die basale und zellspezifische Expression verschiedener Gene wie die humane Aromatase oder Rattencollagen II. (Rosemblit et al., 1996)

HREs wurden auf dem TRPM-2-Gen bis jetzt noch nicht identifiziert. Der Mechanismus der hormonabhängigen Regulierung der TRPM-2-Expression ist demzufolge nicht geklärt.

Die Kontrolle der TRPM-2-Expression im Reproduktionstrakt ist nicht vollständig untersucht. Beim Vergleich von TRPM-2-Promotor-Regionen von Ratte und Mensch wurden einige Motive identifiziert, die möglicherweise eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle des TRPM-2-Gens spielen. Ebenso wurden einige Transkriptionsfaktoren identifiziert, die mit dem TRPM-2-Promotor assoziieren.

„Caudal-related Homeobox Proteine“ (Cdx) mit Bindungsmotiv zwischen -771 und -732, werden als entwicklungsregulatorisch für Hoden und Nebenhoden angenommen. Die Unterdrückung des TRPM-2-Gens in der Prostata bei Anwesenheit des Hormons und Hochregulierung nach Kastration scheinen durch den unterdrückenden Effekt vom „Cellulare Nucleic Acid Binding Protein“ (CNBP) reguliert zu werden. Der Transkriptionsfaktor bindet den Promotor an Nucleinsäuren der DNA zwischen -1266 und -1259, einem „Steroid Receptor Element“- (SRE) ähnlichen Element. (Tenniswood et al., 1998)

Der Transkriptionsfaktor „Nuclear Factor 1“ (NF1) bindet an Zwillings-Bindungselemente zwischen Nucleinsäure -356 und -309 und induziert TRPM-2-Expression in einer gewebespezifischen Weise bei Brustdrüsenregression, aber nicht zwangsläufig bei Rückbildung der Prostata. Die gewebespezifische Expression von NF1 ist Beispiel für Unterschiede der Kinetik in der TRPM-2-Induktion. (Furlong et al., 1996; Tenniswood et al., 1998)

Analysen der Clusterin-Promotor-Aktivität in verschiedenen Zelllinien lassen vermuten, dass mit Ausnahme von AP-1, GC-reichen Regionen und der TATA-Box die Bindung von Transkriptionsfaktoren und ihre Antwort gewebespezifisch ist. (Furlong et al., 1996; Michel et al.,1995; Michel et al.,1997; Rosemblit et al., 1996; Tenniswood et al., 1998)

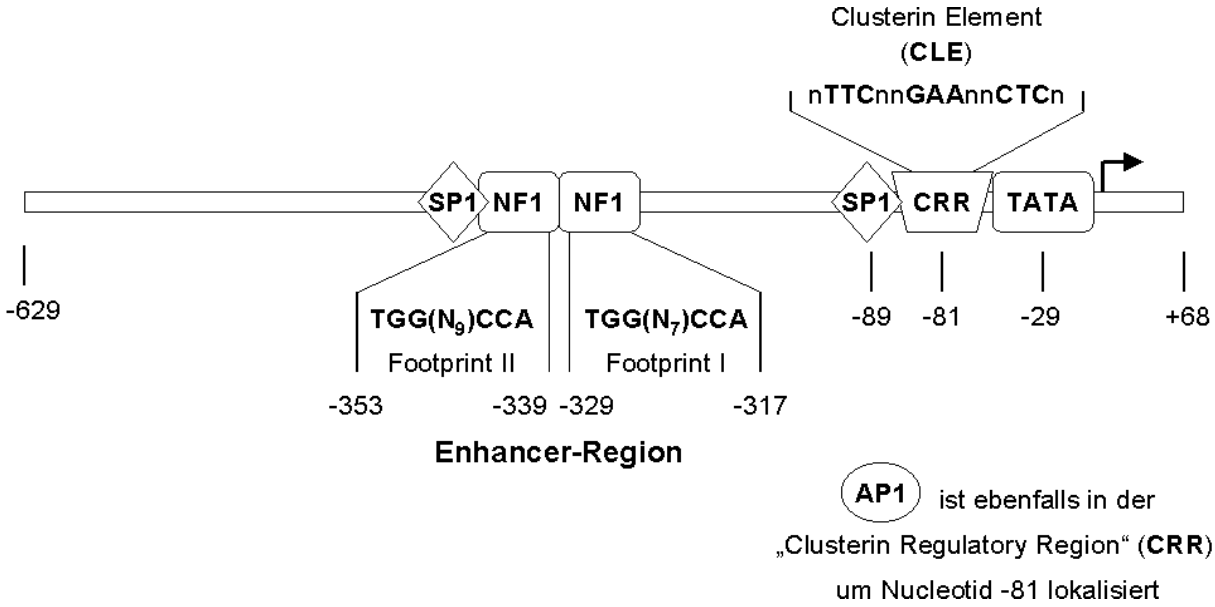


Abbildung 24: Schematische Darstellung regulatorischer Elemente des TRPM-2-Promotors (nach Furlong et al., 1996; Michel et al., 1997)

Wilson und Easterbrook-Smith postulieren TRPM-2 als neues Heat-Shock-Protein mit Chaperoneigenschaften. Auf Niveau von Genkontrolle und Proteinfunktion teilt es viele Gemeinsamkeiten mit Hsps. Aminosäuresequenz-Analysen deuten auf eine entfernte Verwandtschaft zwischen TRPM-2 und Hsps hin. Eng verwandte Proteine sind zurzeit nicht bekannt, lassen deshalb TRPM-2 als einzelnes Protein ohne Familie vermuten. Des Weiteren schlagen Wilson und Easterbrook-Smith TRPM-2 als erstes identifiziertes sekretierbares Chaperon in Säugerzellen vor, das *in vivo* als extrazelluläres Chaperon agiert. Weitere sekretierbare Hsps wurden bisher in Hefen

und Pflanzen identifiziert. Funktionen dieser Hsps sind bis jetzt unbekannt. (Wilson und Easterbrook-Smith, 2000)

Hefe-Promotoren

Hefezellen enthalten normalerweise keine Steroidhormonrezeptoren. Zur Detektion hormoneller/antihormoneller Effekte wurden rekombinante Hefestämme mit Expressionssystem für humanen Estrogenrezeptor/Androgenrezeptor entwickelt.

Für das Reportergensystem wurde der „Phosphoglyceratkinase-Gen-Promotor“ (PGK-Promotor), ein starker Hefepromotor mit kontinuierlich hoher Expressionsrate, aus *Saccharomyces cerevisiae* in modifizierter Form verwendet.

Das PGK-Gen ist ein hoch exprimiertes glycolytisches Gen in knospender Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Das Promotorgen enthält zwei mögliche TATA-Boxen in Position -114 und -152, eine CAAT-Box bei -129 und eine „Upstream Activation Sequenz“ (UAS) zwischen -538 und -402, stromaufwärts des Translationsstartpunktes. Die UAS beinhaltet Bindungsstellen für multifunktionale Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Rap1p und Abf1p und glycolysespezifische Transkriptionsfaktoren wie Gcr1p. Rap1p und Gcr1p sind in die transkriptionale Aktivierung des Promotors involviert. Die Rolle von Abf1p ist nicht geklärt. Für weitere Mitglieder der multifunktionalen Transkriptionsfaktor-Familie wie Reb1p und Cpf1p wurden Bindungsstellen unmittelbar vor der definierten UAS identifiziert. (Dobson et al., 1982; Packham et al., 1996; Routledge and Sumpter, 1996)

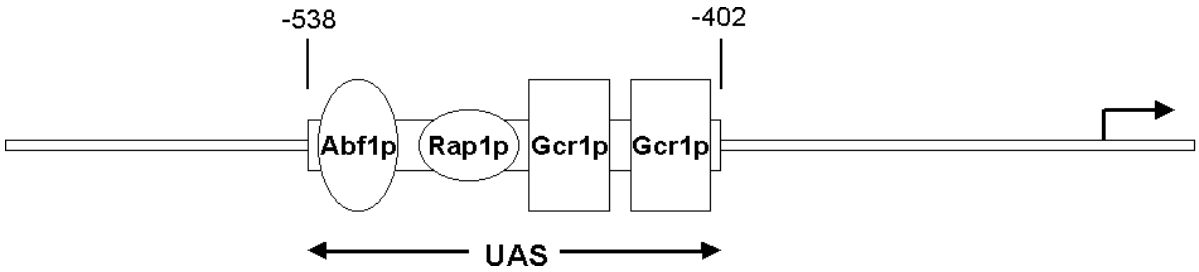


Abbildung 25: Schematische Darstellung regulatorischer Elemente des PGK Promotors

Das Expressionssystem zur Ermittlung androgener/antiandrogener Aktivität in *Saccharomyces cerevisiae* PKGhAR besteht aus einem hAR-Expressionsplasmid (pPGK-*hAR*) und dem Reportergenkonstrukt für Androgeninduktion (pATPGK*are-lacZ*). Der humane Androgenrezeptor wird unter Kontrolle des PGK-Promotors konstitutiv exprimiert. Das Reportergenkonstrukt für androgene Induktion besteht

ebenfalls aus einem modifizierten PGK-Promotor. An Stelle der stromaufwärts gelegenen Aktivierungssequenz UAS wurden eine Dreifachanordnung von AREs und eine β-Galactosidase kodierende *lacZ*-Sequenz eingefügt. Die ARE-Sequenzen sind Wiederholungen einer 15-bp-Region, analog der androgenabhängigen transkriptionalen Enhancer-Region der MMTV-LTR. Sie initiieren die Transkription des Reportergens *lacZ*. (Buckholz, 1993; Purvis et al., 1991; Sohoni and Sumpter, 1998)

Für das Reportergensystem zur Detektion estrogener/antiestrogener Aktivität wurde die Sequenz des hERα unter Kontrolle des PGK-Promotors stabil ins Genom des Hefestammes *Saccharomyces cerevisiae* integriert. Das ebenfalls stabil enthaltene Expressionsplasmid birgt in der starken PGK-Promotor-Sequenz eine Anordnung von zwei Tandem-Consensus-EREs, die die Expression des Reportergens *lac*Z regulieren. (Routledge and Sumpter, 1996; Sohoni and Sumpter, 1998; Wrenn and Katzenellenbogen, 1993)

2.5.6 Mechanismus der Transkriptionsaktivierung

Steroidhormone gelangen durch passive Diffusion in die Zelle. Die entsprechenden Steroidhormonrezeptoren liegen in Abhängigkeit ihrer Rezeptorlokalisation als Hsp-gebundene Intermediärkomplexe (mit Hsp70, Hsp90 und Cofaktoren) im Cytosol oder Nucleus vor. Scheinbar gleichzeitig mit der Bindung von p23 und Immunophylin dissoziiert ein Teil der Heat-Shock-Proteine (Hop und Hsp70 mit Cofaktoren). Der entstandene reife Rezeptorkomplex ist Voraussetzung für die hormonbindende Konformation. Der Steroidhormonrezeptor wird spontan vom stabilisierenden Hsp-Komplex verlassen, hat die Möglichkeit, spezifisch Hormone zu binden und zu dimerisieren. Infolgedessen kommt es je nach Rezeptortyp zur Translokation oder bei kernlokalisierten Rezeptoren zur stärkeren Assoziation mit Kernstrukturen. Diese ermöglicht die Interaktion mit spezifischen HREs. (Buchner, 1999; McDonnell et al., 1995)

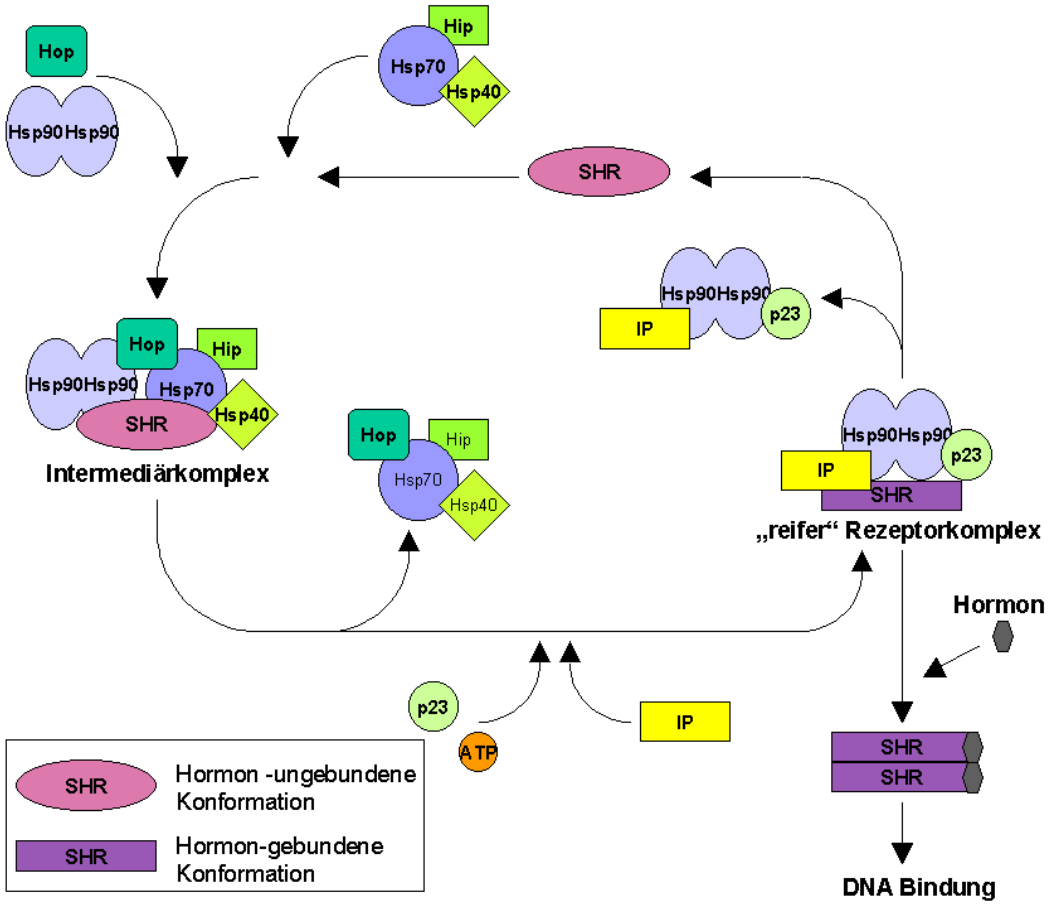


Abbildung 26: Steroidhormonrezeptor-Aktivierung mit involviertem Hsp90-Chaperon-Zyklus (nach Buchner, 1999)

Die Interaktionen des Steroidhormonrezeptoren-Komplexes mit HREs kann in Abhängigkeit von Zielgen und -gewebe zur Aktivierung oder Unterdrückung der Transkription führen. Der Rezeptor-DNA-Komplex erleichtert den Zusammenschluss mit Transkriptionsfaktoren und die Bildung eines funktionalen Transkriptionsapparates. An diesem Prozess sind Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und weiteren Faktoren beteiligt. In den Zusammenschluss des Transkriptionskomplexes der meisten eukaryontischen Promotoren für RNA-Polymerase II ist der allgemeine Transkriptionsfaktor TFIID involviert. Neben allgemeinen existieren auch gewebespezifische Cofaktoren und rezeptorspezifische Faktoren, wie z. B. für die aminoterminale Domäne der PR-B-Isoform. Einige der Interaktionen bewirken Konformationsänderungen des Komplexes, inklusive der Bildung von DNA-Schleifen, um lange Abstände zwischen Promotor und HREs zu überbrücken. (Church Landel et al., 1995; Hill and Treisman, 1995; Wu et al., 1999)
Infolge der Wechselwirkungen des Rezeptor-DNA-Komplexes mit verschiedenen Adapterproteinen kommt es zur Interaktion mit dem basalen Transkriptionsapparat.

Die Transkription wird nach Bindung der RNA-Polymerase II an die TATA-Box induziert. (McDonnell et al., 1995)

2.5.7 Antihormonelle Wirkung

Agonistische/Antagonistische Aktivität einer Verbindung wird beeinflusst durch Metabolismus, Bindungsaffinität, Assoziations- und Dissoziationsrate, ligandinduzierter Rezeptorkonformation, Stabilisierung, Dimerisation, DNA-Bindung und der Interaktion mit assoziierenden Proteinen. (Kemppainen et al., 1999)

Steroidhormonrezeptoragonisten und -antagonisten binden die ligandbindende Domäne an gleicher Stelle, aber unter verschiedenen Modalitäten. Dadurch induziert jeder Ligand individuelle Konformationsänderungen in der Transaktivierungsdomäne der LBD. Vorherrschende Modelle für antihormonelle Wirkung beschreiben zwei Mechanismen für Transkriptionsinhibierung:

- Typ-I-Antagonisten binden den Rezeptor, verhindern jedoch die Bindung an die DNA.
- Typ-II-Agonisten induzieren die DNA-Bindung, verhindern aber die Initiation der Transkription.

Für antagonistische Wirkung sind verschiedene Mechanismen denkbar:

- ungünstige Rezeptorkonformation und damit verbundene niedrige Stabilität erhöhen die Abbaurate des Rezeptors
- differierende Ligand-Bindungs-Kinetik von Agonist und Antagonist; z. B. reduziert schnelle Dissoziation des Liganden die Stabilität des Rezeptors und *in vivo* die agonistische Aktivität bei parallel dosisabhängigem Anstieg antagonistischer Aktivität
- verhinderte Dimerisierung
- Dimerkonformation aufgrund gemischter Liganden befähigt nicht zur DNA-Bindung
- konformationsbedingte Verhinderung der für die DNA-Bindung notwendigen Dissoziation Rezeptor-assoziierter Proteine

(Brzozowski et al., 1997; Kelce and Wilson, 1997; Kemppainen et al., 1999)

2.5.8 Cross-talk mit anderen Signaltransduktionswegen

Protoonkogene wie c-*fos* und c-*jun* spielen eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulierung und Transformation normaler Zellen: AP-1, ein Dimer der Fos- und Jun-Protein-Familie, bindet AP-1-Enhancer-Elemente und moduliert die Transkription. Nach Estrogenbehandlung ovarektomierter Nager wurde die transiente Stimulation der c-*fos*-Genexpression in Epithelzellen, Runterregulierung der c-*jun*-Genexpression in Epithelzellen, aber Hochregulierung von c-*jun* in Stroma und Myometrium beobachtet. In männlichem Reproduktionsgewebe trat nach Kastration unabhängig von der Estrogenbehandlung eine Erhöhung der c-*fos*-Genexpression in Epithelzellen auf. (Yamashita, 2001)

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Wachstumsfaktoren wie z. B. der „Epidermal Growth Factor“ (EGF) oder der „Insulin-like Growth Factor“ (IGF), cAMP und andere Agentien wie Dopamin die transkriptionale Aktivität des Estrogenrezeptors stimulieren. Andererseits werden in verschiedenen Zelltypen des weiblichen Reproduktionstrakts EGF, IGF-1 und „Transforming Growth Factor“ (TGF) durch Estrogenbehandlung induziert. Diese Wachstumsfaktoren werden als autokrine oder parakrine Mediatoren Estrogen-induzierter Zellproliferation und -differenzierung dieser Gewebe vermutet. Expression von c-*fos*-mRNA in Mausuterus kann ER-unabhängig über den EGF-Signalweg stimuliert werden. (Katzenellenbogen und Katzenellenbogen, 2000)

Für cAMP ist die Änderung des agonistisch/antagonistischen Gleichgewichtes einiger Antiestrogene beschrieben. Estrogene und in geringerem Umfang Antiestrogene erhöhen neben weiteren Proteinen wie Protein-Kinase-Aktivatoren und Wachstumsfaktoren die Phosphorylierung vom ER und möglicherweise anderen, in ER-spezifische Antwortwege involvierten Proteinen. Änderungen im zellulären Posphorylierungsstatus scheinen entscheidend für die biologische Aktivität des ERs und die Wirkung von Antiestrogenen.

Die transkriptionale ER-Aktivität wird mit der Phosphorylierung verschiedener Serinreste assoziiert. Daneben ist die Stimulation von c-*Src*-Kinase- und MAP-Kinase- (MAP = „Mitogen-activated Protein“) Signaltransduktionswegen durch Estradiol beschrieben. Änderungen von Signalwegen für Wachstumsfaktoren und Proteinkinasen werden für hormonresistente Brusttumoren diskutiert. Für einige wachstumshemmende Agentien wurde die Änderung des Phosphorylierungsstatus

am ER sowie die Modulation der Genexpression durch Co-Regulatoren und andere Proteine gezeigt. Zudem werden bei der Wachstumsregulierung von Brustdrüsen und Brustkrebszellen Wechselwirkungen zwischen cAMP und Estrogenen angenommen. (Beato and Klug, 2000; Kato et al., 2000; Katzenellenbogen, 2000)
Neben synergistischen Effekten von Estrogenen mit einigen Proteinkinase-Aktivatoren und Wachstumsfaktoren sind weitere Effekte auf die Gentranskription beschrieben. Beispielsweise steigern Estrogene den Gesamtgehalt der Tyrosin-Phosphorylierung in Zellen, erhöhen die intrazellulare Calcium-Konzentration einiger Zellen, steigern die Phosphorylierung von „cAMP Responsive Element Binding Protein“ (CREB), aktivieren G-Protein-gekoppelte Signale und erhöhen MAP-Kinase-Aktivitäten, verbunden mit einer Estrogen-Stimulation bei der Zellproliferation. (Katzenellenbogen and Katzenellenbogen, 2000)

Der ER steht bezüglich der Modulation biologischer Reaktionen in Beziehung zum Progesteronrezeptor-System. Estrogene stimulieren die Expression von PR und TFF1, die wiederum in bestimmtem Umfang Maß der ER-Funktion sind. Ligandgebundener PR senkt hingegen Estrogen-stimulierte ER-Aktivität. Die Signalunterdrückung ist abhängig von PR-Isoform, Ligand, Promotor und Zelltyp. In der PR-positiven T-47D-Mammakarzinomzelllinie wurde die reversible Stimulation von c-*Src*/p21*ras*/Erk-2-Signalwegen gezeigt. (Beato and Klug, 2000; Hanby et al., 1998; Katzenellenbogen, 2000)

Die exakte physiologische Rolle der Phosphorylierung von Steroidhormonrezeptoren ist noch nicht geklärt. Androgenrezeptoren werden androgenabhängig und unabhängig vom Liganden phosphoryliert. Modulatoren der Protein-Kinase A können die transkriptionale Funktion des AR in Abwesenheit des Liganden aktivieren. Ebenfalls wurde die Aktivierung des AR für Wachstumsfaktoren wie EGF, Keratinocyten-Wachstumsfaktor, Interleukin-6, GnRH und IGF-1 gezeigt. (Lamb et al., 2001)

Umfangreicher Cross-talk übernimmt im Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Steroidhormonen eine wichtige Rolle und ist für mitogene Effekte von Steroidhormonen in Prostata- und Brustkrebszellen essentiell. Die alternativen Signaltransduktionswege haben profunde Effekte, besonders bei Tumoren, indem sie

hormonunabhängiges Wachstum ermöglichen. (Beato and Klug, 2000; Lamb et al., 2001)

2.6 Testsysteme zur Erfassung hormoneller Aktivität

Potentielle endokrine Disruptoren können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* detektiert werden. *In-vivo*-Studien berücksichtigen pharmakokinetische Einflüsse, erfordern jedoch hohen technischen Aufwand, große Tierzahlen und sind sehr kostenintensiv. Für ein schnelles, breites Screening eignen sich targetorientierte *In-vitro*-Methoden.
Verbindungen mit vielfältigem oder unerwartetem Wirkspektrum werden beim *In-vitro*-Screening nicht identifiziert. Ebenfalls unberücksichtigt bleiben Einflüsse auf Steroidhormonbiosynthese, Metabolismus sowie Resorption, Verteilung, Speicherung und Elimination. *In-vivo*-Untersuchungen bieten die Möglichkeit, endokrine Disruptoren und deren Einflüsse auf die Entwicklung zu erkennen, während *In-vitro*-Tests die Suche potenter Verbindungen erleichtern und zur mechanistischen Aufklärung beitragen können.
Zur umfassenden Bewertung einer Substanz hinsichtlich ihres endokrinen Potentials sollten daher sowohl *In-vivo*- als auch *In-vitro*-Untersuchungen herangezogen werden.

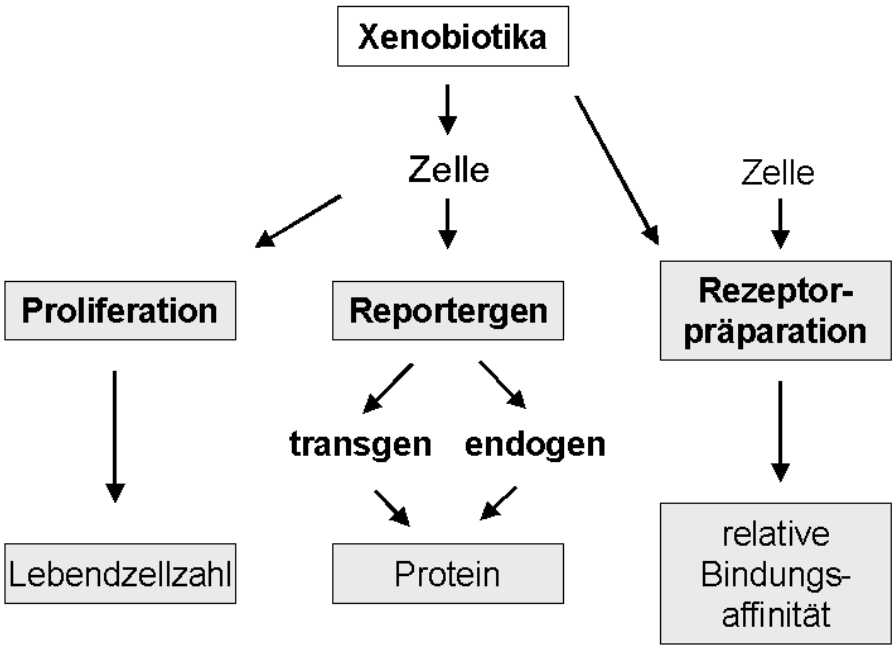


Abbildung 27: Schematische Darstellung möglicher zellulärer Testsysteme zur Erfassung von hormonellem Potential

2.6.1 *In-vivo*-Testsysteme

Erste *In-vivo*-Untersuchungen hormoneller/antihormoneller Aktivitäten wurden über Organgewichtsbestimmung erfasst. Uterotropher und Hershberger-Assay basieren auf dem Anstieg mitotischer Aktivität in Geweben des Genitaltraktes von juvenilen oder ovarektomierten bzw. kastrierten Nagetieren nach Behandlung mit Testsubstanzen. Messgrößen für estrogene/antiestrogene Aktivität sind Uterusgewicht und vaginale Verhornung. Androgenes/antiandrogenes Potential wird in männlichen Tieren durch Bestimmung von Prostata- bzw. Hodengewicht detektiert. Effekte hormonell aktiver Verbindungen während der embryonalen Entwicklung können in Mehrgenerationenstudien untersucht werden. Parameter für entwicklungstoxische Verbindungen sind unter anderem Störungen bei der Ausbildung sekundärer Geschlechtsorgane und reduzierte Fertilität.

Neben der Erfassung morphologischer und biometrischer Parameter können molekularbiologische Messgrößen zur Erfassung von hormonellem/antihormonellem Potential herangezogen werden.

2.6.2 *In-vitro*-Testsysteme

In vitro bieten sich verschiedene Möglichkeiten, hormonelle/antihormonelle Aktivität zu detektieren: erstens die Bestimmung der Proliferationsrate hormonabhängig wachsender Zelllinien, zweitens Untersuchungen endogener oder transgener Reportergenaktivität unter Steroidhormonrezeptor-Kontrolle und drittens Messungen der relativen Bindungsaktivität am Hormonrezeptor.

Beim **Proliferationsassay** wird als Endpunkt die steroidhormonabhängige Zellproliferation infolge erhöhter Expression wachstumstimulierender Faktoren genutzt. Die hormoninduzierte, erhöhte Proliferationsrate kann anhand der Lebendzellzahl detektiert werden. Der so genannte E-Screen-Assay wurde in der estrogenabhängig wachsenden Brustkrebszelllinie MCF-7 zur Erfassung estrogener/antiestrogener Aktivität von Umweltchemikalien entwickelt. Proliferative Effekte als Response auf Androgene kann mittels A-Screen-Assay in bestimmten Varianten der androgen sensitiven humanen Prostatakrebszelllinie LNCaP ermittelt werden, die androgenabhängig proliferieren. (Soto et al., 1995; Sonnenschein and Soto, 1998)

Vorteil des Proliferationsassays ist, dass es sich um kein artifizielles System handelt, das eine Transfektion von fremden genetischen Material erfordert. Nachteilig ist zu bewerten, dass die Wachstumskontrolle der Zellen neben Steroidhormonrezeptoren auch anderen Signalwegen unterliegt, die ebenfalls Einfluss auf die Regulation nehmen können.

Bei Reportergenassays wird zwischen endogenen und transgenen Ansätzen unterschieden. Dem **endogenen Reportergenassay** liegt das natürliche System „Zelle“ zugrunde. Steroidhormonrezeptor-kontrollierte Gene dienen als Reporter und werden nach Induktion durch das entsprechende Hormon konzentrationsabhängig exprimiert. Der Nachweis kann auf mRNA-Ebene mittels „Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR) oder Northern-Blotting erfolgen. Zum Nachweis endogener, hormonkontrollierter Reporter auf Protein-Ebene können immunochemische Verfahren wie „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) oder „Radio-Immuno-Assay“ (RIA) herangezogen werden.

Transgene Reportergenassays beruhen auf der Transfektion geeigneter Zellen mit einem Steroidhormonrezeptor-kontrollierten Promotor-Reportergen-Konstrukt und gegebenenfalls einem Steroidhormonrezeptor-Expressionsplasmid. Das

Reportergenprodukt ist häufig ein Enzym. Bei Induktion durch das entsprechende Steroidhormon kommt es zur konzentrationsabhängigen Expression des Reportergens. Infolgedessen kann das Reportergenprodukt, das proportional zur Genexpression ist, direkt oder nach enzymkatalytischer Umsetzung eines Substratreagenzes detektiert werden.

Reportergenassays geben direkte Auskunft über die Transkriptionsaktivierung. Nachteil transgener Reportergenassays ist das durch die Transfektion artifizielle System.

Am isolierten Steroidhormonrezeptor wird die „**relative Bindungsaffinität“** (RBA) bestimmt. Es wird die Konkurrenz von radioaktiv markiertem Hormon und Testsubstanz um die Rezeptorbindungsstellen gemessen. Nachteil des Assays ist, dass lediglich eine Aussage über das Verhältnis der Rezeptoraffinität von zu untersuchenden Substanzen zur Bezugsverbindung gemacht werden kann. Aussagen zur Transkriptionsaktivierung können nicht getroffen werden.

Auskunft über Ligand-Rezeptor-DNA-Interaktionen und mechanistische Aufklärung bietet der Gel-Mobility- (Band-) Shift-Assay. (Guth, 2000)

2.6.3 Auswertverfahren

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen weisen bei halblogarithmischer Auftragung eine typisch sigmoidale Dosis-Wirkungs-Beziehung auf. Diese lässt sich mathematisch durch folgende logistische Formel allgemein beschreiben:

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

A1: unteres Plateau (nicht aktivierter Rezeptor)

A2: oberes Plateau (Sättigungsbereich des Rezeptors)

p : Power; Steigung im Übergang vom unteren zum oberen Plateau

X_0: X-Wert bei 50 % Aktivierung (Y); Wendepunkt der Kurve
= Dissoziationskonstante (K_D) oder Effektive Konzentration 50 % (EC_{50})

Aus den Messdaten lassen sich mittels nichtlinearer Regression die den Kurvenverlauf bestimmenden Parameter berechnen. X_0 entspricht im Falle

agonistischen Wirkpotentials dem EC_{50}-Wert, der Konzentration halbmaximaler Aktivität. (Mußler, 1999)

Zur Bestimmung agonistischer/antagonistischer Aktivität wird eine Signifikanzschwelle eingeführt. Sie ergibt sich aus dem oberen 95. Percentil des Konfidenzintervalls im unteren Plateau (A1) für beginnende Aktivität bzw. dem unteren 95. Percentil im Bereich der zu antagonisierenden Konzentration für beginnende Hemmung.

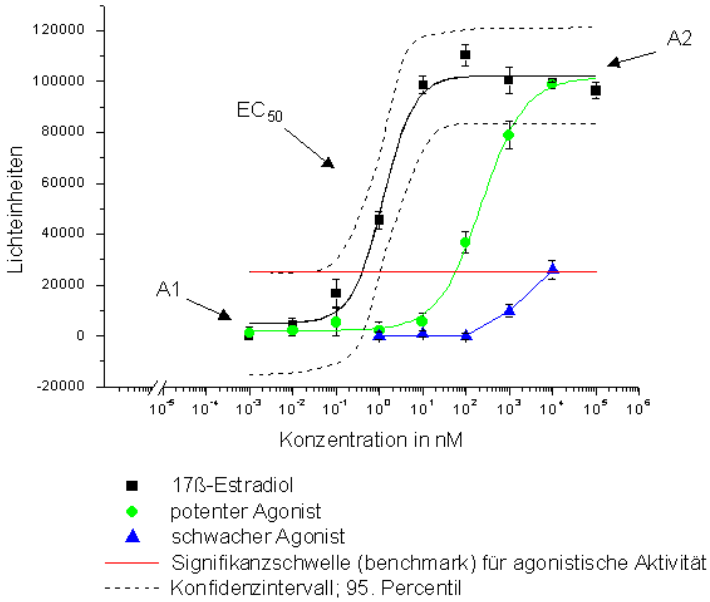


Abbildung 28: Auswertverfahren: Logistischer Fit mit 95. Percentil der Messdaten des physiologischen Liganden (17β-Estradiol) und Angabe einer Signifikanzschwelle für agonistische Aktivität

2.7 Zelllinien

2.7.1 COS-7

Zellen der etablierten Affennierenzelllinie CV-1 wurden mit einer Deletionsmutante des SV-40 transformiert. Die Deletion betrifft sechs Nucleotide in der „origin“-Region der viralen DNA-Replikation. Aus der Transformation gehen drei Zellpopulationen hervor: COS (CV-1 origin, SV-40) 1, 3 und 7, die das SV-40-T-Antigen exprimieren.
COS-7-Zellen entsprechen im Hinblick auf den Sicherheitsstandard etablierten Affennierenzellen, die defekte virale Genome enthalten und keine infektiösen Viruspartikel abgeben. Transfektionen mit Vektoren, die den SV-40 ori enthalten,

führen binnen 70 bis 90 Stunden zur Akkumulation von $>10^5$ Kopien, was das Absterben der Zelle zur Folge hat. COS-7-Zellen eignen sich daher vor allem für transiente Transfektionen des Vektors. Sie enthalten keine Steroidhormonrezeptoren. (Couette et al., 1994; Gluzman, 1981; ZKBS, 1994)

2.7.2 LNCaP

Die LNCaP-Zelllinie (LNCaP = „Lymphe Node Carcinoma of the Prostate“) wurde 1977 aus der supraclaviculären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Mannes mit Prostata-Adenokarzinom gewonnen. 1983 wurde von Horoszewicz et al. der Androgenrezeptorgehalt im Cytosol mit 153 bzw. 266 fmol/mg Protein, der Estrogenrezeptorgehalt mit 44 bzw. 72 fmol/mg Protein bestimmt. Der Steroidhormonrezeptorgehalt kann sich allerdings in Permanentkultur verändern. Die auch als Xenograft-Modell wachsenden Zellen weisen aufgrund einer Mutation in der „Ligandbindenden Domäne“ des Androgenrezeptors anormale Bindungscharakteristika auf. (DSMZ, 1999; Horoszewicz et al., 1983; van Steenbrugge et al., 1989; Veldscholte et al., 1990)

2.7.3 MCF-7

Eine als MCF-7 bezeichnete humane Mammakarzinom-Zelllinie wurde 1973 aus einem pleuralen Erguss einer Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom gewonnen. Die gut differenzierte Zelllinie ist eine der am besten charakterisierten steroidhormonrezeptorpositiven Mammakarzinom-Zelllinien.

Neben dem Progesteronrezeptor sind beide Subtypen des Estrogenrezeptors enthalten. Verglichen mit dem ERα exprimieren MCF-7-Zellen jedoch nur geringe Mengen ERβ. Sun et al. berichten, dass MCF-7-Zellen fast ausschließlich den ERα enthalten. Steroidhormonrezeptorgehalte schwanken in Abhängigkeit von endogenen biochemischen Faktoren, der Anzahl von Passagen, sowie von Aufarbeitungsmethoden und Nachweisverfahren erheblich. Neben etablierten *In-vitro*-Testsystemen finden MCF-7-Zellen auch als Xenograft-Modell Anwendung. (Soule, 1973; Gotthardis und Jordan, 1988; Jager, 1992; Okubo et al., 2001; Sun et al., 2002; Vladusic et al., 2000)

2.7.4 MCF-7-Luciferase (MVLN-C15)

Der im Luciferase-Assay eingesetzte Subklon der estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 wurde mit dem Plasmid pVit-tk-Luc stabil transfiziert. Die 5`-flankierende Region des *Xenopus*-Vitellogenin-A2-Gens (-482 bis -87), die ein ERE und estrogenresponsive Regionen enthält, ist an das Thymidinkinasegen (tk) des Herpes-Simplex-Virus-Promotors gekoppelt. Diese regulatorischen Sequenzen kontrollieren die Expression des Strukturgens der Luciferase. Luciferase kann als Biolumineszenz des enzymkatalytisch angeregten Substrats detektiert werden.
Zur Selektion des stabilen Subklons wurde das Plasmid pAG 60 in die Zellen cotransfiziert. Die bakterielle Aminoglycosid-Phosphotransferase ermöglicht unter Kontrolle des tk-Promotors eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin. (Klein-Hitpaß et al., 1986; Pons et al., 1990)

2.7.5 T-47D

Die als T-47D bezeichnete Zelllinie wurde aus der pleuralen Effusion einer an ductalem Mammakarzinom erkrankten 54-jährigen Patientin isoliert. Nach Keydar et al. enthalten T-47D-Zellen 254 fmol/mg Protein Progesteronrezeptor, 29 fmol/mg Protein Glucocoticoidrezeptor, 17 fmol/mg Protein Estrogenrezeptor und 3 fmol/mg Protein Androgenrezeptor. Der Steroidhormonrezeptorgehalt kann sich in Permanentkultur verändern. (ATCC, 2000; Keydar et al., 1979)

2.7.6 T-47D-Luciferase

Zur Detektion antiandrogenen Wirkpotentials wurde ein Subklon der steroidhormonrezeptorpositiven Brustkrebszellinie T-47D mit dem Plasmid pMamneo-Luc stabil transfiziert und mit Geniticin selektioniert. Das Expressionsplasmid für Luciferase wird unter Kontrolle des MMTV-Promotors exprimiert. Die cytosolische Luciferase kann mithilfe einer Enzymreaktion quantifziert werden. (Guth, 2000)

2.7.7 *Saccharomyces cerevisiae* PKGhAR

Zur Ermittlung androgenen/antiandrogenen Potentials in Hefen wurde ein Expressionssystem in *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Der im Reportergen-

Assay eingesetzte Subklon des Hefestammes wurde mit einem hAR-Expressionsplasmid und einem Reportergenplasmid mit dem androgenresponsiven Promotorelement des MMTV-Promotors und dem β-Galactosidase kodierenden *lacZ*-Gen (pATPGKare-*lacZ*) stabil transfiziert. β-Galactosidase-Aktivität, Maß AR vermittelter Aktivität der Testsubstanz, kann mithilfe einer Enzymreaktion detektiert werden. Die Selektion erfolgt über fehlendes Tryptophan im Minimalmedium. (Purvis et al., 1991; Sohoni and Sumpter, 1998)

2.7.8 *Saccharomyces cerevisiae* hER

Zur Detektion estrogener/antiestrogener Aktivität wurde ein Subklon des Hefestammes *Saccharomyces cerevisiae* mit stabil transfiziertem hERα Expressionsplasmid und einem Reportergenplasmid mit einem estrogenresponsiven Promotorelement, bestehend aus zwei Tandem-Consensus-EREs und dem β-Galactosidase kodierenden *lacZ*-Gen eingesetzt. Die ER-vermittelte Aktivität der Testsubstanz kann als Enzymreaktion der β-Galactosidase Aktivität photometrisch detektiert werden. Permanente Selektion erfolgt über Kultivierung in Minimalmedium. (Routledge and Sumpter, 1996; Wrenn and Katzenellenbogen, 1993)

3 PROBLEMSTELLUNG

Aufgrund ähnlicher biologischer Wirkungen auf endokrine Funktionen werden Verbindungen unterschiedlicher Substanzklassen, natürlichen und anthropogenen Ursprungs, als endokrine Disruptoren zusammengefasst. Die Komplexizität des Hormonsystems bietet vielfältige Angriffspunkte. Für eine Beurteilung, ob eine Verbindung Einfluss auf das endokrine System nehmen kann, sind umfassende Kenntnisse der Substanzen erforderlich. Die klassische instrumentelle Analytik kann hierzu nur einen beschränkten Beitrag leisten.

Für ein wirkstoffbezogenes Screening zur Erfassung hormoneller/antihormoneller Aktivität eignen sich effektive und sensitive *In-vitro*-Testsysteme. Als detektierbare Endpunkte können Proliferationsraten hormonabhängig wachsender Zelllinien, endogene oder transgene Reportergenaktivitäten unter Steroidhormonrezeptor-Kontrolle sowie relative Bindungsaktivitäten am Hormonrezeptor dienen. Zur Verifizierung relevanter Ergebnisse können in deutlich aufwendigeren *In-vivo*-Methoden, neben morphologischen und biometrischen Parametern, ebenfalls biologische Messgrößen zur Erfassung von hormonellem/antihormonellem Potential herangezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten funktionelle Reportergensysteme in Säugerzellen und Hefen zur Anwendung kommen.

Neben der weiterführenden Validierung eines PSA-Assays und Testung neuer Verbindungen in bereits etablierten Systemen (T-47D-Luc, COS-AR-Luc, MCF-7-Luc) lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Etablierung und Validierung von Testsystemen, die eine Quantifizierung endogener Reporter auf mRNA-Ebene mittels kompetitiver RT-PCR ermöglichen. Die unter Kontrolle von Steroidhormonrezeptoren nativ in der Zelle exprimierten endogenen Reportergene bieten den Vorteil, keine genetischen Veränderungen eines artifiziellen Systems zu erfordern. Als Zielgene sollten TRPM-2 und pS2 untersucht werden. TRPM-2 wird in Abwesenheit des physiologischen Hormons induziert und kann in entsprechenden Zellmodellen als Parameter für estrogene/antiestrogene bzw. androgene/antiandrogene Aktivität herangezogen werden. pS2 wird estrogenabhängig exprimiert.

Für ein schnelles und kostengünstiges Screening auf androgene/antiandrogene bzw. estrogene/antiestrogene Aktivität sollten transgene Reportergensysteme in Hefen etabliert werden. Im Vergleich zu Säugerzellen deutlich unempfindlicher gegenüber Fremdstoffen, ermöglichen Hefesysteme Untersuchungen höherer Konzentrationen von Testsubstanzen und können die Testung von Umweltproben ermöglichen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Geeignete *In-vitro*-Testsyteme ermöglichen ein schnelles, effizientes Screening potentieller endokriner Disruptoren. Zur Prüfung auf estrogene/antiestrogene, androgene/antiandrogene Aktivität sind in der Arbeitsgruppe bereits verschiedene Assays etabliert. Für die Quantifizierung endogener Reporter auf mRNA-Ebene standen bisher keine geeigneten Methoden zur Verfügung. Die Etablierung und Validierung dieser Testsysteme war daher Hauptziel der Arbeit.
Weitere Ziele bestanden in der Etablierung transgener Reportergenassays in Hefen mit humanem Estrogen- bzw. Androgenrezeptor sowie der weiterführenden Validierung des PSA-Assays und der Testung ausgewählter Verbindungen in bereits etablierten Testsystemen (T-47D-Luc, COS-AR-LUC, MCF-7-Luc).

4.1 Endogene Reportergenassays

Endogene Reportergene werden unter Kontrolle von Steroidhormonrezeptoren nativ in der Zelle exprimiert. Vorteil endogener Reportergenassays ist, dass es sich um keine artifiziellen Systeme handelt, in dem genetische Veränderungen erforderlich sind. Nachteilig können sich endogene Hintergrundsignale auswirken.

4.1.1 Bestimmung des endogenen Reporters TRPM-2 mittels kompetitiver RT-PCR

RT-PCR ermöglicht die Bestimmung der TRPM-2-Expression auf RNA-Ebene. Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Inkubationsansätze ist die Mitführung eines Standards notwendig. Zunächst wurde β-Actin als **interner endogener Standard** herangezogen. β-Actin wird in den meisten eukaryontischen Zellen konstitutiv exprimiert und als so genanntes House-keeping-Gen bezeichnet.
Es besteht die Möglichkeit der Amplifikation von House-keeping- und Target-Gen in zwei Gefäßen oder im selben Reaktionsansatz.
Um Standard und Zielgen coamplifizieren zu können, müssen beide Amplifikate aufgrund ihrer Länge gelelektrophoretisch gut trennbar sein. Primer beider Gene sollten idealerweise in Länge, Basenzusammensetzung und Schmelztemperatur übereinstimmen, jedoch nicht miteinander interagieren. Ebenfalls sollten nach

erfolgter Amplifikation die DNA-Konzentrationen von Standard- und Zielgen in vergleichbarer Größenordnung liegen.

House-keeping- und Target-Gen weisen häufig verschiedene Amplifikationskinetiken auf, so dass nur die Amplifikat-Konzentrationen eines Gens im linearen Bereich liegen. Unterschiedliche Genexpressionsraten können die Amplifikationseffizienz ebenso beeinflussen wie differierende Anlagerungseigenschaften der Primer und die verschiedene Basenzusammensetzung von Standard- und Zielsequenz. Die Verwendung von House-keeping-Genen ermöglicht somit lediglich eine semiquantitative Aussage. Außerdem ist zu beachten, dass Standard- und Zielgen nicht co-reguliert werden.

Erste semiquantitative RT-PCR-Analysen mit dem House-keeping-Gen β-Actin als internen endogenen Standard lieferten keine verlässlichen Daten zur Quantifizierung der TRPM-2-Expression über mehrere Größenordnungen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Amplifikation von β-Actin gegenüber TRMP-2 bevorzugt stattfindet.

Es wurde davon Abstand genommen, weitere House-keeping-Gene auf die Verwendbarkeit als **internen endogenen Standard** zu prüfen, da sie meist für essentielle Bestandteile des Zellstoffwechsels codieren und mit hoher Wahrscheinlichkeit in stärkerem Maße exprimiert werden als das zu quantifizierende TRPM-2-Gen.

Bei getrennten Ansätzen und aufeinander abgestimmten Amplifikationszyklen spielten Pipettierungenauigkeit der eingesetzten Gesamt-RNA (je 1 µg bei Zielgen und entsprechendem Standard) als zusätzliche Fehlerquelle sowie der sprunghafte Anstieg der Analysenkosten eine Rolle. Da Standard und Probe in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen amplifiziert werden, kann bei schwacher Bandenintensität nicht zwangsläufig auf verminderte Genexpression geschlossen werden, ohne eine gestörte Replikation zu erwägen. Die Verwendung eines **externen endogenen Standards** erfordert ein hohes Maß an Präzision beim Pipettieren und vielfache Wiederholungen, um statistisch sichere Ergebnisse zu erhalten.

Alternativ wurde ein **interner exogener Standard** konzipiert, der sich lediglich durch eine Deletion von der zu untersuchenden Zielsequenz unterscheidet. Diese Sequenzen stellen ideale Standards dar, da sie mit den gleichen Primern amplifiziert werden wie die Zielsequenz. Um eine effiziente Amplifikation von Standard und Target zu gewährleisten, sollten sich die Längen der Sequenzen nicht zu stark unterscheiden, jedoch elektrophoretisch gut trennbar sein. Aufgrund der Ähnlichkeit

beider Sequenzen kann davon ausgegangen werden, dass keine bevorzugt amplifiziert wird. Da Standard und Target in einem Reaktionsgefäß coamplifiziert werden, ist der systematische Fehler gering.

4.1.1.1 Konstruktion eines internen exogenen Standards zur Quantifizierung des endogenen Reportergens TRPM-2

In Abbildung 29 sind in komprimierter Darstellung die wichtigsten Schritte zur Konstruktion des exogenen Standards dargestellt.

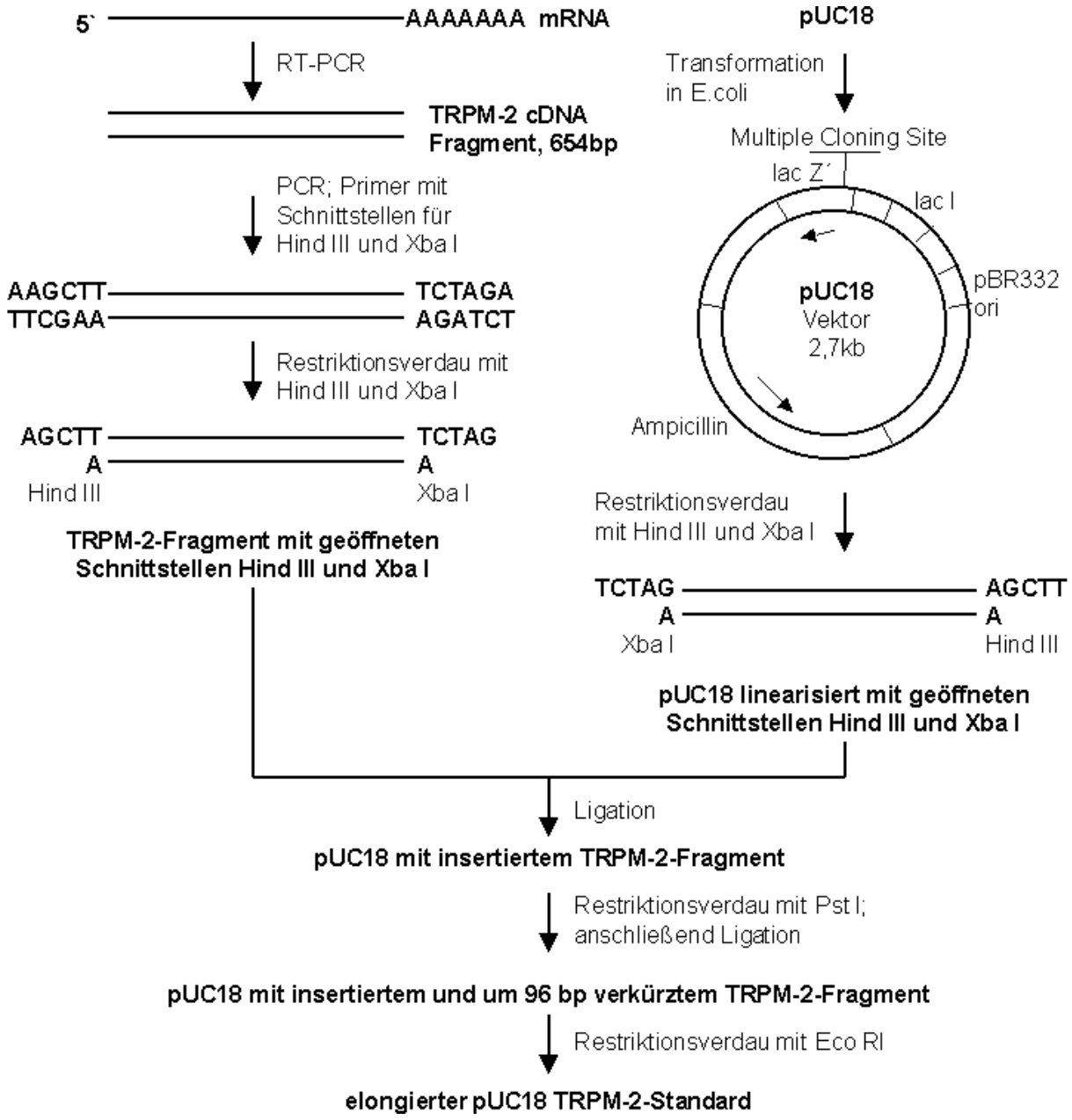


Abbildung 29: Konstruktion eines internen exogenen TRPM-2-Standards

Als Ausgangsplasmid diente der kommerziell verfügbare Vektor pUC18. pUC-Plasmide enthalten ein Ampicillinresistenzgen, die „origin of replication“, zusammen mit einem Abschnitt des E.coli-*lacZ*-Gens (*lacZ*`) und eine „Multiple Cloning Site“. Der Vektor wurde in E.coli $DH_{5\alpha}$ transformiert, amplifiziert und mittels Maxipräparation aufgereinigt. Durch Restriktionsverdau mit Hind III und Xba I wurde der Vektor für die Ligation mit dem TRPM-2-Insert geöffnet.

Aus Aufarbeitungen der Gesamt-RNA von LNCaP-Zellen erfolgte mittels RT-PCR die Amplifikation einer TRPM-2-Sequenz von 654 bp (Abbildung 30).

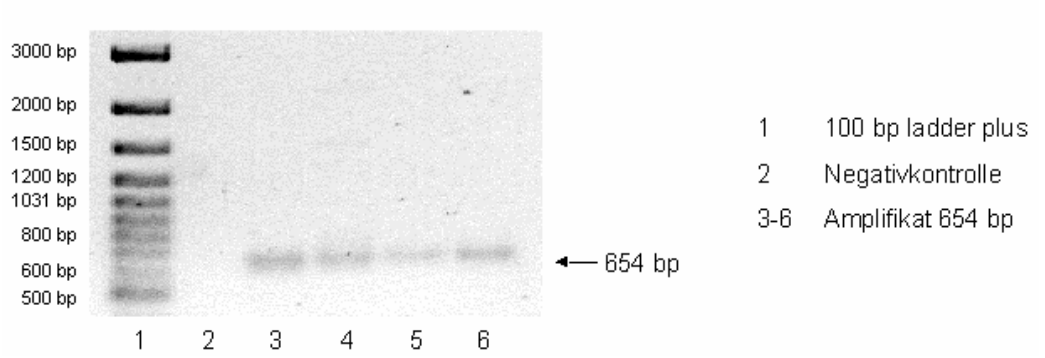


Abbildung 30: TRPM-2-Amplifikat aus Gesamt-RNA

Mit einem verlängerten Primer der zusätzlichen Basenabfolge für Restriktionsschnittstellen Hind III und Xba I wurden dem Amplifikat durch weitere PCR-Amplifikation Schnittstellen angefügt. Um die TRPM-2-Sequenz mit korrekter 5`-3`-Orientierung in den Vektor klonieren zu können, ist die Lage der richtigen Restriktionsschnittstelle am entsprechenden Primer entscheidend. Anfügen der Schnittstellen, Schneiden der aufgereinigten Sequenz mit den Enzymen Hind III und Xba I und erneute gelelektrophoretische Aufreinigung ermöglichen die Ligation mit dem ebenfalls mit Hind III und Xba I geschnittenen und elektrophoretisch aufgereinigten Vektor (Abbildung 31).

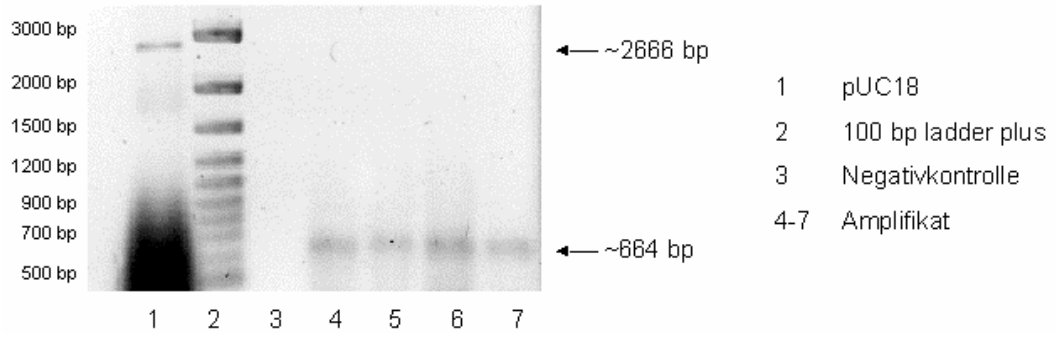


Abbildung 31: Restriktionsverdau des schnittstellenverlängerten Amplifikats und des pUC18-Plasmids mit Hind III und Xba I

Der Ligationsansatz wurde direkt in E.coli $DH_{5\alpha}$ transformiert und amplifiziert. Nach Minipräparation erfolgte die Überprüfung des Insert-Einbaus durch Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen (Abbildung 32).

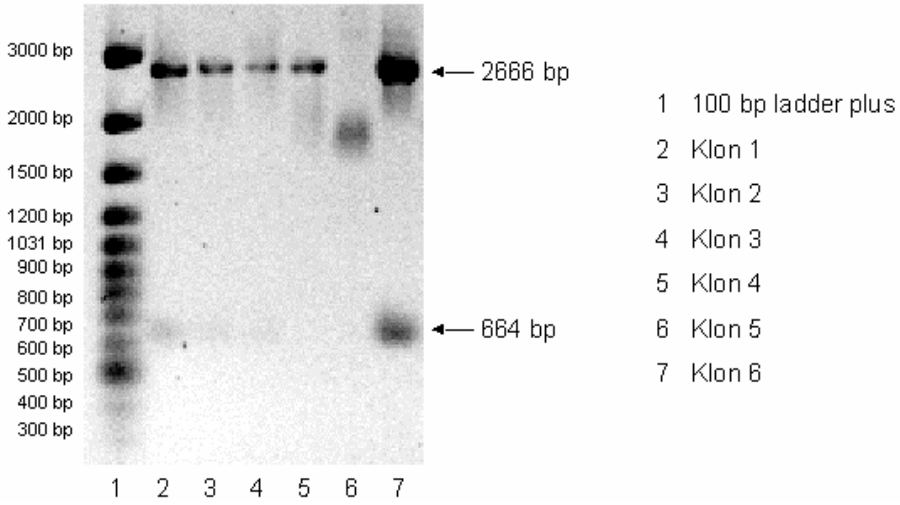


Abbildung 32: Hind-III- und Xba-I-Restriktion des Vektors pUC18 mit insertiertem TRPM-2-Fragment

Der erfolgreiche Einbau des Inserts wurde eindeutig für die Klone 1 bis 3 und 6 nachgewiesen.

Mittels Pst-I-Verdau wurden 96 bp aus dem insertierten TRPM-2-Fragment herausgeschnitten. Das religierte Plasmid wurde direkt in E.coli $DH_{5\alpha}$ transformiert. Über Hind-III- und Xba-I-Verdau erfolgte die Kontrolle des amplifizierten und aufgereinigten Ligationsansatzes (Abbildung 33). Das deletierte Insert umfasst nur noch 558 bp.

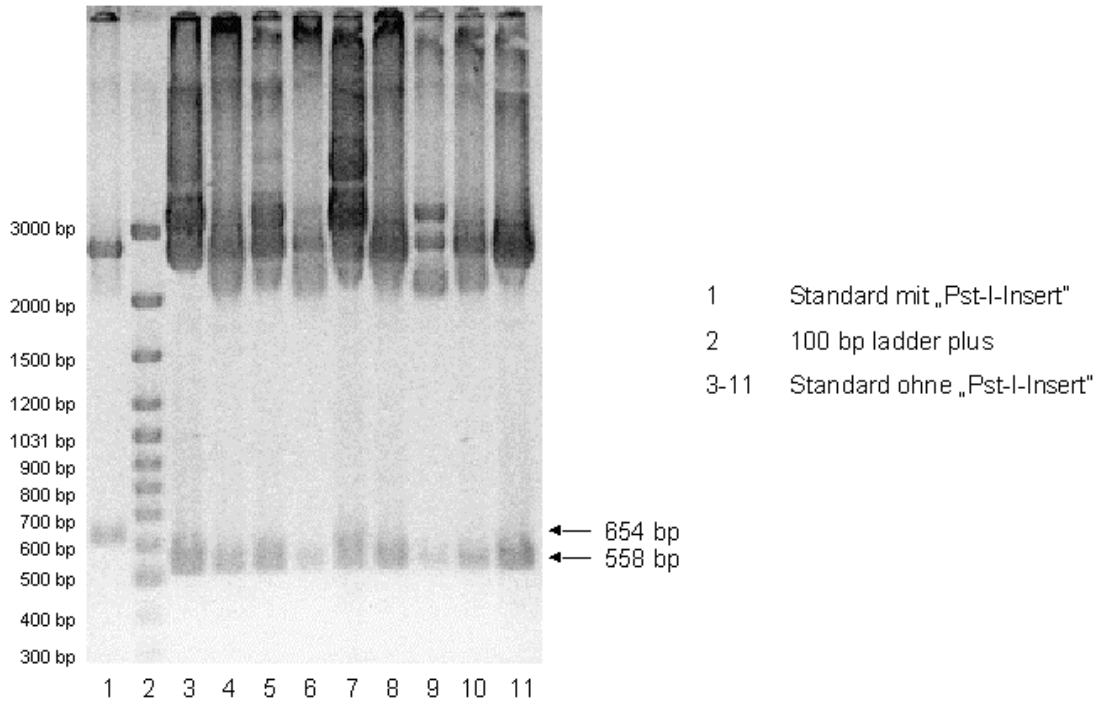


Abbildung 33: Hind-III- und Xba-I-Restriktion des Vektors pUC18 mit insertiertem, deletiertem TRPM-2-Fragment

Der Vektor pUC18 TRPM-2 wurde mit EcoR I linearisiert und zur PCR eingesetzt. Bei Überprüfung des elongierten Plasmids mittels PCR wurden insgesamt nur sehr schwache Banden von teilweise unspezifischer Länge erzielt. Es lag die Vermutung nahe, dass die Primer bevorzugt andere Stellen des Vektors binden. Innerhalb des deletierten TRPM-2-Inserts wurde ein neues Primerpaar gewählt. Infolgedessen umfasst das Amplifikat der TRPM-2-Sequenz 556 bp und der deletionsmutierte Standard 460 bp.

Ein Vorteil gegenüber synthetischen Standards liegt in der schnellen Verfügbarkeit des Standards durch erneute Amplifikation des modifizierten pUC18-Plasmids in E.coli. Voraussetzung ist eine gleichmäßige Effizienz der RT-Reaktion, da diese bei Verwendung von DNA-Standards unberücksichtigt bleibt.

4.1.1.2 Etablierung und Validierung eines endogenen TRPM-2-Reportergenassays zur Bestimmung von androgenem/antiandrogenem Potential in T-47D-Zellen

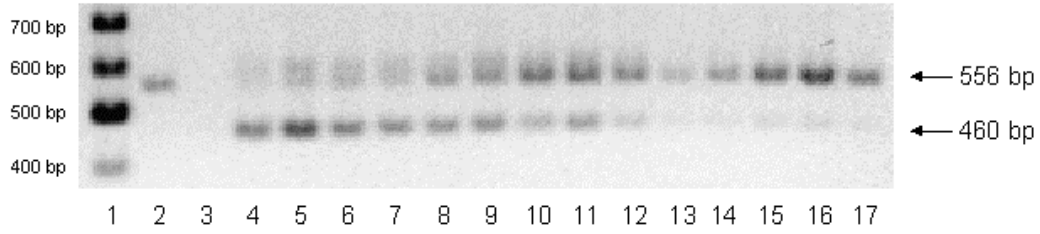
Die für die Standardgenerierung verwendete LNCaP-Prostatakrebszelllinie enthält eine Mutation in der LBD des AR, die dem Rezeptor eine signifikant gesteigerte Affinität für progestagene und estrogene Steroide verleiht. Daneben üben Antiandrogene stimulative Effekte auf die Proliferation von LNCaP-Zellen aus. Um mögliche Effekte dieser Mutation zu umgehen und eine bessere Vergleichbarkeit mit Ergebnissen bereits etablierter Testsysteme zu erreichen, wurden die Untersuchungen mit T-47D-Zellen durchgeführt. Die Brustkrebszelllinie enthält endogen neben Androgenrezeptoren auch Progesteron-, Glucocorticoid- und Estrogenrezeptoren. (Horoszewicz et al., 1983; Keydar et al., 1979; van Steenbrugge et al., 1989; Veldscholte et al., 1990)

Bei der Etablierung eines Testsystems muss die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass ligandinduzierte Interaktionen mit allen Steroidhormonrezeptoren und anderen Signalwegen die endogene TRPM-2-Expression beeinflussen können. Das erhaltene Testsystem eignet sich daher nicht ohne weiteres, agonistische/antagonistische Effekte am AR allein zu detektieren. Vielmehr beschreibt es die Wirkung auf das gesamte Zellmodell.

Die zur Etablierung des endogenen Reportergenassays herangezogenen T-47D-Zellen wurden exakt zwanzig Stunden serumfrei mit den Testsubstanzen inkubiert. 1 µg RNA der Gesamt-RNA-Aufarbeitungen wurde pro Reaktionsansatz zur RT-PCR eingesetzt.

In Gesamt-RNA-Aufarbeitungen können Spuren genomischer DNA enthalten sein. Bei der PCR können dadurch Enzymaktivität und Primerpotential an unerwünschte Amplifikationen verloren gehen. Um die Mitamplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurde das eingesetzte µg Template der Gesamt-RNA-Aufarbeitung zunächst vor der RT-PCR mit DNase verdaut. Durch die Hitzebehandlung bei der Inaktivierung des Enzyms entstanden größere Fehler als durch Anwesenheit möglicher Spuren genomischer DNA. Aus diesem Grund wurde im Folgenden vom DNase-Verdau abgesehen.

TRPM-2-Konzentrationen verändern sich innerhalb einer Zelllinie - abhängig von der Passagezahl - mitunter beträchtlich. Eichung des Standards auf entsprechende RNA-Aufarbeitungen ist zur Quantifizierung endogener Reportergene unerlässlich. Angestrebt wird eine vergleichbare Bandenintensität von Probe und Standard. Die Eichung erfolgt durch Zufügen steigender Konzentration des exogenen Standards zu einer konstanten Menge Gesamt-RNA (Abbildung 34).



1	100 bp ladder plus
2	nur Template
3	Negativkontrolle
4+5	Template + Standard 1:5 000
6+7	Template + Standard 1:10 000
8+9	Template + Standard 1:15 000
10+11	Template + Standard 1:25 000
12+13	Template + Standard 1:50 000
14+15	Template + Standard 1:75 000
16+17	Template + Standard 1:100 000

Abbildung 34: Amplifikat von TRPM-2-Sequenz und exogenem Standard mittels RT-PCR

Vergleichbare Banden-Intensitäten von Probe und Standard konnten bei einer 1:15 000-Verdünnung des Standards detektiert werden. Wesentlich ist anzumerken, dass dieses nur auf die verwendete Zelllinie, die Passage und den entsprechenden Inkubationsansatz zutrifft. Die durchschnittlich verwendete TRPM-2-Standard-Konzentration betrug für Aufarbeitungen von T-47D-Zellen 40,4 ng elongierte Plasmid-DNA pro Reaktionsansatz.

Für die Auswertung der Ergebnisse, von denen eine Messreihe exemplarisch in Abbildung 35 dargestellt ist, wurde die mittels Lumi-Imager quantifizierte Bandenintensität der Probe durch die Intensität des Standards dividiert.

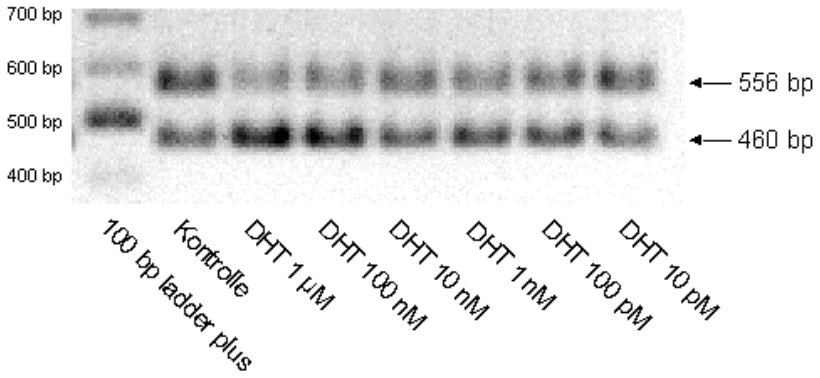


Abbildung 35: TRPM-2-Expression in T-47D-Zellen nach Inkubation mit Dihydrotestosteron (DHT)

Inkubation mit dem physiologischen Hormon Dihydrotestosteron (DHT) bewirkte die erwartete dosisabhängige Unterdrückung der TRPM-2-Expression über mehrere Größenordnungen (Abbildung 36). Hohe DHT-Konzentrationen von 1 µM reprimieren die TRPM-2-Expression auf 34 %, während niedrige Konzentrationen von 10 pM eine 100%ige Induktion bis auf das Niveau der Kontrolle bewirken. Bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergibt sich bei rezeptorvermittelten Prozessen ein typisch sigmoidaler Kurvenverlauf. Ermittelt wurde ausschließlich der lineare Bereich der TRPM-2-Repression. Sowohl oberes als auch unteres Plateau sind nicht durch Messergebnisse belegt, da der Assay sehr kostenintensiv und aufwendig ist.

Die halbmaximale Repression im angegebenen Messbereich liegt im Bereich der physiologischen DHT-Konzentration von 10 nM.

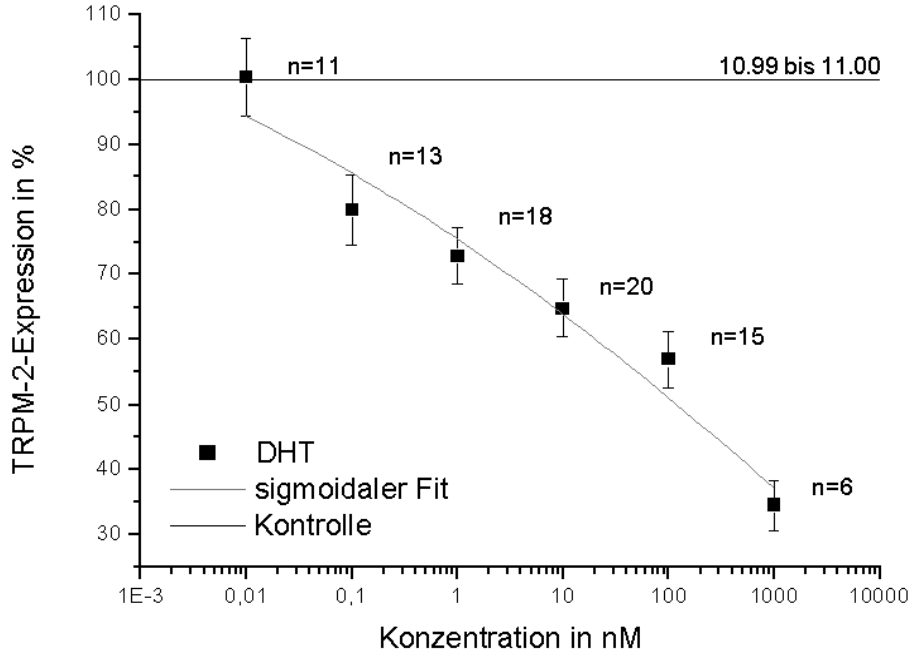


Abbildung 36: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays in T-47D-Zellen mittels des physiologischen Agonisten Dihydrotestosteron (DHT)

Die weitergehende Validierung des endogenen Reportergenassays erfolgte durch Kompetitionsexperimente mit etablierten Androgenrezeptorantagonisten. Die zu hemmende DHT-Konzentration wurde anhand des Kurvenverlaufs gewählt. Erforderlich ist eine Konzentration, bei der die rezeptorvermittelte Repression genügend groß, gleichzeitig aber der Sättigungsbereich des Rezeptors bzw. die maximale TRPM-2-Unterdrückung noch nicht erreicht ist. Für die Coinkubationen wurde eine DHT-Konzentration knapp unterhalb des sensitiven Wendebereichs der Kurve von 10 nM gewählt.

Im Säulendiagramm sind jeweils die Einzelergebnisse von DHT und den Coinkubationsexperimenten dargestellt. Als Bezugspunkt wurde die Kontrolle mit 100 % angenommen. Zum direkten Vergleich der Testsubstanzen wurden die Ergebnisse der Einzelmessungen in die Konsensuskurve übertragen, wobei 10 nM DHT als Bezugsgröße diente. Da der Kontrollwert wie auch der Wert der durch 10 nM DHT induzierten TRPM-2-Repression mit einem Fehler behaftet ist, können die Messreihen – abhängig vom verwendeten Bezugspunkt - leicht voneinander abweichen. Für alle Messreihen auf Basis der RT-PCR wurden Mittelwerte und Standardfehler einzelner Messpunkte berechnet. Aufgrund der Kurvenverläufe und großen Fehler der mittels RT-PCR detektierten Messwerte ergab der Vertrauensbereich des 95. Percentils als Signifikanzschwelle keinen Sinn. Als

signifikant antagonistisch wird die Konzentration einer Testsubstanz betrachtet, deren Wert einschließlich Fehler außerhalb des Fehlerbereichs der zu antagonisierenden DHT-Konzentration liegt.

Zur Validierung des Testsystems wurde Hydroxyflutamid, der Metabolit des klinisch eingesetzten Flutamids, verwendet. Der potente Androgenrezeptorantagonist antagonisiert dosisabhängig die durch DHT unterdrückte Genantwort (Abbildung 37 und Abbildung 38). Als signifikant kann jedoch erst die Coinkubation von 10 µM Hydroxyflutamid mit 10 nM DHT angesehen werden.

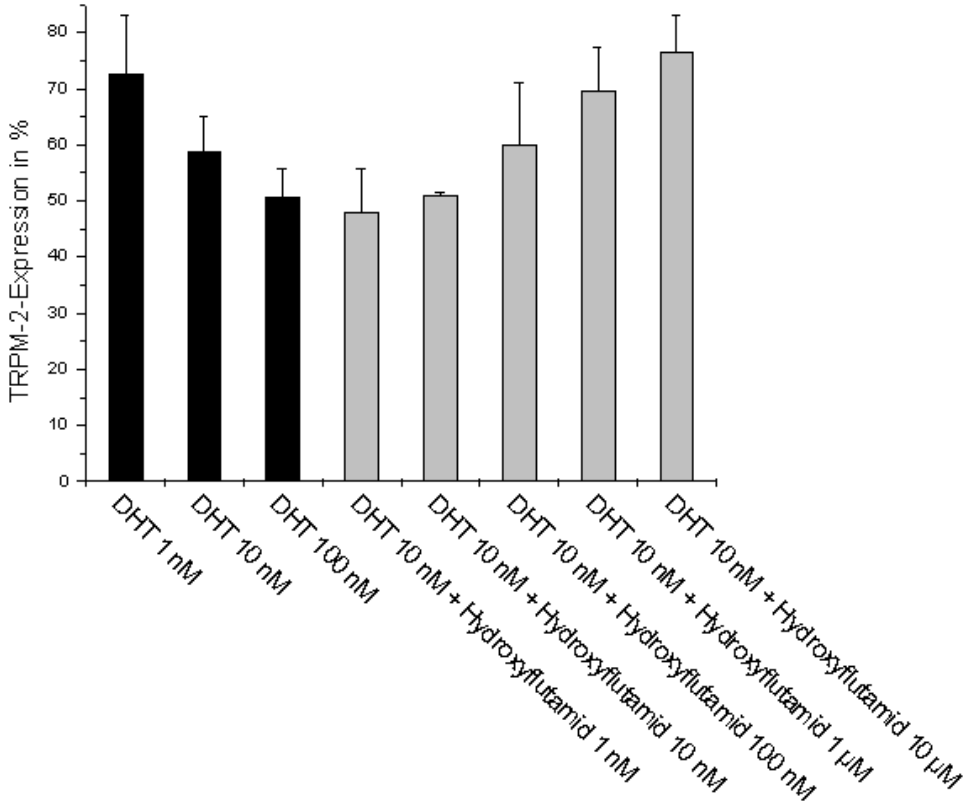


Abbildung 37: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 10 nM DHT reprimierten TRPM-2-Expression durch Hydroxyflutamid (Darstellung der Einzelergebnisse)

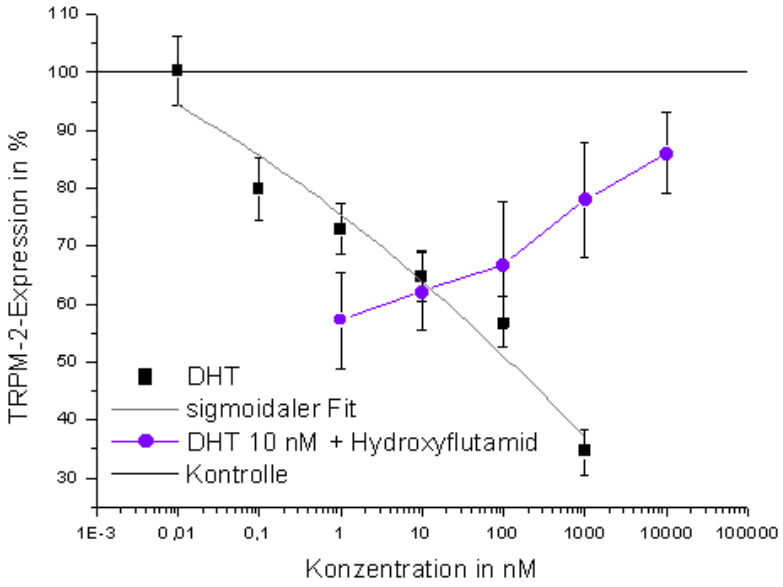


Abbildung 38: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 10 nM DHT reprimierten TRPM-2-Expression durch Hydroxyflutamid (auf Konsensuskurve übertragen)

Das *in vivo* und *in vitro* als Antiandrogen beschriebene systemische Herbizid Linuron antagonisiert dosisabhängig die durch DHT unterdrückte Genexpression von TRPM-2. Bei äquimolarer Konzentration wird die Repression fast maximal antagonisiert. 10 nM Linuron antagonisieren die durch 10 nM DHT reprimierte TRPM-2-Expression signifikant (Abbildung 39 und Abbildung 40).

Das Nichterreichen des Kontrollwertes von 100 % kann nicht zwangsläufig auf ein schwächeres antagonistisches Potential zurückgeführt werden. Für verschiedene Verbindungen ist ein stabilisierender Effekt auf die mRNA beschrieben. Häufig trifft dies auf den physiologischen Liganden zu. Yeap et al. beschreiben z. B. die Stabilisierung der Androgenrezeptor-mRNA durch DHT. Hingegen berichten Staton et al. von destabilisierenden Effekten einiger Verbindungen auf bestimmte mRNA. Es scheint demzufolge möglich, dass destabilisierende Effekte von Testverbindungen ein Absinken der mRNA-Konzentrationen bei höheren Substanz-Konzentrationen verursachen und der Kontrollwert von 100 % nicht erreicht wird. (Staton et al., 2000; Yeap, et al., 1999)

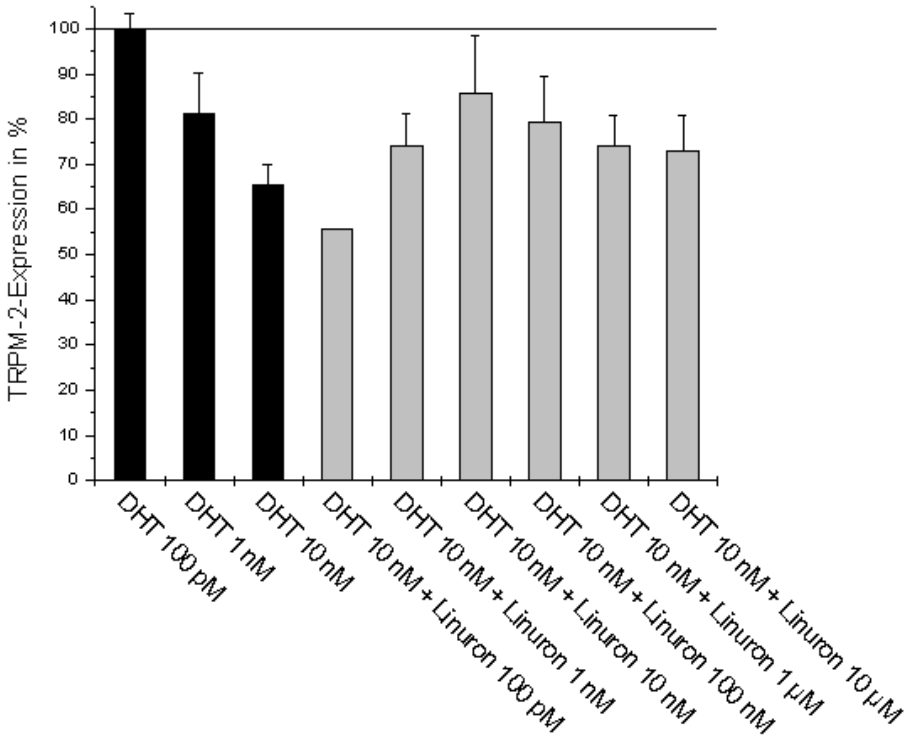


Abbildung 39: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 10 nM DHT reprimierten TRPM-2-Expression durch Linuron (Darstellung der Einzelergebnisse)

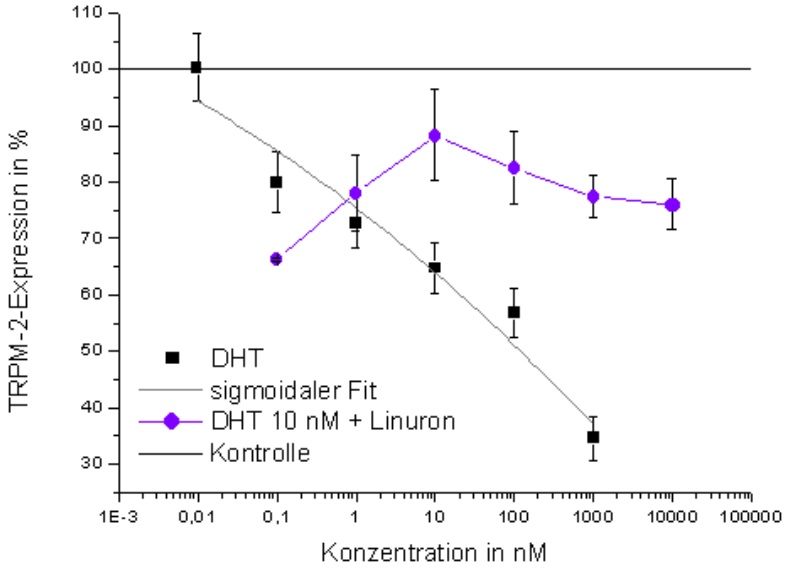


Abbildung 40: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 10 nM DHT reprimierten TRPM-2-Expression durch Linuron (auf Konsensuskurve übertragen)

Die durch 10 nM DHT unterdrückte TRPM-2-Expression wird bei Coinkubation des DDT-Metaboliten p,p`-DDE dosisabhängig antagonisiert. Das endogene Reportergen wird durch 1 µM p,p`-DDE in Coinkubation mit 10 nM DHT vollständig induziert (Abbildung 41). Bei Übertragung der Einzelergebnisse in die Konsensuskurve von

DHT kann die Coinkubation von 100 nM p,p`-DDE mit 10 nM DHT bereits als signifikant betrachtet werden (Abbildung 42).

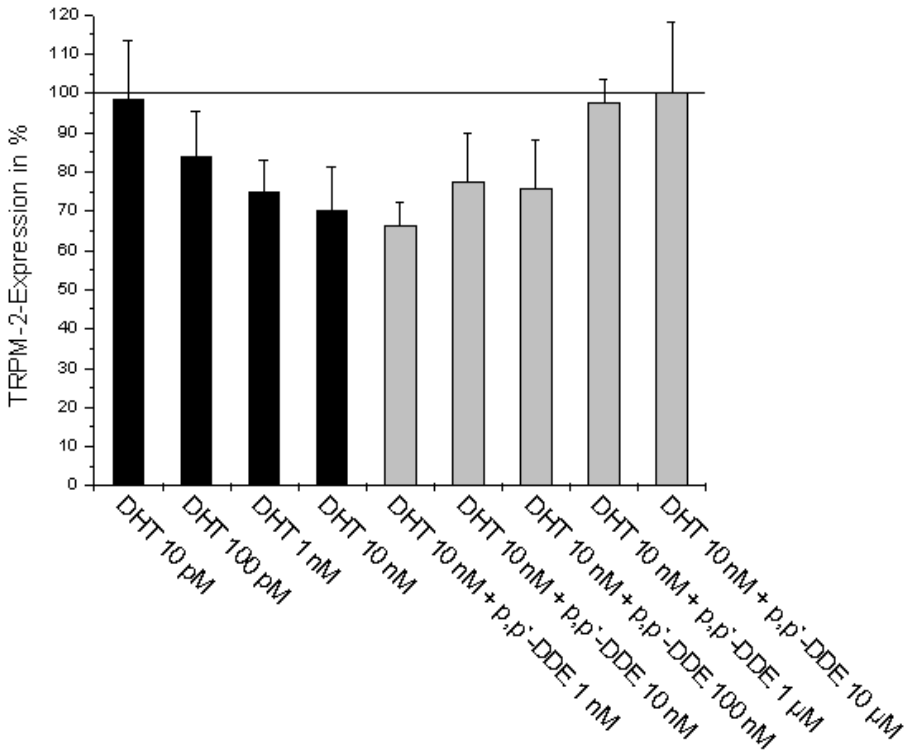


Abbildung 41: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 10 nM DHT reprimierten TRPM-2-Expression durch p,p`-DDE (Darstellung der Einzelergebnisse)

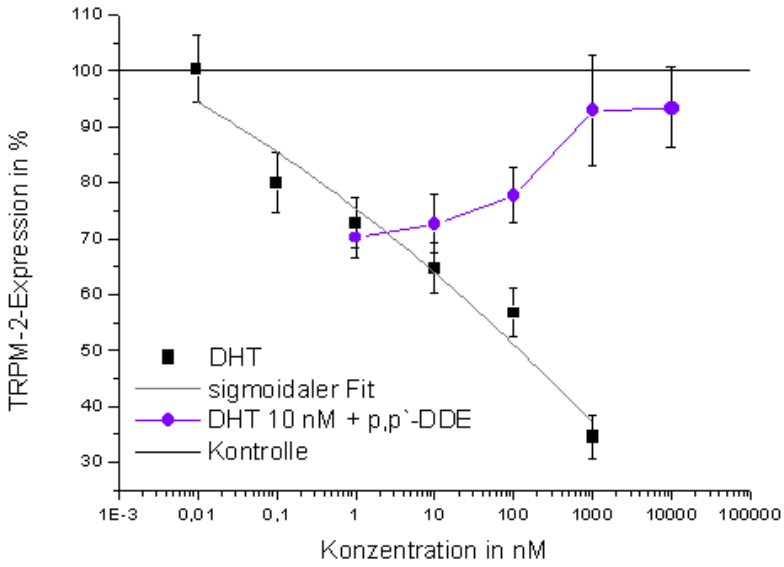


Abbildung 42: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 10 nM DHT reprimierten TRPM-2-Expression durch p,p`-DDE (auf Konsensuskurve übertragen)

Die Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays anhand des physiologischen Hormons DHT und der drei etablierten Antiandrogene

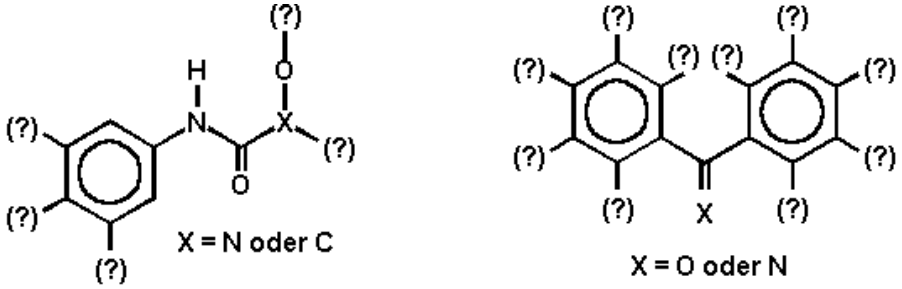
Hydroxyflutamid, Linuron und p,p`-DDE war somit erfolgreich. Das Testsystem kann in T-47D-Zellen als etabliert angesehen werden und steht für Untersuchungen potentieller Androgene/Antiandrogene zur Verfügung.

Da die als 100 % angenommene Kontrolle wie auch der Wert der 10 nM DHT-Inkubation mit einem Fehler behaftet sind, ergeben die Auswertungen der Messreihen - abhängig vom verwendeten Bezugspunkt - leicht abweichende Ergebnisse.

In dem verwendeten Testsystem erwies sich Linuron als potentestes Antiandrogen. Auf die Konsensuskurve bezogen, antagonisiert bereits 1 nM Linuron die durch 10 nM DHT reprimierte TRPM-2-Expression signifikant, während bei den Einzelergebnissen die Signifikanzschwelle bei 10 nM Linuron in Coinkubation mit 10 nM DHT überschritten wird. p,p`-DDE antagonisiert die durch 10 nM DHT induzierte TRPM-2-Repression signifikant im Bereich von 100 nM (auf Konsensuskurve bezogen) bzw. 1 µM (Einzelergebnisse). Der Kurvenanstieg der Repressionsantagonisierung von Linuron erfolgt bei einer um zwei Zehnerpotenzen geringeren Konzentration als bei p,p`-DDE. Aufgrund großer Fehlerbereiche der Coinkubationsexperimente von DHT mit Hydroxyflutamid kann für Hydroxyflutamid eine signifikante Antagonisierung erst bei 10 µM angegeben werden.

4.1.1.3 Untersuchungen des androgenen/antiandrogenen Potentials ausgewählter Verbindungen mittels endogenen TRPM-2-Reportergenassays in T-47D-Zellen

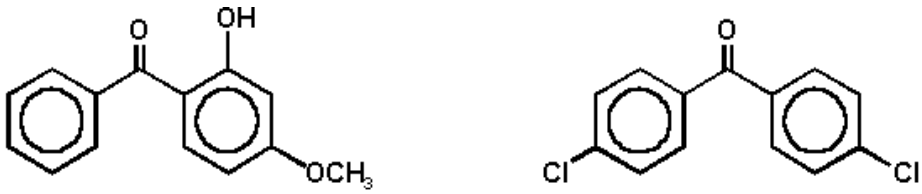
Bisher identifizierte nichtsteroidale Antiandrogene können aufgrund ihrer Struktur in zwei Gruppen eingeteilt werden. Mußler entwickelte zwei mögliche Leitstrukturen, denen Analoga des Phenylharnstoffs bzw. Benzophenons zugrunde liegen. Die Konsensusstrukturen nichtsteroidaler Antiandrogene sind in Abbildung 43 dargestellt. (Mußler, 1999)



Phenylharnstoff-Analogon Benzophenon-Analogon

Abbildung 43: Leitstrukturen nichtsteroidaler Antiandrogene (Mußler, 1999)

Anhand der Leitstrukturen wurden in der Arbeitsgruppe über online-Strukturdatenbank Beilstein-Crossfire bereits weitere strukturähnliche Verbindungen identifiziert. Im endogenen TRPM-2-Reportergenassay sollten die Benzophenon-Analoga Oxybenzon und p,p`-Dichlorbenzophenon untersucht werden.



Oxybenzon p,p`-Dichlorbenzophenon

Abbildung 44: Benzophenon-Analoga

Oxybenzon

Oxybenzon (2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon) ist ein UV-Absorber mit weiter Verbreitung in Medizin, Kosmetik und Industrie als Sonnenschutz und zur Erhöhung der Lichtstabilität. Mit einem Absorptionsspektrum im Bereich von 200 bis 350 nm bietet es Schutz vor UVA- und UVB-Strahlen. Schlumpf et al. zeigten für Oxybenzon proliferatives Potential und Induktion des pS2-Proteins in MCF-7-Zellen. Im Uterotrophen Assay ist Oxybenzon bei viertägiger oraler Applikation von 1,525 mg/kg KG/Tag als aktiv beschrieben. Bei schneller dermaler Resorption sind 2,4-Dihydroxybenzophenon und 2,2`-Dihydroxy-4-methoxybenzophenon als Hauptmetaboliten im Plasma zu finden, während 2,3,4-Trihydroxybenzophenon, gefolgt von 2,4-Dihydroxybenzophenon, den Hauptmetaboliten in Leber, Niere, Milz und Hoden darstellt. Hepatocyteninkubation mit Oxybenzon bewirkt eine konzentrations- und zeitabhängige Abnahme der Zellviabilität, begleitet vom Verlust intrazellulärer ATP- und Adenin-Nucleotid-Quellen.

Für die plasmagebundenen Metaboliten 2,4-Dihydroxybenzophenon und 2,2`-Dihydroxy-4-methoxybenzophenon ist konzentrationsabhängig die kompetitive Verdrängung von 17β-Estradiol am ERα beschrieben. Während alle drei Metaboliten die Proliferation in MCF-7-Zellen fördern, konnten Nakagawa und Suzuki für Oxybenzon keine proliferationsfördernde Wirkung nachweisen. (Nakagawa and Suzuki, 2002; Okereke et al., 1994; Schlumpf et al., 2001)

Befunde einer *In-vivo*-Studie des „National Toxicological Programme“ der USA (NTP-Studie TOX-21, 1992) weisen auf ein antiandrogenes Potential von Oxybenzon hin. Eine dreizehnwöchige Studie zeigte bei Ratten mit oraler Applikation von 50 000 ppm Oxybenzon über das Futter sowie bei Mäusen mit dermaler topischer Applikation von 22 bis 200 mg/kg KG/Tag in allen getesteten Dosen eine reduzierte Spermienzahl. Bei weiblichen Ratten wurde eine Zyklusverlängerung nach oraler Applikation beobachtet. Daston et al. konnten bei dermaler topischer Applikation von bis zu 400 mg/kg KG/Tag Oxybenzon an Mäusen keine Effekte am männlichen Reproduktionstrakt detektieren. (Datson et al., 1993)

In *In-vitro*-Untersuchungen konnte Guth für Oxybenzon antiandrogene Wirkung im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen und im PSA-Assay zeigen. Der Nachweis potentieller antiandrogener Wirkung in dem etablierten endogenen TRPM-2-Reportergenassay war daher ebenfalls von Interesse. (Guth, 2000)

Im verwendeten Testsystem erwies sich Oxybenzon als potentes Antiandrogen. Bereits 10 nM Oxybenzon antagonisieren die durch 10 nM DHT reprimierte TRPM-2-Expression signifikant. 10 µM Oxybenzon induzierten die durch 10 nM DHT unterdrückte Genantwort zu 100 % (Abbildung 45 und Abbildung 46). Die Ergebnisse bestätigen die von Guth ermittelte antiandrogene Aktivität von Oxybenzon im transienten Transaktivierungsassay und im PSA-Assay. (Guth, 2000)

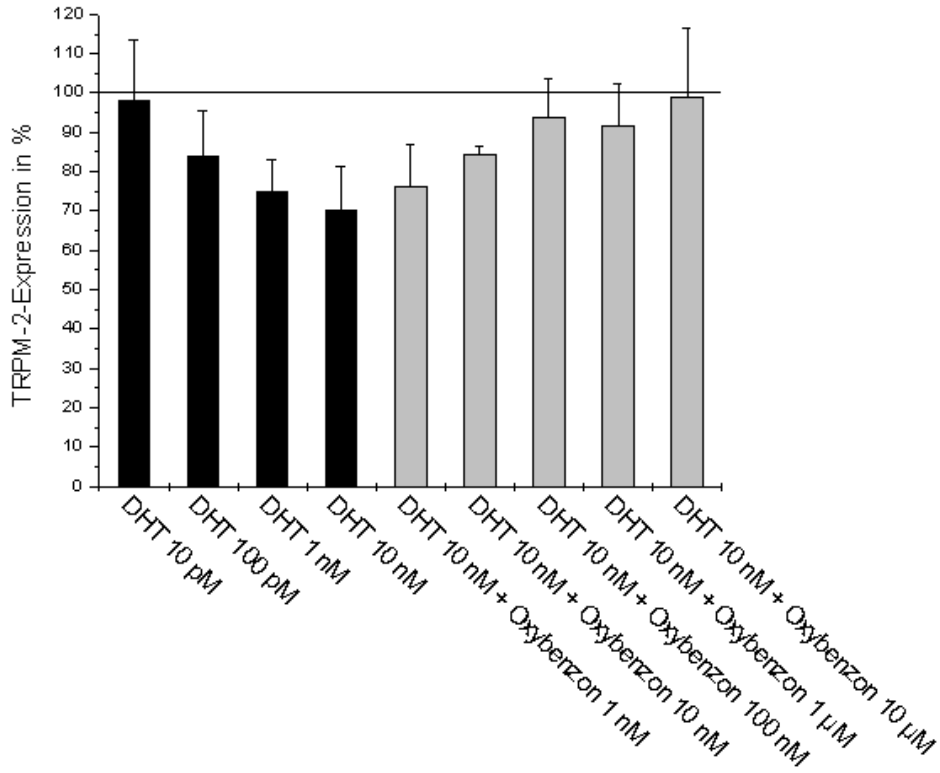


Abbildung 45: Antiandrogene Aktivität von Oxybenzon im endogenen TRPM-2-Reportergenassay (Darstellung der Einzelergebnisse)

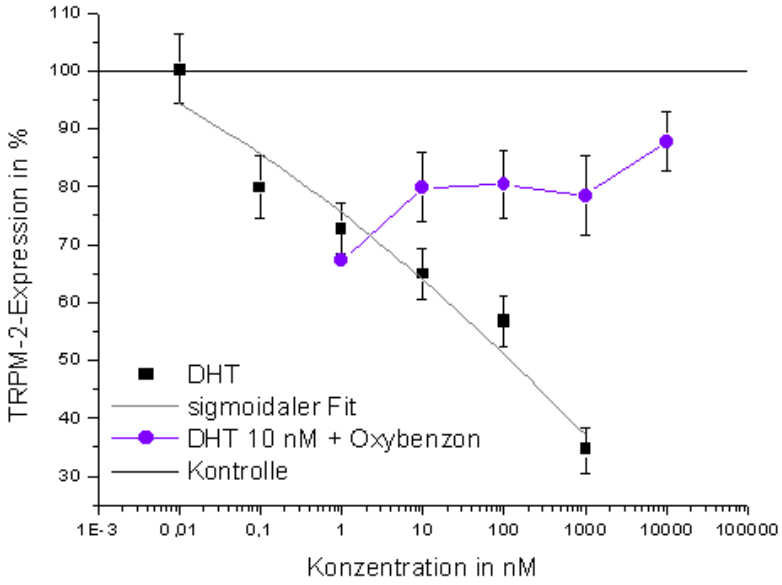


Abbildung 46: Antiandrogene Aktivität von Oxybenzon im endogenen TRPM-2-Reportergenassay (auf Konsensuskurve bezogen)

p,p`-Dichlorbenzophenon

Das von Guth im transienten Transaktivierungsassay und PSA-Assay auf antiandrogenes Potential getestete p,p`-Dichlorbenzophenon sollte ebenfalls im endogenen TRPM-2-Reportergenassay untersucht werden. (Guth, 2000)

Studien zur Chlorierung von Sonnenschutzfiltern in gechlortem Badewasser zeigten, dass Oxybenzon in Wasser bei RT und Chlor-Konzentrationen von 5 und10 ppm binnen 30 Minuten chloriert wird. Bei 5 ppm wurden unter diesen Bedingungen 5 % der Ausgangssubstanz, bei 10 ppm 10 % in 2- und/oder 5-Position chloriert. (BgVV, persönliche Mitteilung, 1999)

Das US Government Printing Office beschreibt p,p`-Dichlorbenzophenon als einen Metaboliten des Pestizids Dicofol in Ratten, während Höll p,p`-Dichlorbenzophenon als Zerfallsprodukt von Dicofol nachweisen konnte. (US Government Printing Office, 1978; Höll, persönliche Mitteilung, 2002)

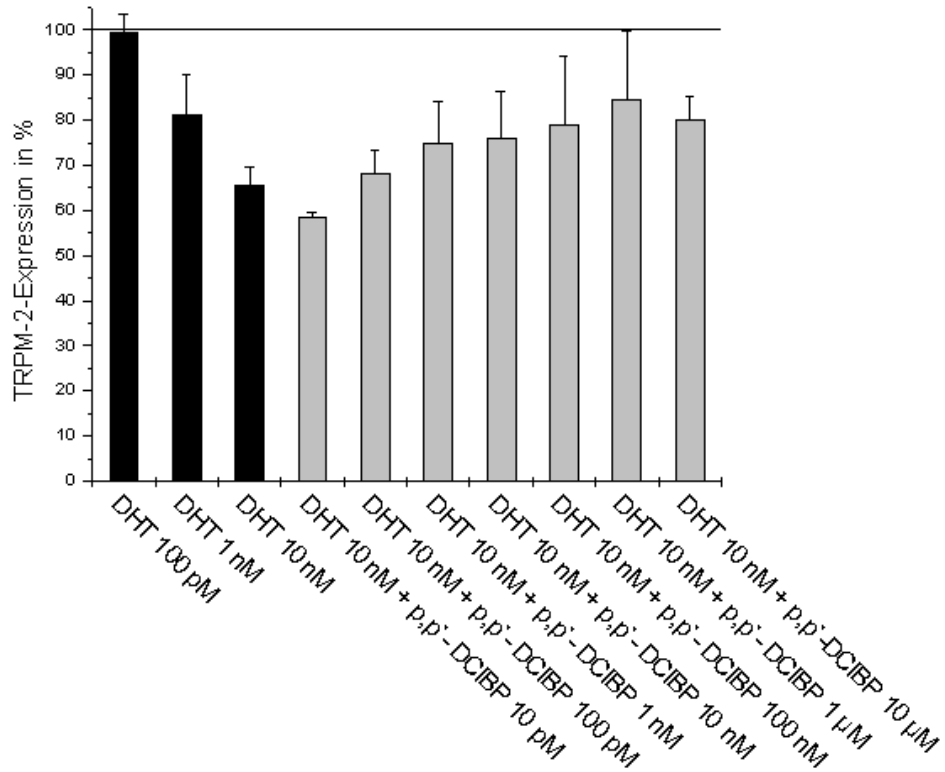


Abbildung 47: Antiandrogenes Potential von p,p`-Dichlorbenzophenon (p,p`-DClBP) im endogenen TRPM-2-Reportergenassay (Darstellung der Einzelergebnisse)

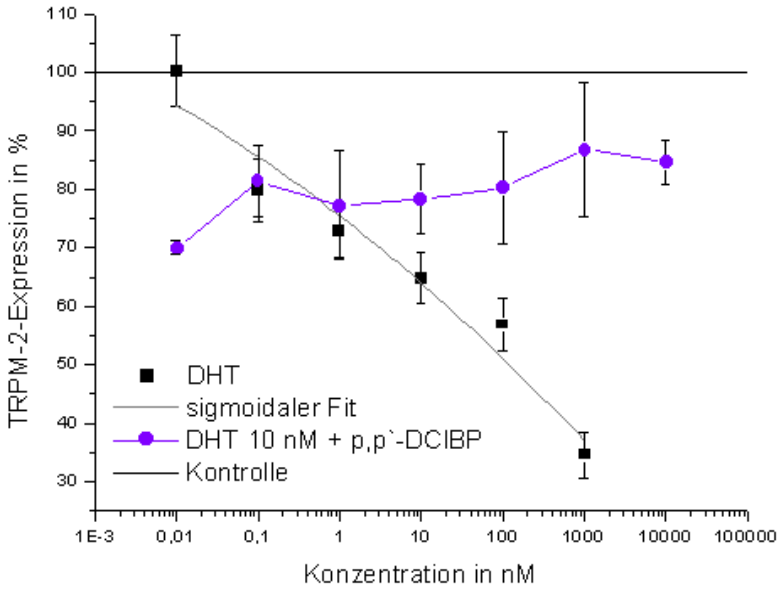


Abbildung 48: Antiandrogenes Potential von p,p`-Dichlorbenzophenon (p,p`-DClBP) im endogenen TRPM-2-Reportergenassay (auf Konsensuskurve bezogen)

p,p`-Dichlorbenzophenon antagonisiert im endogenen Reportergenassay dosisabhängig die DHT-bedingte TRPM-2-Repression. Als signifikant antagonistisch kann eine p,p`-Dichlorbenzophenon-Konzentration von 1 µM betrachtet werden, deren Fehler außerhalb des Fehlerbereichs der zu antagonisierenden TRPM-2-Repression von 10 nM DHT liegt (Abbildung 47 und Abbildung 48). Somit konnte im endogenen TRPM-2-Assay antiandrogenes Potential der Testsubstanz nachgewiesen werden.

4.1.1.4 Etablierung und Validierung eines endogenen TRPM-2-Reportergenassays zur Bestimmung von estrogenem/antiestrogenem Potential in MCF-7-Zellen

Die Etablierung des TRPM-2-Assays zur Untersuchung von estrogenem/antiestrogenem Potential erfolgte in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Die Zelllinie scheint für den Assay geeignet, da die Induktion von TRPM-2 in MCF-7-Zellen *in vivo* in ovarektomierten weiblichen Nacktmäusen durch Unterlassung einer Estradiolbehandlung beschrieben ist. Zudem berichten Chen et al. von einer Erhöhung der TRPM-2-Induktion auf mRNA-Ebene durch das Antiestrogen Tamoxifen in MCF-7-Zellen. (Chen et al., 1996; Kyprianou et al., 1991)

Die herangezogenen Zellen wurden exakt zwanzig Stunden serumfrei mit den Testsubstanzen inkubiert. Für die RT-PCR-Einzelreaktionen in MCF-7-Zellen wurde analog den Untersuchungen in T-47D-Zellen 1 µg Gesamt-RNA-Aufarbeitung pro Reaktion eingesetzt und mit TRPM-2-Standard versetzt. Die durchschnittlich verwendete TRPM-2-Standard-Konzentration betrug für MCF-7-Zellaufarbeitungen 67,3 ng elongierte Plasmid-DNA pro Reaktionsansatz.

In Abbildung 49 ist die TRPM-2-Expression in MCF-7-Zellen exemplarisch anhand eines bei 600 nm detektierten Agarosegels dargestellt.

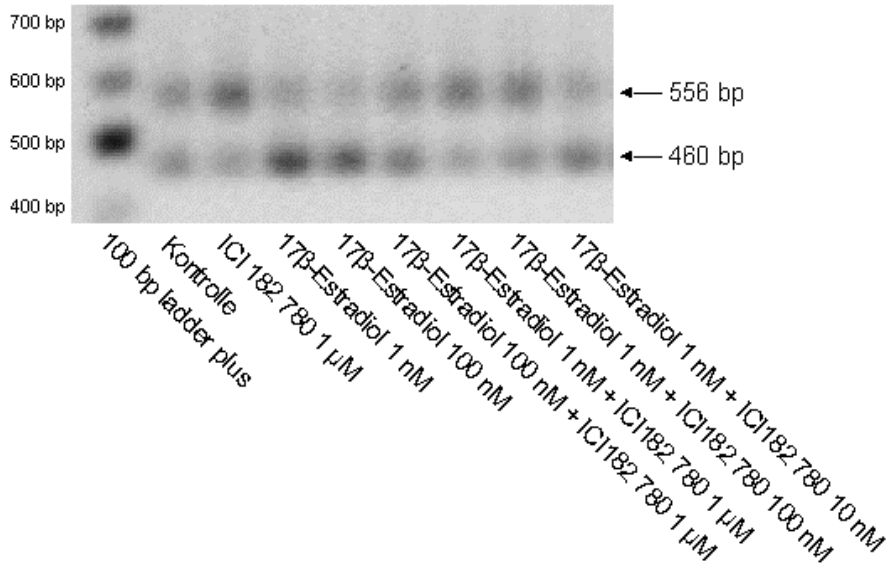


Abbildung 49: TRPM-2-Expression in MCF-7-Zellen nach Inkubation mit 17β-Estradiol (E_2) und ICI 182 780

Inkubation mit dem physiologischen Hormon 17β-Estradiol (E_2) bewirkte die erwartete dosisabhängige Unterdrückung der TRPM-2-Expression über mehrere Größenordnungen. Bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergibt sich der für rezeptorvermittelte Prozesse typische sigmoidale Kurvenverlauf. Die Graphik der Abbildung 50 zeigt ein sehr sensitives System. Inkubationen von 100 pM 17β-Estradiol bewirken bereits die Repression der TRPM-2-Induktion ins untere Plateau. Der mittels logistischem Fit berechnete EC_{50}-Wert endogener TRPM-2-Expression auf RNA-Ebene liegt bei 7,23 pM. Im Vergleich zum Transaktivierungsassay in MCF-7-Luc-Zellen ist die Empfindlichkeit des endogenen Reportergenassays um etwa zwei Größenordnungen nach links verschoben.

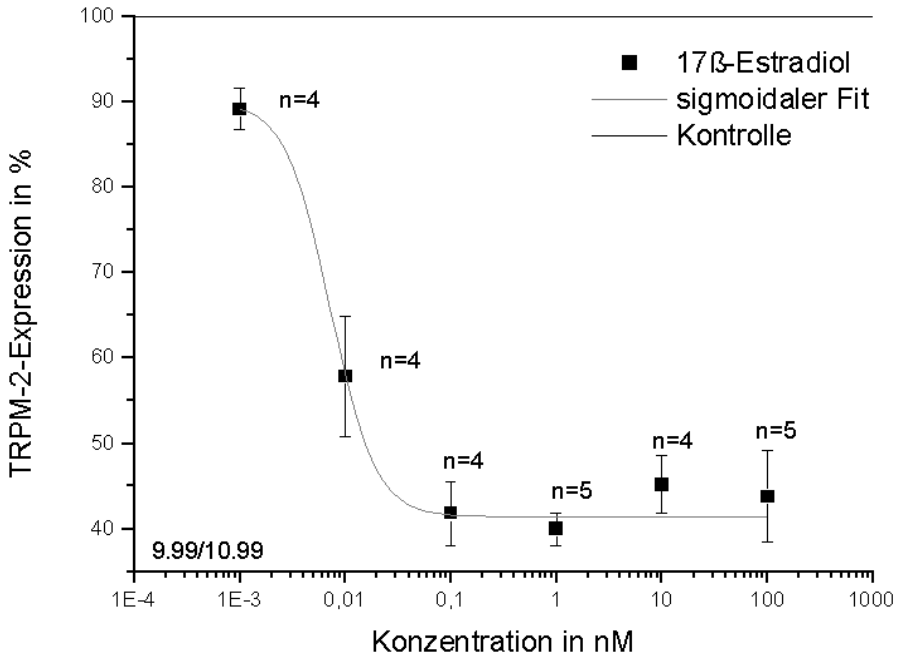


Abbildung 50: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen mittels des physiologischen Agonisten 17β-Estradiol (E_2)

Die weitere Validierung des endogenen Reportergenassays erfolgte durch Kompetitionsexperimente mit dem etablierten Estrogenrezeptorantagonisten ICI 182 780. Als zu antagonisierende Estradiol-Konzentration wurde der physiologische Bereich von 1 nM gewählt.

Erwartungsgemäß erfolgte die Antagonisierung der TRPM-2-Repression dosisabhängig. Die durch 1 nM 17β-Estradiol bedingte 60%ige Unterdrückung der TRPM-2-Expression kann durch eine um zwei Größenordnungen niedrigere Konzentration des potenten steroidalen Estrogenrezeptorantagonisten ICI 182 780 bereits signifikant antagonisiert werden. Äquimolare ICI 182 780-Konzentration antagonisieren die Repression von 1 nM 17β-Estradiol auf 90 % der vollständigen TRPM-2-Expression, während 100 nM des Antagonisten die Unterdrückung der TRPM-2-Expression nicht nur aufheben, sondern um 70 % überinduzieren (Abbildung 51 und Abbildung 52).

Aufgrund der in Kapitel 2.5.5 unter dem TRPM-2-Promotor beschriebenen Korrelation der TRPM-2-Expression mit Apoptoseinduktion kann die Überinduktion der TRPM-2-Expression möglicherweise in der apoptotischen Wirkung von ICI 182 780 begründet sein. Während Ercoli et al. auf die Apoptose-induzierende Wirkung von ICI 182 780 in der Estrogenrezeptor-negativen Ovarkrebszelllinie A2780WT hinweisen, konnten Wilson et al. in MCF-7-Zellen keine eindeutige Apoptose

identifizieren, da neben DNA-Fragmenten von 50 und 300 kbp internucleosomale Abspaltungen von 180 bp nicht nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig wird jedoch in der Literatur darauf hingewiesen, dass verschiedene DNA schädigende und in anderen Zelltypen Apoptose induzierende Agentien, in MCF-7-Zellen nur limitiert morphologisch erkennbare Apoptosen hervorrufen. (Ercoli et al., 1998; Ercoli et al., 2000; Wilson et al., 1995)

Die Auswertung erfolgte analog zum endogenen TRPM-2-Reportergenassay bei der Bestimmung von androgenem/antiandrogenem Potential in T-47D-Zellen. Im Säulendiagramm sind jeweils die Einzelergebnisse mit der Kontrolle von 100 % als Bezugsgröße dargestellt. Im direkten Vergleich wurden die Ergebnisse der Einzelmessungen in die Konsensuskurve übertragen, wobei der zu antagonisierende Inkubationsansatz als Bezugsgröße diente. Für alle Messreihen auf Basis der RT-PCR wurden Mittelwerte und Standardfehler einzelner Messpunkte berechnet.

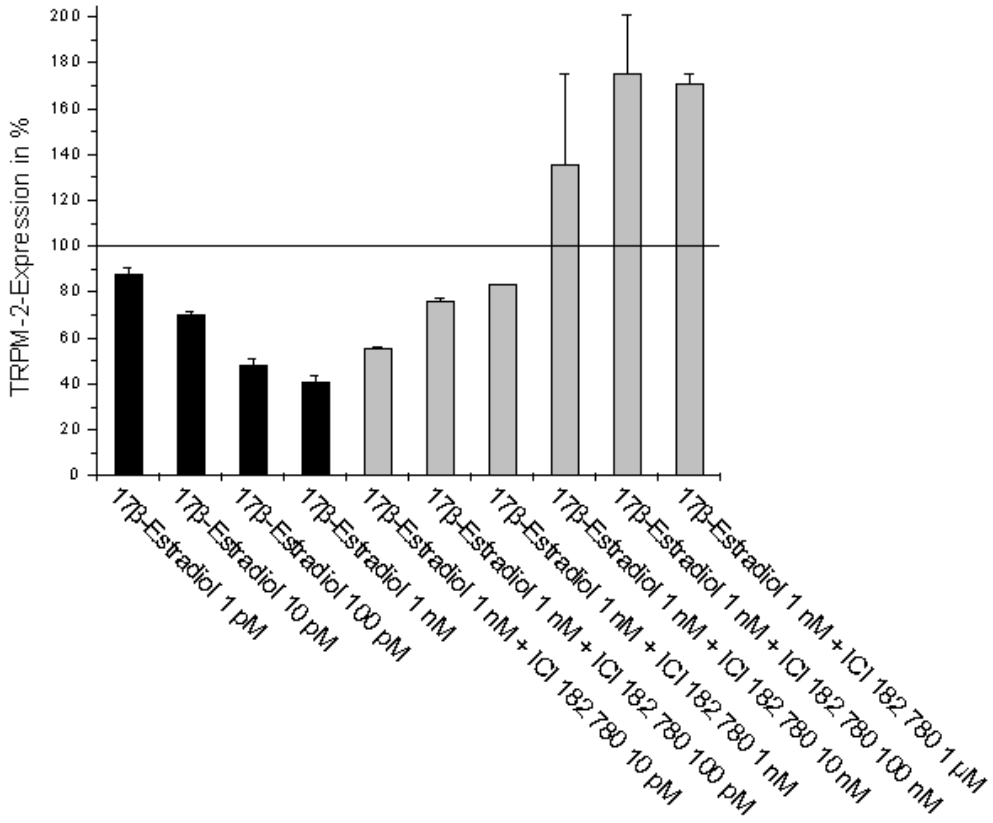


Abbildung 51: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 1 nM 17β-Estradiol reprimierten TRPM-2-Expression durch ICI 182 780 (Darstellung der Einzelergebnisse)

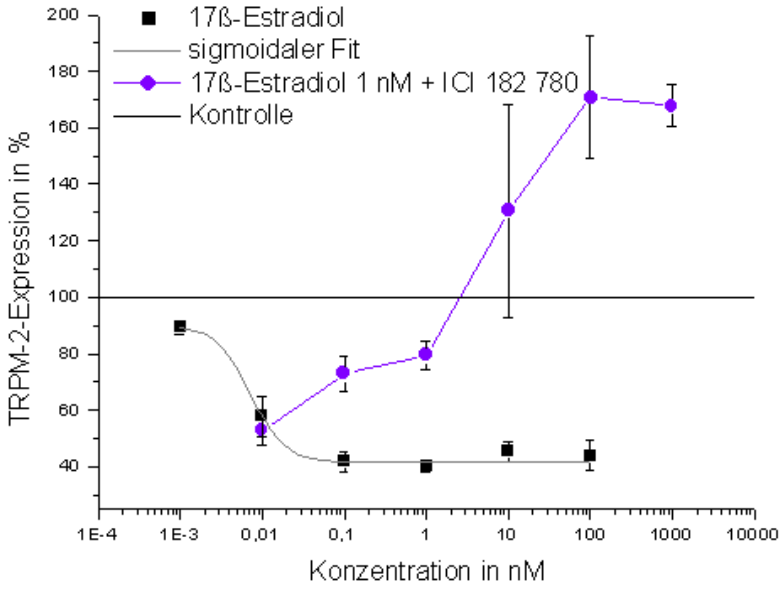


Abbildung 52: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 1 nM 17β-Estradiol reprimierten TRPM-2-Expression durch ICI 182 780 (auf Konsensuskurve übertragen)

Die Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen sollte anhand des synthetischen Estrogens Diethylstilbestrol (DES) vervollständigt werden. DES unterdrückt dosisabhängig die TRPM-2-Expression in MCF-7-Zellen. Die Repression durch 1 nM DES erfolgte bis auf das Niveau der Unterdrückung durch 100 pM 17β-Estradiol. Die Repressionspotenz ist im Vergleich zu 17β-Estradiol um eine Größenordnung nach rechts verschoben (Abbildung 53 und Abbildung 54). Ergebnisse des vorliegenden Assays stimmen mit den von Mußler im Transaktivierungsassay in MCF-7-Luc-(MVLN)-Zellen generierten Resultaten überein. (Mußler, 1999)

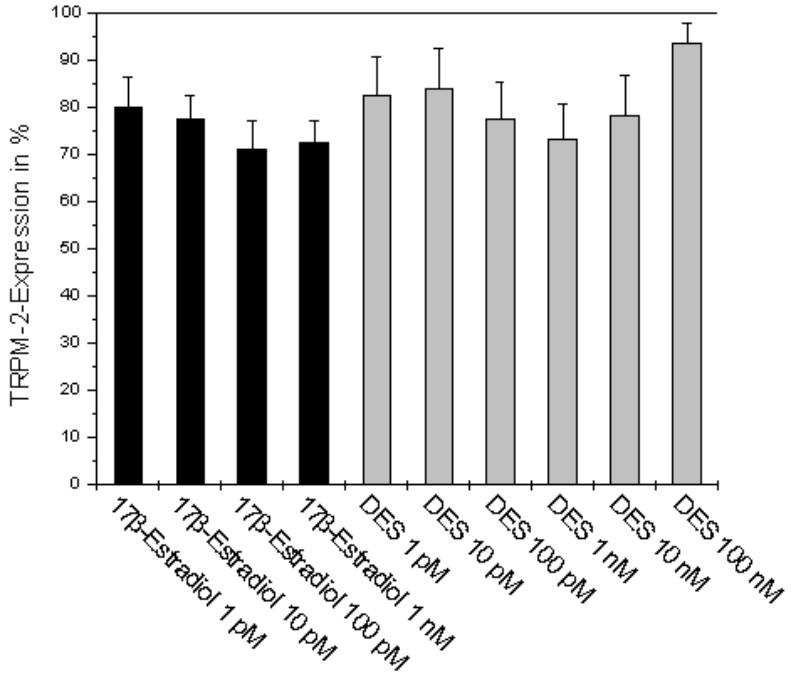


Abbildung 53: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen mittels des potenten Estrogenrezeptoragonisten Diethylstilbestrol (DES) im Vergleich zum physiologischen Agonisten 17β-Estradiol (Darstellung der Einzelergebnisse)

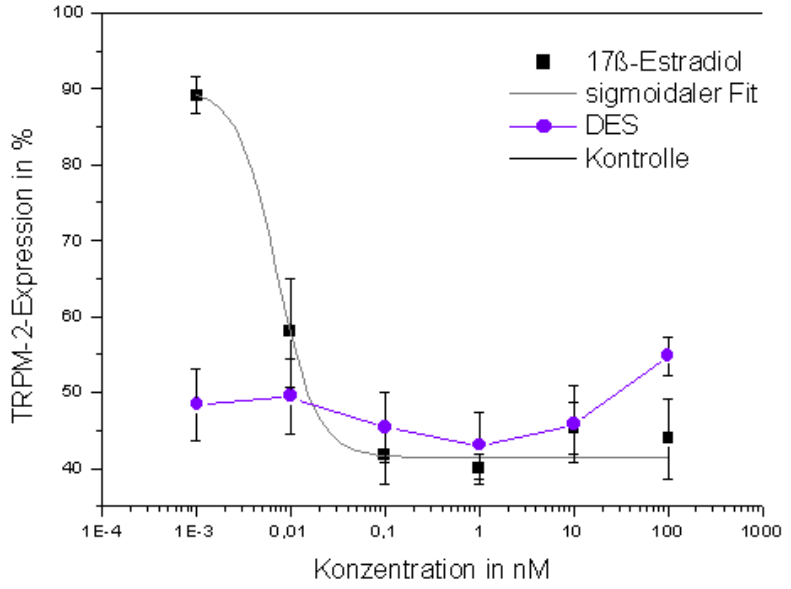


Abbildung 54: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen mittels des potenten Estrogenrezeptoragonisten Diethylstilbestrol (DES) im Vergleich zum physiologischen Agonisten 17β-Estradiol (auf Konsensuskurve übertragen)

Anhand der Einzelergebnisse in Abbildung 53 ist zu erkennen, dass 1 pM 17β-Estradiol bereits eine Repression der TRPM-2-Expression verursacht. Auch die untersuchten niedrigen DES-Konzentrationen konnten keine TRPM-2-Expression ins Kontrollniveau von 100 % bewirken. Deutlich wird dieses beim Übertragen der

Einzelergebnisse in die Konsensuskurve. Der scheinbar zu hohe Kontrollwert ist möglicherweise auf Veränderung der Zellpopulation zurückzuführen. Aufgrund der vorliegenden Messergebnisse sollten Kompetitionsexperimente von 1 pM DES mit ICI 182 780 die Validierung des Testsystems abschließen.

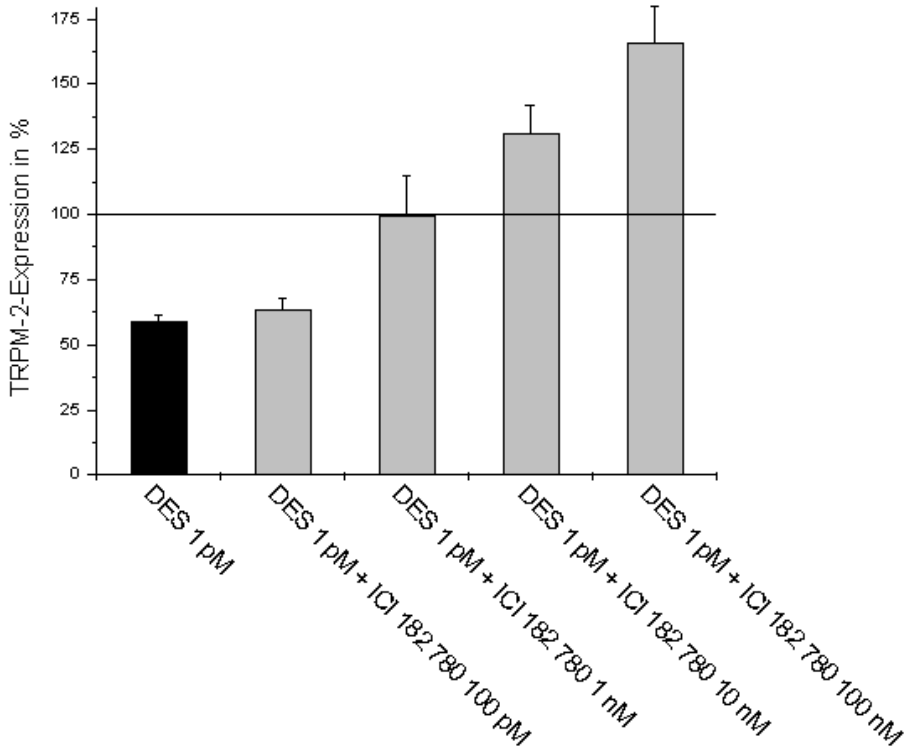


Abbildung 55: Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 1 pM DES reprimierten TRPM-2-Expression durch ICI 182 780 (Darstellung der Einzelergebnisse)

Erwartungsgemäß erfolgte die Antagonisierung der TRPM-2-Repression dosisabhängig. Die durch 1 pM DES bedingte 41%ige Unterdrückung der TRPM-2-Expression kann durch eine drei Größenordnungen höhere Konzentration von ICI 182 780 bereits auf 100 % antagonisiert werden. 100 µM des Estrogenrezeptorantagonisten überinduzieren die TRPM-2-Expression analog zum Kompetitionsexperiment mit 17β-Estradiol um 66 % (Abbildung 55).

Die Validierung des endogenen TRPM-2-Reportergenassays anhand des physiologischen Hormons 17β-Estradiol, des synthetischen Estrogenrezeptorliganden Diethylstilbestrol und dem etablierten Antiestrogen ICI 182 780 war somit erfolgreich. Die Methode ermöglicht eine um zwei Größenordnungen verbesserte Nachweisempfindlichkeit gegenüber dem bisher verwendeten transgenen Transaktivierungsassay in MCF-7-Luc-Zellen. Das Testsystem kann in

MCF-7-Zellen als etabliert angesehen werden und steht für Untersuchungen potentieller Estrogene/Antiestrogene zur Verfügung.

TRPM-2 scheint somit ein geeigneter endogener Reporter für Androgene/Antiandrogene und Estrogene/Antiestrogene zu sein. Der Assay konnte für beide Hormone und Antagonisten etabliert und validiert werden. Zu beachten ist die sehr aufwendige Versuchsdurchführung. Ein alternatives Testsystem zur Quantifizierung der TRPM-2-Expression steht jedoch nicht zur Verfügung.

4.1.1.5 Untersuchungen des estrogenen/antiestrogenen Potentials ausgewählter Verbindungen mittels endogenen TRPM-2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen

Als Estrogenrezeptorliganden fassen Fang et al. fünf Kategorien von Verbindungen mit strukturellen Charakteristika zusammen. Zu diesen zählen Steroide, DES-ähnliche Verbindungen, Phytoestrogene, Diphenylmethane, Biphenyle und Phenole. (Fang et al., 2001)

Im etablierten endogenen TRPM-2-Reportergenassay sollte das als Phytoestrogen/Phytoantiestrogen diskutierte Stilbenderivat Resveratrol auf estrogene/antiestrogene Aktivität untersucht werden.

Die Bindungsaffinität von Resveratrol zum ERα und ERβ ist mit einer etwa fünf Größenordnungen niedrigeren Affinität beschrieben als die des Estradiols. (Bowers et al., 2000; Slater et al., 1999)

Erhöhung der Proliferationsrate durch Resveratrol wird von Basly et al. in MCF-7- und MVLN-Zellen ab einer Konzentration von 10 µM für das *E*-Isomer und 25 µM für das *Z*-Isomer beschrieben, Antagonisierung der durch 100 pM 17β-Estradiol induzierten Proliferation ausschließlich durch 25 µM des *E*-Isomers. In MCF-7-Zellen berichten Lu und Serrero von einer dosisabhängigen Wachstumshemmung und Antagonisierung estrogenabhängiger PR-Expression auf mRNA-Ebene infolge der Coinkubation von 1 nM 17β-Estradiol mit Resveratrol in Konzentrationen ab 1 µM. (Basley et al., 2000; Lu and Serrero, 1999)

In-vivo-Untersuchungen zum estrogenen Potential an drei Wochen alten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ergaben bei oraler Applikation lediglich eine leichte Erhöhung des Uterusgewichts (signifikant nur bei 10 µM/Tag), während hohe Dosen

(1000 µg/Tag) die Fähigkeit des Estradiols, den Cholesterinserumspiegel zu senken, antagonisierten. (Turner et al., 1999)

Hsieh und Wu berichten von der Hypothese, dass Resveratrol über drei mechanistische Eigenschaften verfügt, die allgemein chemopräventiven Agentien zugeschrieben werden: erstens Unterdrückung der Zellreplikation, zweitens Induktion von Apoptose und drittens Wiederherstellung der Differenzierung. Sie beschreiben die Proliferationsinhibierung von LNCaP-Prostatakrebszellen durch 2,5 x 10^{-5} und 2,5 x 10^{-6} M Resveratrol sowie die Reduktion des intrazellulären und sekretierbaren PSA um etwa 80 %. In AR-Expressionsexperimenten konnte keine Veränderung zwischen Kontrolle und Resveratrol-behandelten Zellen beobachtet werden, was auf einen AR-unabhängigen Mechanismus der PSA-Regulierung durch Resveratrol schließen lässt. (Hsieh and Wu, 2000)

Endogenes TRPM-2-Reportergen wird in MCF-7-Zellen durch Inkubation von 10 µM Resveratrol deutlich unter das Niveau der Kontrolle reprimiert. Die 20%ige Unterdrückung durch Resveratrol entspricht in den Einzelmessungen dem Niveau der Unterdrückung durch 1 pM 17β-Estradiol (Abbildung 56). Aufgrund möglicher Veränderung der Zellpopulation als Folge steigender Passagezahlen mit nicht auszuschließenden Spontanmutationen mit Selektionsvorteil über den Messzeitraum mehrerer Monate und einer damit verbundenen Sensitivitätsveränderung des Assays, ergibt die auf die Konsensuskurve übertragene Resveratrol-bedingte TRPM-2-Repression eine deutlich stärkere Unterdrückung. Die Repression durch 10 µM Resveratrol erreicht das Niveau der Repression von 10 bis 100 pM 17β-Estradiol (Abbildung 57).

Obwohl Übertragung von Einzelergebnissen in Konsensuskurven die Veranschaulichung der Ergebnisse verbessert und ergänzende Informationen liefert, zeigt dieses Beispiel deutlich, dass bei der Verwendung unterschiedlicher Zellpopulationen durch den Übertrag auch fehlerhafte Ergebnisse produziert werden können.

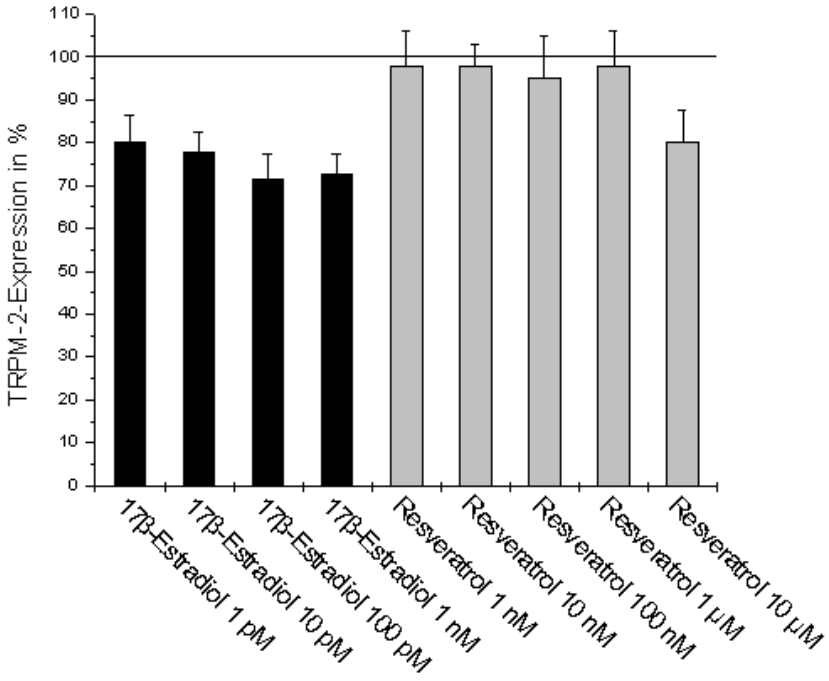


Abbildung 56: Estrogenes Potential von Resveratrol im endogenen TRPM-2-Reportergenassay (Darstellung der Einzelergebnisse)

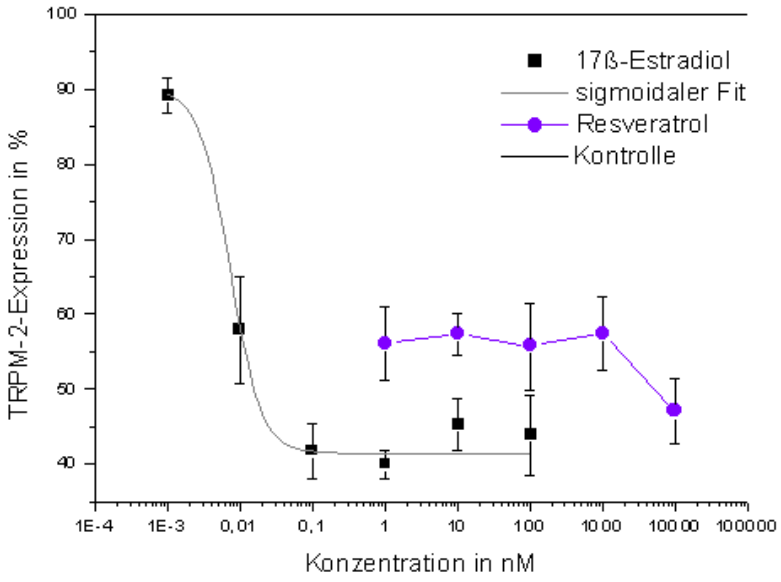


Abbildung 57: Estrogenes Potential von Resveratrol im endogenen TRPM-2-Reportergenassay (auf Konsensuskurve übertragen)

Aufgrund vorliegender Messergebnisse sollten Kompetitionsexperimente von 10 µM Resveratrol mit ICI 182 780 die Antagonisierbarkeit der durch Resveratrol bedingten Repression belegen.

1 nM ICI 182 780 antagonisiert die 32%ige TRPM-2-Repression der Inkubation mit 10 µM Resveratrol vollständig bis ins Niveau der Kontrolle. Analog zu den Coinkubationen mit 17β-Estradiol und Diethylstilbestrol überinduziert eine ICI 182

780-Konzentration von 100 nM die durch Resveratrol reprimierte TRPM-2-Expression um etwa 57 % (Abbildung 58).

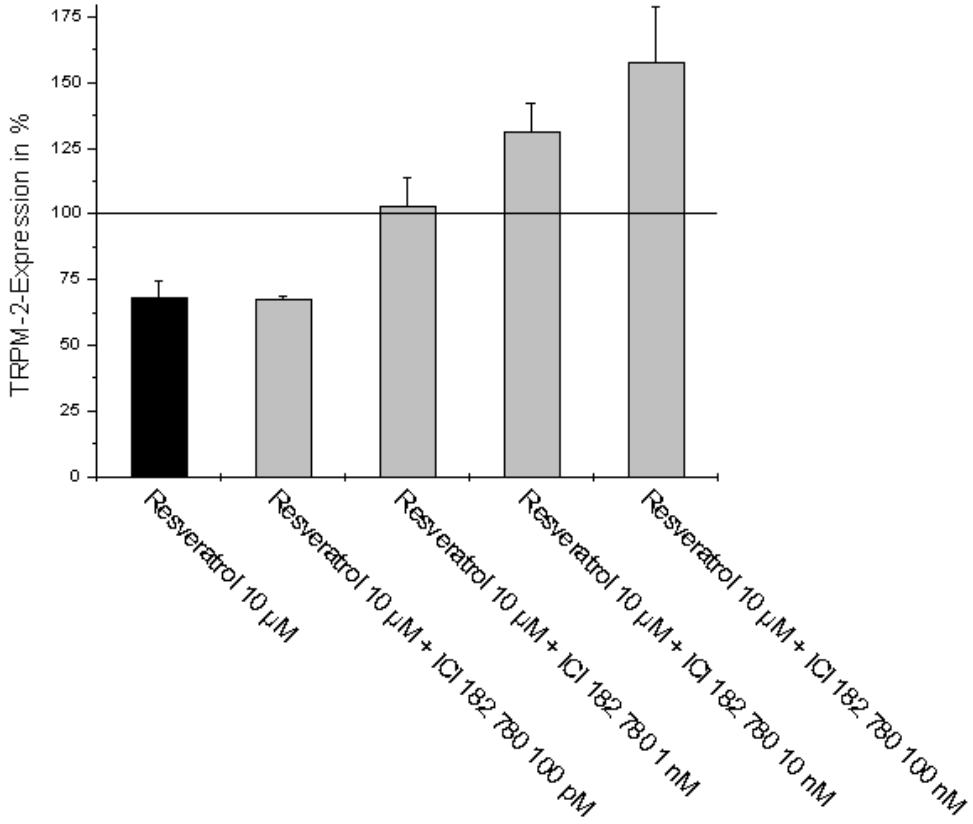


Abbildung 58: Antagonisierung der durch 10 µM Resveratrol reprimierten TRPM-2-Expression durch ICI 182 780 (Darstellung der Einzelergebnisse)

Abschließend sollte Resveratrol auf sein antiestrogenes Potential im endogenen TRPM-2-Assay untersucht werden. Aufgrund der Steilheit der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve von 17β-Estradiol im linearen Bereich wurden die Kompetitionsexperimente mit 100 pM 17β-Estradiol durchgeführt, der Konzentration, die gerade so das untere Plateau der maximalen TRPM-2-Unterdrückung erreicht.

In Abbildung 59, der Darstelllung der Einzelergebnisse, ist bei einer Kompetition von 100 pM 17β-Estradiol mit 1 und 10 nM sowie 10 µM Resveratrol eine schwache Antagonisierung der TRPM-2-Repression zu beobachten. Beim Beziehen der Ergebnisse auf die Konsensuskurve (

Abbildung 60) zeigen die Coinkubationen von 100 pM 17β-Estradiol mit 1 nM und 10 µM Resveratrol ebenfalls leicht antagonistische Aktivität, die jedoch nicht als signifikant betrachtet werden kann.

Höll konnte im MCF-7-Luc-Reportergenassay für 100 nM Resveratrol bei Coinkubation mit 10 nM 17β-Estradiol antiestrogene Aktivität nachweisen, die bei

steigender Resveratrol-Konzentration geringer wurde. Dieser Effekt kann Hinweis für ein antiestrogenes Potential von Resveratrol bei niedrigen Konzentrationen sein, der durch die agonistische Aktivität hoher Konzentrationen überlagert wird. Lu und Serrero berichteten ebenfalls von dosisabhängigen, antagonistischen Effekten bei Coinkubation von 1 nM 17β-Estradiol mit Resveratrol ab 1 µM. (Höll, 2000; Lu and Serrero, 1999)

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse lassen bisher keine eindeutige Bewertung zu. Möglicherweise könnte im vorliegenden Assay durch weitere, noch ausstehende Versuche signifikant antiestrogenes Potential von Resveratrol nachgewiesen werden. Zum einen könnte die Resveratrol-Konzentration gesenkt, aber auch noch auf 25 µM erhöht werden, bevor toxische Effekte zum Tragen kommen, die von Basley et al. ab 50 µM beschrieben sind. Zum anderen besteht die Möglichkeit, die Estradiol-Konzentration zu variieren. Kopp berichtete über additive Effekte suboptimaler Dosierungen von Resveratrol und 17β-Estradiol. (Basley et al., 1999; Kopp, 1998)

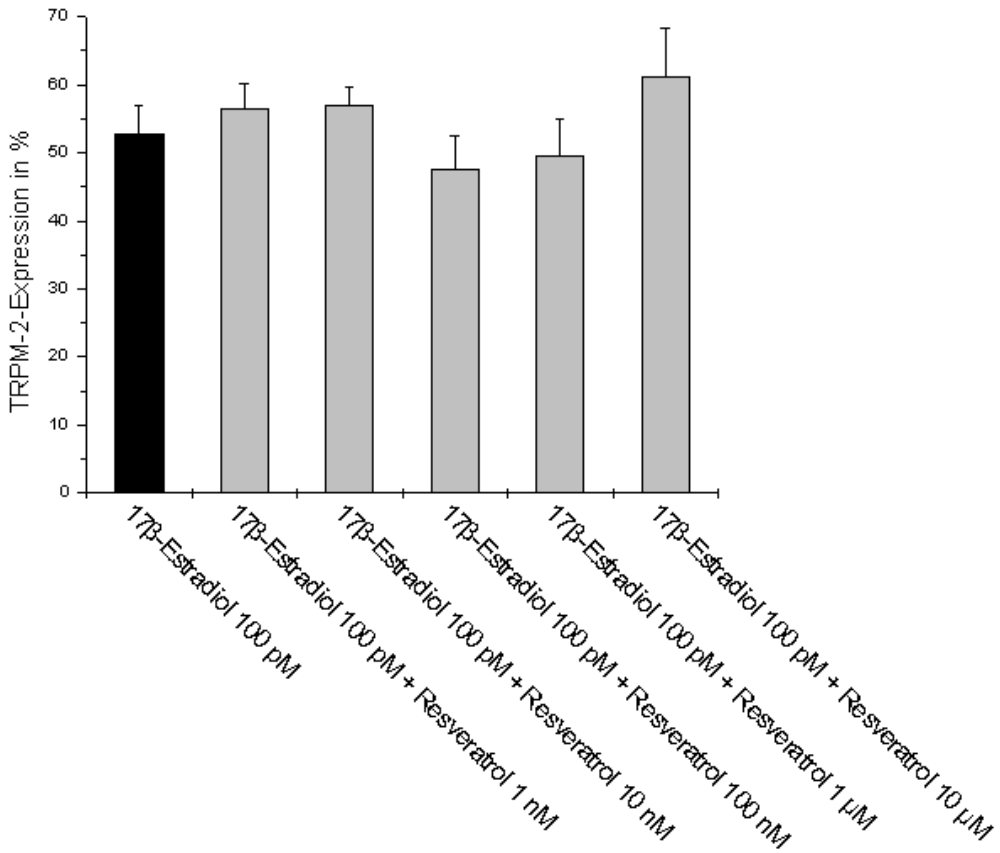


Abbildung 59: Kompetition der durch 100 pM 17β-Estradiol reprimierten TRPM-2-Expression durch Resveratrol (Darstellung der Einzelergebnisse)

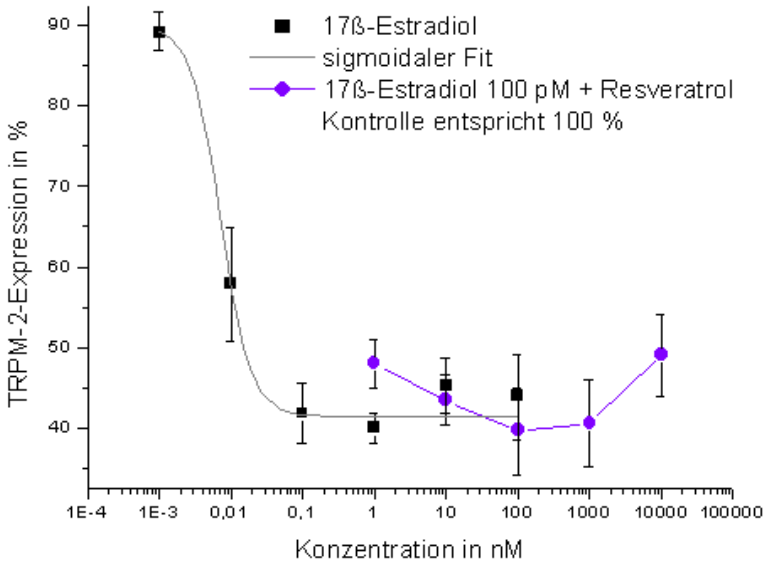


Abbildung 60: Kompetition der durch 100 pM 17β-Estradiol reprimierten TRPM-2-Expression durch Resveratrol (auf Konsensuskurve übertragen)

4.1.2 Bestimmung des endogenen Reporters pS2 mittels kompetitiver RT-PCR

Die Konstruktion des internen exogenen pS2-Standards erfolgte analog zum TRPM-2-Standard im Rahmen einer Diplomarbeit. Amplifikat der Probe und delitionsmutierter Standard haben unter Verwendung des gewählten Primerpaares eine Länge von 425 bzw. 325 bp. (Gensler, 1999)

4.1.2.1 Etablierung und Validierung eines endogenen pS2-Reportergenassays zur Bestimmung von estrogenem/antiestrogenem Potential in MCF-7-Zellen

Die Etablierung und Validierung des endogenen pS2-Reportergenassays zur Untersuchung von estrogenem/antiestrogenem Potential erfolgte in der Estrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Die Inkubation der Testsubstanzen erfolgte exakt zwanzig Stunden serumfrei. Für RT-PCR-Einzelreaktionen wurde in Analogie zu den Untersuchungen von TRPM-2 1 µg Gesamt-RNA-Aufarbeitung pro Reaktion eingesetzt und mit pS2-Standard versetzt. Die durchschnittlich verwendete pS2-Standard-Konzentration betrug für MCF-7-Zellaufarbeitungen 82 pg elongierte Plasmid-DNA pro Reaktionsansatz.

Die pS2-Expression in MCF-7-Zellen ist in Abbildung 61 exemplarisch anhand eines bei 600 nm detektierten Agarosegels dargestellt.

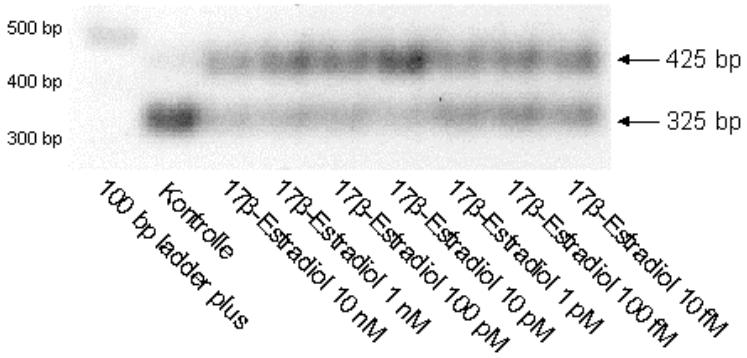


Abbildung 61: pS2-Expression in MCF-7-Zellen nach Inkubation mit 17β-Estradiol (E_2)

Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die mittels Lumi-Imager quantifizierte Bandenintensität der Probe durch die Intensität des Standards dividiert. Kontrollwerte der pS2-Expression werden von Messwerten der Inkubationsansätze subtrahiert.

Inkubation mit dem physiologischen Hormon 17β-Estradiol bewirkte die erwartete dosisabhängige Induktion der pS2-Expression. Bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergibt sich der typisch sigmoidale Kurvenverlauf. Die Graphik der Abbildung 62 zeigt ein sehr sensitives System. Inkubationen von 10 pM 17β-Estradiol bewirken bereits eine Expressionsinduktion des pS2-Gens ins obere Plateau.

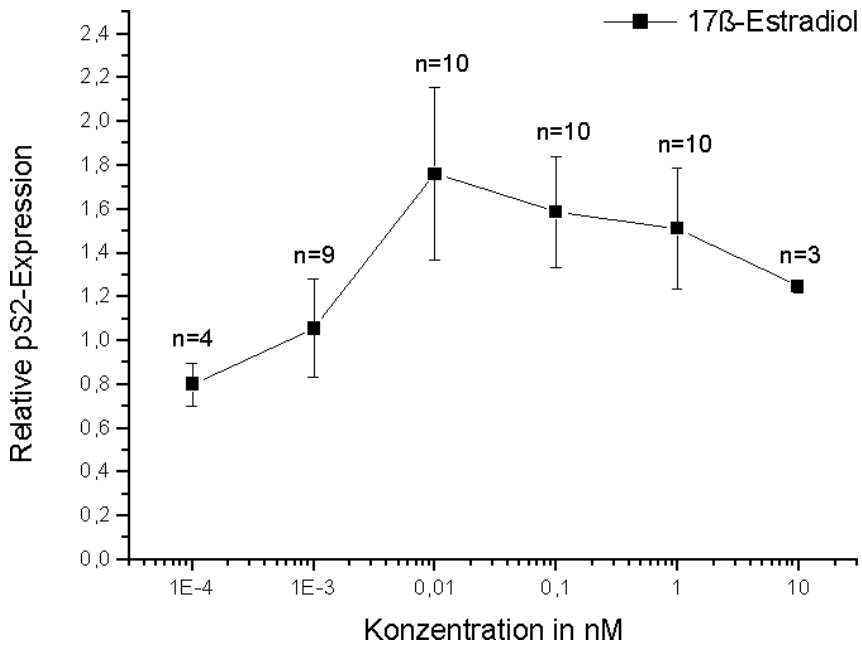


Abbildung 62: Validierung des endogenen pS2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen mittels des physiologischen Agonisten 17β-Estradiol (E_2)

Aufgrund der sinkenden pS2-Expression bei höheren Estradiol-Konzentrationen ergab der logistische Fit über die gesamten Messwerte kein sinnvolles Ergebnis. Die Werte der vier niedrigen Inkubationsansätze von 100 fM bis 100 pM 17β-Estradiol decken den Bereich der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung weitestgehend ab. Daher wurden bei der weiteren Auswertung die Messpunkte der Inkubationen mit 1 und 10 nM 17β-Estradiol nicht herangezogen (Abbildung 63).

Der mittels logistischemn Fits berechnete EC_{50}-Wert (1,16 pM) endogener pS2-Expression auf RNA-Ebene liegt im Vergleich zum pS2-Radio-Immuno-Assay um zwei Zehnerpotenzen niedriger (Seng, 2000). Im Vergleich zum Transaktivierungsassay in MCF-7-Luc-Zellen ist die Empfindlichkeit des endogenen pS2-Assays um drei Größenordnungen nach links verschoben.

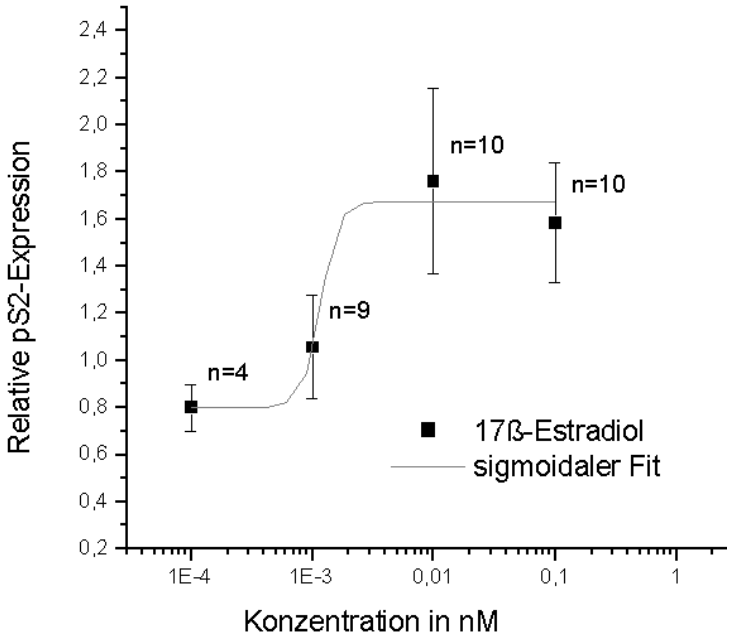


Abbildung 63: Validierung des endogenen pS2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen mittels des physiologischen Agonisten 17β-Estradiol (E_2) und logistischem Fit

Die weitere Validierung des endogenen pS2-Assays erfolgte durch Kompetitionsexperimente mit ICI 182 780. Als zu antagonisierende Estradiol-Konzentration wurde der bereits im oberen Plateau liegende subphysiologische Bereich von 100 pM gewählt.

Erwartungsgemäß erfolgte eine dosisabhängige Antagonisierung der pS2-Induktion. 1 nM ICI 182 780 bewirkt bereits eine über 40%ige Repression der pS2-Induktion durch 100 pM Estradiol. Durch eine drei Größenordnungen höhere Konzentration des Antagonisten konnte die Geninduktion vollständig unterdrückt werden (Abbildung 64). Das entspricht etwa dem Verhältnis im Transaktivierungsassay in MCF-7-Luc-Zellen.

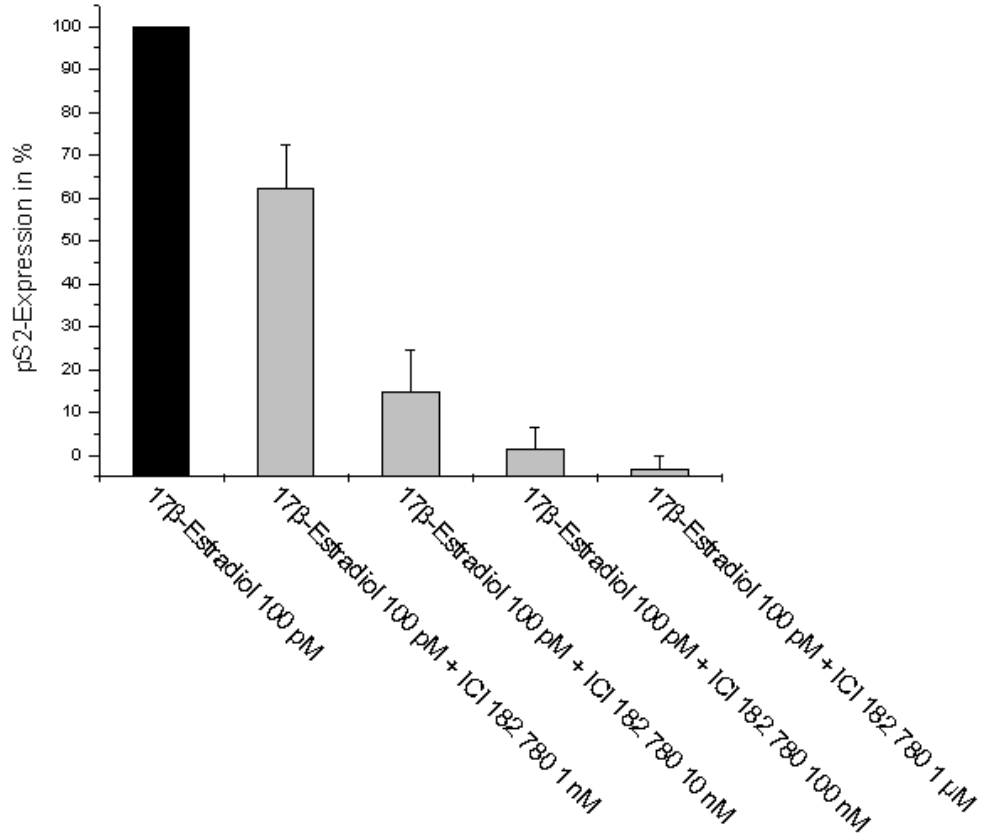


Abbildung 64: Validierung des endogenen pS2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 100 pM 17β-Estradiol induzierten pS2-Expression durch ICI 182 780

Die Validierung des pS2-Assays sollte durch das synthetische Estrogen Diethylstilbestrol vervollständigt werden.

Diethylstilbestrol (DES) induziert dosisabhängig die pS2-Expression in MCF-7-Zellen. Die Induktion von 100 pM DES erfolgte bis ins obere Niveau der pS2-Expression durch 17β-Estradiol. Jedoch schien bereits 1 pM DES das pS2-Gen stärker zu induzieren als die gleiche Konzentration 17β-Estradiol (Abbildung 65).

Die estrogene Potenz von DES im Vergleich zu 17β-Estradiol ist aufgrund der Datenlage schwer abzuschätzen, da keine Messwerte vorliegen, die das untere Plateau der pS2-Induktion durch DES anzeigen.

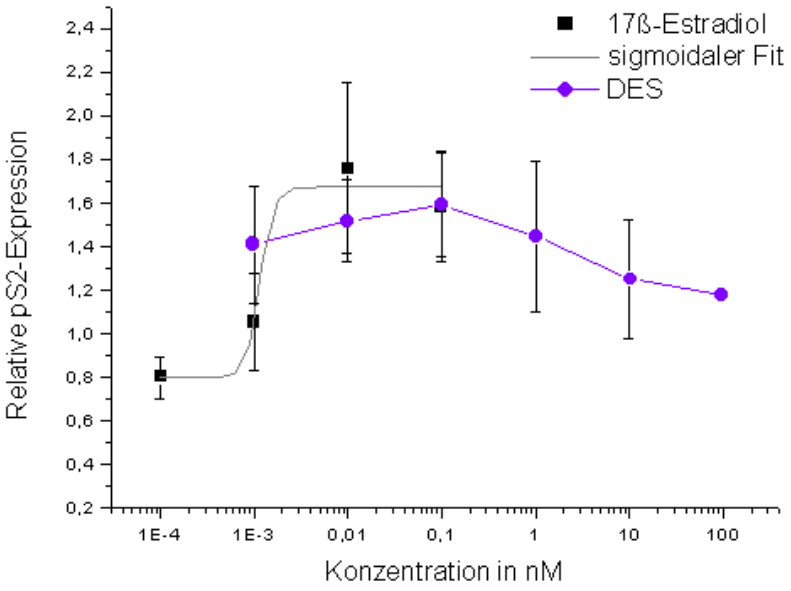


Abbildung 65: Validierung des endogenen pS2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen mittels des potenten Estrogenrezeptoragonisten Diethylstilbestrol (DES) im Vergleich zum physiologischen Agonisten 17β-Estradiol

In Analogie zum endogenen TRPM-2-Assay in MCF-7-Zellen sind die durch niedrige DES-Konzentrationen verursachten Effekte stärker als bei vergleichbaren Konzentrationen von 17β-Estradiol. Die konzentrationsabhängige Annäherung an den Kontrollwert konnte für DES anhand der untersuchten Konzentrationen nicht ermittelt werden. Untersuchungen mit DES-Konzentrationen im femtomolaren Bereich stehen im TRPM-2-Assay und im pS2-Assay noch aus.

1 nM DES reprimiert die TRPM-2-Expression um etwa 20 %, während die pS2-Induktion ungefähr 63 % der maximalen Induktion durch 10 pM 17β-Estradiol entspricht.

Aufgrund der pS2-Induktion im Wendebereich des logistischen Fits der Estradiol-Induktion sollten Kompetitionsexperimente von 1 pM DES mit ICI 182 780 die Validierung des Testsystems abschließen.

Während 100 pm ICI 182 780 noch keinen antagonisierenden Effekt auf die pS2-Induktion durch 1 pM DES zeigen, reduziert 1 nM des potenten Estrogenrezeptorantagonisten die Induktion auf etwa 25 %. Vollständige Hemmung der pS2-Genexpression wird in Kompetition mit 10 nM ICI 182 780 erreicht (Abbildung 66). Die Ergebnisse stimmen in der Größenordnung mit denen der TRPM-2-Repression im endogenen TRPM-2-Assay überein.

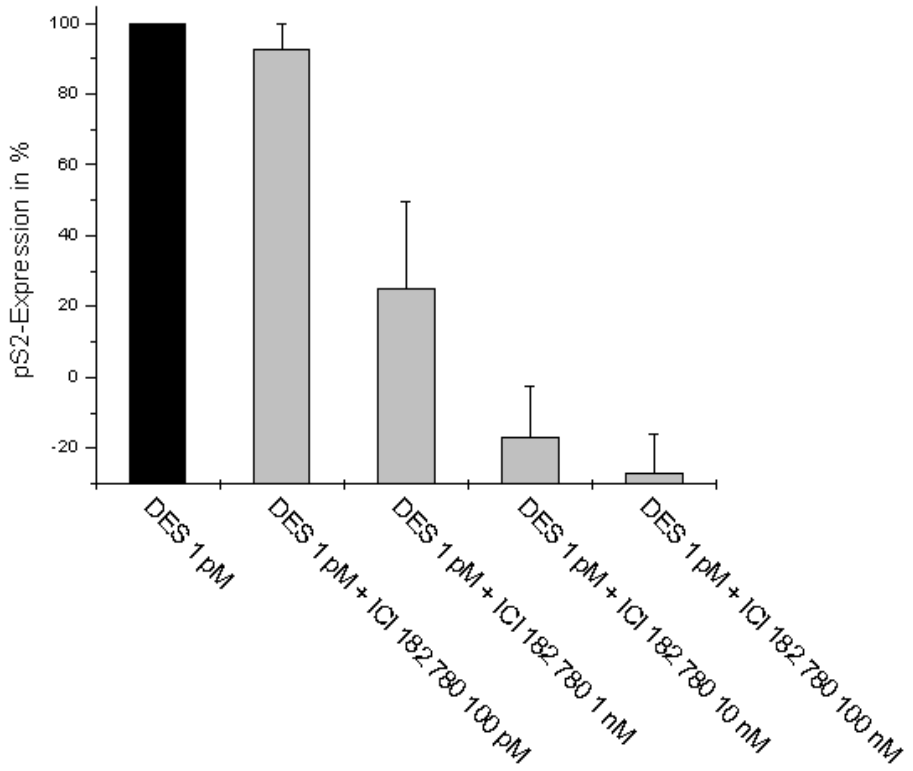


Abbildung 66: Validierung des endogenen pS2-Reportergenassays: Antagonisierung der durch 1 pM DES induzierten pS2-Expression durch ICI 182 780

Die Validierung des endogenen pS2-Assays auf RNA-Ebene erfolgte anhand des physiologischen Hormons 17β-Estradiol, des synthetischen Estrogenrezeptorliganden Diethylstilbestrol und dem etablierten Antiestrogen ICI 182 780. Das Testsystem kann als etabliert angesehen werden und für Untersuchungen potentieller Estrogene/Antiestrogene herangezogen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass ein sehr sensitives System vorliegt, das einen funktionellen Nachweis von Estrogenen mit vergleichbarer Wirkstärke von 1 bis 10 pM 17β-Estradiol erlaubt. Die Methode ermöglicht eine um zwei bzw. drei Größenordnungen verbesserte Nachweisempfindlichkeit gegenüber dem bisher verwendeten pS2-Radio-Immuno-Assay bzw. transgenen Testsystem zur Detektion estrogener Aktivität. Die Einschränkung liegt allerdings in der deutlich aufwendigeren Durchführung und Auswertung.

4.1.2.2 Untersuchungen des estrogenen/antiestrogenen Potentials ausgewählter Verbindungen mittels endogenen pS2-Reportergenassays in MCF-7-Zellen

Das am Estrogenrezeptor als partial agonistisch/antagonistisch beschriebene Potential von Resveratrol sollte ergänzend zum TRPM-2-Reportergenassay auf seine Induktion im endogenen pS2-Assay untersucht werden.

10 µM Resveratrol induzieren die Expression des pS2-Gens bis ins obere Plateau der Konsensuskurve von 17β-Estradiol. Die Halbmaximale pS2-Induktion durch Resveratrol wird im Vergleich zu 17β-Estradiol bei etwa sechs Größenordnungen höherer Konzentration erreicht (Abbildung 67).

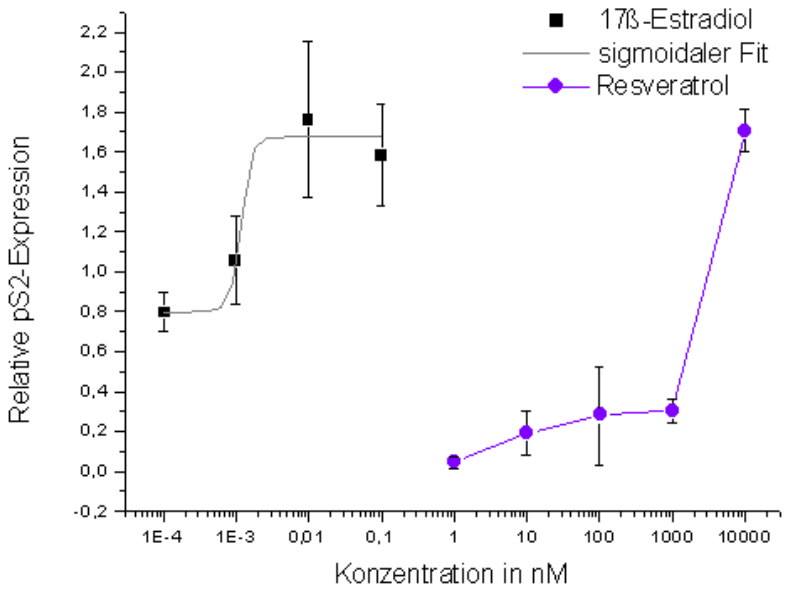


Abbildung 67: Estrogenes Potential von Resveratrol im endogenen pS2-Assay

Im Folgenden sollte die Antagonisierung der Resveratrol-bedingten pS2-Induktion durch ICI 182 780 ermittelt werden.

Während 100 pM ICI 182 780 auf die pS2-Induktion durch 10 µM Resveratrol noch keinen Einfluss haben, antagonisiert 1 nM ICI 182 780 die Genexpression um über 90 % (Abbildung 68). Das Ergebnis korreliert sehr gut mit dem Resultat aus der Antagonisierung der Resveratrol-bedingten TRPM-2-Repression durch ICI 182 780.

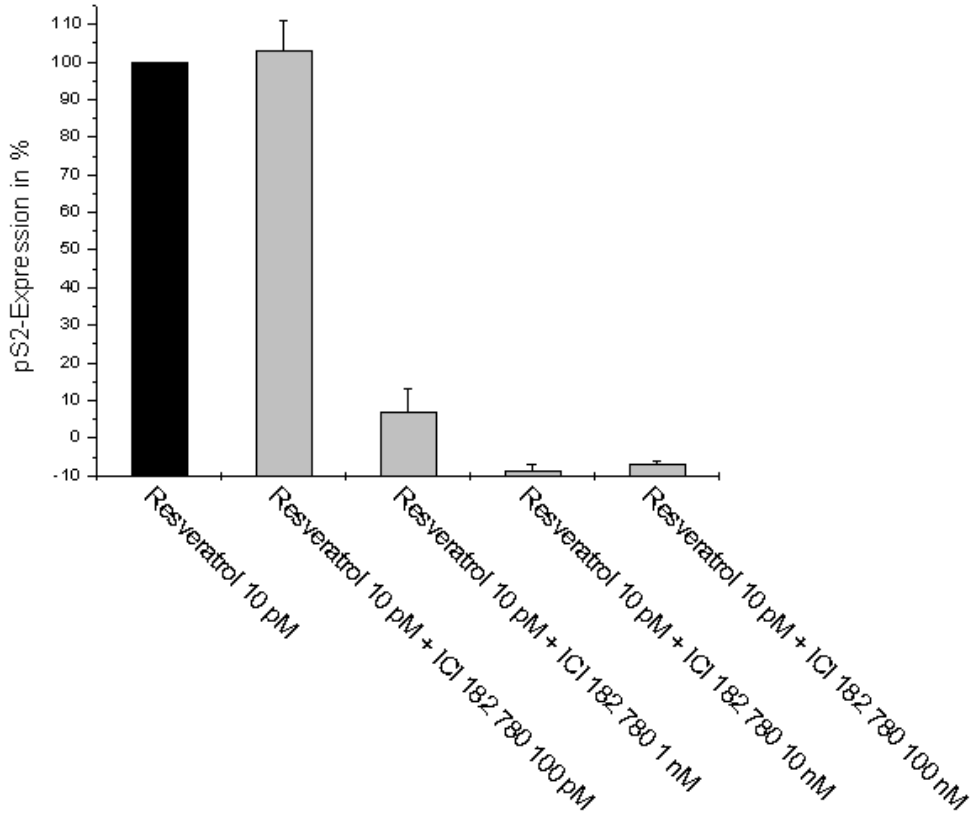


Abbildung 68: Antagonisierung der durch 10 µM Resveratrol induzierten pS2-Expression durch ICI 182 780

Abschließend wurde im endogenen pS2-Assay die potentiell antiestrogene Aktivität von Resveratrol durch Kompetitionsexperimente mit 100 pM 17β-Estradiol untersucht.

Signifikant antiestrogenes Potential von Resveratrol wurde im verwendeten Assay nicht detektiert. Dennoch war die Reportergeninduktion in Analogie zu Untersuchungen von Höll im MCF-7-Luc-Reportergenassay bei der Coinkubation mit 100 nM Resveratrol am niedrigsten (Abbildung 69). Der ermittelte V-förmige Kurvenverlauf könnte durch partiell agonistische/antagonistische Aktivität von Resveratrol erklärt werden. Bei Coinkubation von 10 µM Resveratrol mit 100 pM 17β-Estradiol wurde eine auf 126,6 % signifikant erhöhte pS2-Expression festgestellt. Diese erhöhte Expression kann auf den von Kopp beschriebenen additiven Effekt suboptimaler Dosierungen von Resveratrol und 17β-Estradiol zurückzuführen sein. Resveratrol wird in kompetitiven Bindungsstudien am ER aus MCF-7-Kernextrakten als relativ schwacher Ligand mit einem IC_{50} von etwa 10 µM bei 0,1 nM ^{125}I-markiertem 17β-Estradiol beschrieben. (Höll, 1999; Kopp, 1998)

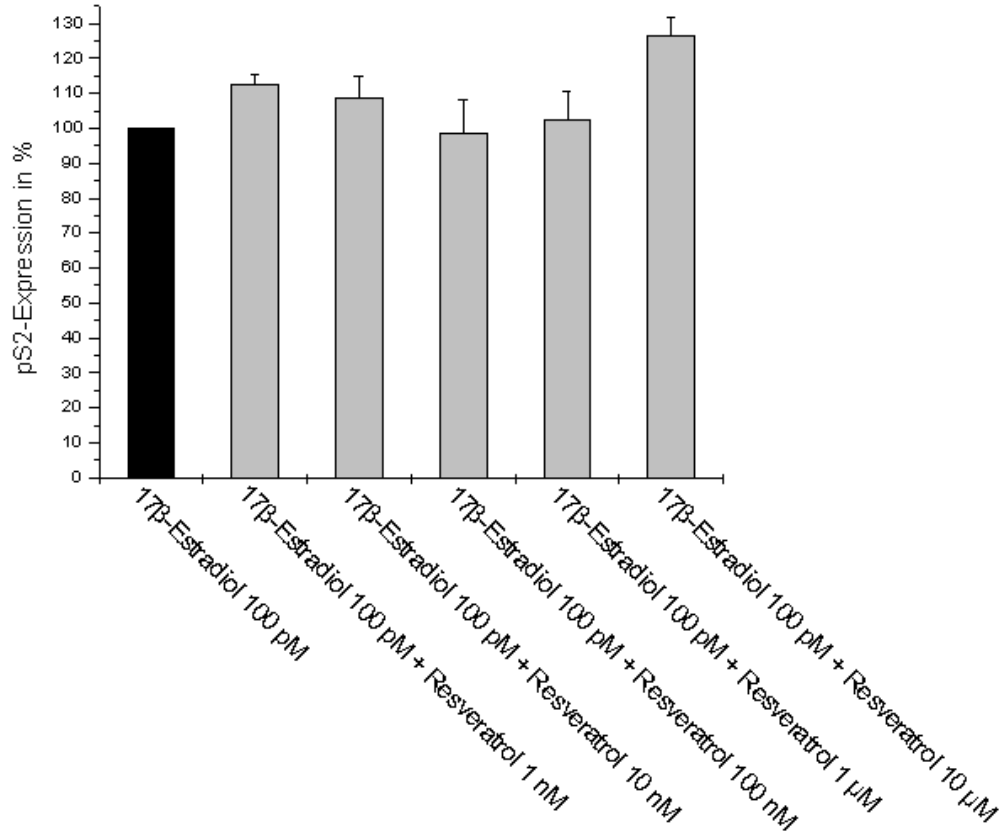


Abbildung 69: Kompetition der durch 100 pM 17β-Estradiol induzierten pS2-Expression durch Resveratrol

4.1.3 Weiterführende Validierung des PSA-Assays

„Prostataspezifisches Antigen“ (PSA) bietet sich als endogener Reporter für Untersuchungen antiandrogener Aktivität an. Es wird in T-47D-Zellen unter Einwirkung von Androgenen und Progestinen gebildet. Daher eignet es sich nur für Untersuchungen von antiandrogenem, nicht aber von androgenem Potential. (Rosenberg et al., 1998)

Mittels physiologischen Agonisten DHT und den drei bekannten Antiandrogenen Hydroxyflutamid, Vinclozolin M2 und p,p`-DDE etablierte Guth einen PSA-Assay in T-47D-Zellen und setzte ihn zur Untersuchung ausgewählter Verbindungen ein. (Guth, 2000)

Da T-47D-Zellen neben Androgenrezeptoren auch Progesteron-, Glucocorticoid- und Estrogenrezeptoren enthalten (ATCC, 2000; Keydar et al., 1979), sollte in einer weiterführenden Validierung des Assays eine mögliche Induktion von PSA durch das synthetische Progestin Norgestimat und das Glucocorticoid Dexamethason

untersucht werden. Ebenso war der Einfluss des Antiprogestins/Antiglucocorticoids Mifepriston auf den physiologischen Androgenrezeptorliganden DHT von Interesse.

Inkubation steigender DHT-Konzentrationen bewirkte eine dosisabhängige PSA-Expression, die mittels ELISA detektiert werden konnte. Halblogarithmische Auftragung und logistischer Fit ergaben die erwartete Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abbildung 70) und mit einem EC_{50}-Wert von 0,71 nM eine vergleichbarer Sensitivität wie bei Guth. (Guth, 2000)

Für alle Messreihen wurden Mittelwerte und Standardabweichung einzelner Messpunkte berechnet. Das 95. Percentil ließ sich aus den ermittelten Daten nicht berechnen. Aus diesem Grund muss auf die Angabe einer Signifikanzschwelle verzichtet werden.

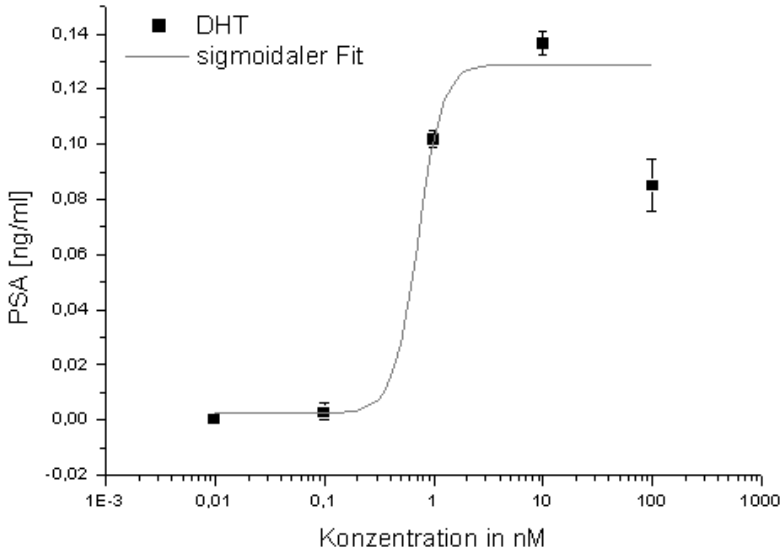


Abbildung 70: PSA-Induktion in T-47D-Zellen durch DHT

Für Antagonisierungsexperimente wurde eine DHT-Konzentration von 1 nM gewählt. Die Hemmung DHT-induzierter PSA-Konzentration wurde vergleichend für Hydroxyflutamid und Mifepriston durchgeführt. Während 100 nM Hydroxyflutamid die durch 1 nM DHT induzierte PSA-Konzentration zu 84 % hemmen, antagonisiert 1 µM des Androgenrezeptorantagonisten die PSA-Induktion vollständig (Abbildung 71).

Mifepriston zeigt im PSA-Assay vergleichbare antagonistische Aktivität wie Hydroxyflutamid. 10 pM Mifepriston antagonisieren die durch 1 nM DHT induzierte PSA-Konzentration um 32 %, 100 pM um 80 %. Ab 1 nM Mifepriston in Coinkubation mit 1 nM DHT entspricht die Antagonisierung über 90 % (Abbildung 72), während gleichzeitig eine dosisabhängige Wachstumshemmung von 13 % (18 % bzw. 20 %

bei 10 nM und 100 nM Mifepriston) detektiert wurde (ohne graphische Darstellung). Rosenberg et al. beschreiben in der Brustkrebszelllinie BT-474 für 1 nM DHT in Coinkubation mit 100 nM Mifepriston lediglich eine 18%ige Hemmung der PSA-Konzentration. In der vorliegenden Arbeit war die antiprogestine Wirkung des Mifepristons deutlich weniger selektiv. (Rosenberg et al., 1998)

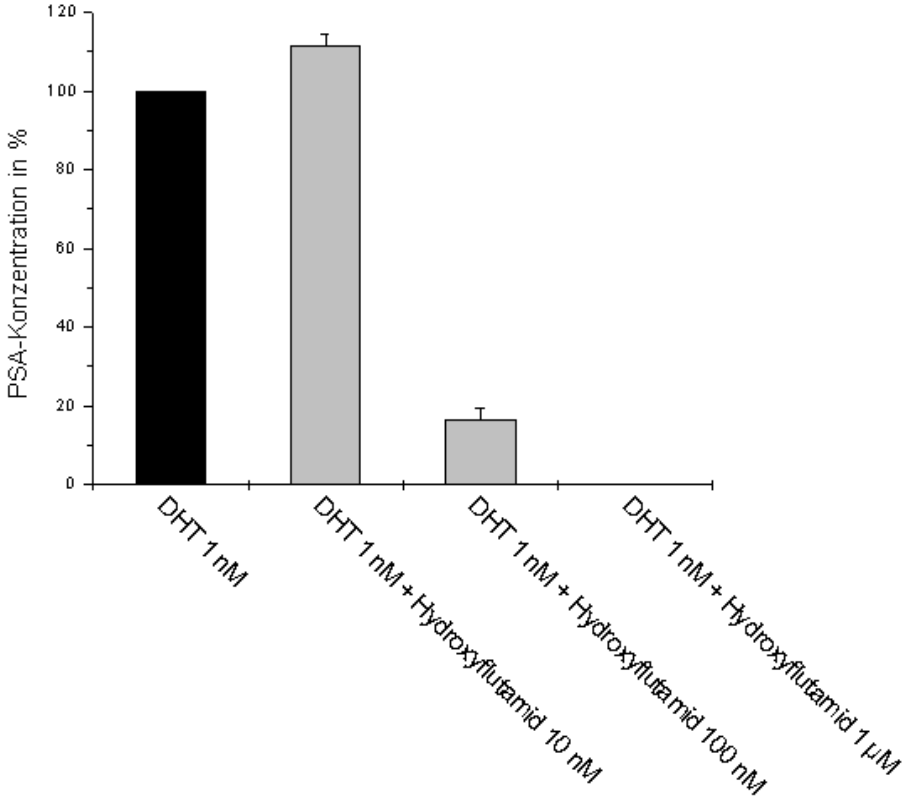


Abbildung 71: Antagonisierung von 1 nM DHT durch Hydroxyflutamid im PSA-Assay

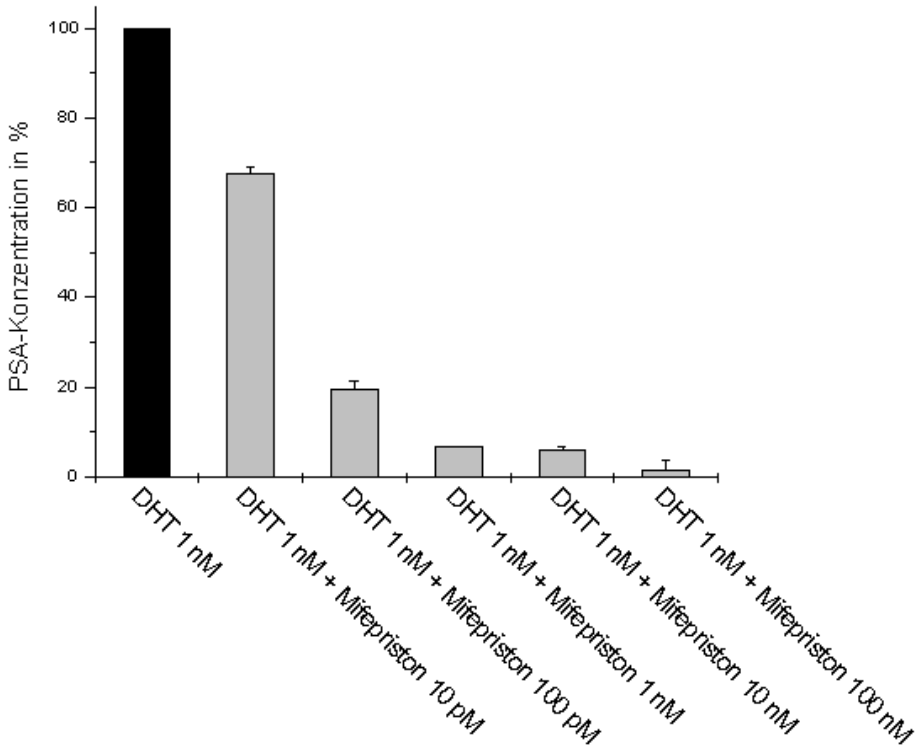


Abbildung 72: Antagonisierung der durch 1 nM DHT induzierten PSA-Induktion durch Mifepriston

Als Nächstes sollte die Induktion von PSA durch das synthetische Progestin Norgestimat einschließlich der potentiellen Antagonisierung durch den Androgenrezeptorantagonisten Hydroxyflutamid und das Antiprogestin Mifepriston untersucht werden.

Norgestimat bewirkt eine dosisabhängige PSA-Expression in T-47D-Zellen. Bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergab sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, bei der die halbmaximale PSA-Induktion mit 4,9 nM Norgestimat im Vergleich zu DHT mit 0,7 nM um fast eine Größenordnung nach rechts verschoben war (Abbildung 73). Das Testsystem erwies sich somit für das Progestin Norgestimat weniger sensitiv.

Die absolute PSA-Konzentration im oberen Plateau beträgt für Norgestimat etwa 60 % der durch DHT induzierten Konzentration. Erwähnenswert ist eine dosisabhängige Wachstumshemmung der T-47D-Zellen durch Inkubation mit 1 nM bis 100 nM Norgestimat von 18 bis 23 % (ohne graphische Darstellung). Unter Berücksichtigung der Wachstumshemmung ergibt sich für Norgestimat eine relative Effizienz, die etwa dreiviertel der maximalen durch DHT induzierten PSA-Konzentration beträgt.

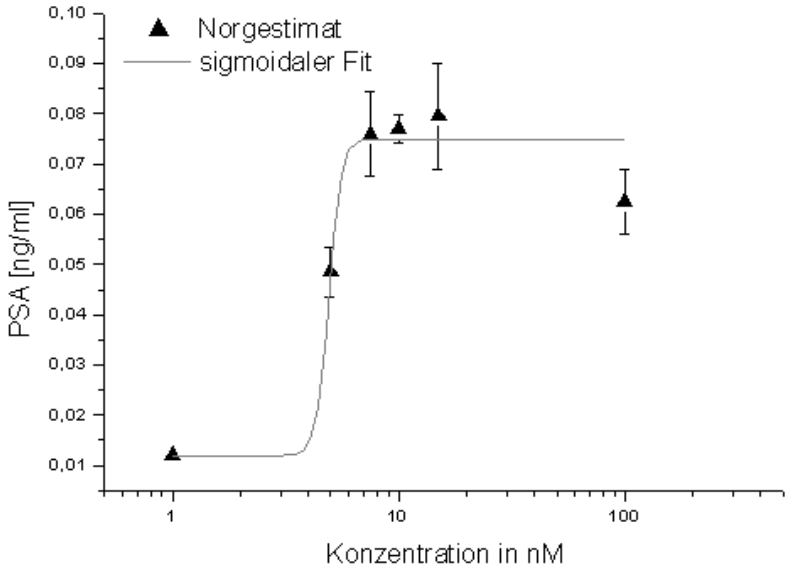


Abbildung 73: PSA-Induktion in T-47D-Zellen durch Norgestimat

7,5 nM Norgestimat wurden für Antagonisierungsexperimente eingesetzt, die vergleichend mit Hydroxyflutamid (Abbildung 74) und Mifepriston (Abbildung 75) durchgeführt wurden.

Für beide Verbindungen wurde eine dosisabhängige Hemmung der durch 7,5 nM Norgestimat induzierten PSA-Konzentration festgestellt. Die Substanzen zeigen vergleichbare antagonistische Aktivität. In beiden Fällen wird die induzierte PSA-Konzentration durch 100 pM des Antagonisten um 62 % gehemmt, während 1 µM Antagonist eine 70%ige und 10 µM eine 84%ige Hemmung bewirken. Unterschiede können lediglich in der Wachstumshemmung der T-47D-Zellen beobachtet werden (ohne graphische Darstellung). Während 10 µM Hydroxyflutamid die Zellproliferation um 20 % reduzieren, wird das Zellwachstum durch die gleiche Konzentration Mifepriston um 48 % gehemmt.

Auch in diesem Fall zeigten sich die Hormonrezeptorantagonisten Hydroxyflutamid und Mifepriston weit weniger spezifisch als angenommen.

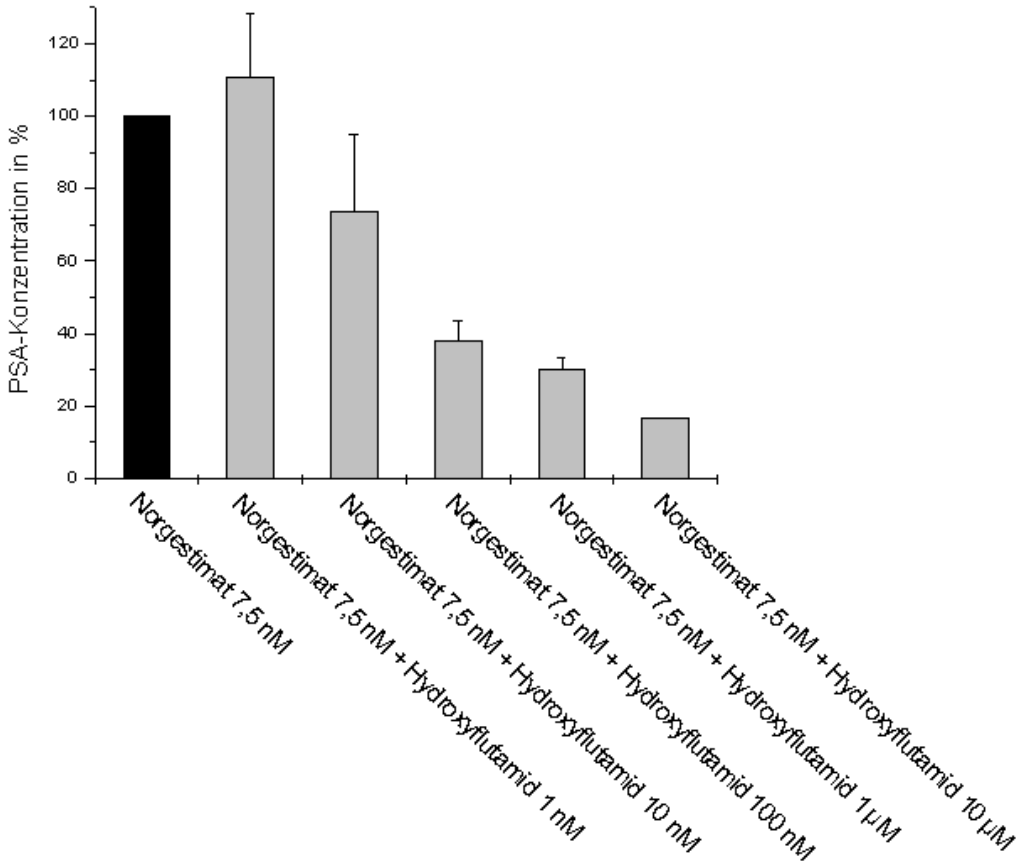


Abbildung 74: Antagonisierung der durch 7,5 nM Norgestimat induzierten PSA-Induktion durch Hydroxyflutamid

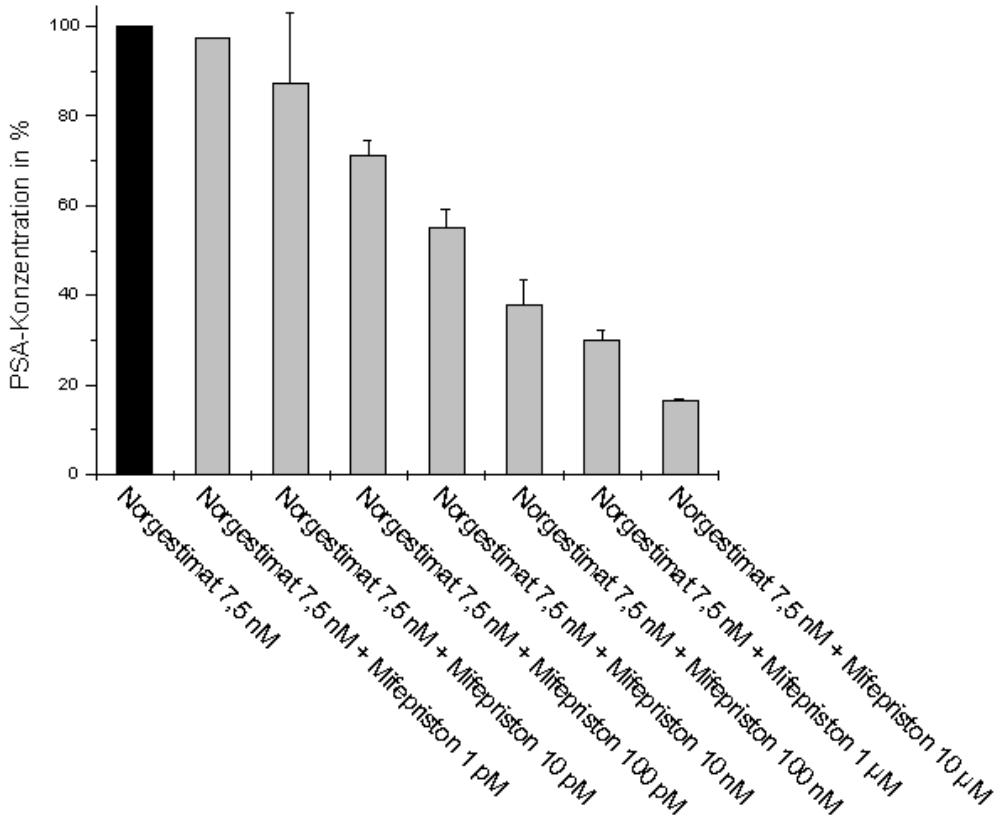


Abbildung 75: Antagonisierung der durch 7,5 nM Norgestimat induzierten PSA-Induktion durch Mifepriston

Abschließend sollte die Induktion von PSA durch das synthetische Glucocorticoid Dexamethason untersucht werden. Die Verbindung bewirkte erwartungsgemäß eine nur sehr schwache PSA-Induktion (Abbildung 76) und beginnende Wachstumshemmung von 10 % bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µM (ohne graphische Darstellung).

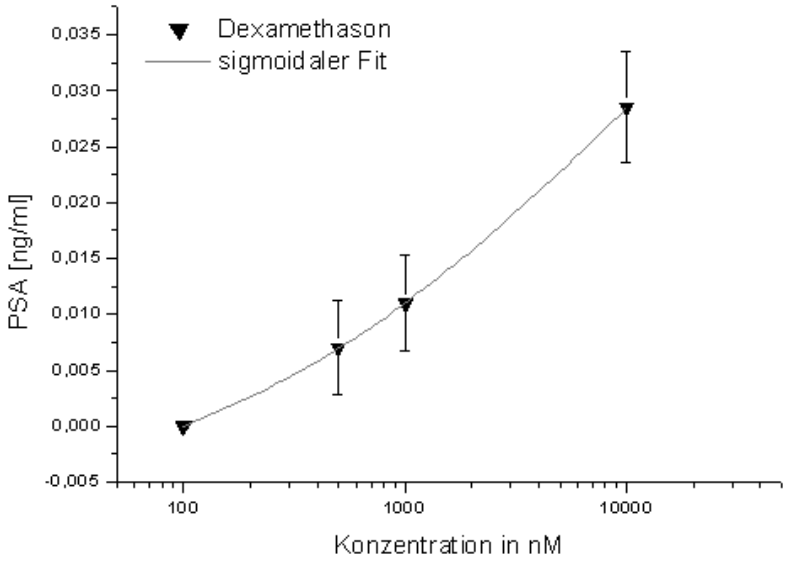


Abbildung 76: PSA-Induktion in T-47D Zellen durch Dexamethason

Im PSA-Assays in T-47D-Zellen zeigten die verwendeten Antagonisten Hydroxyflutamid und Mifepriston ein weit weniger spezifisches Verhalten gegenüber den Agonisten DHT und Norgestimat als in vergleichbaren Untersuchungen von Rosenberg et al. in der Mammakarzinom-Zelllinie BT-474. (Rosenberg et al.,1998)
Des Weiteren bleibt in einem Androgenrezeptor-selektiven Assay, wie dem transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen (Kapitel 4.2.1), zu klären, inwieweit Norgestimat und Dexamethason das Reportergen induzieren können und wie spezifisch die Antagonisierung durch Hydroxyflutamid und Mifepriston gegenüber dem synthetischen Norgestimat, Dexamethason und dem physiologischen Androgenrezeptorliganden DHT ausfällt.

4.1.4 Zusammenfassung: endogene Reportergenassays

In der vorliegenden Arbeit gelangen Etablierung und Validierung von drei *In-vitro*-Testsystemen zur Erfassung hormoneller/antihormoneller Aktivität mittels kompetitiver RT-PCR.

1. TRPM-2-Assay in T-47D-Zellen
2. TRPM-2-Assay in MCF-7-Zellen
3. pS2-Assay in MCF-7-Zellen

Des Weiteren konnte die Validierung des von Guth etablierten **PSA-Assays in T-47D-Zellen** durch die potentiellen Agonisten Norgestimat und Dexamethason fortgeführt werden. Deutlich weniger selektiv als in der Literatur beschrieben erwiesen sich der Androgenrezeptorantagonist Hydroxyflutamid und das Antiprogestin/Antiglucocorticoid Mifepriston (Abbildung 77). (Guth, 2000; Rosenberg et al., 1998)

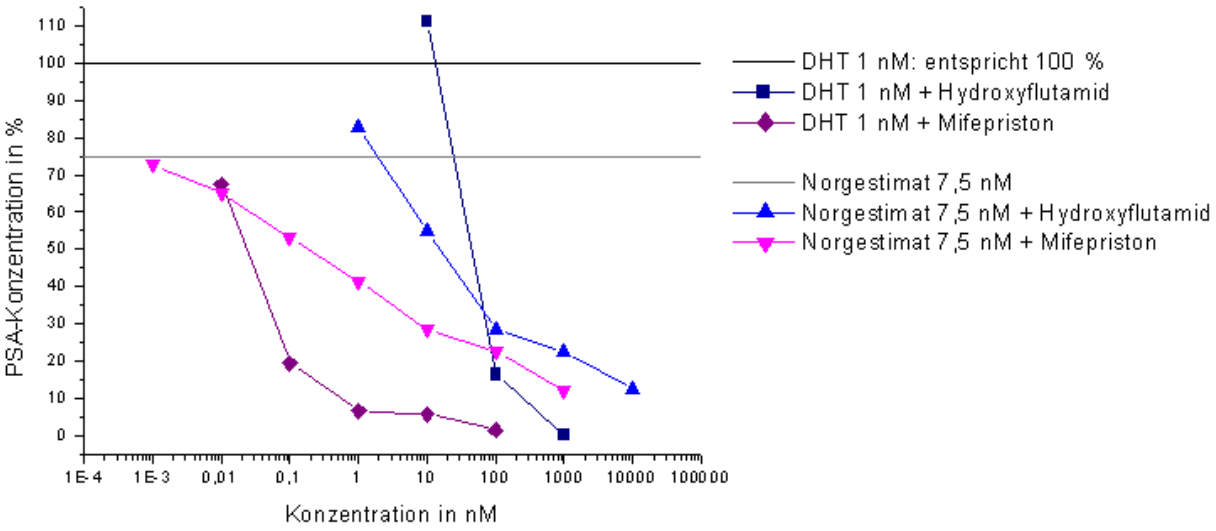


Abbildung 77: Antagonisierung der PSA-Induktion mit den Antagonisten Hydroxyflutamid und Mifepriston mittels PSA-Assay in T-47D-Zellen

Untersuchungen androgener/antiandrogener Aktivität zeigten den TRPM-2-Assay in T-47D-Zellen vergleichbar sensitiv wie die von Guth etablierten Transaktivierungsassays. Anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve von DHT kann die halbmaximale Genrepression im TRPM-2-Assay auf den Bereich um 10 nM abgeschätzt werden. Am sensitivsten und mit einer sehr steilen Dosis-Wirkungs-Kurve von DHT am präzisesten ist der PSA-Assay. Der EC_{50}-Wert liegt mit 0,71 nM etwa eine Größenordnung nach links verschoben. (Guth, 2000)

Zur Ermittlung von estrogenem/antiestrogenem Potential in MCF-7-Zellen weist der TRPM-2-Assay in MCF-7-Zellen mit einer sehr steilen Dosis-Wirkungs-Kurve von 17β-Estradiol und einem EC_{50}-Wert von 7,2 pM eine um etwa zwei Größenordnungen höhere Sensitivität auf als der von Mußler etablierte Transaktivierungsassay. Die Detektion von pS2-mRNA ist mit einem EC_{50}-Wert von 1,16 pM nochmals fast eine Dekade sensitiver. Im Vergleich zu dem von Seng etablierten pS2-Radio-Immuno-Assay zeigt der pS2-Assay auf RNA-Ebene ebenfalls eine um eine Größenordnung höhere Sensitivität. (Mußler, 1999; Seng, 2000)

Nachteil der endogenen Reportergenassays auf RNA-Ebene ist die im Vergleich zu anderen Assays deutlich aufwendigere Versuchsdurchführung.

Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse sollen im Folgenden zusammengefasst diskutiert werden.
Ein Vergleich hormoneller/antihormoneller Aktivität der untersuchten Verbindungen wird durch Darstellung der Kurven in einer Gesamtgraphik ermöglicht. Auf Angabe von Standardfehlern wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Sie können den Einzelgraphiken entnommen werden.

Zunächst sollen die Ergebnisse des TRPM-2-Assays in T-47D-Zellen diskutiert werden. Problematisch gestaltet sich die Einreihung der in Hemmexperimenten ermittelten Wirkstärke von Verbindungen, weil diese bis auf wenige Ausnahmen nicht den gesamten Dosis-Wirkungs-Bereich einer Sigmoide wiedergeben. Ein Grund dafür ist die Limitierung des getesteten Konzentrationsbereichs durch Cytotoxizität und Löslichkeitsprobleme im Bereich oberhalb 10 µM und ein begrenzter Zeitraum für fehlende Messpunkte im Bereich von niedrigeren Konzentrationen. Das bedeutet, dass ein logistischer Fit in den meisten Fällen nicht möglich war und somit andere Kriterien für das Ranking herangezogen werden mussten. Es besteht die Möglichkeit, die Potenz von Verbindungen nach Konzentration signifikanter (Definition siehe 4.1.1.2) oder halbmaximaler Antagonisierung der durch DHT reprimierten TRPM-2-Expression zu sortieren. Beide Verfahren sind mit relativ großen Fehlern behaftet.
Ein relativer Vergleich antiandrogener Aktivität der untersuchten Verbindungen wird durch die Darstellung der Kurven in der Gesamtgraphik ermöglicht. Anhand von Konzentrationswerten für halbmaximale Antagonisierung der durch DHT reprimierten TRPM-2-Expression lassen sich die untersuchten Verbindungen in einer Reihe mit steigender Aktivität aufstellen: Hydroxyflutamid (~ 4 µM) ≤ Oxybenzon (~ 3 µM) < p,p`-DDE = p,p`-Dichlorbenzophenon (~ 200 nM) < Linuron (~ 3 nM).
In Abbildung 78 ist zu erkennen, dass diese Reihe nicht unbedingt die Kurvenverläufe widerspiegelt. Während Hydroxyflutamid und p,p`-DDE relativ steile Kurven von annähernd sigmoidalem Verlauf zeigen, die eine verhältnismäßig präzise Aussage bezüglich der Aktivität zulassen, sind bei den Benzophenonderivaten Oxybenzon und p,p`-Dichlorbenzophenon eher sesselförmige Kurvenverläufe zu erkennen.

Ergebnisse der Kompetitionsexperimente mit Linuron weisen keinen sigmoidalen Kurvenverlauf auf. Das untere Plateau wurde nicht ermittelt. Der Abfall einer Dosis-Wirkungs-Beziehung, wie er bei Linuron ab 100 nM ausgeprägt auftritt, kann auf destabilisierende Effekte der mRNA durch die Inkubationssubstanz zurückzuführen sein oder auf potentielle agonistische Aktivität einer Verbindung in hohen Konzentrationen hinweisen. Da Guth im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen für Linuron kein agonistisches Potential nachweisen konnte, scheinen dem Kurvenabfall andere Ursachen zugrunde zu liegen. Signifikant antagonistische Aktivität wurde für 10 nM Linuron detektiert. (Guth, 2000)

p,p`-DDE antagonisierte die durch 10 nM DHT reprimierte TRPM-2-Expression im Konzentrationsbereich zwischen 100 nM und 1 µM signifikant. Für Hydroxyflutamid begann signifikant antagonistische Aktivität erst bei 10 µM. Das obere Plateau der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde somit nicht erreicht.

Bei p,p`-Dichlorbenzophenon setzte die Hemmwirkung bereits bei 100 pM ein. Die durch 10 nM DHT induzierte TRPM-2-Repression wurde durch 1 µM p,p`-Dichlorbenzophenon signifikant antagonisiert. Bei Oxybenzon erfolgte die Antagonisierung der durch 10 nM DHT reprimierten TRPM-2-Expression signifikant durch 10 nM, halbmaximal durch etwa 3 µM. In beiden Fällen zeigte p,p`-Dichlorbenzophenon höhere antiandrogene Potenz als Oxybenzon.

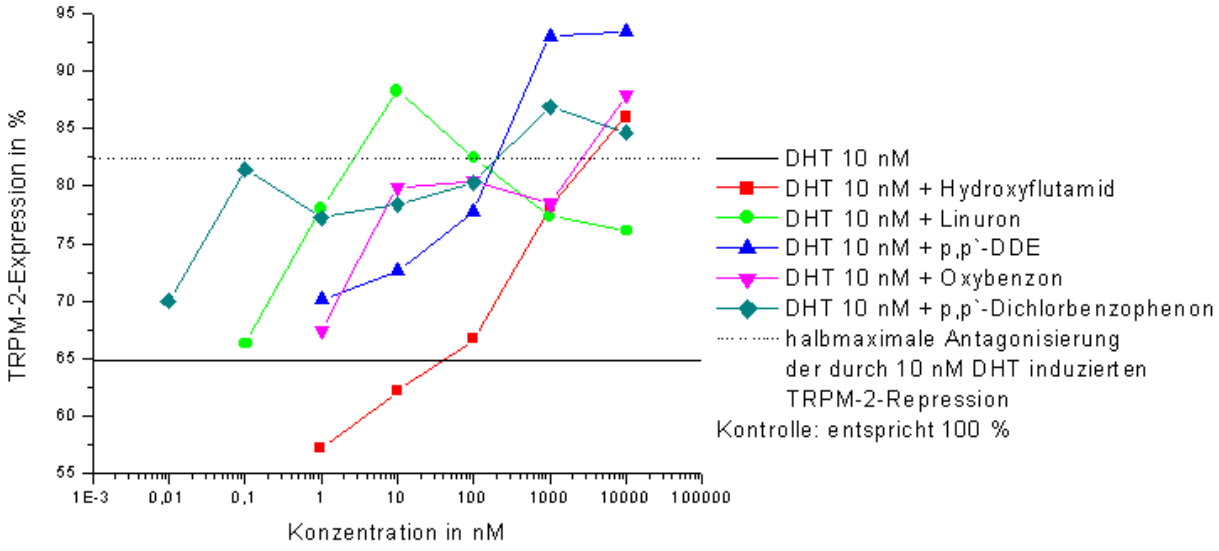


Abbildung 78: Untersuchungen antiandrogener Aktivität verschiedener Verbindungen im endogenen TRPM-2-Reportergenassay in T-47D-Zellen

In MCF-7-Zellen bewirkten neben 17β-Estradiol DES und Resveratrol eine TRPM-2-Repression. Für beide Verbindungen wurde keine vollständige Dosis-Wirkungs-Kurve

ermittelt. 1 pM DES senkte die TRPM-2-Expression noch deutlich unter das Kontrollniveau, während 1 nM DES eine Repression der TRPM-2-Genexpression bis ins untere Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve von 17β-Estradiol bewirkte. Für 10 µM Resveratrol wurde im Vergleich zu 1 nM 17β-Estradiol eine halbmaximale Repression der TRPM-2-Expression festgestellt.

Hemmexperimente mit ICI 182 780 bewirkten eine Antagonisierung der durch die Agonisten 17β-Estradiol, DES und Resveratrol induzierten TRPM-2-Repression. 100 nM ICI 182 780 überinduzierten in den untersuchten Fällen die reprimierte TRPM-2-Expression um 57 bis 71 % (Abbildung 79). Induktion von TRPM-2-Expression könnte auf Apoptose-induzierende Wirkung von ICI 182 780 zurückzuführen sein. (Ercoli et al., 1998; Ercoli et al., 2000; Wilson et al., 1995)

Bei Resveratrol wurde für die beiden niedrigsten und die höchste eingesetzte Konzentration schwache, nicht signifikante antagonistische Aktivität festgestellt (Abbildung 79). Während Untersuchungen von Höll auf antiestrogene Aktivität von Resveratrol in niedrigen Konzentrationen hinweisen, beschreiben Lu und Serrero denselben Effekt für Konzentrationen ab 1 µM. Die vorhandenen Messdaten im endogenen TRPM-2-Reportergenassay reichen für eine abschließende Beurteilung nicht aus. Grund ist möglicherweise eine suboptimale Dosierung von 17β-Estradiol und Resveratrol. In der Literatur sind für niedrige 17β-Estradiol-Konzentrationen sogar additive Effekte in Coinkubation mit Resveratrol beschrieben. (Basley et al., 1999; Höll, 1999; Kopp, 1998; Lu and Serrero, 1999)

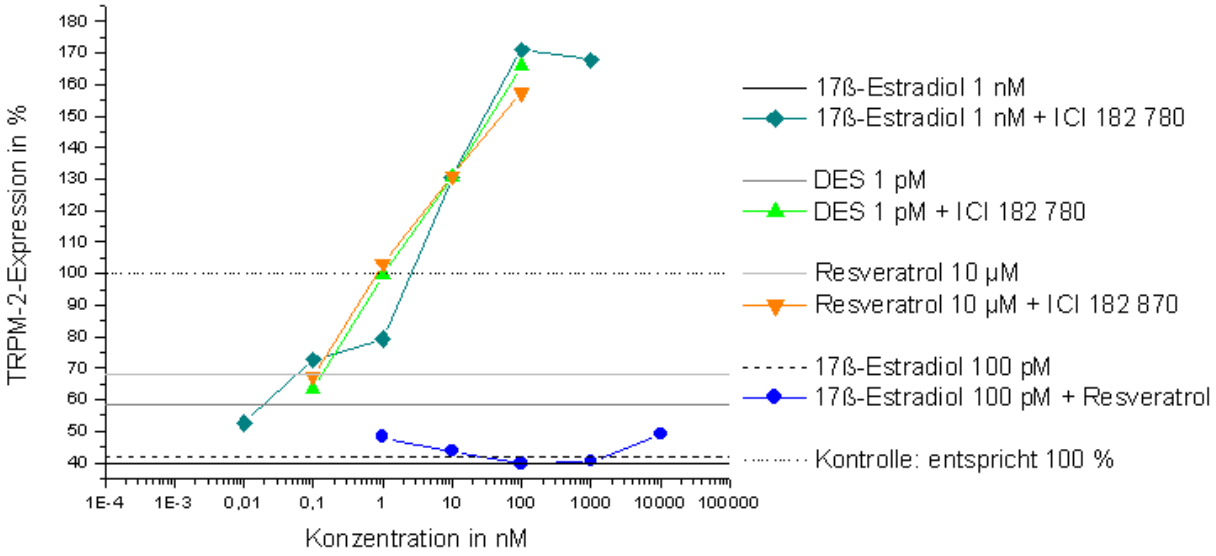


Abbildung 79: Untersuchungen antiestrogener Aktivität im endogenen TRPM-2-Reportergenassay in MCF-7-Zellen

Analog zu der Repression der TRPM-2-Expression durch 17β-Estradiol, DES und Resveratrol induzieren die Verbindungen in MCF-7-Zellen pS2. 1 pM DES induziert die Genexpression von pS2 auf etwa 90 % des Sättigungsplateaus von 17β-Estradiol, das durch 100 pM 17β-Estradiol erreicht wird. Durch 10 µM Resveratrol wurde eine maximale pS2-Expression induziert.

Hemmexperimente mit ICI 182 780 zeigten für 17β-Estradiol, DES und Resveratrol eine vollständige Unterdrückung der pS2-Expression (Abbildung 80). Coinkubationen von 100 pM 17β-Estradiol mit Resveratrol ließen keine antagonistischen Effekte erkennen. Allerdings zeigte die Coinkubation mit 100 nM Resveratrol in Analogie zu Untersuchungen von Höll im transgenen Reportergenassay die niedrigste Induktion. Der ermittelte V-förmige Kurvenverlauf könnte zudem auf partiell agonistische/antagonistische Aktivität von Resveratrol hindeuten (Abbildung 80). (Höll, 1999)

Durch 10 µM Resveratrol in Coinkubation mit 100 pM 17β-Estradiol wurde eine signifikante Expressionssteigerung um 26,6 % festgestellt. Diese kann in dem von Kopp beschriebenen additiven Effekt suboptimaler Dosierungen von Resveratrol und 17β-Estradiol begründet sein. (Kopp, 1998)

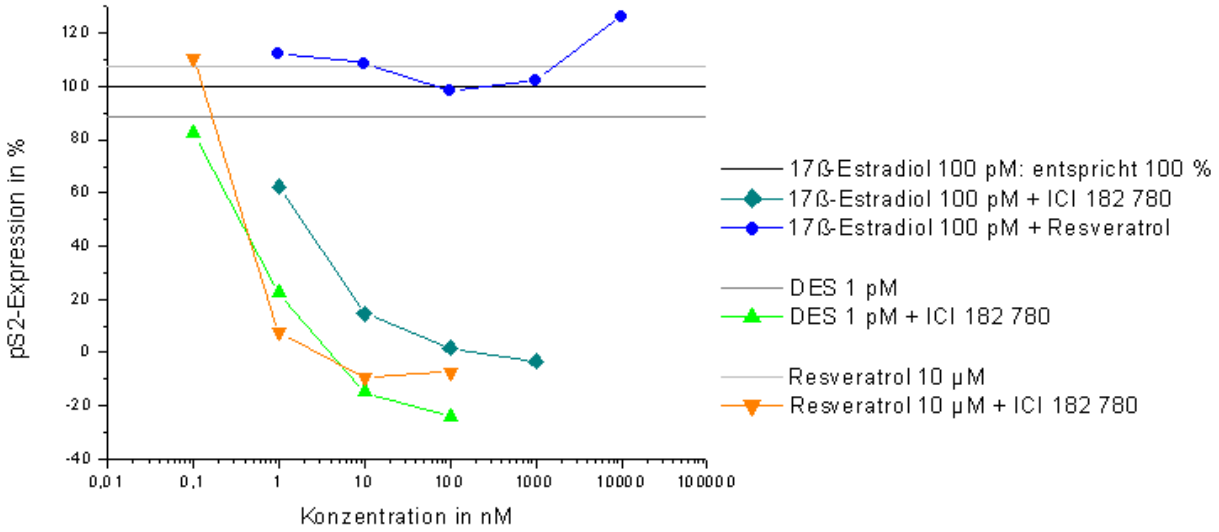


Abbildung 80: Untersuchungen antiestrogener Aktivität im endogenen pS2-Reportergenassay in MCF-7-Zellen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TRPM-2 ein geeigneter endogener Reporter für androgene/antiandrogene und estrogene/antiestogene Wirkung ist. Er bietet die Möglichkeit, in entsprechenden Zielzellen beide Aktivitäten anhand desselben Gens zu detektieren. Welche kontrollierenden Elemente bei der Regulierung des TRPM-2-Promotors eine entscheidende Rolle spielen, ist ungeklärt. Responsive Elemente für Androgen- und Estrogenrezeptor sind auf dem nicht vollständig charakterisierten TRPM-2-Promotor noch nicht identifiziert.

Zur sensitiven Detektion von estrogenem/antiestrogenem Potential bietet sich ebenfalls das pS2-Gen an. Auf RNA-Ebene lässt sich mittels RT-PCR ein sehr frühes Signal beider Gene detektieren.

Für eine kompetitive RT-PCR ist die Eichung des Standards auf jede einzelne RNA-Aufarbeitung ebenso notwendig wie eine Vielzahl von Wiederholungen. Daneben spielt die Kinetik eine wichtige Rolle.

Ein alternatives Testsystem zur Quantifizierung der TRPM-2-Expression ist nicht vorhanden. Für pS2 bietet sich die Quantifizierung des Proteins mittels Radio-Immuno-Assay an. Bei etwas niedrigerer Sensitivität ist der Aufwand der Versuchsdurchführung deutlich geringer.

4.2 Transgene Reportergenassays in Säugerzellen

Unter transgenen Reportergenen werden Gene oder Genfragmente verstanden, die endogen nicht in der Zelle vorkommen und für detektierbare und quantifizierbare Genprodukte kodieren.

Einsatz finden Reportergene zum einen bei funktionellen Untersuchungen potentieller Promotor-/Enhancer-enthaltender DNA-Fragmente bezüglich ihrer transkriptionsregulierenden Funktion. Zu untersuchende Sequenzen werden im Vektor vor die kodierende Sequenz des Reportergens kloniert. Über den spezifischen Nachweis des Reportergens können die regulatorischen Sequenzen identifiziert werden. Zum anderen, wie in der vorliegenden Arbeit, werden Reportergene zum Nachweis ligandinduzierter Transkriptionsaktivierung herangezogen. In dem Fall wird eine durch den zu untersuchenden Liganden kontrollierte Promotor-Region vor das Reportergen kloniert. (Alam and Cook, 1990; Hartmann, 1991)

Als Reportergen kam in dieser Arbeit Luciferase zur Anwendung. Luciferasen sind Biolumineszenz-Reaktionen katalysierende Enzyme, die in Glühwürmchen, Leuchtkäfern sowie marinen Organismen wie Fischen, Bakterien und Muscheln identifiziert wurden.

Das verwendete Luciferasegen entstammt der nordamerikanischen Feuerfliege *Photinus pyralis*. Das 62 kDa große Polypeptid-Monomer ist eine Oxygenase, die die heterocyclische organische Säure Luciferin oxidiert. In einer von ATP und Magnesium abhängigen Reaktion wird eine Acyl-AMP-Zwischenstufe des Luciferins gebildet, die unter Einwirkung von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert. Das angeregte Oxyluciferin emittiert nach Decarboxylierung Photonen, die luminometrisch bei 560 nm vermessen werden können. Die Halbwertszeit von wenigen Sekunden wird durch Zugabe von Coenzym A deutlich erhöht. (Hartmann, 1991; Wood, 1990)

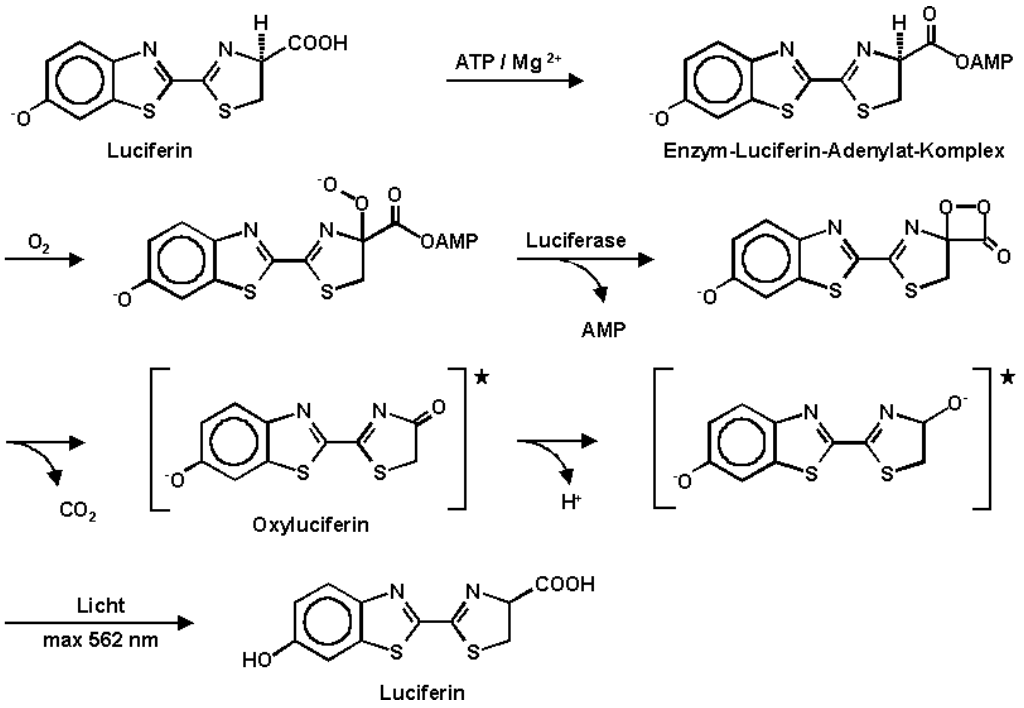


Abbildung 81: Mechanismus der enzymatischen Leuchtkäfer-Luciferase (nach Gundermann, McCapra, 1987)

Vorteile transgener Reportergenassays auf Basis der Luciferase sind:

- hohe Sensitivität und großer Linearitätsbereich (8 Dekaden)
- Fehlen von Hintergrundsignalen aus endogener Enzymaktivität
- schnelle und einfache Durchführung
- kostengünstig

Für die Isolierung der Luciferase ist eine Zelllyse erforderlich. (Promega, 1998; Hartmann, 1991)

Als weiteres Reportergen kam in dieser Arbeit β-Galactosidase zur Anwendung. β-Galactosidase ist befähigt, β-Galactoside zu hydrolysieren. Bei der Umsetzung eines Chemolumineszenz-Substrates werden Photonen freigesetzt, die mittels Luminometer erfasst werden können. Die sensitive Reaktion mit einer Nachweisgrenze von 10^{-13} g Protein hat einen Linearitätsbereich über mehrere Größenordnungen. Isolierung von β-Galactosidase setzt ebenfalls eine Zelllyse voraus. (Alam and Cook, 1990; Clontech, 1999)

4.2.1 Transienter Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen zur Identifizierung von androgenem/antiandrogenem Potential

Für transiente Transfektionen mit von SV-40 abgeleiteten Plasmiden eignen sich COS-7-Zellen besonders, da sie mit einer in der „origin"-Region defekten Mutante des SV-40 transformiert sind. Durch das funktionelle SV-40-T-Antigen in COS-7-Zellen kommt es zu einer verstärkten Replikation und somit auch Expression der Plasmide, die den „SV-40 origin of replication" enthalten. Nach 72 Stunden führt die hohe extrachromosomale Plasmid-Konzentration mit bis zu 10^5 Kopien allerdings zum Absterben der Zelle, so dass keine stabile Transfektion möglich ist. (Maniatis et al., 1989)

Zur Erfassung androgener/antiandrogener Aktivität in Zelllinien ohne endogenen Androgenrezeptor wurde der Vektor pSG5AR als Androgenrezeptor-Expressionsplasmid verwendet (Abbildung 82). Der humane AR wird unter der Kontrolle des SV-40-Promotors (SV-40 = „Simian Virus 40") exprimiert. Als Reportergenvektor kam das Plasmid pMamneoLuc zur Anwendung. Die Expression des Reportergens Luciferase wird durch den Androgenrezeptor-kontrollierten MMTV-Promotor gesteuert (Abbildung 82). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Vektor pSV-β cotransfiziert (Abbildung 82). Das Reportergen für β-Galactosidase wird unter der Kontrolle des SV-40-Promotors konstitutiv exprimiert. (Guth, 2000)

Die verwendeten Plasmide wurden in E.coli transformiert, amplifiziert und mittels Maxipräparation aufgereinigt.

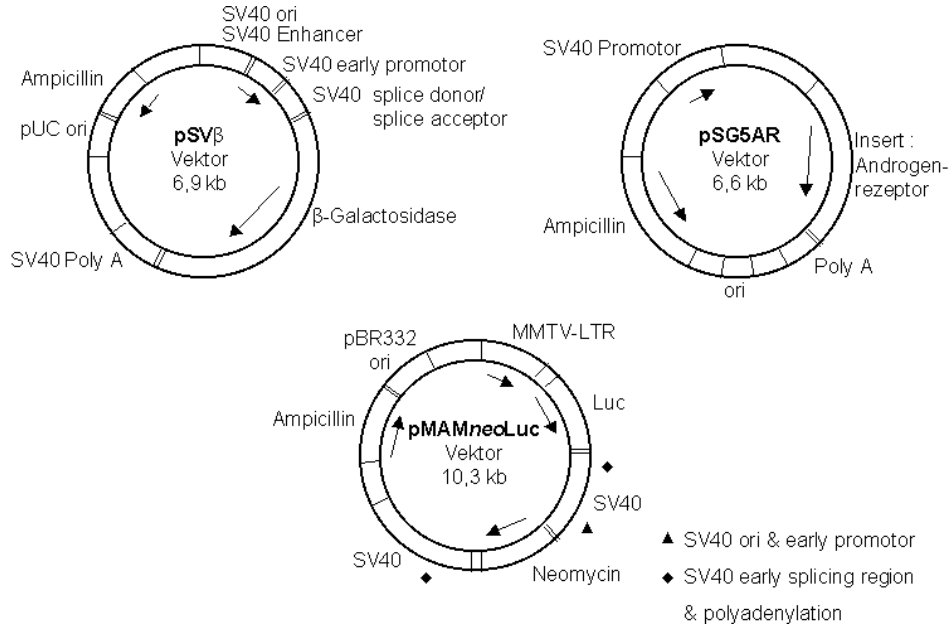


Abbildung 82: Schematische Darstellung der Plasmide pMamneoLuc, pSG5AR und pSVβ

Der Gentransfer der drei Plasmide pMamneoLuc, pSG5AR und pSVβ erfolgte mittels Elektroporation. Achtzehn Stunden nach der Transfektion wurde für 24 Stunden mit Testsubstanzen inkubiert, weitere 24 Stunden nachinkubiert und anschließend eine Zelllyse durchgeführt. Luciferase- wie auch β-Galactosidase-Aktivität des Lysats wurden luminometrisch vermessen. Durch Abgleich mit der β-Galactosidaseaktivität konnte die normalisierte Luciferaseaktivität bestimmt werden.

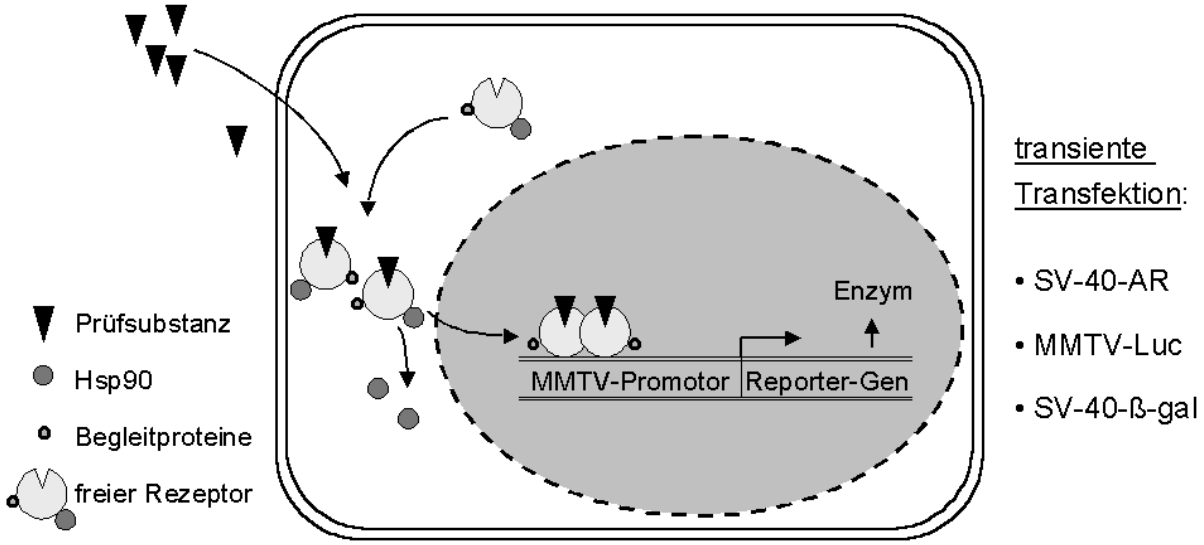


Abbildung 83: Transienter Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen

Inkubation mit dem physiologischen Liganden Dihydrotestosteron (DHT) ergibt für den mehrere Größenordnungen umfassenden Dosisbereich die erwartete Dosis-

Wirkungs-Beziehung. Bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergibt sich der für rezeptorvermittelte Prozesse typische sigmoidale Kurvenverlauf. Der EC_{50}, 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. (Guth, 2000)

Die Signifikanzschwelle für agonistische Aktivität gibt im transienten Transaktivierungsassay das obere 95. Percentil des unteren Plateaus A1 mit 17,2 % der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität an. Das untere 95. Percentil der verwendeten Hemmkonzentration von 100 nM DHT gibt die Signifikanzschwelle für antagonistische Aktivität mit 83,3 % der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität an.

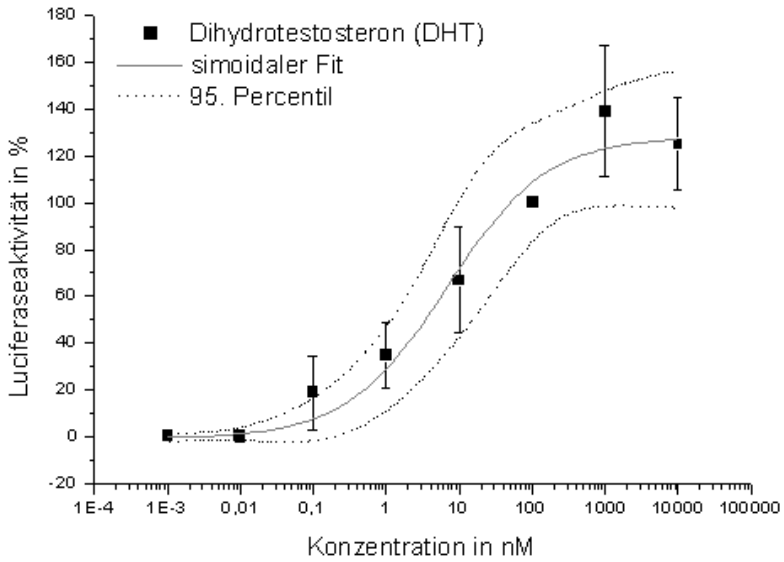


Abbildung 84: Androgene Aktivität des physiologischen Androgenrezeptorliganden DHT im transienten Transaktivierungsassay (Guth, 2000)

4.2.2 Stabil transfizierter Transaktivierungsassay in T-47D-Zellen zur Identifizierung von antiandrogenem Potential

Für ein effizientes Screening wurde von Guth eine stabile transgene Zelllinie etabliert. Das Reportergenplasmid pMamneoLuc wurde mittels Elektroporation in T-47D-Zellen transfiziert (Abbildung 82). Die Expression des Reportergens Luciferase wird durch den Androgenrezeptor-kontrollierten MMTV-Promotor gesteuert. Das im Vektor enthaltene Neomycin-Resistenzgen ermöglicht die permanente Selektion mit dem Antibiotikum Geniticin. (Guth, 2000)

Neben ligandaktivierten Androgenrezeptoren binden auch ligandaktivierte Progesteron- und Glucocorticoidrezeptoren an den MMTV-Promotor. Daher eignet sich das Testsystem nicht ohne weiteres zur Prüfung agonistischer Aktivität am AR. Lediglich antagonistische Aktivität lässt sich durch Hemmung der durch Agonisten induzierten Reportergenaktivität ermitteln.

Die in Geniticin-haltigem Medium kultivierten T-47D-Luc-Zellen wurden für 24 Stunden mit Testsubstanzen inkubiert, 24 Stunden nachinkubiert und anschließend lysiert. Die Luciferaseaktivität des Lysats wurde luminometrisch vermessen.

Nach Inkubation mit dem physiologischen Liganden Dihydrotestosteron (DHT) zeigte sich die erwartete Dosis-Wirkungs-Beziehung über einen Bereich von mehreren Größenordnungen. Bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit liegt der Wendepunkt der Kurve mit 1,2 nM fast eine Größenordnung unterhalb des physiologischen DHT-Bereichs.

Als Hemmkonzentrationen wurden im T-47D-Luc-Reportergenassay jeweils 10 und 100 nM DHT eingesetzt. Die Ergebnisse der Versuchsreihen stimmten allgemein überein, so dass im Folgenden ausschließlich Kompetitionsexperimente mit 10 nM DHT dargestellt sind. Die DHT-Konzentration von 100 nM diente bei allen Messreihen als Bezugspunkt. Daher konnte für den Wert kein Fehler angegeben werden.

Das untere 95. Percentil der verwendeten Hemmkonzentration gibt im stabilen T-47D-Luc-Assay die Signifikanzschwelle für antagonistische Aktivität der durch 10 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität mit 83,1 % der durch 10 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität an.

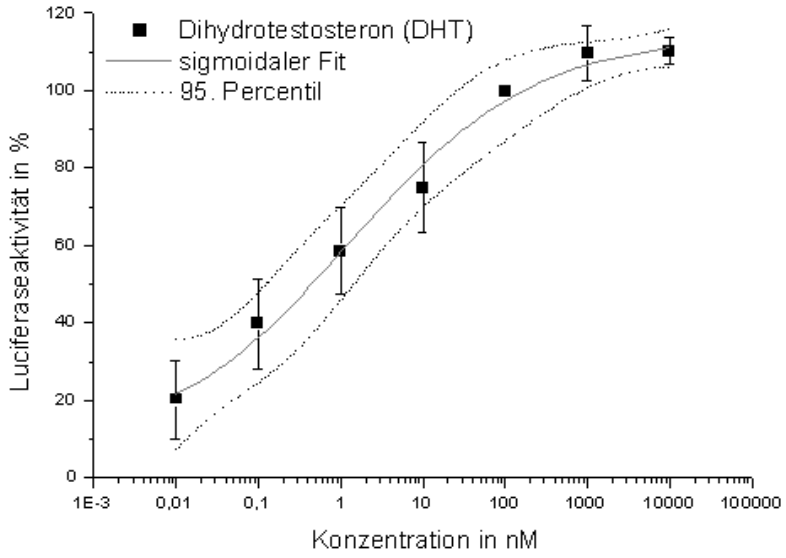


Abbildung 85: Androgene Aktivität des physiologischen Androgenrezeptorliganden DHT im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay

4.2.3 Stabil transfizierter Transaktivierungsassay in MCF-7-Zellen zur Identifizierung von estrogenem/antiestrogenem Potential

Zur schnellen, einfachen Charakterisierung estrogen/antiestrogen aktiver Verbindungen entwickelten Pons et al. auf Basis von MCF-7-Zellen einen stabil transfizierten Transaktivierungsassay, der die Expression der Feuerfliegen-Luciferase unter Kontrolle des *Xenopus-laevis*-Vitellogenin-A2-Promotors erlaubt.

Die Zelllinie exprimiert humanen Estrogenrezeptor endogen, so dass keine Cotransfektion eines Estrogenrezeptor-Expressionsplasmids erforderlich war. Bei dem verwendeten rekombinanten Plasmid pVIT-tk-Luc des estrogensensitiven Assays ist die 5`-flankierende Region des Vitellogenin-A2-Gens (-48 bis -87), das ein ERE und estrogenresponsive Regionen enthält, an den starken Promotor des Thyminkinasegens (tk) des Herpes-Simplex-Virus gekoppelt. Dieser regulatorische Teil kontrolliert die Expression des Strukturgens der Luciferase. Zur Selektion wurde neben dem pVIT-tk-Luc das Plasmid pAG 60 in die Zellen cotransfiziert. Es enthält das Gen für bakterielle Aminoglycosid-Phosphotransferase unter Kontrolle des tk-Promotors, dessen Expression die Resistenz gegen Neomycin ermöglicht. (Pons et al., 1990)

Vom „Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee“ (EDSTAC) wird die MCF-7-VITA2-Luciferase-(MCF-7-Luc, MVLN)-Zelllinie als am besten

geeignetes und valides Testsystem für *In-vitro*-Untersuchungen von endokrinen Disruptoren empfohlen (EDSTAC, 1998).

Inkubation mit Testsubstanzen und Nachinkubation erfolgte in MCF-7-Luc-Zellen für jeweils 24 Stunden. Nach der Zelllyse wurde die Luciferaseaktivität im Lysat luminometrisch vermessen.

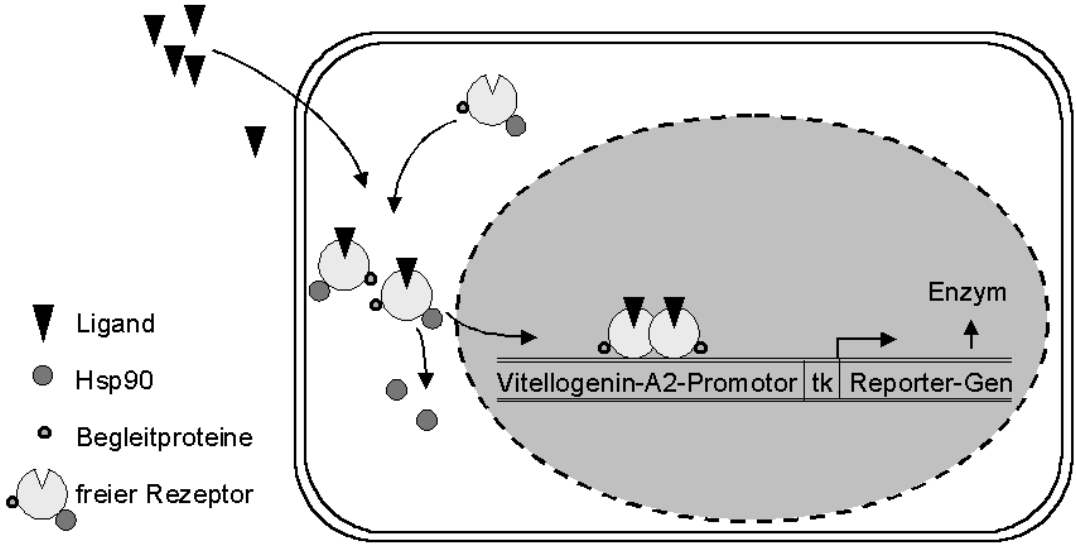


Abbildung 86: Stabiler Transaktivierungsassay in MCF-7-Zellen

Nach Inkubation mit dem physiologischen Liganden 17ß-Estradiol (E_2) zeigte sich die erwartete Dosis-Wirkungs-Beziehung über einen Bereich von mehreren Größenordnungen. Nach halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergibt sich ein für rezeptorvermittelte Prozesse typischer sigmoidaler Kurvenverlauf.

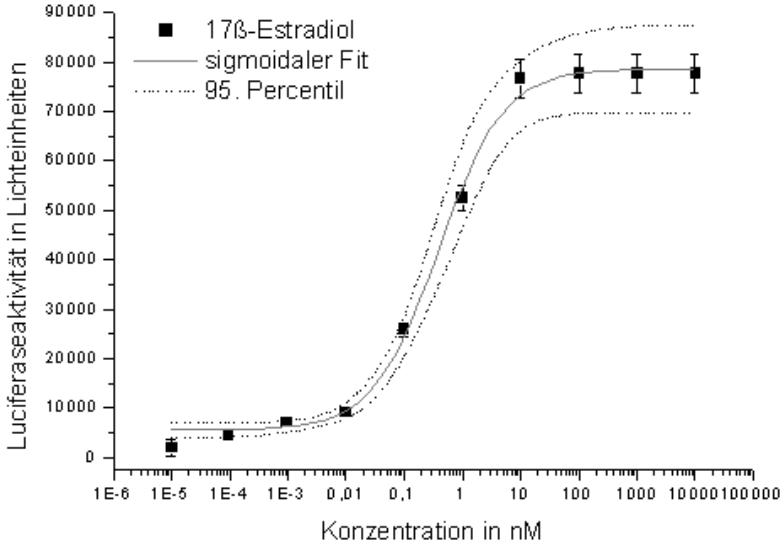
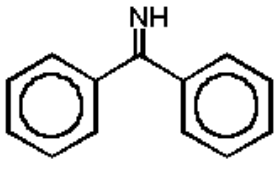


Abbildung 87: Estrogene Aktivität des physiologischen Estrogenrezeptorliganden 17ß-Estradiol im stabilen MCF-7-Luc-Reportergenassay (Mußler, 1999)

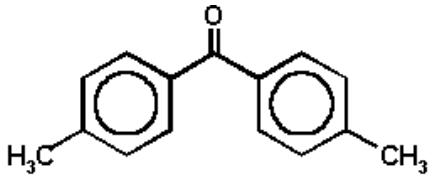
4.3 Untersuchungen ausgewählter Verbindungen auf androgene/antiandrogene Aktivität in den etablierten Testsystemen (T-47D-Luc-, COS-AR-Luc- und PSA-Assay)

Zurückgreifend auf die Konsensusstrukturen nichtsteroidaler Antiandrogene von Mußler, hat Guth zur Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf androgenes/antiandrogenes Potential, Phenylharnstoff-Analoga und Benzophenon-Derivate mit möglichst unterschiedlichen Substituenten sowie die unsubstituierten Analoga Phenylharnstoff und Benzophenon in geeigneten Transaktivierungsassays untersucht. (Mußler, 1999; Guth, 2000)

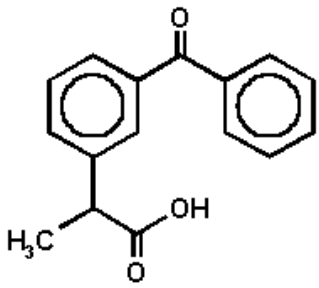
Auf ihr mögliches androgenes/antiandrogenes Potential sollten weitere strukturverwandte Benzophenon-Derivate, Pharmaka, ein potentielles Phytoandrogen/-antiandrogen und zwei steroidale Verbindungen mittels der vorgestellten Reportergensysteme untersucht werden.



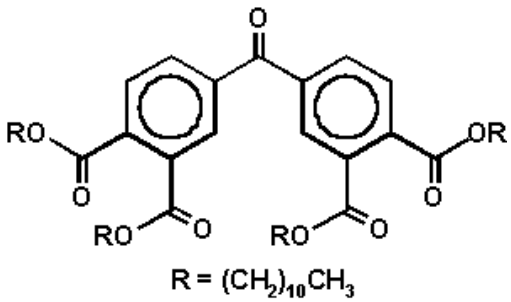
Benzophenonimin



p,p`-Dimethylbenzophenon

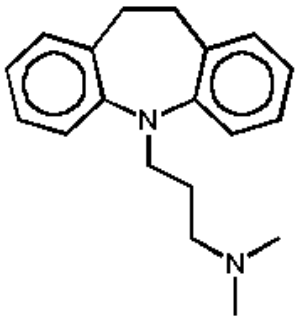


Ketoprofen

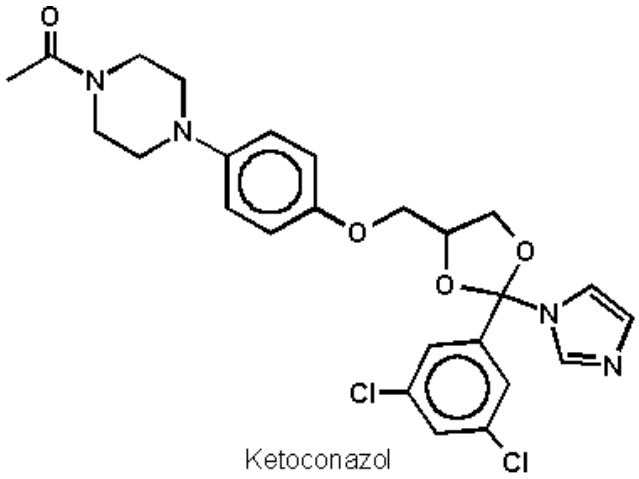


Selectophor ®

Abbildung 88: Benzophenon-Analoga



Imipramin



Ketoconazol

Abbildung 89: Pharmaka: Imipramin und Ketoconazol

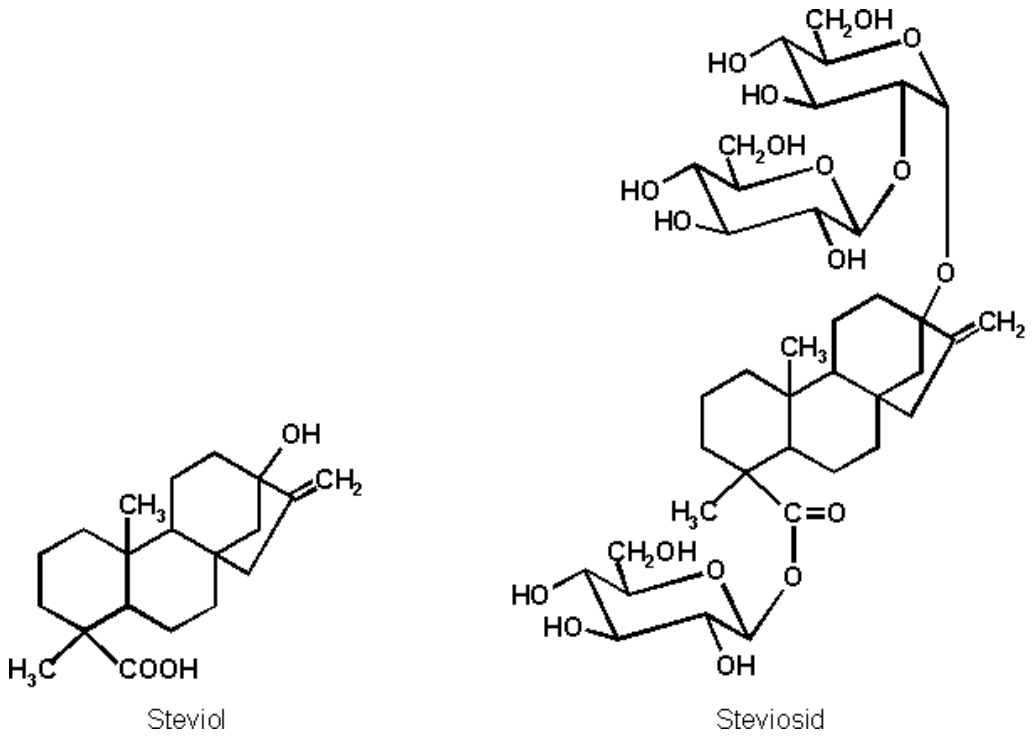


Abbildung 90: Phytoandrogen/-antiandrogen aus *Stevia rebaudiana*

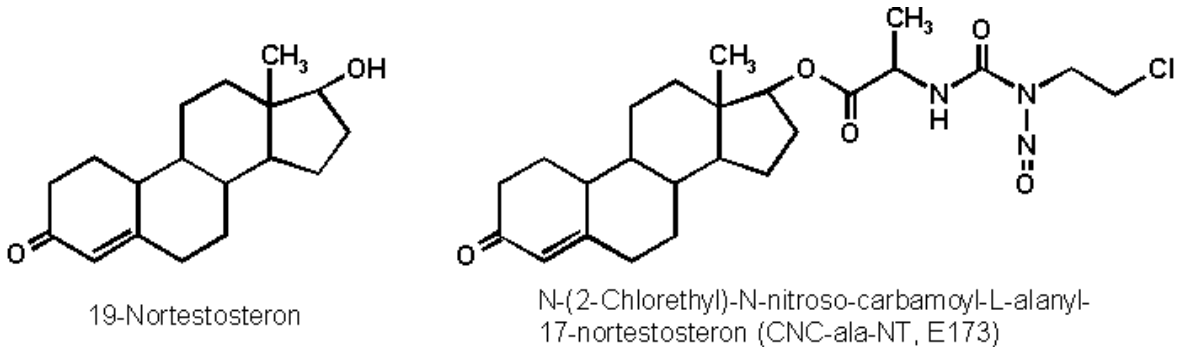


Abbildung 91: steroidale Androgenrezeptorliganden

4.3.1 Benzophenon-Analoga

4.3.1.1 Benzophenonimin

Um festzustellen, ob für die Substanzklasse der Benzophenone das Sauerstoffatom auf die Ligand-Rezeptor-Interaktion entscheidenden Einfluss hat, wurde das entsprechende Imin untersucht.

Die Ergebnisse der drei Testsysteme waren nicht einheitlich. Im stabilen T-47D-Reportergenassay wurde für Benzophenonimin keine signifikante Hemmung der durch DHT induzierten Luciferaseexpression detektiert (Abbildung 92). Im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen dagegen zeigte Benzophenonimin antiandrogene Aktivität. Die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität wurde mit 100 nM Benzophenonimin um 27 % gehemmt (Abbildung 93). Der Einbau von Stickstoff bewirkt somit eine Verringerung antiandrogener Aktivität um mehr als die Hälfte im Vergleich zu Benzophenon, das bei 100 nM 60%ige Hemmung induzierte (Guth, 2000). Agonistische Wirkung wurde im transienten Transaktivierungsassay für 1 µM Benzophenonimin, vergleichbar mit der durch 100 pM DHT induzierten Aktivität, an der Grenze der Signifikanzschwelle ermittelt. Eine höhere Konzentration von 10 µM zeigte dagegen keinen agonistischen Effekt (Abbildung 94).

Im PSA-Assay wurde eine 22%ige Hemmung des durch 1 nM DHT induzierten PSA durch Coinkubation mit 10 µM Benzophenonimin erreicht (Abbildung 95). Cytotoxische Effekte wurden im untersuchten Konzentrationsbereich nicht festgestellt. Das antiandrogene Potential von Benzophenonimin wurde somit in einem zweiten Assay bestätigt, wenngleich der Einbau von Stickstoff eine Abnahme der Rezeptoraffinität des Benzophenon-Derivats zu bewirken scheint.

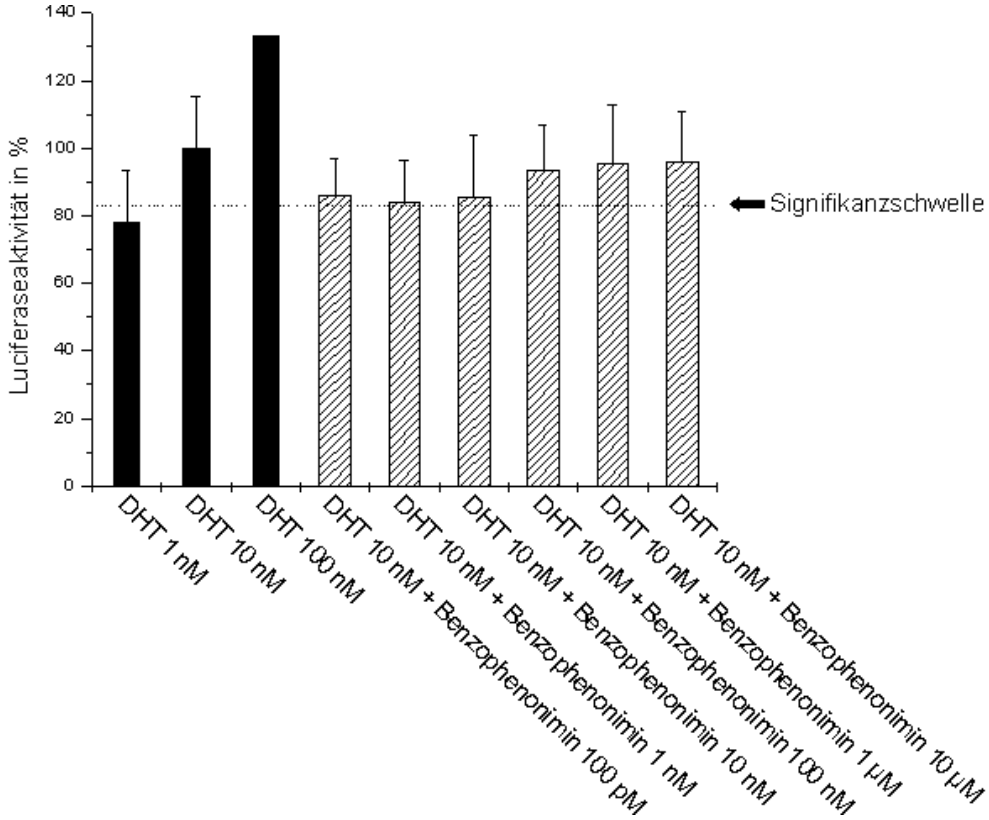


Abbildung 92: Antiandrogene Aktivität von Benzophenonimin im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay

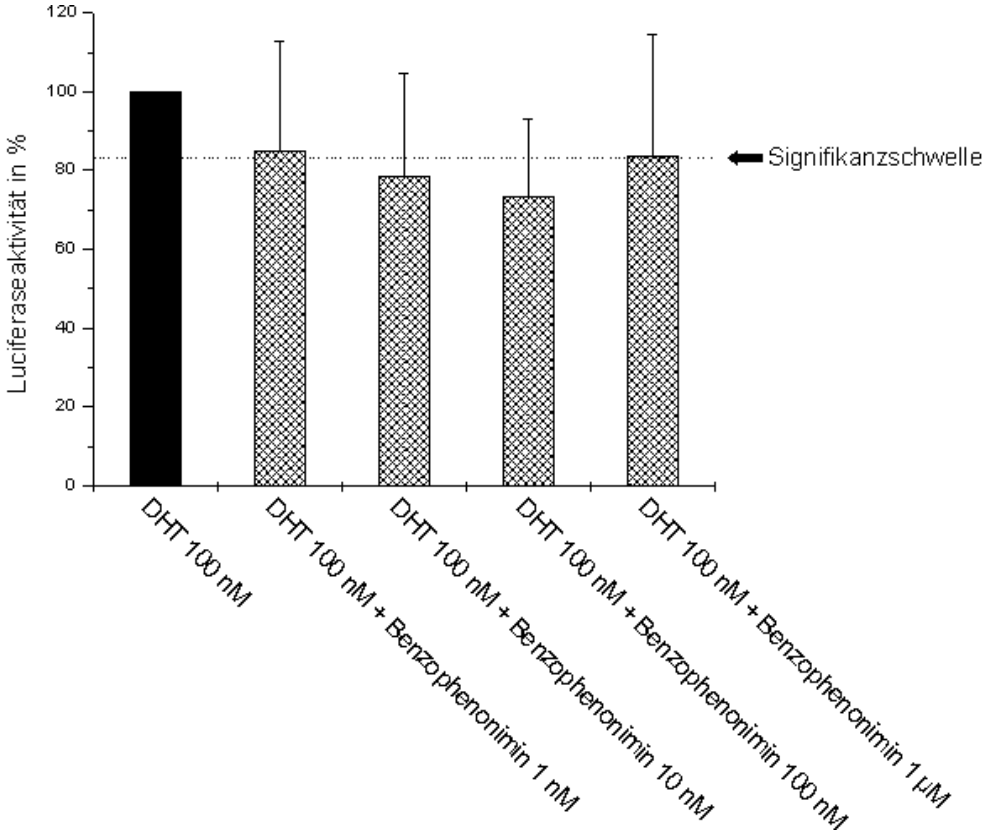


Abbildung 93: Antiandrogene Aktivität von Benzophenonimin im transienten Transaktivierungsassay

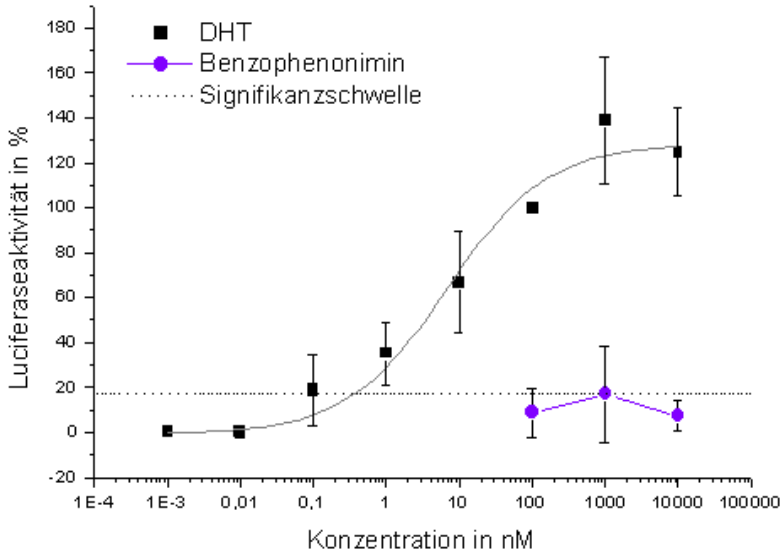


Abbildung 94: Androgene Aktivität von Benzophenonimin im transienten Transaktivierungsassay

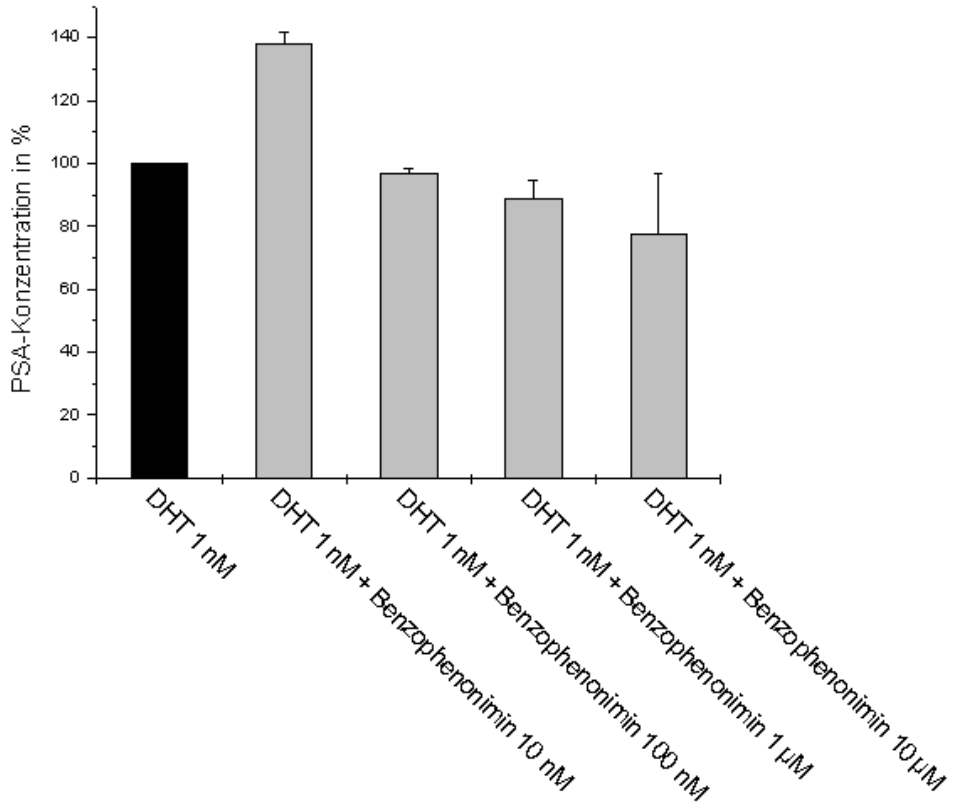


Abbildung 95: Antiandrogene Aktivität von Benzophenonimin im PSA-Assay

4.3.1.2 p,p`-Dimethylbenzophenon

Nachdem Guth p,p`-Dihydroxy- und p,p`-Dimethoxybenzophenon auf ihr androgenes/antiandrogenes Potential untersucht hatte, war von Interesse, ob sich das entsprechende p,p`-Dimethyl-Derivat in den verwendeten Assays analog verhält oder die Sauerstoffatome eine entscheidende Rolle spielen. (Guth, 2000)

Antiandrogene Aktivität wurde im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay nicht nachgewiesen. Die Coinkubation von 10 µM p,p`-Dimethylbenzophenon mit 10 nM DHT ließ durch eine signifikante Expressionssteigerung der Luciferaseaktivität um ca. 40 % agonistisches Potential vermuten (Abbildung 96), das im transienten Transaktivierungsassay jedoch nicht bestätigt werden konnte (Abbildung 98). Die Steigerung der Luciferaseaktivität muss demnach in einem anderen Mechanismus begründet sein. Im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen zeigte p,p`-Dimethylbenzophenon ab 1 nM in Coinkubation mit 100 nM DHT antiandrogene Aktivität knapp unterhalb der Signifikanzschwelle. Durch 10 nM p,p`-Dimethylbenzophenon wurde eine etwa 25%ige Hemmung der Luciferaseaktivität detektiert (Abbildung 97). Im PSA-Assay ließ sich die durch 1 nM DHT induzierte

PSA-Konzentration durch 10 µM p,p`-Dimethylbenzophenon um 88 % hemmen (Abbildung 99). Das im Vergleich zum transienten Transaktivierungsassay ausgeprägte antiandrogene Potential kann in der langen Inkubationszeit begründet sein. Cytotoxizität wurde aufgrund von Wachstumskontrollen für den Effekt ausgeschlossen.

p,p`-Dihydroxy- und p,p`-Dimethoxybenzophenon zeigten im transienten Transaktivierungsassay (Guth, 2000) etwas stärkere Hemmwirkung auf die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität als p,p`-Dimethylbenzophenon. Im PSA-Assay wies p,p`-Dimethylbenzophenon bei hoher Konzentration vergleichbare antagonistische Aktivität wie p,p`-Dihydroxybenzophenon (Guth, 2000) auf. Zu p,p`-Dihydroxy- und p,p`-Dimethoxybenzophenon liegen bislang keine Untersuchungen im T-47D-Luc-Reportergenassay vor.

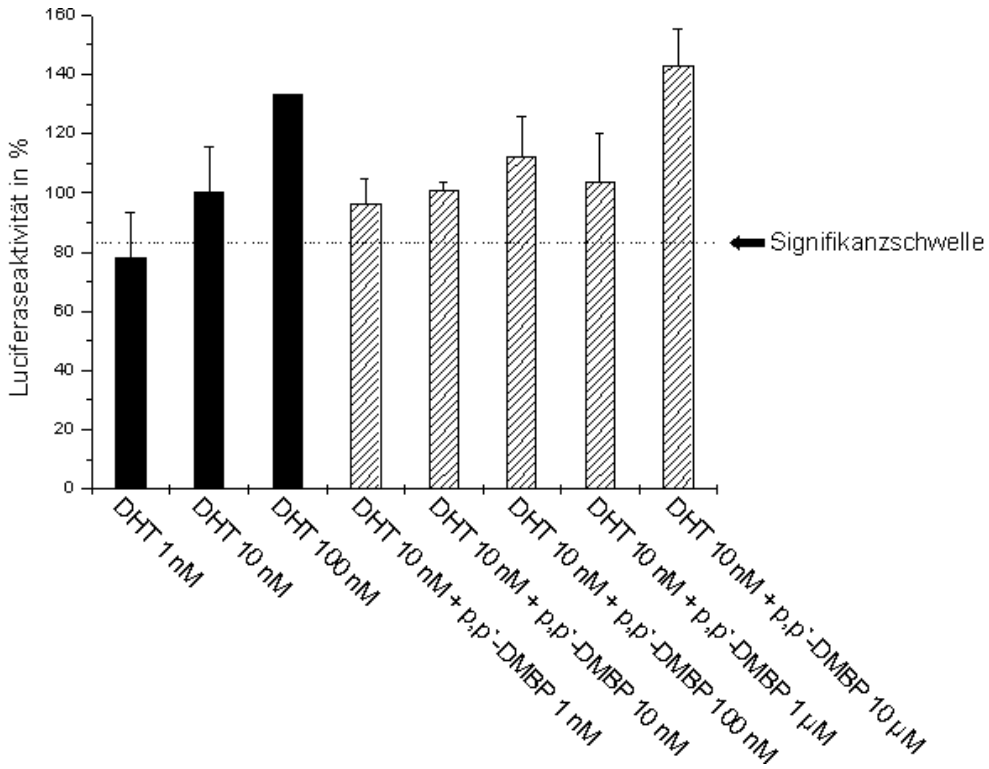


Abbildung 96: Antiandrogene Aktivität von p,p`-Dimethylbenzophenon (p,p`-DMBP) im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay

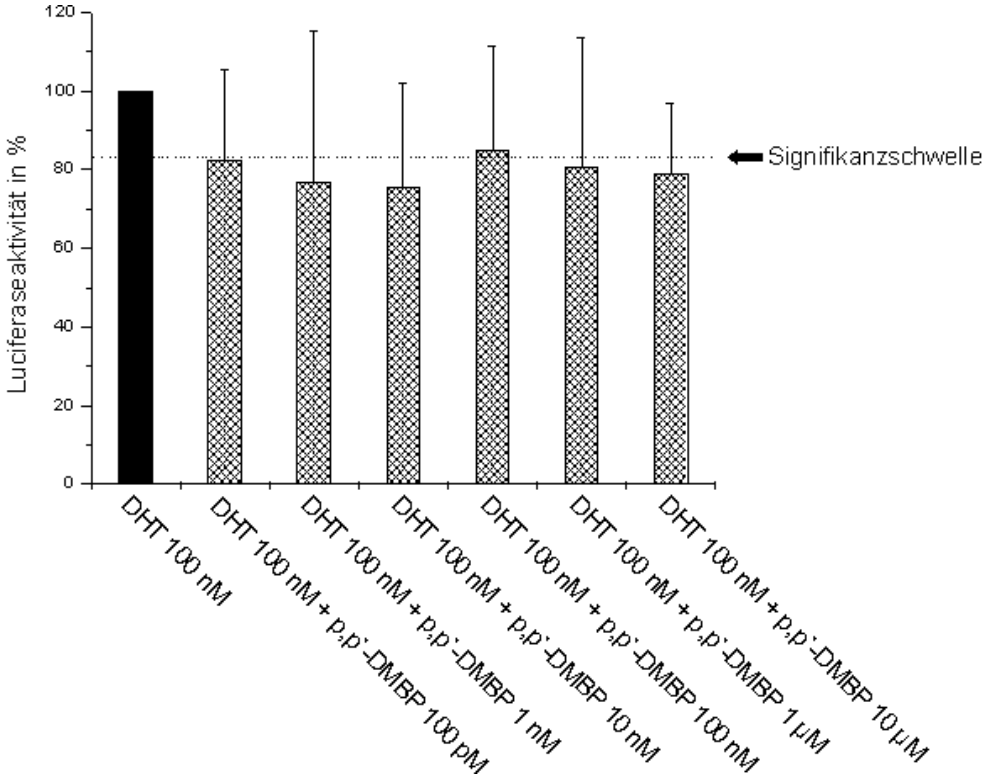


Abbildung 97: Antiandrogenes Potential von p,p`-Dimethylbenzophenon (p,p`-DMBP) im transienten Transaktivierungsassay

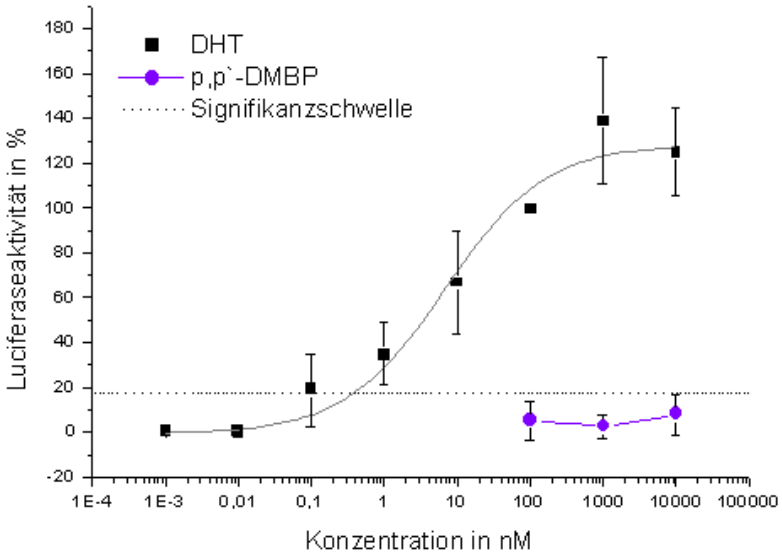


Abbildung 98: Androgene Aktivität von p,p`-Dimethylbenzophenon (p,p`-DMBP) im transienten Transaktivierungsassay

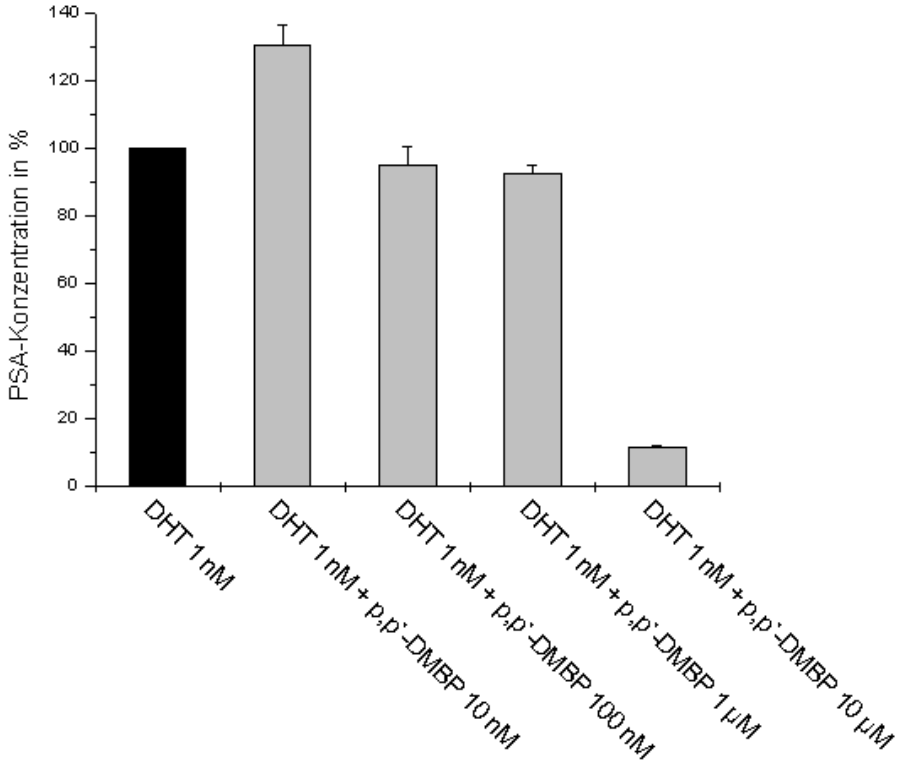


Abbildung 99: Antiandrogene Aktivität von p,p`-Dimethylbenzophenon (p,p`-DMBP) im PSA-Assay

4.3.1.3 Selectophor®

Benzophenon-3,3`,4,4`-tetracarbonsäuretetraundecylester wird als so genannter „Plasticizer“ in der Kunststoffindustrie eingesetzt. Im Hinblick auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen verschieden substituierter Benzophenone ist die Verbindung aufgrund der langen Seitenketten von Interesse, die eine hohe Lipophilie bedingt.

Cytotoxische Effekte wurde selbst bei Konzentrationen von 10 µM nicht detektiert, trotzdem sollte die Lipophilie der Substanz nicht außer Acht gelassen werden.

Antiandrogene Effekte von Selectophor® traten in allen drei eingesetzten Testsystemen auf. Im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay wurde eine Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität um etwa 20 % durch die Coinkubation mit 10 µM Selectophor® festgestellt (Abbildung 100). Die im transienten Transaktivierungsassay durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität wurde durch 1 nM Selectophor® um 30 % gehemmt, während 100 nM Selectophor® eine Hemmung von 36 % bewirkte. Bei Coinkubation mit 10µM Selectophor® konnte hingegen keine Hemmung mehr detektiert werden (Abbildung 101). Im PSA-Assay reduzierte die Coinkubation von 10 µM Selectophor® mit 1 nM DHT die Induktion der

PSA-Konzentration um etwa 82 % (Abbildung 103). Die deutlich stärkere Hemmung kann unter anderem in der fünfmal längeren Inkubationszeit begründet sein. Nicht auszuschließen sind auch indirekte, durch die Lipophilie der Verbindung verursachte Effekte. Agonistisches Potential von Selectophor® wurde im transienten Transaktivierungsassay nicht detektiert (Abbildung 102).

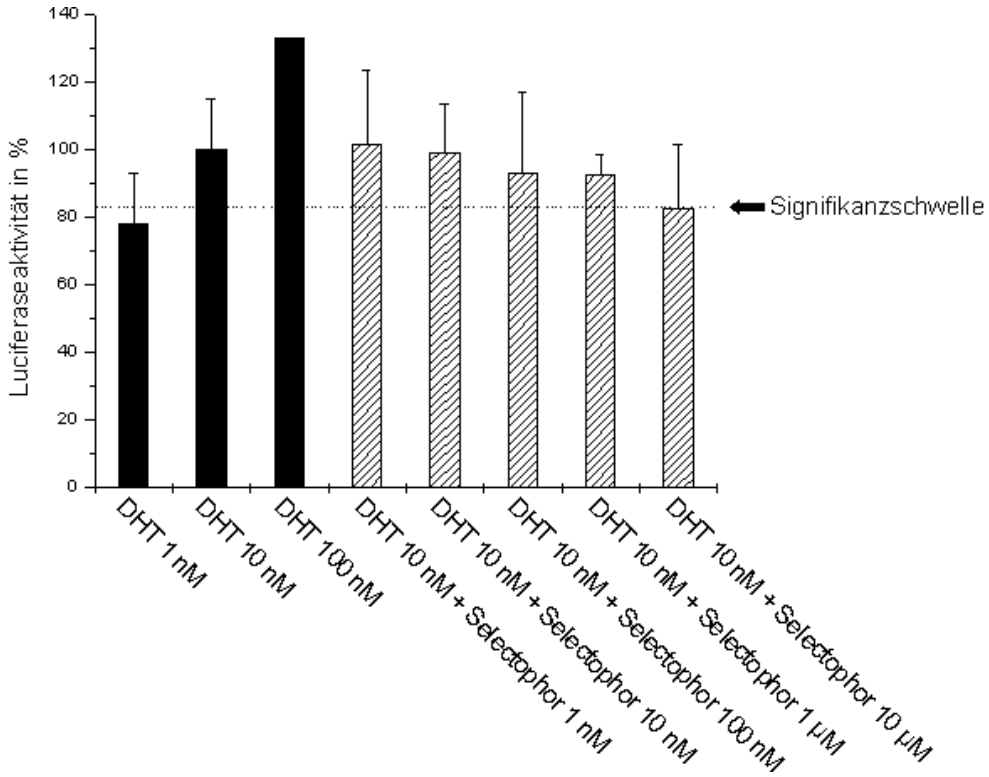


Abbildung 100: Antiandrogene Aktivität von Selectophor® im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay

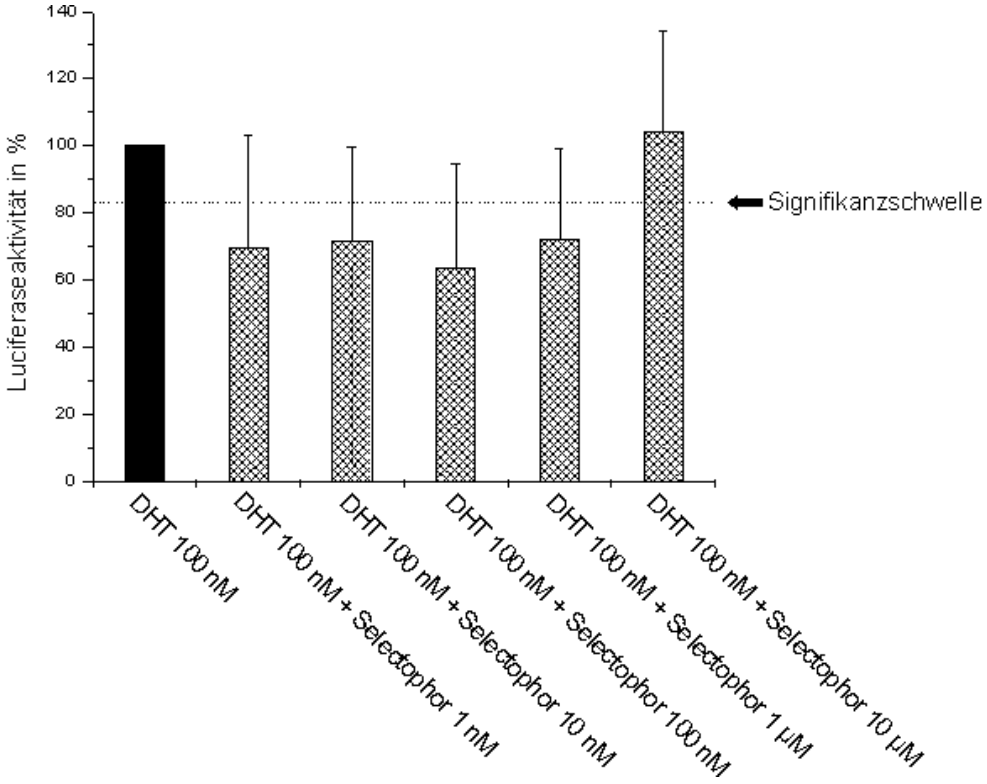


Abbildung 101: Antiandrogene Aktivität von Selectophor® im transienten Transaktivierungsassay

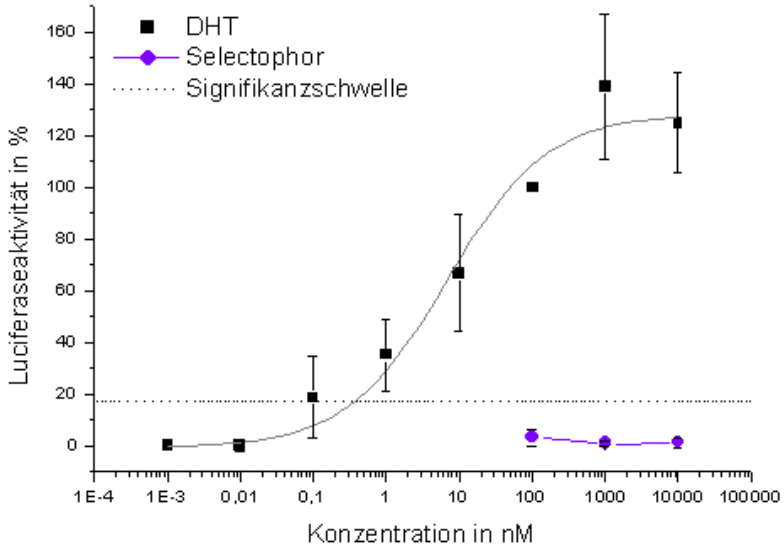


Abbildung 102: Androgene Aktivität von Selectophor® im transienten Transaktivierungsassay

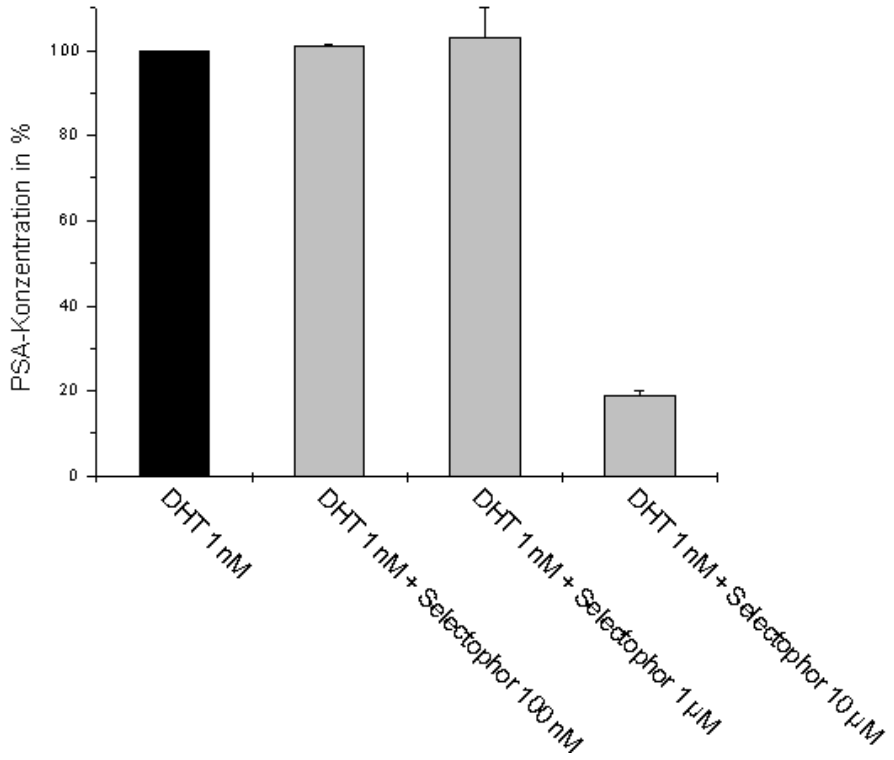


Abbildung 103: Antiandrogene Aktivität von Selectophor® im PSA-Assay

4.3.1.4 Ketoprofen

Ein Pharmakon mit Benzophenon-Struktur ist Ketoprofen. Es besitzt vorwiegend antiphlogistische, antirheumatische Wirkung. Für Ketoprofen sind photosensitive Reaktionen wie Phototoxizität und Photoallergien beschrieben. Ketoprofen ist in photoinduzierte Lipidperoxidationsprozesse involviert und induziert *in vitro* als Folge von Bestrahlung DNA-Einzelstrangbrüche, während parallel Pyrimidindimere gebildet werden. Ketoprofen ist eines der Medikamente, das als Nebenwirkung photoallergische Kontaktdermatitis und Kreuzreaktionen mit anderen Arylpropionylsäure-Derivaten hervorruft. (Bagheri et al., 2000; Milpied-Homsi, 2001)

Barkey et al. berichten von einer Zunahme der FSH- und LH-Spiegel nach dreimaliger Applikation von 50 mg Ketoprofen beim Mann. Des Weiteren wurden erheblich erhöhte Spermienbeweglichkeit und cAMP-Niveaus detektiert. Der Testosteronspiegel der Samenflüssigkeit hingegen war reduziert. (Barkey et al., 1984)

Aus ökotoxikologischer Sicht ist Ketoprofen wegen seiner Benzophenonstruktur für androgene/antiandrogene Untersuchungen von Interesse, da es eine gewisse Umweltrelevanz besitzt. In Oberflächenwässern wurden von Daughton und Ternes

Konzentrationen von bis zu 0,12 µg/l detektiert. Im Vergleich zu den deutlich höheren Dosen unter Medikation mit Ketoprofen ist die ökotoxikologische Belastung jedoch zweitrangig. (Daughton and Ternes, 1999)

In den verwendeten drei Assays wurde für Ketoprofen schwache antiandrogene Aktivität nachgewiesen. Im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay wurde die durch 10 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität in Coinkubation mit 1 nM bis 10 µM Ketoprofen gleichmäßig um etwa 20 % gehemmt (Abbildung 104). Im transienten Transaktivierungsassay betrug die Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität ab 1 µM Ketoprofen etwa 40 % (Abbildung 105).

Im PSA Assay wurde mit der höchsten eingesetzten Ketoprofen-Konzentration von 10 µM die durch 1 nM DHT induzierte PSA-Menge um etwa 70 % gehemmt (Abbildung 107). PSA-Überinduktion wurde vor allem bei niedrigen Ketoprofen-Konzentrationen von 10 nM in Coinkubation mit 1 nM DHT detektiert. Dieser Effekt kann nicht auf agonistische Aktivität am AR zurückgeführt werden, da im transienten Transaktivierungsassay keine agonistische Aktivität festgestellt werden konnte (Abbildung 106). Er muss daher in anderen zellulären Regulationsmechanismen begründet sein, möglicherweise in Effekten an GR oder PR.

Die Wachstumskontrolle in T-47D-Zellen zeigte keine Hemmungseffekte durch Ketoprofen.

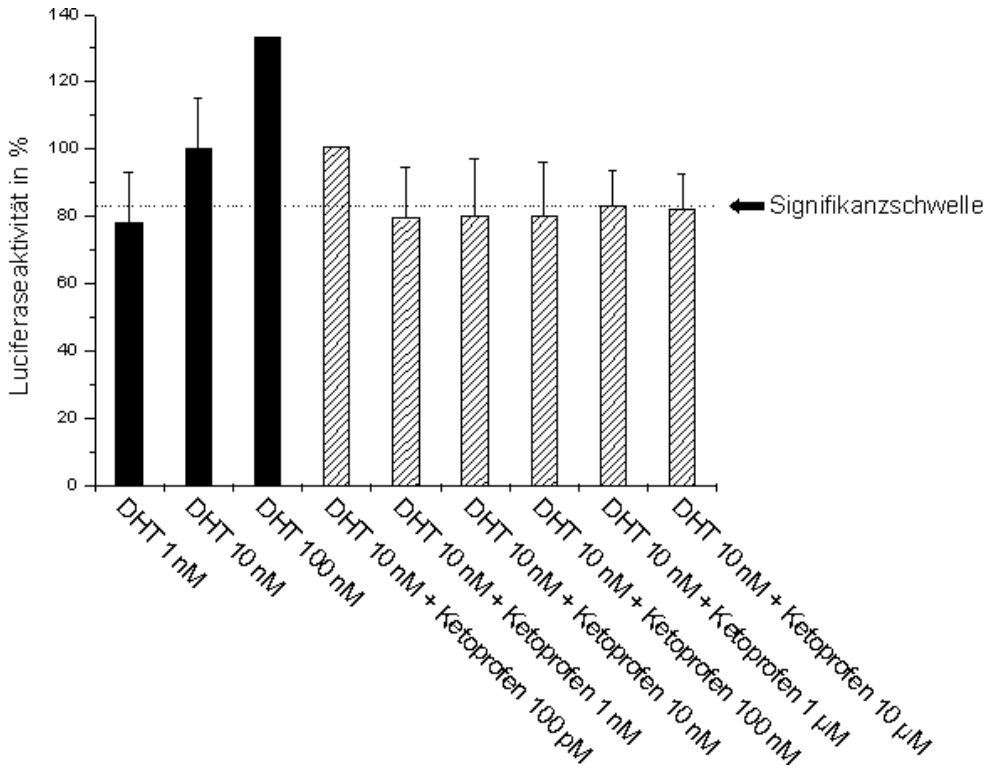


Abbildung 104: Antiandrogene Aktivität von Ketoprofen im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay

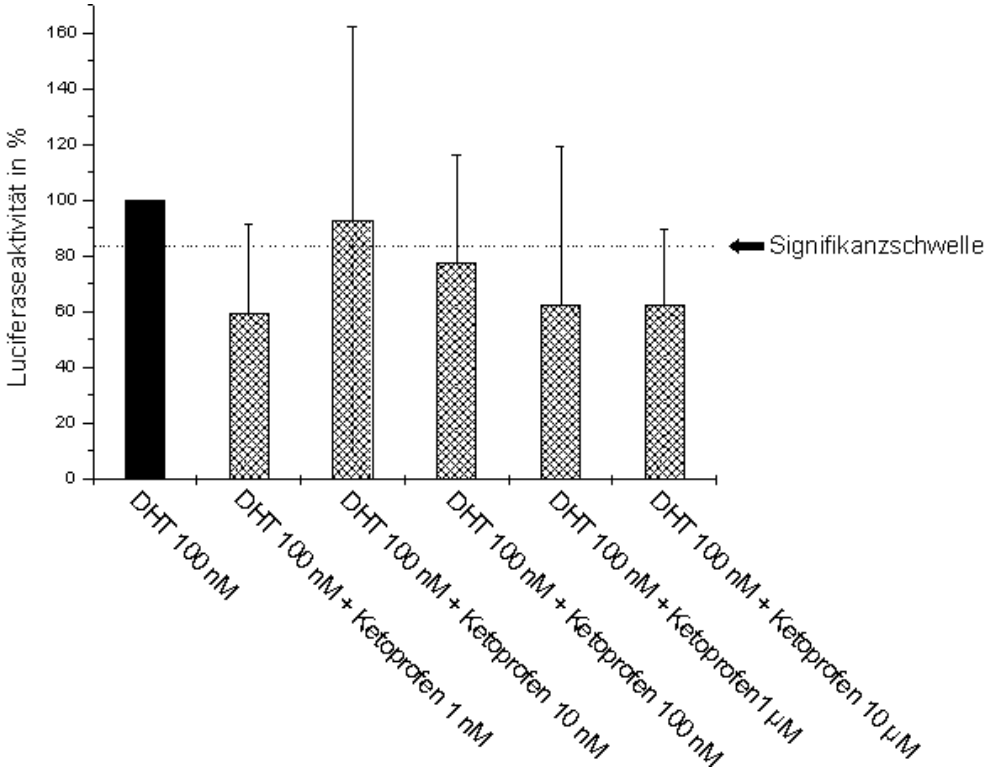


Abbildung 105: Antiandrogene Aktivität von Ketoprofen im transienten Transaktivierungsassay

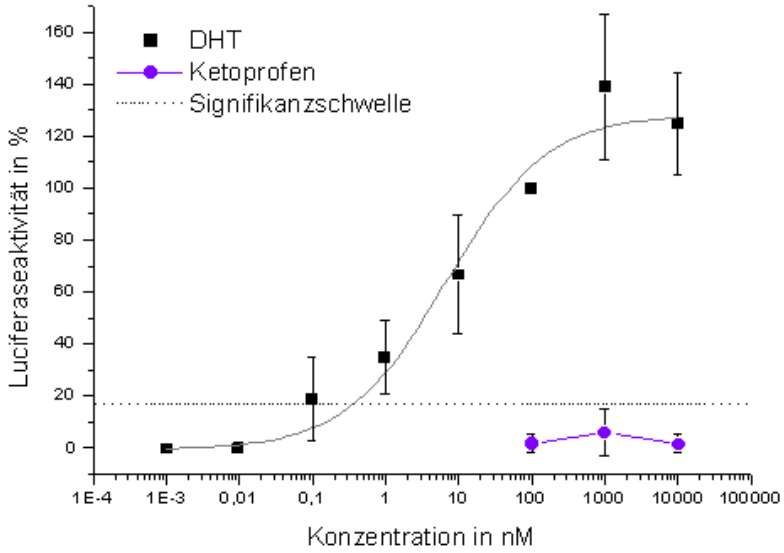


Abbildung 106: Androgene Aktivität von Ketoprofen im transienten Transaktivierungsassay

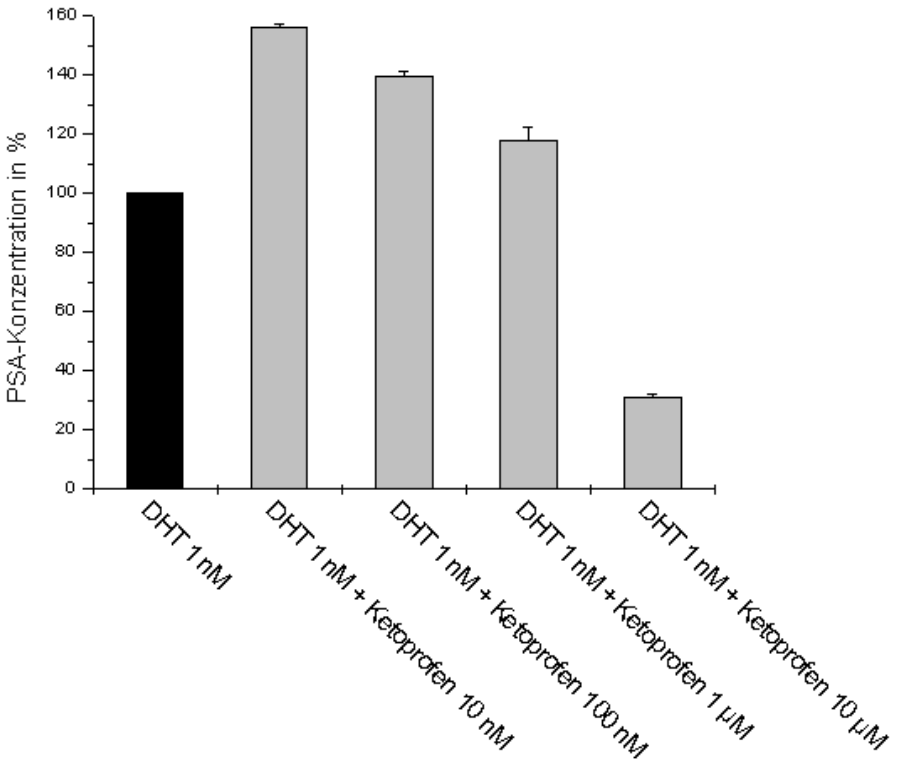


Abbildung 107: Antiandrogene Aktivität von Ketoprofen im PSA-Assay

4.3.2 Pharmaka: Imipramin und Ketoconazol

4.3.2.1 Imipramin

Das tricyclische Iminodibenzyl-Derivat Imipramin wird in der Pharmakologie als Antidepressivum eingesetzt. Neben ihrer Wirkung auf Serotonin-, Dopamin- und Adrenalinrezeptoren besitzen tricyclische Antidepressiva anticholinerge Effekte. Imipramin ist Substrat für „Cytochrom P450 1A2“ (CYP1A2). Als Biotransformationsreaktionen wurden unter anderem N-Demethylierung, N-Oxidation, Ring- und Seitenkettenhydroxylierung gefunden. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend als Glucuronid über den Harn. (Mutschler, 1981; Frühwald et al., 1999, Shet et al., 1997)

Für Imipramin ist eine Wirkungsabschwächung durch ovariale Steroidhormone beschrieben. Ovarialen, nicht aber testikulären Steroidhormonen wird eine wichtige Rolle bei der Regulation von Transportern für Dopamin und Serotonin im Gehirn zugeschrieben. (Attali et al., 1997; Schultz, Rosch, 1991)

Ochsenkuhn et al. und Nijman et al. beschreiben vorübergehende orale Aufnahmen von Imipramin als effektive und sichere Behandlung bei rückläufiger Ejakulation infolge einiger Krankheiten. (Nijman et al., 1987; Ochsenkuhn et al., 1999)

Aufgrund der Wirkungen auf ovariale Steroidhormone und krankheits- bzw. medikamentenbedingte rückläufige Ejakulation erschien Imipramin für Untersuchungen auf androgenes/antiandrogenes Potential interessant.

Im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay wurde in Coinkubation mit 10 nM DHT für 100 pM bis 100 nM Imipramin eine Hemmung zwischen 15 und 22 % der Luciferaseaktivität ermittelt. Die Werte schwanken konzentrationsunabhängig im Bereich der Signifikanzschwelle. Bei höheren Konzentrationen, ab 1 µM Imipramin, war der Effekt nicht mehr zu detektieren (Abbildung 108). Im transienten Transaktivierungsassay wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität durch Imipramin ermittelt. Die stärkste Hemmung von etwa 35 % wurde durch 100 nM Imipramin hervorgerufen. Bei höheren Konzentrationen war die Tendenz gegenläufig, was auf partiell agonistische Aktivität hindeutet (Abbildung 109). Im transienten Transaktivierungsassay wurde androgenes Potential von Imipramin bestätigt. Konzentrationen von 10 µM des

tricyclischen Antidepressivums erhöhen die Luciferaseaktivität auf ein Niveau, das durch etwa 3,5 nM des physiologischen Liganden DHT induziert wird und etwa zwei Fünftel des oberen Plateaus der durch DHT induzierten Luciferaseaktivität entspricht (Abbildung 110). Unter Berücksichtigung des Standardfehlers von ± 19,6 % Luciferaseaktivität an Stelle der Standardabweichung kann die durch Imipramin induzierte Luciferaseaktivität aufgrund siebenfacher Wiederholung als signifikant agonistisch betrachtet werden.

Im PSA-Assay wurde die durch 1 nM DHT induzierte PSA-Konzentration mit 10 µM Imipramin fast vollständig gehemmt, während niedrigere Konzentrationen keinen Effekt auf die PSA-Induktion ausübten (Abbildung 111). Gleichzeitig wurde im Cytotoxizitätstest für 10 µM Imipramin eine Wachstumshemmung von 44 % beobachtet. Dies erklärt möglicherweise den stark hemmenden Effekt hoher Imipramin-Konzentrationen.

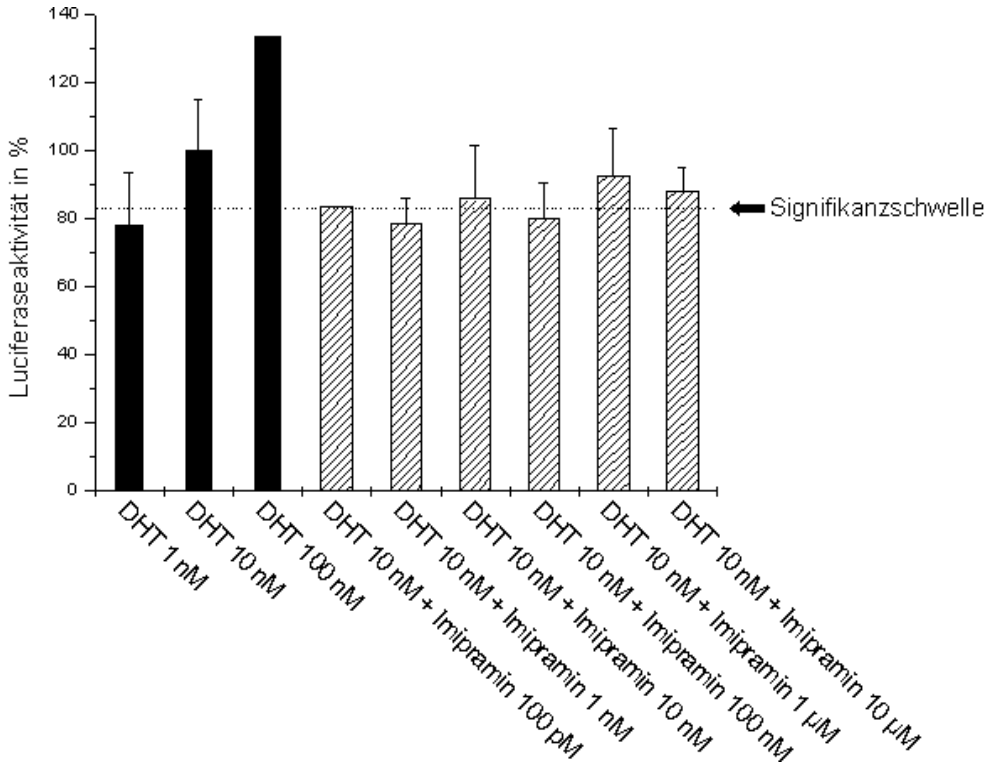


Abbildung 108: Antiandrogene Aktivität von Imipramin im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay

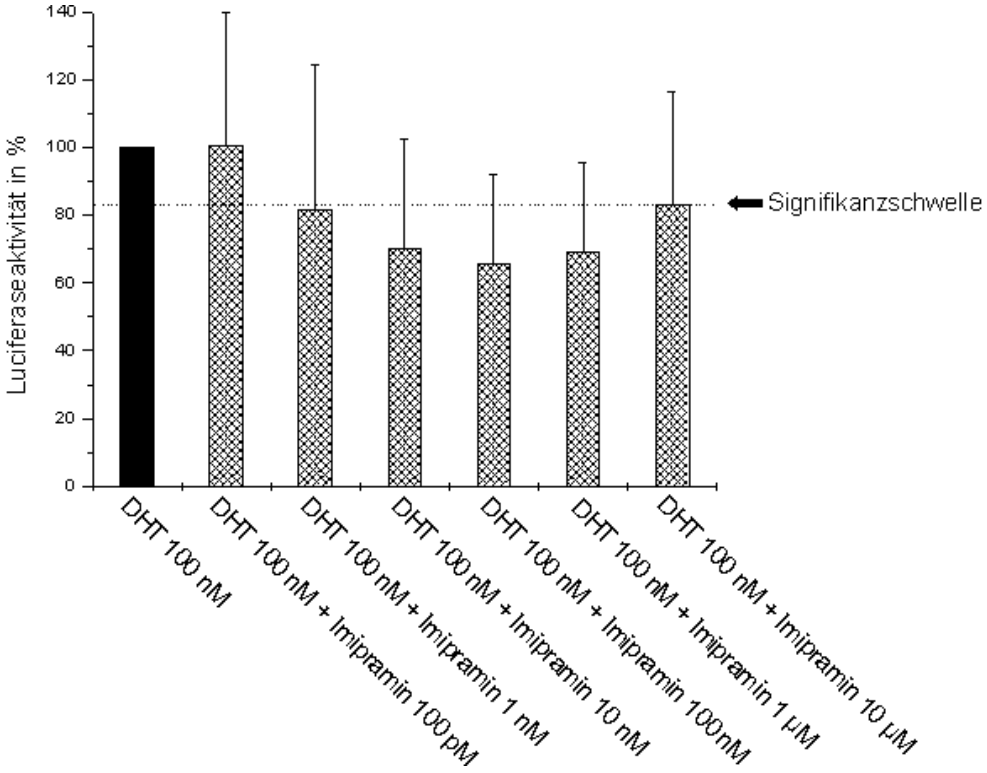


Abbildung 109: Antiandrogene Aktivität von Imipramin im transienten Transaktivierungsassay

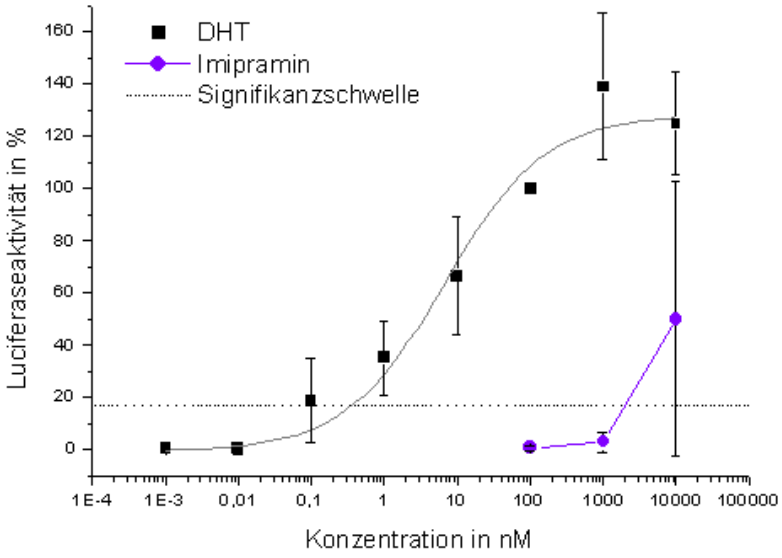


Abbildung 110: Androgene Aktivität von Imipramin im transienten Transaktivierungsassay

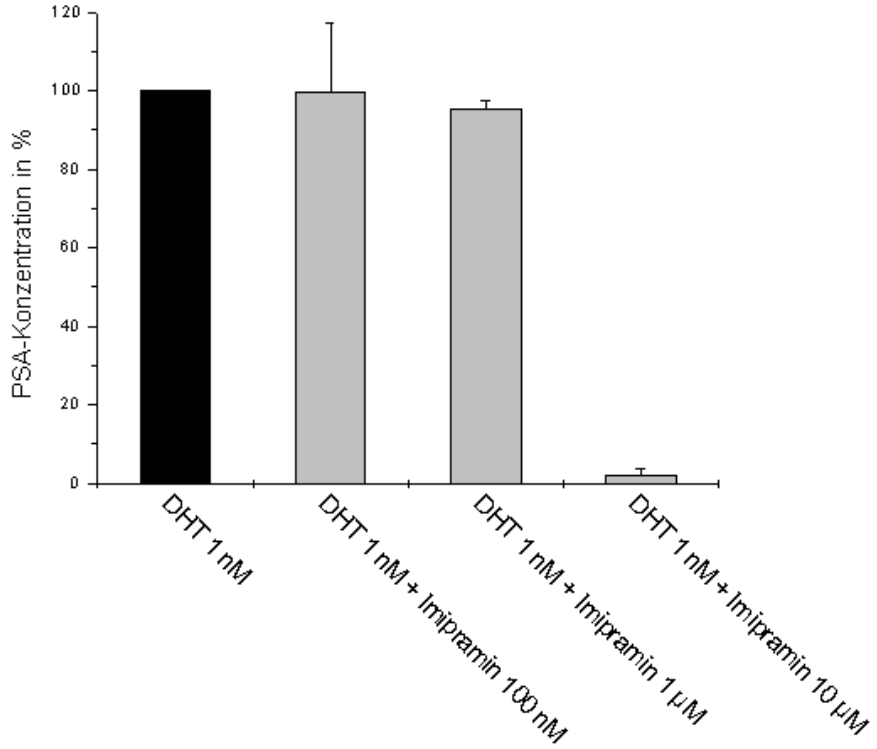


Abbildung 111: Antiandrogene Aktivität von Imipramin im PSA-Assay

4.3.2.2 Ketoconazol

Das systemische Antimycoticum Ketoconazol findet Anwendung bei fungalen Oberflächeninfektionen, Pilzerkrankungen im Genitalbereich, der Schleimhäute, aber auch bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen.

Die Absorptionsrate von Ketoconazol nach oraler Applikation ist variabel. Es wird bei topischer Verabreichung nicht, bei vaginaler nur in geringem Umfang absorbiert. Die Ausscheidung erfolgt über die Fäzes. Beim Menschen verläuft die metabolische Inaktivierung von Ketoconazol hauptsächlich über Oxidation am Imidazolring und anschließenden Abbau des oxidierten Imidazols. Nach oxidativer Sauerstoff-Dealkylierung wird der Piperazinring ebenfalls oxidativ abgebaut. Abschließend erfolgt eine Hydroxylierung am Aromaten. Für den hepatischen First-pass-Metabolismus wird eine Autoinhibition angenommen. (Boxenbaum, 1999; Daneshmend and Warnock, 1988)

Aufgrund seiner Struktur erschien es interessant, Ketoconazol auf androgene/antiandrogene Aktivität zu untersuchen.

Antiandrogenes Potential von Ketoconazol wurde in den transgenen Transaktivierungsassays und im PSA-Assay festgestellt. Im stabilen T-47D-Luc-

Assay wurde die durch 10 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität durch Ketoconazol konzentrationsunabhängig über einen Bereich von 1 nM bis 1 µM um 21 bis 26 % gehemmt. Die Coinkubation von 10 µM Ketoconazol bewirkte eine signifikante 57%ige Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität (Abbildung 112). Gleichzeitig konnte in nicht transfizierten T-47D-Zellen eine 15%ige Wachstumshemmung durch 24-stündige Inkubation von 10 µM Ketoconazol hervorgerufen werden, auf die möglicherweise ein Teil der reduzierten Luciferaseaktivität zurückzuführen ist. Im transienten Transaktivierungsassay hemmte 10 nM Ketoconazol die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität um 28 %. Bei 10 µM Ketoconazol in Coinkubation mit 100 nM DHT konnte keine Hemmung der Luciferaseinduktion mehr festgestellt werden (Abbildung 113). Agonistisches Potential von Ketoconazol wurde im transienten Transaktivierungsassay nicht detektiert (Abbildung 114). Im PSA-Assay betrug die Hemmung der durch 1 nM DHT induzierten PSA-Konzentration durch 1 µM Ketoconazol 32 % (Abbildung 115). Die vollständige Hemmung der durch 1 nM DHT induzierten PSA-Konzentration durch 10 µM Ketoconazol kann unter anderem in der stark ausgeprägten Wachstumshemmung von 66 % und möglicher Zellschädigung begründet sein.

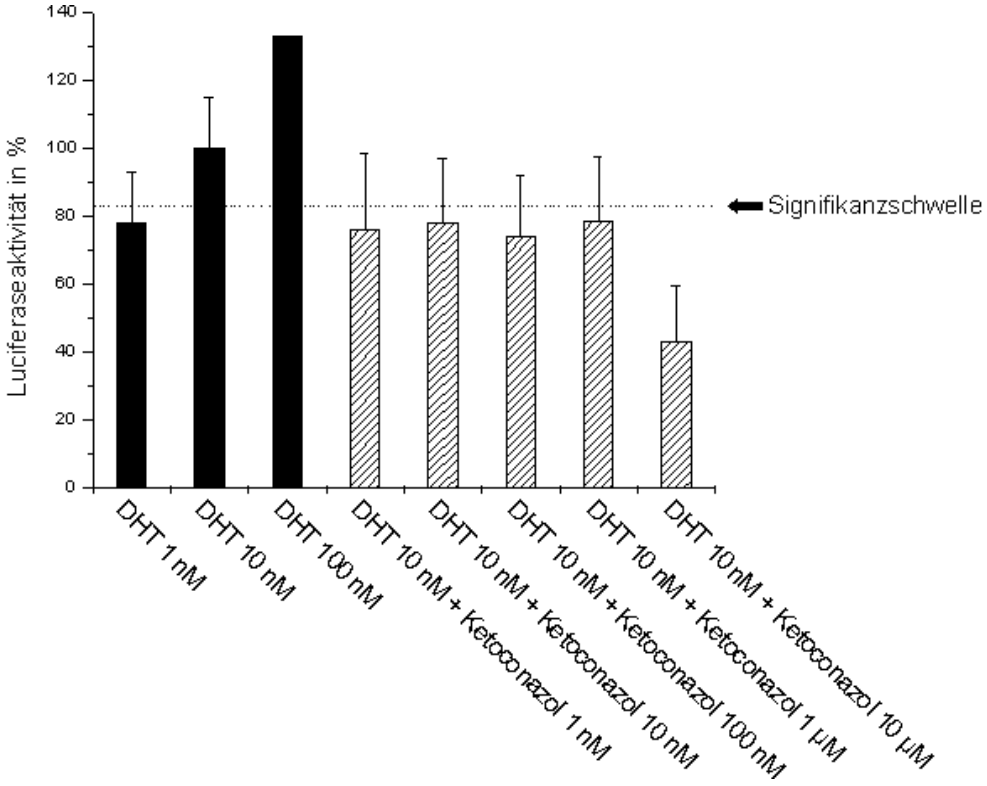


Abbildung 112: Antiandrogene Aktivität von Ketoconazol im stabilen T47-D-Luc-Reportergenassay

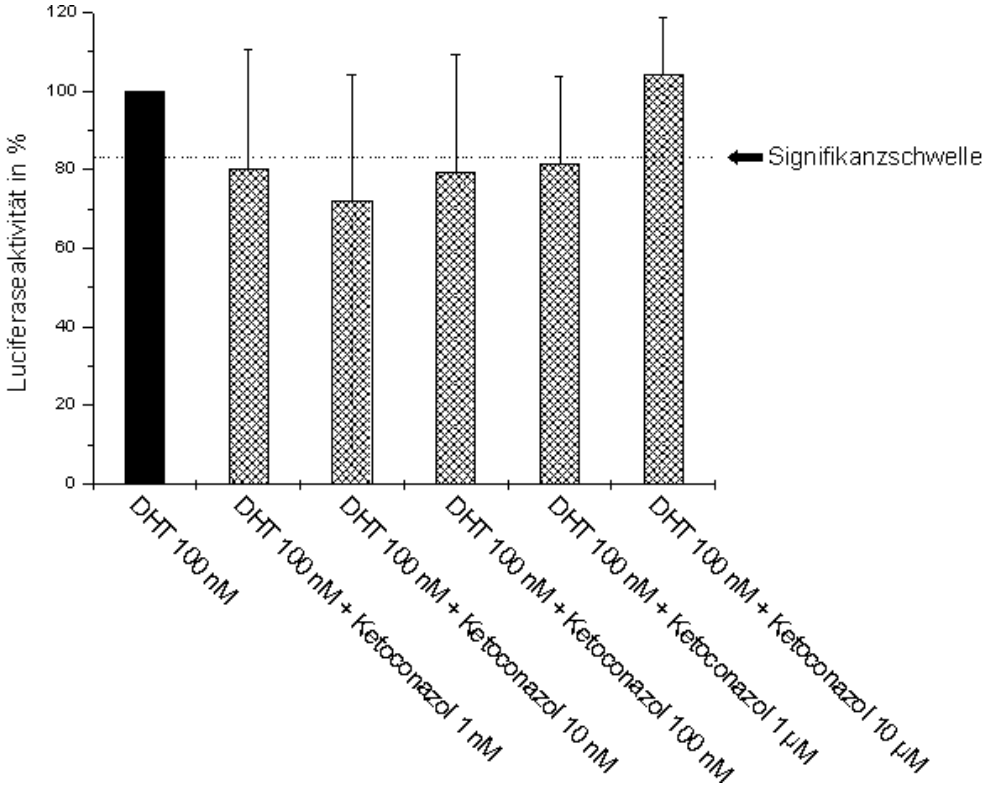


Abbildung 113: Antiandrogene Aktivität von Ketoconazol im transienten Transaktivierungsassay

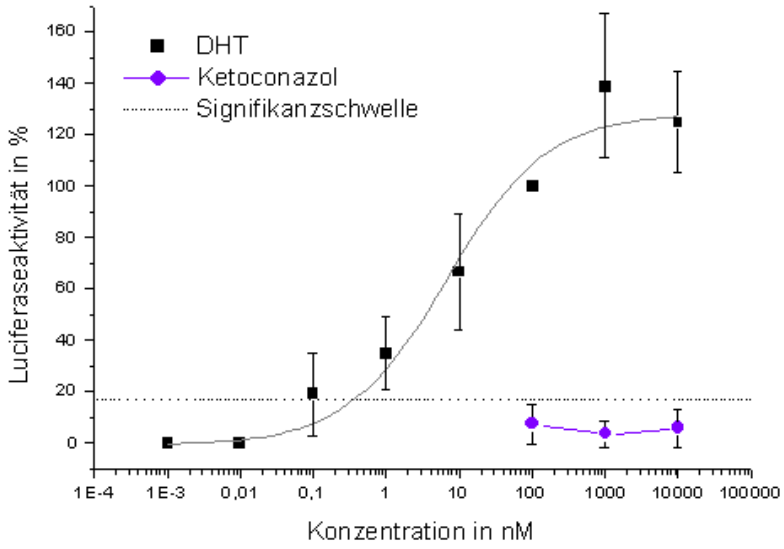


Abbildung 114: Androgene Aktivität von Ketoconazol im transienten Transaktivierungsassay

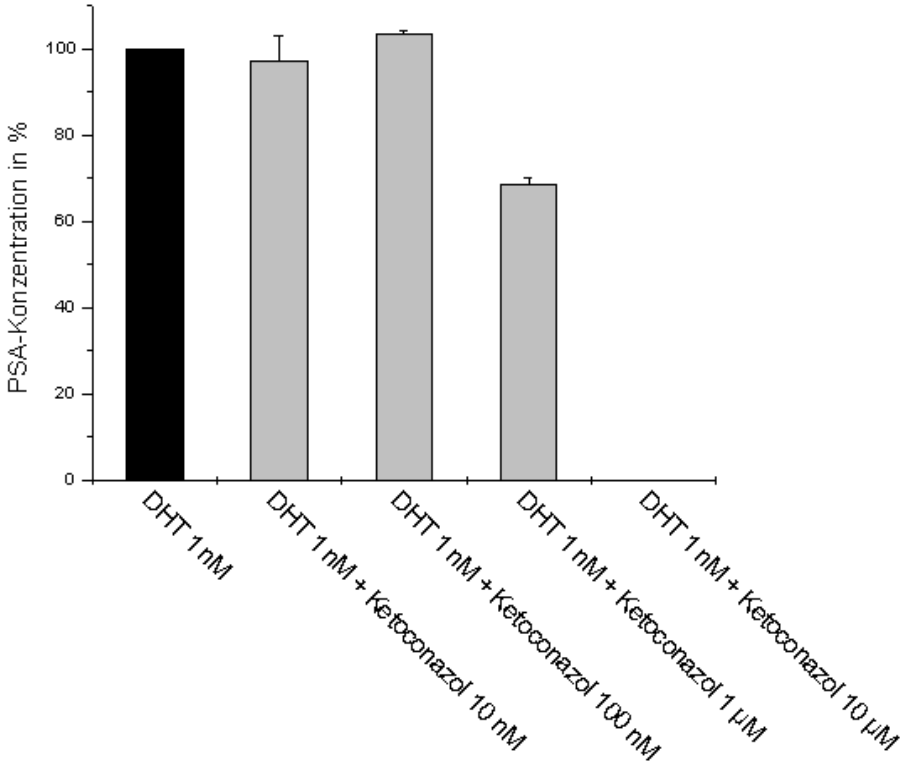


Abbildung 115: Antiandrogene Aktivität von Ketoconazol im PSA-Assay

4.3.3 Phytoandrogen/-antiandrogen aus *Stevia rebaudiana*

4.3.3.1 Steviosid

Als natürlicher Süßstoff mit bis zu 300facher Süßkraft der Saccharose wird Steviosid, 13-(2-O-β-D-Glucopyranosyl-α-D-glucopyranosyloxy)-kaur-16-en-18-säure-19-β-D-glucopyranosylester, aus Blättern und Stängeln des Korbblütlers *Stevia rebaudiana* gewonnen.

Planas und Kuć berichten über die Verwendung von *S. rebaudiana* als orales Kontrazeptivum bei einem paraguayischen Indianerstamm. Des Weiteren beschreiben sie eine reduzierte Fertilität bei weiblichen Ratten durch Gabe wässriger *S.-rebaudiana*-Extrakte. (Planas and Kuć, 1968)

Uehara et al. zeigten 1992 *in vitro*, dass Steviosid gebundenes DHT vom Androgenrezeptor verdrängt und bestätigte diese Untersuchungen 1993 mithilfe des synthetischen Androgens Methyltrienolon (R1881). Die für Kompetitionsexperimente verwendeten Steviosid-Konzentrationen lagen mindestens um das 100fache über der Konzentration des physiologischen Liganden. (Uehara et al., 1992; Uehara et al., 1993)

Sowohl Xili et al. als auch Yodyingyuad und Bunyawong konnten keinen Einfluss von *S. rebaudiana* auf Wachstum und Fertilität bei Ratte und Hamster detektieren und stellen in Frage, ob wirksame Gewebekonzentrationen durch orale Aufnahme getrockneter Blätterextrakte erreicht werden können. (Xili et al., 1992; Yodyingyuad and Bunyawong, 1991)

In einer Fütterungsstudie von Melis erhielten prepubertierende männliche Ratten über 60 Tage zweimal täglich 2 ml wässrigen *S.-rebaudiana*-Extrakt (66,7 g trockene Blätter/100 ml fertige Lösung). Melis konnte ein verringertes Endgewicht von Hoden und Nebenhoden behandelter Tiere detektieren. Ebenfalls waren die Fructose-Konzentrationen in beteiligten Drüsen und Nebenhoden herabgesetzt. Die vorliegenden Ergebnisse schließen eine mögliche Fertilitätsbeeinträchtigung männlicher Ratten nicht aus. (Melis, 1999)

Aufgrund der angeführten gegensätzlichen Berichte bestand Interesse, das potentielle Phytoandrogen/Phytoantiandrogen Steviosid in den etablierten Testsystemen zu untersuchen.

Antiandrogene Aktivität wurde sowohl in den transgenen Transaktivierungsassays als auch im PSA-Assay festgestellt. Die durch 10 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität wurde im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay konzentrationsabhängig von 100 nM Steviosid um ca. 23 % gehemmt. Bei 10 µM Steviosid in Coinkubation mit 10 nM DHT war die Hemmung weniger ausgeprägt (Abbildung 116). Im transienten Transaktivierungsassay hemmte Steviosid ab einer Konzentration von 100 nM die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität um etwa 30 % (Abbildung 117). Signifikant androgene Aktivität konnte im transienten Transaktivierungsassay nicht festgestellt werden (Abbildung 118). Im PSA-Assay wurde die durch 1 nM DHT induzierte PSA-Konzentration mit 1 µM Steviosid um 70 % gehemmt. Bei 10 µM Steviosid verringerte sich die Hemmung wieder auf etwa 50 % (Abbildung 119). Dem gegenläufigen Effekt können mögliche Wechselwirkungen mit GR und PR zugrunde liegen. Nicht ganz auszuschließen ist ein sehr schwaches, im transienten Transaktivierungsassay nicht detektiertes androgenes Potential, das erst durch die lange Inkubationszeit von fünf Tagen zum Tragen kommt.

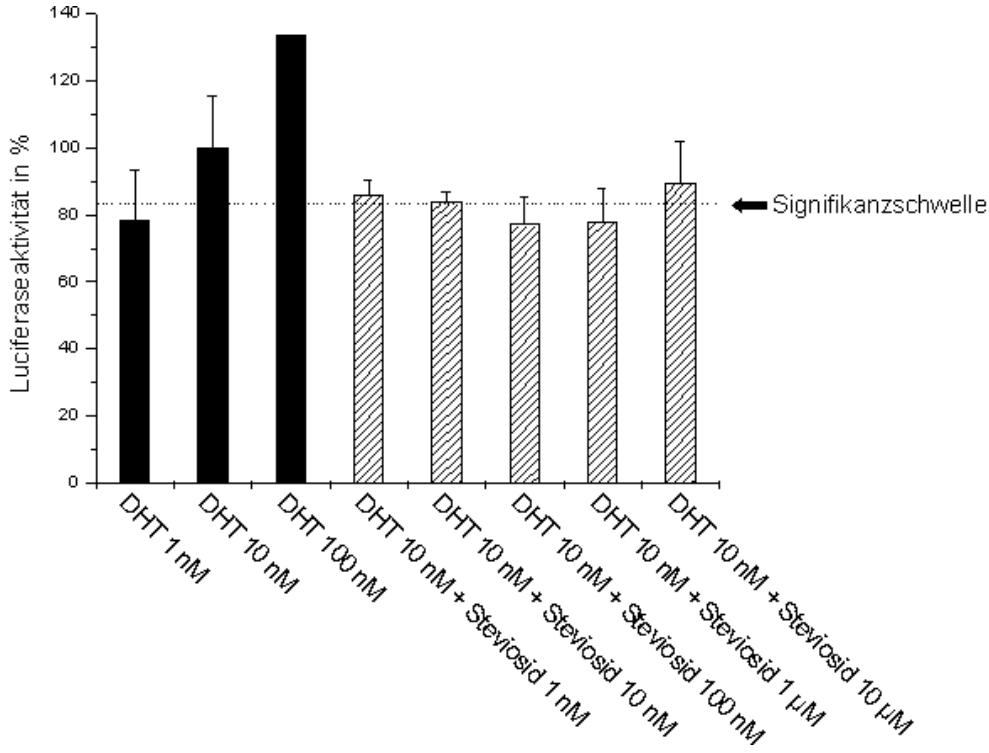


Abbildung 116: Antiandrogene Aktivität von Steviosid im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay

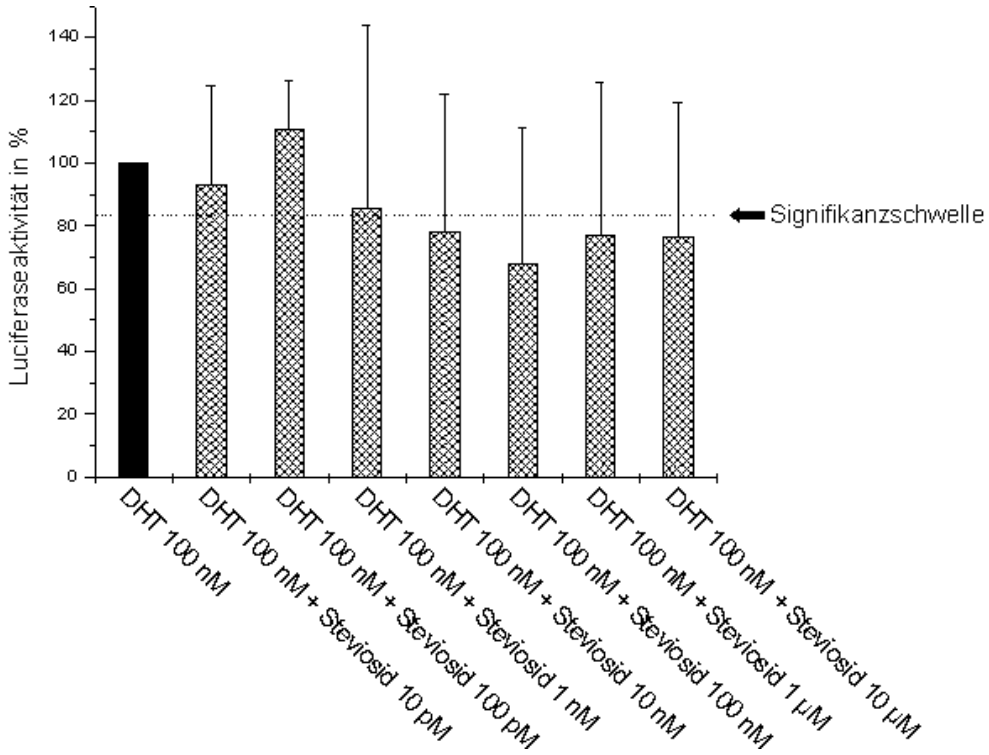


Abbildung 117: Antiandrogene Aktivität von Steviosid im transienten Transaktivierungsassay

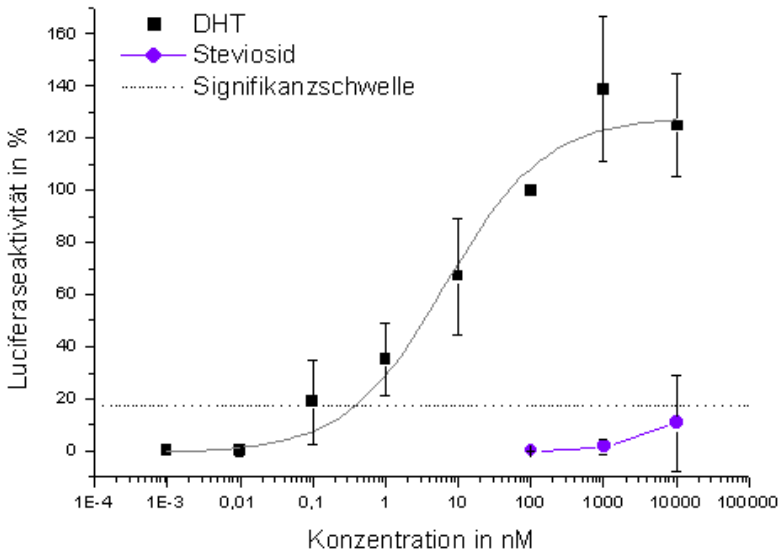


Abbildung 118: Androgene Aktivität von Steviosid im transienten Transaktivierungsassay

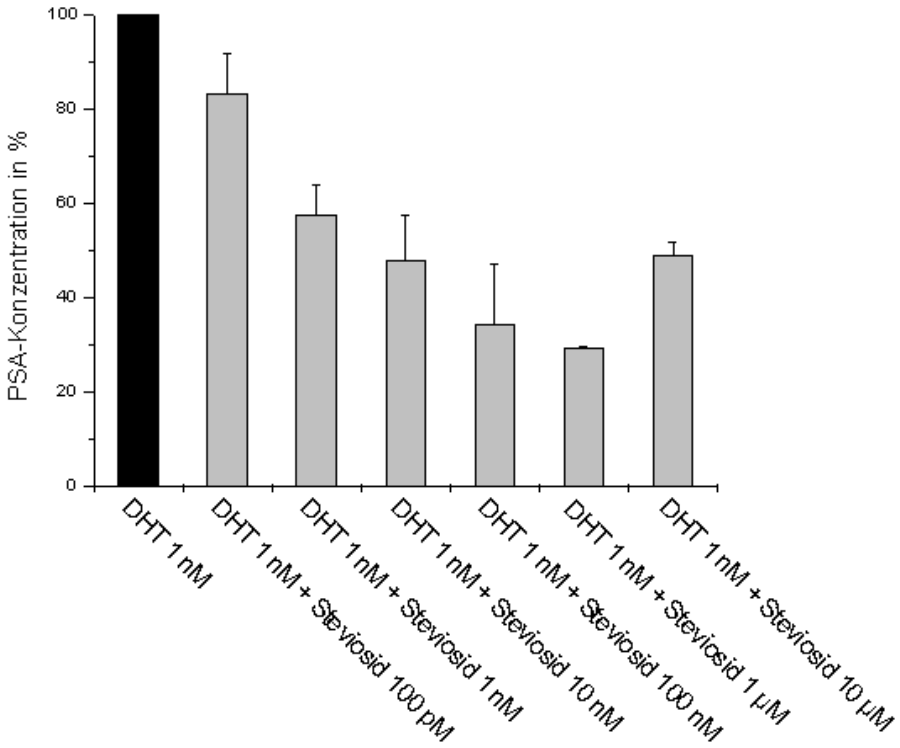


Abbildung 119: Antiandrogene Aktivität von Steviosid im PSA-Assay

4.3.3.2 Steviol

Steviol, *ent*-13-Hydroxy-16-kauren-18-säure, ist das Aglycon, der zuckerfreie Bestandteil, des Steviosids. Im direkten Vergleich zum Glucosid sollte die potentielle androgene/antiandrogene Aktivität des Steviols in den etablierten Transaktivierungsassays T-47D-Luc und COS-AR-Luc sowie dem endogenen PSA-Assay untersucht werden.

Für Steviol wurde im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay keine antiandrogene Aktivität nachgewiesen. Die Coinkubation von 10 nM DHT mit 1 µM Steviol bewirkte bereits eine Erhöhung der Luciferaseaktivität um 43 %, mit 10 µM um 124 % (Abbildung 120). Im transienten Transaktivierungsassay wurde eine Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität durch 1 nM Steviol um 30 % festgestellt. Mit steigender Steviol-Konzentration wurde die Hemmung der Enzymaktivität reduziert. 10 µM Steviol in Coinkubation mit 100 nM DHT überinduzierte die Luciferaseaktivität um 30 % (Abbildung 121). Die Hinweise auf androgenes Potential von Steviol konnten im transienten Transaktivierungsassay bestätigt werden. 1 µM Steviol führte etwa zu gleichen Effekten wie 0,1 nM DHT, während 10 µM Steviol eine Luciferaseaktivität vergleichbar mit 3,6 nM DHT

induzierten (Abbildung 122). Anhand des PSA-Assays wurde kein eindeutig antiandrogenes Potential von Steviol festgestellt. Lediglich 1 µM Steviol hemmte die durch 1 nM DHT induzierte PSA-Konzentration um etwa 13 % (Abbildung 123). Die leichte Hemmung der PSA-Induktion durch 1 µM Steviol in Coinkubation mit 1 nM DHT ist möglicherweise auf die Konkurrenz um den Rezeptor und die partiell agonistische/antagonistische Aktivität von Steviol zurückzuführen.

Beim Vergleich von Steviosid mit seinem Aglycon Steviol weist Steviosid verstärkt antagonistische Aktivität auf. Agonistisches Potential wurde für Steviosid nicht nachgewiesen. Das zuckerfreie Steviol zeigte dagegen im transienten Transaktivierungsassay bei deutlich niedrigerer Konzentration als das sterisch geräumigere Steviosid antiandrogene Aktivität. Des Weiteren wurde Steviol als potenter Androgenrezeptoragonist identifiziert.

Eine Wachstumshemmung wurde weder für Steviosid noch für Steviol festgestellt.

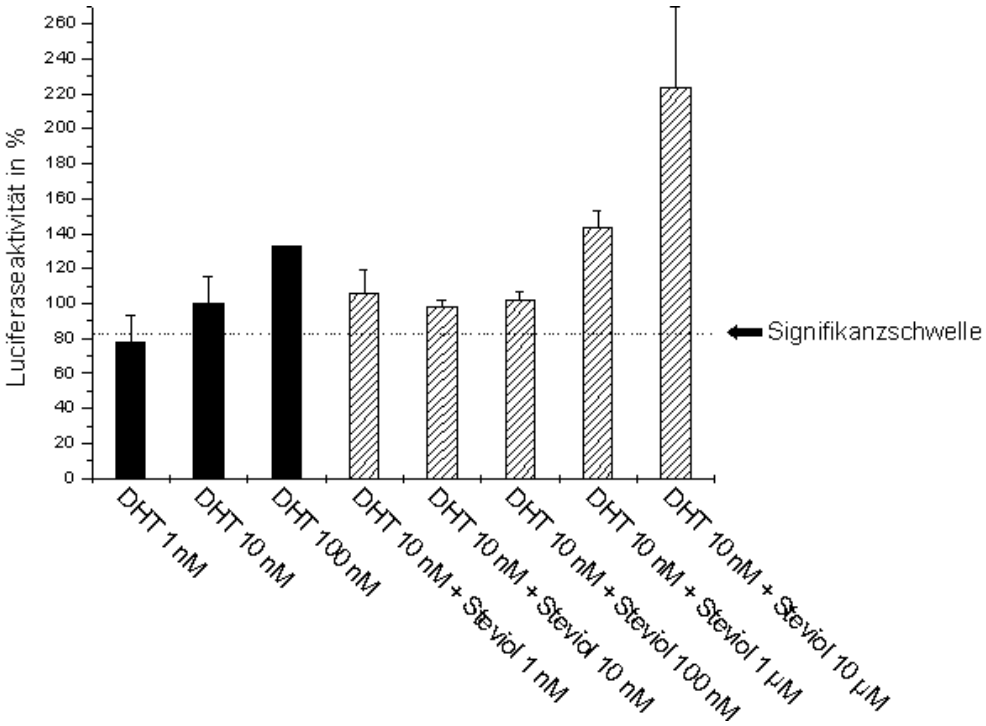


Abbildung 120: Antiandrogene Aktivität von Steviol im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay

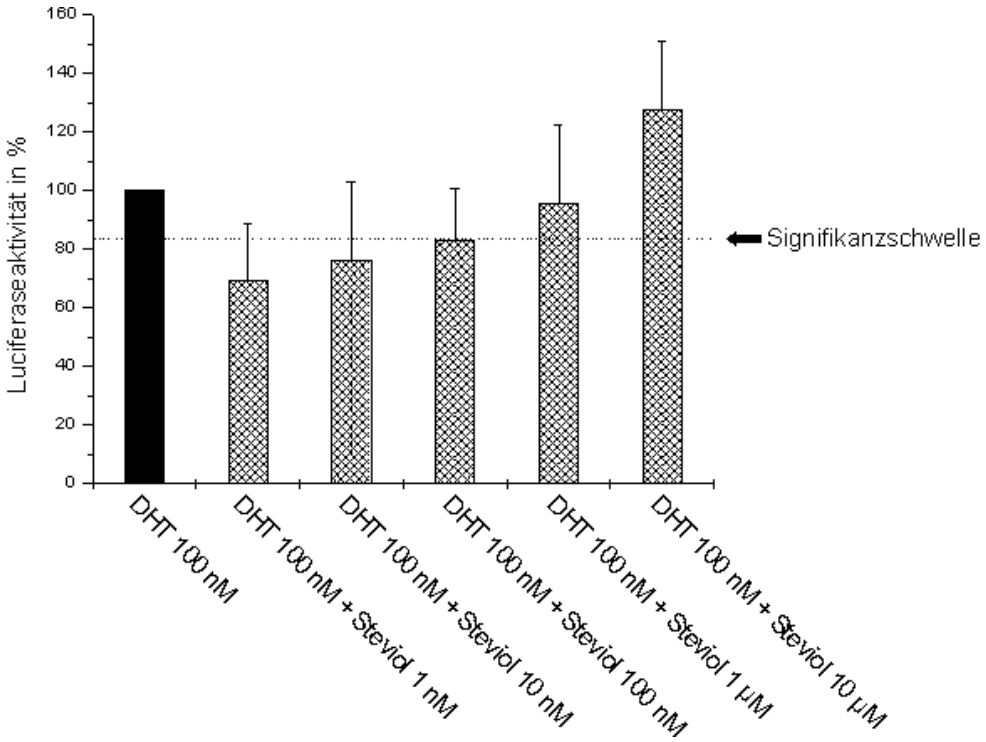


Abbildung 121: Antiandrogene Aktivität von Steviol im transienten Transaktivierungsassay

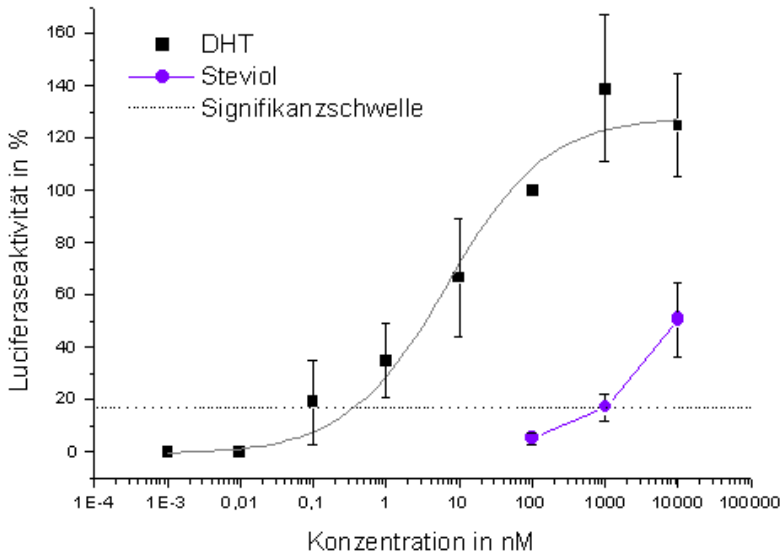


Abbildung 122: Androgene Aktivität von Steviol im transienten Transaktivierungsassay

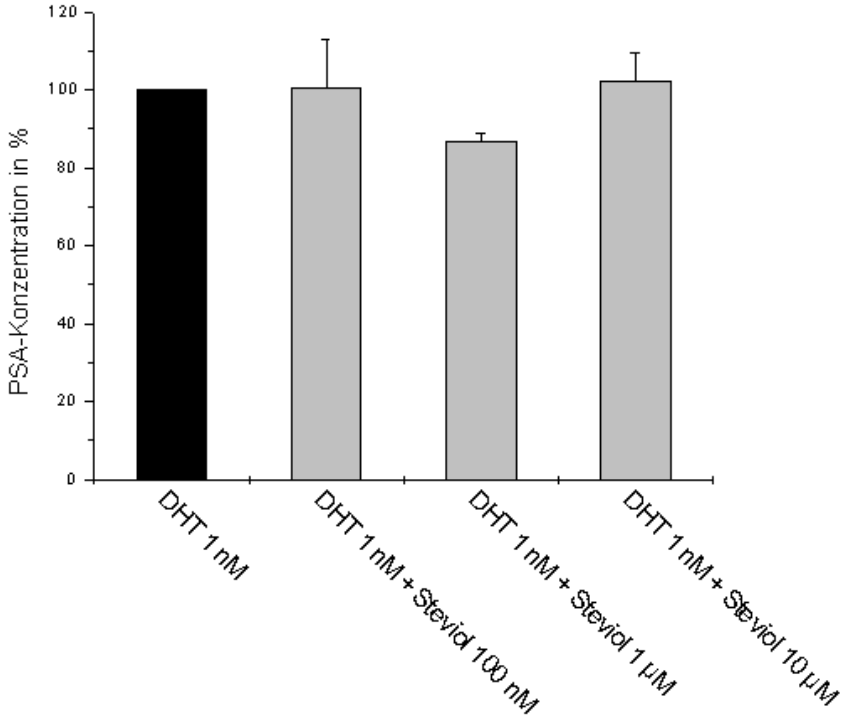


Abbildung 123: Antiandrogene Aktivität von Steviol im PSA-Assay

4.3.4 Steroidale Androgenrezeptorliganden

4.3.4.1 19-Nortestosteron

Das als Anabolikum verwendete 19-Nortestosteron unterscheidet sich durch Fehlen der C-19-Methylgruppe vom Testosteron. Es verhindert die Entwicklung der Spermien durch Senkung des Spiegels der gonadotrophen Hormone Follitropin und Lutropin sowie Testosteron. 19-Nortestosteron sollte im Vergleich zum in Position 17 substituierten N-(2-Chlorethyl)-N-nitroso-carbamoyl-L-alanyl-17-nortestosteron (CNC-ala-NT) auf androgene/antiandrogene Aktivität untersucht werden.

Im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen wurde für niedrige Konzentrationen von 19-Nortestosteron antiandrogene Aktivität nachgewiesen. 1 bis 100 pM 19-Nortestosteron hemmten die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität um ca. 30 %. Ab 1 µM 19-Nortestosteron wurde keine Hemmung mehr detektiert (Abbildung 124). Dieser Effekt ist, wie Untersuchungen auf androgene Aktivität ergaben, auf agonistische Aktivität am Androgenrezeptor zurückzuführen. Im transienten Transaktivierungsassay wurde für 19-Nortestosteron im Vergleich zu DHT eine um eine Zehnerpotenz nach rechts verschobene Dosis-

Wirkungs-Beziehung bis ins obere Plateau, den Sättigungsbereich des Rezeptors, nachgewiesen (Abbildung 125).

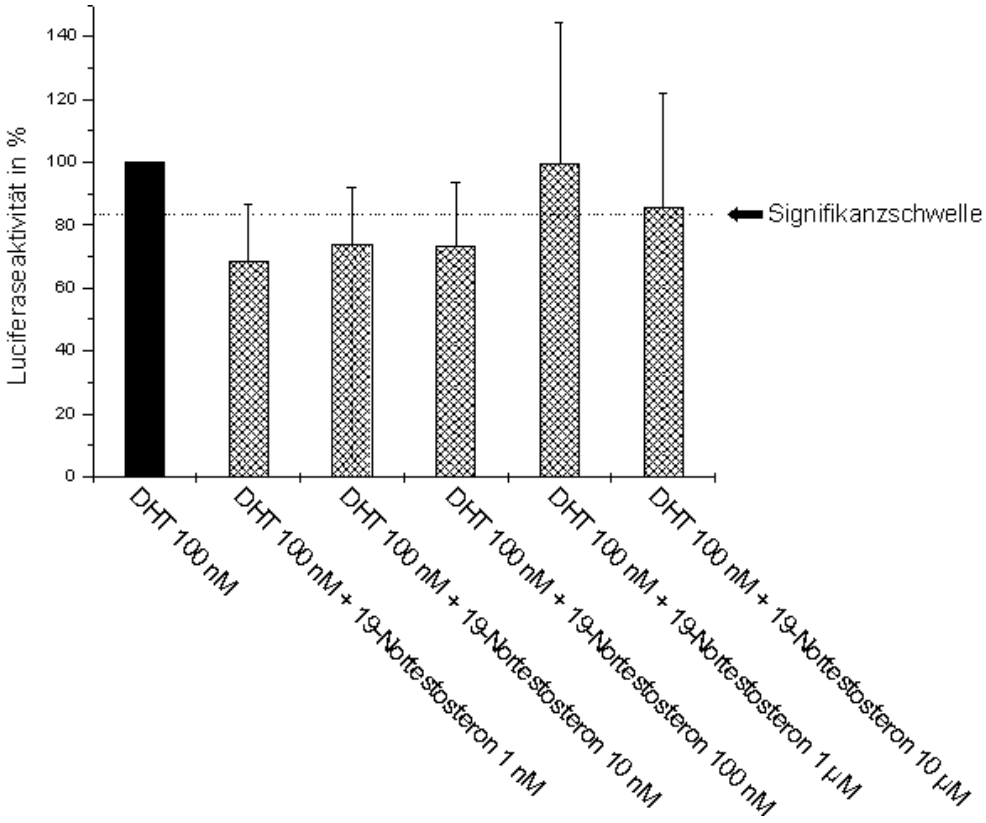


Abbildung 124: Antiandrogene Aktivität von 19-Nortestosteron im transienten Transaktivierungsassay

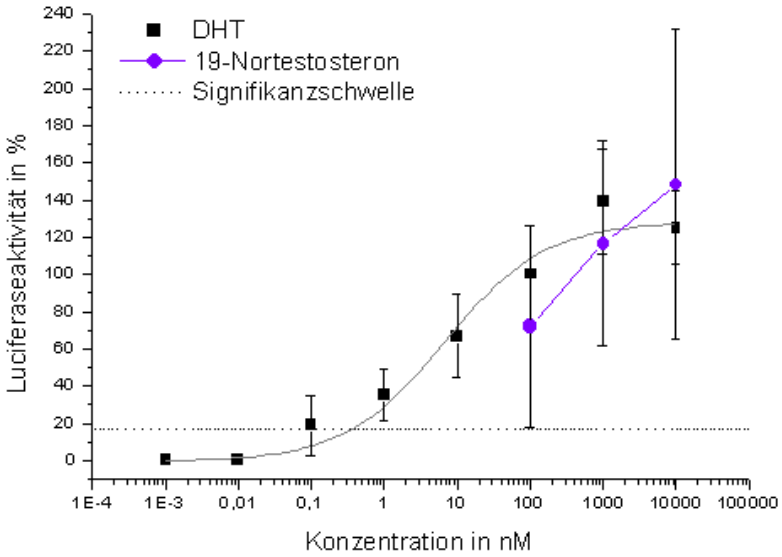


Abbildung 125: Androgene Aktivität von 19-Nortestosteron im transienten Transaktivierungsassay

4.3.4.2 N-(2-Chlorethyl)-N-nitroso-carbamoyl-L-alanyl-17-nortestosteron (CNC-ala-NT, E173)

CNC-ala-NT wurde im Rahmen der Entwicklung antineoplastischer Agentien in unserem Arbeitskreis synthetisiert. 2-Chlorethyl-N-nitroso-harnstoffe weisen antineoplastische Wirksamkeit bei hoher systemischer Toxizität auf. Durch kovalente Bindung des cytostatisch aktiven 2-Chlorethyl-N-nitroso-harnstoffs an einen tumoraffinen Carrier wurde eine Verbindung mit verminderter Toxizität im Sinne des „drug targeting“-Konzepts synthetisiert. Hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit sind sie den unverknüpften Verbindungen überlegen und weisen im Vergleich zu klinisch etablierten Nitrosoharnstoffen geringere Toxizität an Knochenmark und Uterus auf. (Jager, 1992; Schreiber, 1985)

CNC-ala-NT sollte in der vorliegenden Arbeit auf androgenes/antiandrogenes Potential untersucht und mit 19-Nortestosteron verglichen werden.

Für CNC-ala-NT wurde im transienten Transaktivierungsassay antiandrogene Aktivität bei niedrigen Konzentrationen nachgewiesen. 10 nM CNC-ala-NT hemmten die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität signifikant um 42 %, während steigende CNC-ala-NT-Konzentrationen die Hemmung reduzierten (Abbildung 126). CNC-ala-NT zeigte somit im gleichen Konzentrationsbereich ein stärkeres antiandrogenes Wirkpotential als das unsubstituierte 19-Nortestosteron. Untersuchungen auf androgene Aktivität von CNC-ala-NT ergaben ein starkes agonistisches Potential. 100 nM CNC-ala-NT induzierten eine vergleichbare Luciferaseaktivität wie etwa 18 nM DHT. Höhere CNC-ala-NT-Konzentrationen induzierten Luciferaseaktivitäten minimal unterhalb der durch DHT induzierten Enzymaktivitäten (Abbildung 127). Möglicherweise sind im Vergleich zu 19-Nortestosteron die etwas schwächere Induktion und das größere antiandrogene Potential auf eventuelle Beeinträchtigungen des Rezeptors infolge alkylierender Wirkung reaktiver Intermediate der 2-Chlorethyl-N-nitroso-harnstoffgruppe zurückzuführen.

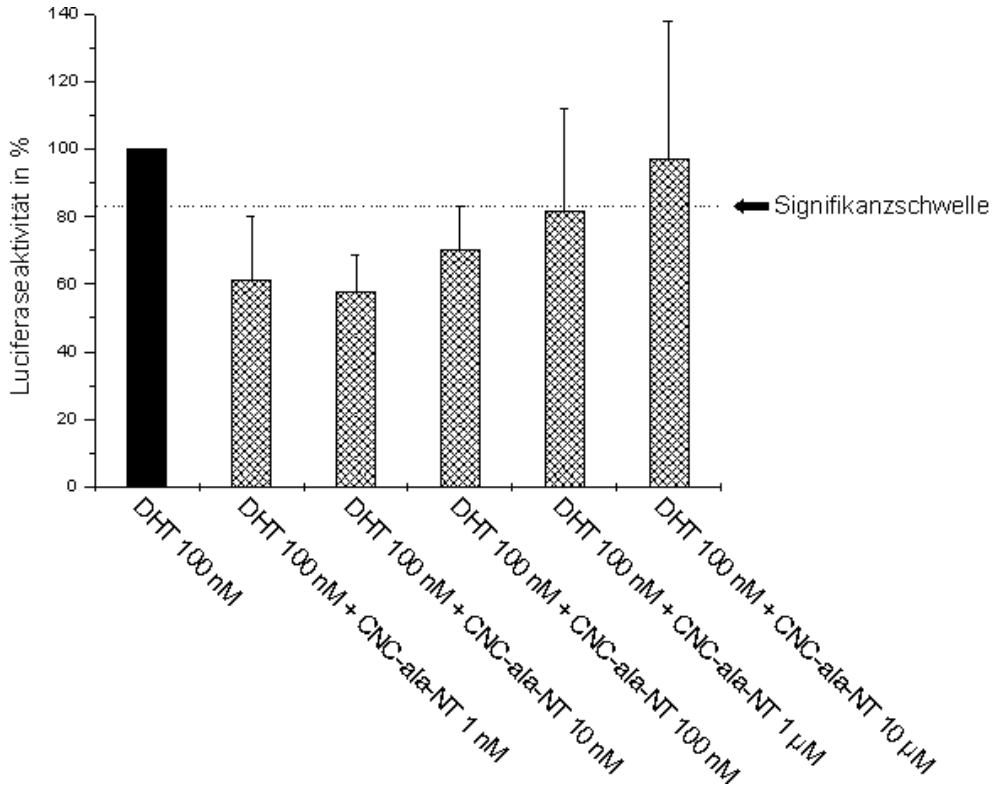


Abbildung 126: Antiandrogene Aktivität von CNC-ala-NT (E173) im transienten Transaktivierungsassay

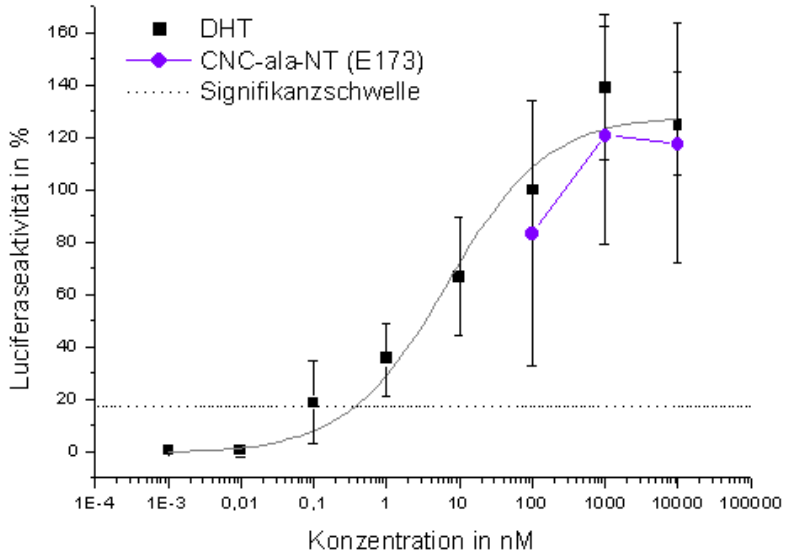


Abbildung 127: Androgene Aktivität von CNC-ala-NT (E173) im transienten Transaktivierungsassay

4.3.5 Zusammenfassung der Untersuchungen ausgewählter Verbindungen auf androgene/antiandrogene Aktivität

Die Ergebnisse des vorangegangenen Kapitels sollen im Folgenden zusammengefasst werden.

Korrekt werden Dosis-Wirkungs-Beziehungen durch einen logistischen Fit dargestellt. Unteres und oberes Plateau (A1 und A2), Steigung (p) und Wendepunkt (X_0) charakterisieren die Kurven vollständig. Um die biologische Wirkstärke einzelner Verbindungen in quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR) vergleichen zu können, müssten die graphischen Daten in Zahlenwerten zusammengefasst werden. Dieses gestaltet sich problematisch, da der EC_{50}-Wert Aussagen zur relativen Potenz, nicht aber zur maximalen Hemmwirkung, der relativen Effizienz, erlaubt. Zum anderen konnte in den wenigsten Fällen ein sigmoidaler Wirkungsverlauf ermittelt werden. In einigen Beispielen wurde eine konzentrationsunabhängige Hemmung über den gemessenen Bereich festgestellt. Aus diesen Gründen ist eine graphische Darstellung vorzuziehen.

Zur Auswertung agonistischer/antagonistischer Aktivität wurden Signifikanzschwellen eingeführt. Für agonistische Aktivität gibt sie das obere 95. Percentil der logistischen Dosis-Wirkungs-Kurve für DHT im unteren Plateau (A1) an und wurde im Bereich der Wirkung von 100 pM DHT ermittelt. Die Signifikanzschwelle für antagonistische Aktivität gibt das untere 95. Percentil der verwendeten DHT-Hemmkonzentration an.

Als signifikant agonistisch/antagonistisch wird die Aktivität einer Verbindung bezeichnet, wenn ein Wert plus dem ermittelten Fehler, der den Einzelgraphiken zu entnehmen ist, außerhalb der Signifikanzschwelle liegt. In den Übersichtsgraphiken wurde auf die Angabe von Fehlerbalken verzichtet. Ein Messwert im Bereich der Signifikanzschwelle wird als schwach aktiv definiert. Da bei den Untersuchungen die Standardfehler ermittelt wurden, liegen einige Messwerte zum Teil deutlich außerhalb der Signifikanzschwelle, ohne als signifikant agonistisch/antagonistisch bezeichnet werden zu können.

Zugunsten besserer Übersichtlichkeit wurden nicht alle untersuchten Verbindungen in einer Graphik dargestellt. Die erste Gruppe enthält die vier Benzophenon-Derivate Benzophenonimin, p,p`-Dimethylbenzophenon, Selectophor® und Ketoprofen. In der zweiten Gruppierung werden die Ergebnisse der Pharmaka Imipramin und Ketoconazol neben dem Phytoandrogen/-antiandrogen Steviosid und seinem

Aglycon Steviol mit den Steroiden 19-Nortestosteron und CNC-ala-NT zusammengefasst.

Zunächst sollen die Ergebnisse zu den Benzophenon-Derivaten diskutiert werden. Im stabilen T-47D-Luc-Reportergenassay zeigten Benzophenonimin und p,p`-Dimethylbenzophenon keine antiandrogene Aktivität. 10 µM Selectophor® bewirkten in Coinkubation mit 10 nM DHT eine Hemmung bis zur Signifikanzschwelle. Selectophor® kann daher in hohen Konzentrationen als gerade noch schwach antiandrogen bezeichnet werden. Für das Pharmakon Ketoprofen wurde ab einer Konzentration von 1 nM in Coinkubation mit 10 nM DHT ebenfalls schwache antagonistische Aktivität nachgewiesen (Abbildung 128).

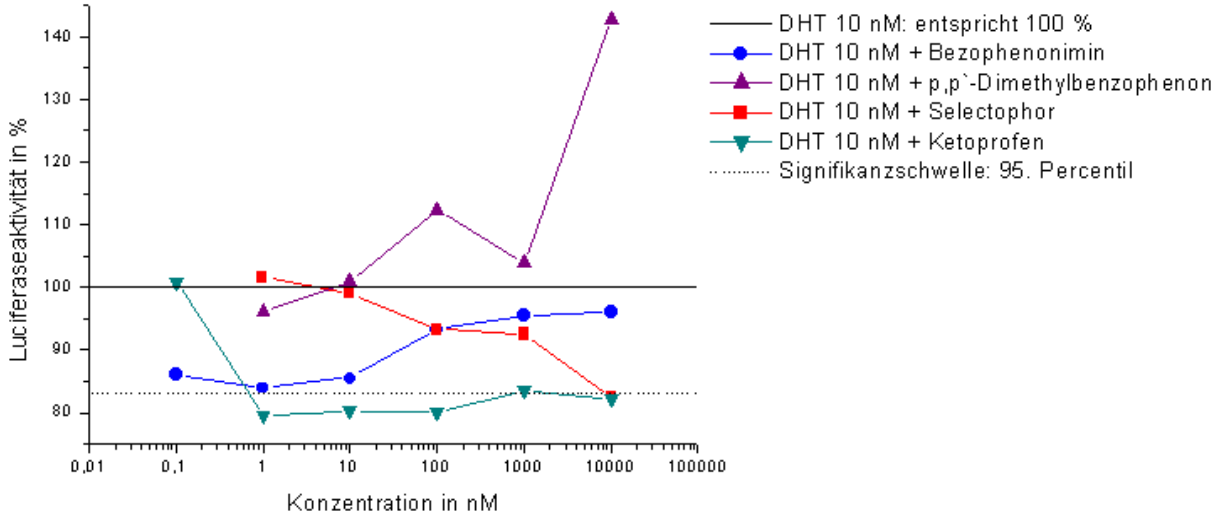


Abbildung 128: Untersuchungen auf antiandrogenes Potential: Überblick der Benzophenon-Derivate in Coinkubation mit 10 nM DHT im stabilen Transaktivierungsassay (T-47D-Luc)

Die im transienten Transaktivierungsassay untersuchten Benzophenon-Derivate sind vergleichend in Abbildung 129 dargestellt. 100 nM Benzophenonimin bewirkte eine 27%ige Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität. Im Vergleich zu dem von Guth untersuchten unsubstituierten Benzophenon wurde für Benzophenonimin eine deutliche Verringerung antiandrogener Aktivität im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen festgestellt. (Guth, 2000)

Für p,p`-Dimethylbenzophenon wurde eine schwache, maximal 25%ige Hemmung im Bereich der Signifikanzschwelle detektiert. p,p`-Dimethylbenzophenon zeigt somit im transienten Transaktivierungsassay COS-AR-Luc geringere Antiandrogenität als die von Guth untersuchten p,p`-Dihydroxy- und p,p`-Dimethoxy-Derivate. (Guth, 2000)

100 nM Selectophor® induzierten eine maximale Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität von 36 %, und bei Coinkubation mit Ketoprofen wurde ab 1 µM eine Hemmung von etwa 40 % detektiert.

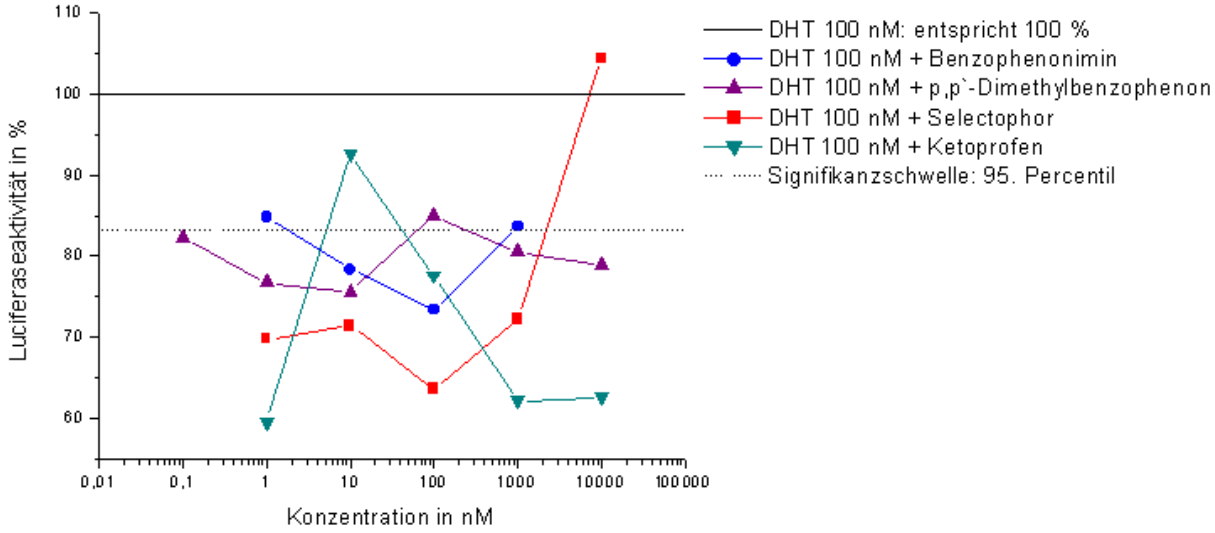


Abbildung 129: Untersuchungen auf antiandrogenes Potential: Überblick der Benzophenon-Derivate in Coinkubation mit 100 nM DHT im transienten Transaktivierungsassay (COS-AR-Luc)

Die im transienten Transaktivierungsassay detektierten androgenen Aktivitäten der Benzophenon-Derivate waren sehr schwach. Lediglich für 1 µM Benzophenonimin wurde schwach agonistisches Potential mit vergleichbarer Wirkstärke von 100 pM DHT festgestellt (Abbildung 130).

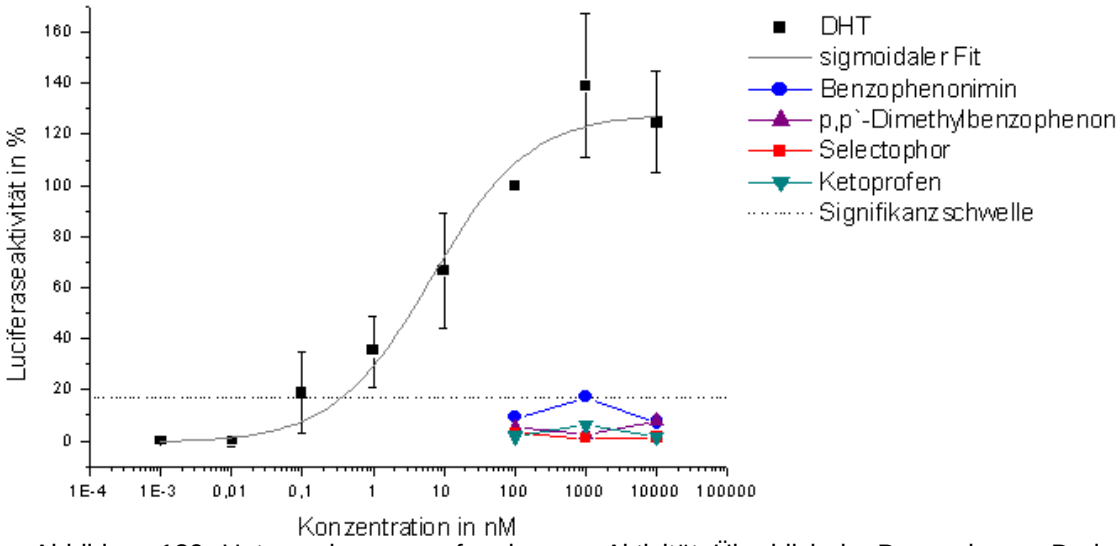


Abbildung 130: Untersuchungen auf androgene Aktivität: Überblick der Benzophenon-Derivate im transienten Transaktivierungsassay (COS-AR-Luc)

Der PSA-Assay erwies sich als deutlich sensitiver. Die ermittelten Messpunkte für DHT reichten allerdings nicht aus, um das 95. Percentil zu berechnen. Aus diesem Grund muss auf die Angabe einer Signifikanzschwelle verzichtet werden.

Die Benzophenon-Derivate lassen sich anhand ihrer IC_{50}-Werte in einer Reihe mit abnehmender Aktivität anordnen: p,p´-Dimethylbenzophenon > Selectophor® > Ketoprofen. Für 10 µM Benzophenonimin wurde lediglich eine maximale Hemmung der durch 1 nM DHT induzierten PSA-Konzentration von 22 % festgestellt.

Die Ergebnisse unterscheiden sich erheblich von den mittels transienten Transaktivierungsassays gemessenen Daten. p,p`-Dimethylbenzophenon zeigte im Gegensatz zu Ergebnissen in transienten Transaktivierungsassays im PSA-Assay sehr starke antiandrogene Aktivität (Abbildung 131). Es wurde ein vergleichbar antiandrogenes Potential wie durch die von Guth untersuchten p,p`-Dihydroxy- und p,p`-Dimethoxy-Derivate ermittelt. (Guth, 2000)

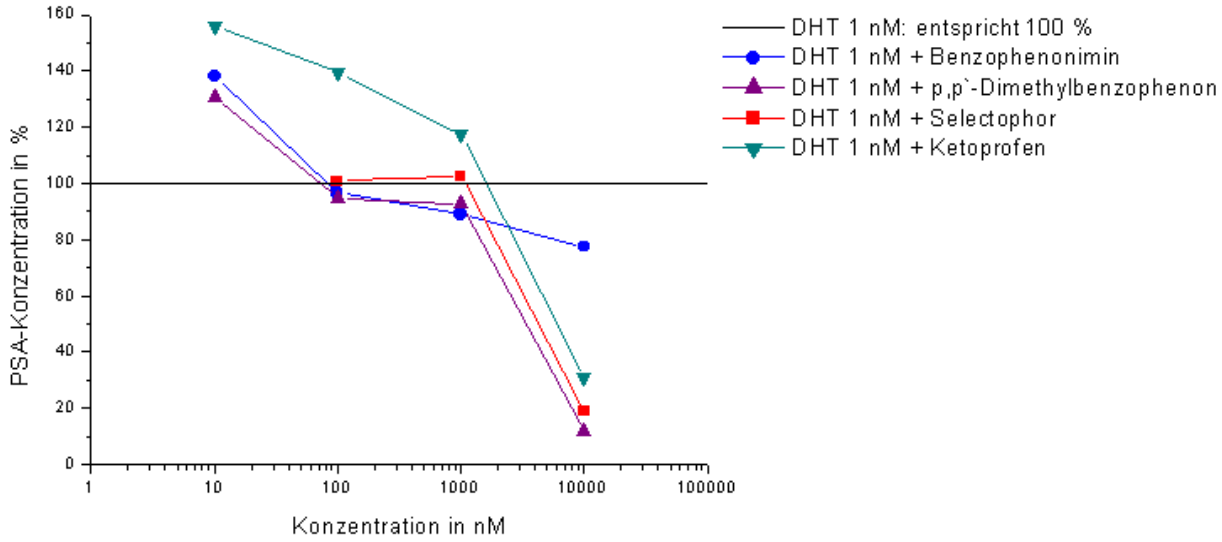


Abbildung 131: Untersuchungen auf antiandrogenes Potential: Überblick der Benzophenon-Derivate in Coinkubation mit 1 nM DHT im PSA-Assay (T-47D-Zellen)

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der zweiten, heterogenen Gruppe von Verbindungen diskutiert werden. In Abbildung 132 sind vergleichend die Ergebnisse des stabilen T-47D-Luc-Reportergenassays dargestellt. Signifikante antiandrogene Aktivität wurde ausschließlich für Ketoconazol festgestellt. Die Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität durch 10 µM Ketoconazol betrug etwa 60 %. Eine in derselben Zelllinie durchgeführte Wachstumskontrolle zeigte für die Konzentration 15%ige Hemmwirkung.

In Coinkubation mit 10 nM DHT wurde für Imipramin und Steviosid eine konzentrationsunabhängige Hemmung der Luciferaseaktivität im Niveau der Signifikanzschwelle detektiert. Steviol ließ im stabilen Transaktivierungsassay keine

antagonistische Aktivität erkennen. 10 µM Steviol steigerten die durch 10 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität um 124 %.

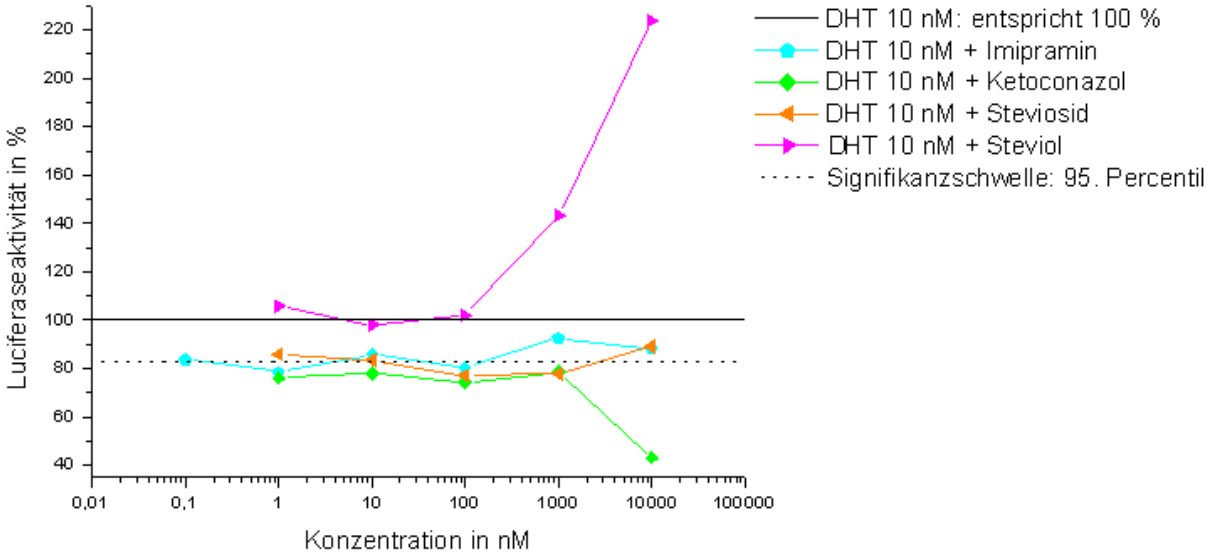


Abbildung 132: Untersuchungen auf antiandrogenes Potential: Überblick verschiedener Verbindungen in Coinkubation mit 10 nM DHT im stabilen Transaktivierungsassay (T-47D-Luc)

In Abbildung 133 sind die Ergebnisse des transienten Transaktivierungsassays zusammengefasst. Die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität wurde mit 100 nM Imipramin um etwa 35 % gehemmt. 10 nM Ketoconazol hemmten die durch 100 nM DHT induzierte Luciferaseaktivität im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen um etwa 28 %. Mit steigender Ketoconazol-Konzentration wurde im Gegensatz zum stabilen Transaktivierungsassay in T-47D-Luc-Zellen eine Verminderung der Hemmwirkung beobachtet.

30%ige Hemmung der durch 100 nM DHT induzierten Luciferaseaktivität wurde im transienten Transaktivierungsassay für 100 nM Steviosid bzw. 1 nM Steviol festgestellt. Steigende Konzentrationen reduzierten den Hemmeffekt. Coinkubation von 100 nM DHT mit 10 µM Steviol führte zur Überinduktion der Luciferaseaktiviät von etwa 30 %.

Für 19-Nortestosteron wurde im Bereich von 1 bis 100 pM in Coinkubation mit 100 nM DHT eine 30%ige Hemmung der Reportergeninduktion detektiert.

Signifikant antagonistische Aktivität wurde im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen für CNC-ala-NT nachgewiesen. Maximale Hemmung von 42 % wurde durch 10 nM der Verbindung in Coinkubation mit 100 nM DHT erreicht.

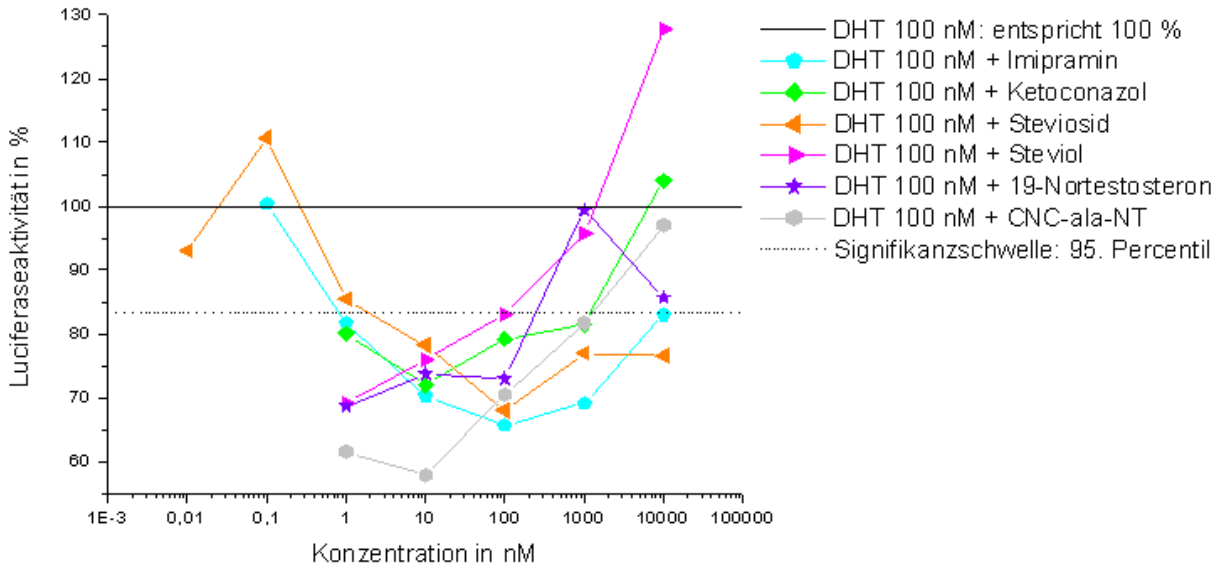


Abbildung 133: Untersuchungen auf antiandrogenes Potential: Überblick verschiedener Verbindungen in Coinkubation mit 100 nM DHT im transienten Transaktivierungsassay (COS-AR-Luc)

In Abbildung 134 ist die agonistische Aktivität der untersuchten Verbindungen zusammengefasst. Für 10 µM Imipramin wurde androgenes Potential deutlich oberhalb der Signifikanzschwelle ermittelt. Unter Berücksichtigung der hohen Standardabweichung kann die Luciferaseinduktion, die der einer 3,5 nM DHT-Induktion entspricht, nicht als signifikant betrachtet werden. Der Standardfehler ist aufgrund siebenfacher Wiederholung wesentlich kleiner und liegt deutlich außerhalb der Signifikanzschwelle.

Für Ketoconazol und Steviosid wurde kein agonistisches Potential oberhalb der Signifikanzschwelle festgestellt.

Signifikant agonistische Aktivität wurde für Steviol, 19-Nortestosteron und CNC-ala-NT ermittelt. Während 10 µM Steviol die Luciferaseaktivität vergleichbar mit 3,6 nM DHT induzierten, wurden durch 19-Nortestosteron und CNC-ala-NT Enzyminduktionen im oberen Plateau von DHT detektiert. Aufgrund fehlender Messdaten im unteren Konzentrationsbereich kann die relative Potenz von 19-Nortestosteron und CNC-ala-NT nur sehr grob, um etwa eine Größenordnung schwächer als DHT, abgeschätzt werden.

Die bei niedrigen Konzentrationen ermittelte signifikant antiandrogene Aktivität von CNC-ala-NT müsste im Hinblick auf potentielle klinische Anwendung in der Prostatakrebs-Therapie vor dem physiologischen hormonellen Hintergrund genau austariert werden, damit die als bedenklich zu bewertende stark agonistische

Aktivität hoher Konzentrationen des antineoplastischen Wirkstoffs nicht zum Tragen kommt.

Beim Vergleich von Steviosid mit seinem Aglycon Steviol weist das Glycosid in höheren Konzentrationen verstärkt antagonistische Wirkung auf. Steviol zeigte bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als das sterisch geräumige Steviosid antiandrogenes Potential und wurde als potenter Androgenrezeptoragonist identifiziert. Es bleibt zu diskutieren, ob der Süßstoff aus *Stevia rebaudiana* vergleichbar mit anderen Naturstoffen partieller Agonist/Antagonist am Steroidhormonrezeptor ist. Die deutlich geringere relative Potenz agonistischer/antagonistischer Aktivität des Glycosids im Vergleich zum Aglycon kann unter anderem in der sterischen Hinderung begründet sein.

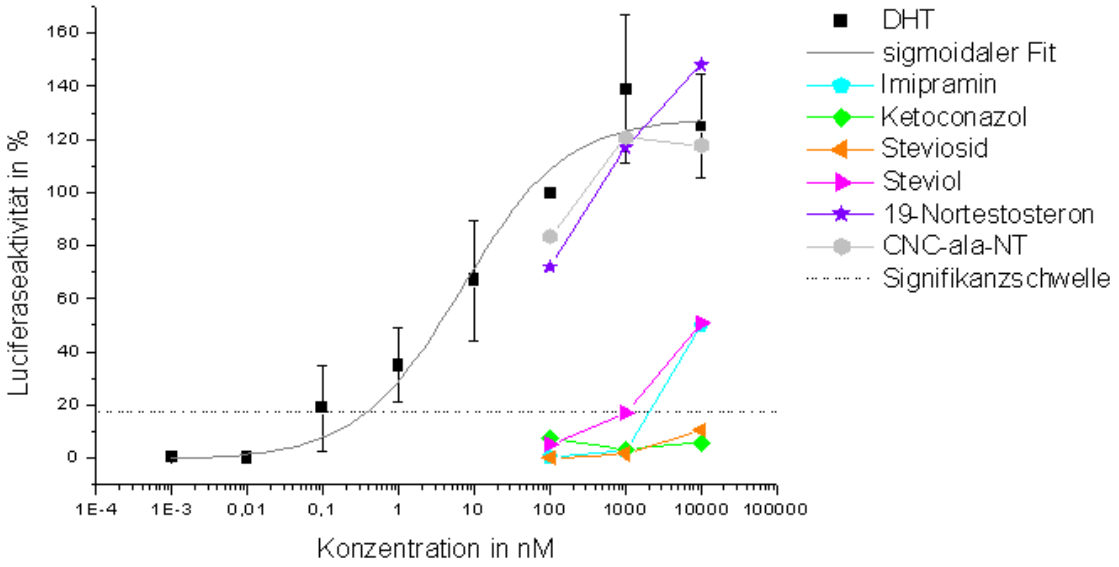


Abbildung 134: Untersuchungen auf androgene Aktivität: Überblick verschiedener Verbindungen im transienten Transaktivierungsassay (COS-AR-Luc)

Die im PSA-Assay ermittelten Ergebnisse bilden aufgrund ihrer IC_{50}-Werte eine Reihe mit abnehmender Aktivität: Steviosid >> Ketoconazol > Imipramin. Für Steviol wurde im gemessenen Konzentrationsbereich keine deutliche antiandrogene Aktivität festgestellt (Abbildung 135).

In ihrer Aussage konnten die Ergebnisse des PSA-Assays die Untersuchungen in den transienten Transaktivierungsassays weitestgehend bestätigen.

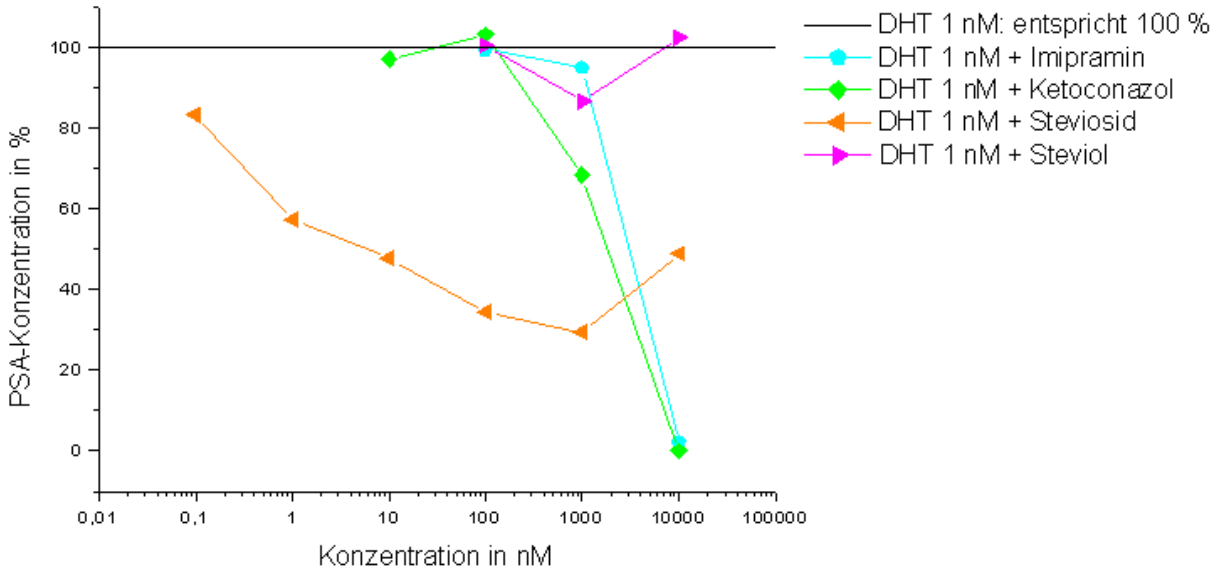


Abbildung 135: Untersuchungen auf antiandrogenes Potential: Überblick verschiedener Verbindungen in Coinkubation mit 1 nM DHT im PSA-Assay (T-47D-Zellen)

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die mit dem Reportergenplasmid pMamneoLuc stabil transfizierte humane Brustkrebszelllinie T-47D-Luc den Vorteil eines effizienten Screenings bietet. Die Expression des Reportergens Luciferase wird durch den Androgenrezeptor-kontrollierten MMTV-Promotor gesteuert.

Für das entzündungshemmende Pharmakon Ketoprofen und die höchste eingesetzte Konzentration des „Plasticizers“ Selectophor® wurde im stabilen Transaktivierungsassay in T47-D-Luc-Zellen schwache, deutlich antiandrogene Aktivität für das Antimycoticum Ketoconazol nachgewiesen. Für das tricyclische Iminodibenzyl-Derivat Imipramin und das Aglycon Steviol aus *Stevia rebaudiana* wurde ein sehr schwaches antagonistisches Potential festgestellt.

Beim transienten Transaktivierungsassay werden das Androgenrezeptor-Expressionsplasmid pSG5AR, das Reportergenplasmid pMamneoLuc und das Kontrollplasmid pSVβ in Steroidhormonrezeptor-negative Affennierenzellen COS-7 transfiziert. Das artifizielle System erlaubt agonistisch und antagonistische Untersuchungen, die auf den Androgenrezeptor beschränkt sind, und ist damit sehr spezifisch.

Im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen wurde antiandrogenes Potential ebenfalls für Ketoprofen und Selectophor® ermittelt. Auch Benzophenonimin und p,p`-Dimethylbenzophenon zeigten schwache antiandrogene Aktivität. Ebenso

ergab sich für Imipramin, Ketoconazol, Steviol und Steviosid sowie 19-Nortestosteron und CNC-ala-NT antagonistische Aktivität, mit partiell agonistischer Wirkung für Imipramin und Steviol bei hoher Konzentration. 19-Nortestosteron und das als antineoplastisches Agens entwickelte CNC-ala-NT zeigten im transienten Transaktivierungsassay deutliche androgene Aktivität im höheren Konzentrationsbereich. CNC-ala-NT zeigte im niedrigen Konzentrationsbereich bis 100 nM ausgeprägte antiandroge Wirkung.

Im PSA-Assay wurde schwache antiandrogene Aktivität für Benzophenonimin, deutlich antagonistisches Potential für p,p`-Dimethylbenzophenon, Selectophor, Ketoprofen, Imipramin und Ketoconazol gezeigt. Ausgeprägte antagonistische Aktivität bei geringen Konzentrationen wurde für Steviosid nachgewiesen, während Steviol im PSA Assay kaum antagonistisches Potential erkennen ließ.

Der PSA-Assay in T-47D-Zellen bietet die Möglichkeit der Detektion eines endogenen Reporters. Das PSA-Gen wird über einen endogen in der Zelle enthaltenen Promotor reguliert, der zwar über eine Anzahl AREs verfügt (siehe 2.5.5.2), aber noch nicht vollständig charakterisiert ist. Somit können weitere regulierende Elemente eine Rolle spielen.

Die deutlich stärkere Antagonisierung der durch DHT induzierten Genantwort kann in der höheren Sensitivität im Vergleich zu den transgenen Transaktivierungsassays sowie der fünfmal längeren Inkubationszeit begründet sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben den Androgenrezeptoren die ebenfalls von T-47D-Zellen exprimierten Glucocorticoid- und Progesteronrezeptoren mit den Testverbindungen wechselwirken und auf die PSA-Genexpression Einfluss nehmen können. Der Assay ist daher weniger spezifisch als der transiente Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen. Wie in Kapitel 4.1.3 gezeigt, erwies sich der PSA-Assay für das Antiandrogen Hydroxyflutamid und das Antiprogestin/Antiglucocorticoid Mifepriston deutlich weniger selektiv als in der Literatur beschrieben. (Rosenberg et al., 1998)

4.4 *In-vitro*-Untersuchungen zur Kombinationswirkung ausgewählter Phyto- und Xenoestrogene in einem estrogensensitiven Luciferase-Reportergensystem

Um estrogene Wirkungen unter Berücksichtigung des physiologischen Hintergrunds endogener Hormone zu untersuchen, bieten sich Kombinationsexperimente an. Auf diese Weise kann auch das Zusammenwirken estrogener Effekte von Verbindungen natürlichen und xenobiotischen Ursprungs ermittelt werden.

Für repräsentative Industriechemikalien (Bisphenol A, p-*tert*-Octylphenol, Nonylphenol, o,p`-DDT) und das Phytoestrogen Daidzein sind mit 1 nM des physiologischen Hormons 17ß-Estradiol in vorangegangenen Versuchen Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt worden. Bei dieser Estradiol-Konzentration ist das Reportergen bereits deutlich aktiviert und ermöglicht neben der Detektion von additiven, überadditiven oder potenzierenden agonistischen Effekten auch die Aufdeckung antagonistischer Effekte. Die von Seng ermittelten Ergebnisse ergaben Anhaltspunkte für überadditive Wirkungen der Gemische von 17ß-Estradiol mit Xenobiotika bei niedrigen Fremdstoff-Konzentrationen von 1 und 10 nM. Unter Berücksichtigung der steilen Kurve der Dosis-Wirkungs-Beziehung für 17ß-Estradiol sollten weiterführende Experimente zur Untersuchung additiver bzw. überadditiver Kombinationswirkungen mit einer niedrigeren Konzentration von 100 pM 17ß-Estradiol in Kombination mit den verschiedenen Fremdstoffen durchgeführt werden. (Seng, 1999)

Um mögliche Effekte durch Kombination eines natürlichen und eines anthropogenen Xenoestrogens bzw. von zwei anthropogenen Xenoestrogenen festzustellen, sollten einige der Verbindungen im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 1 µM jeweils äquimolar miteinander kombiniert werden. Durch diese Kombinationen sollte der Effekt verschiedener estrogenartig wirkender Verbindungen simuliert werden.

Problematisch zeigte sich die Auswertung generierter Daten. Die Überprüfung, ob die Wirkung einer kombinierten Gabe von zwei Substanzen der Summe der Wirkung ihrer Einzelverbindungen entspricht bzw. größer oder kleiner ist, setzt eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung der Einzelverbindungen voraus. Für viele Substanzen wird eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve erhalten. Bei 17ß-Estradiol ist der lineare Bereich sehr steil und erschwert die Bewertung, ob die Kombination von zwei Dosen eine additive Wirkung hervorruft. Kortenkamp und Altenburger empfehlen für

sigmoidale Dosis-Wirkungs-Beziehungen die Methode der Isobolenauswertung, um sicher zwischen additiven und nicht-additiven Kombinationswirkungen zu unterscheiden. Dieses Verfahren setzt jedoch eine größere Anzahl von Messpunkten voraus als im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden. Die Begriffe „additiv“ und „überadditiv“ sind somit nicht streng mathematisch zu verstehen. Sie lassen sich aber deutlich von „potenzierend“ und „antagonisierend“ unterscheiden. (Kortenkamp and Altenburger, 1998)

Für die Durchführung der Kombinationsexperimente wurde zu Beginn der Testphase erneut eine Bezugskurve für 17ß-Estradiol ermittelt. Dieses wurde für sinnvoll erachtet, da Veränderungen von Zellsystemen im Laufe langer Kultivierungszeiträume auftreten. Nach halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergab sich für 17ß-Estradiol vom subphysiologischen Bereich bei 10 pM bis zum Sättigungsbereich des Rezeptors bei 100 nM ein für rezeptorvermittelte Prozesse typischer sigmoidaler Kurvenverlauf mit einem EC_{50}-Wert von 1,2 nM.

Die Kombinationsexperimente sind im Folgenden einheitlich dargestellt:

- In schwarzen Balken ist die Reportergeninduktion des physiologischen Liganden 17ß-Estradiol über einen Konzentrationsbereich von 10 pM bis 100 nM dargestellt.
- Weiße Balken repräsentieren die Reportergeninduktion durch die jeweiligen Einzelverbindungen.
- Die grauen Balken resultieren aus den Coinkubationen von 100 pM 17ß-Estradiol mit dem jeweiligen Fremdstoff.

Für Bisphenol A, Antioxidans für Weichmacher und Monomer in einer Vielzahl von Kunststoffen, ist *in vivo* und *in vitro* estrogene Aktivität beschrieben.

Nach vierzehntägiger subkutaner Applikation von 1 mg Bisphenol A pro adulter männlicher Ratte wird die Inhibierung testikulärer Funktionen beobachtet. Diese sind mögliche Folge einer erhöhten Plasmakonzentration an „Luteinisierendem Hormon“ als negative Feed-back-Reaktion des gesenkten Testosteron-Plasmaspiegels. Ashby und Tinwell beschreiben Bisphenol A im Uterotrophen Assay an geschlechtsunreifen Ratten nach subkutanen wie oralen Gaben von 400 bis 800 mg/kg Benzophenon A als aktiv. Ebenfalls beobachten sie an Tieren nach Applikation von 600 bzw. 800 mg/kg Bisphenol A eine vorzeitige Vaginalöffnung. In Untersuchungen zum

plazentaren Transfer von Bisphenol A konnten Takahashi und Oishi in Ratten einen schnellen Transfer in den Fetus beobachten. Die Plazenta stellt somit keine Barriere für Bisphenol A dar. (Ashby and Tinwell, 1998; Takahashi und Oishi, 2000; Tohei et al., 2001)

In vitro sind für Bisphenol A proliferative Effekte in MCF-7-Zellen sowie estrogenabhängige Reportergeninduktionen in Säugerzellen und Hefen beschrieben. (Kanai et al., 2001; Raun Andersen et al., 1999)

Die durchgeführten Kombinationsexperimente von Bisphenol A mit 100 pM 17ß-Estradiol zeigen eine rein additive Reportergeninduktion (Abbildung 136).

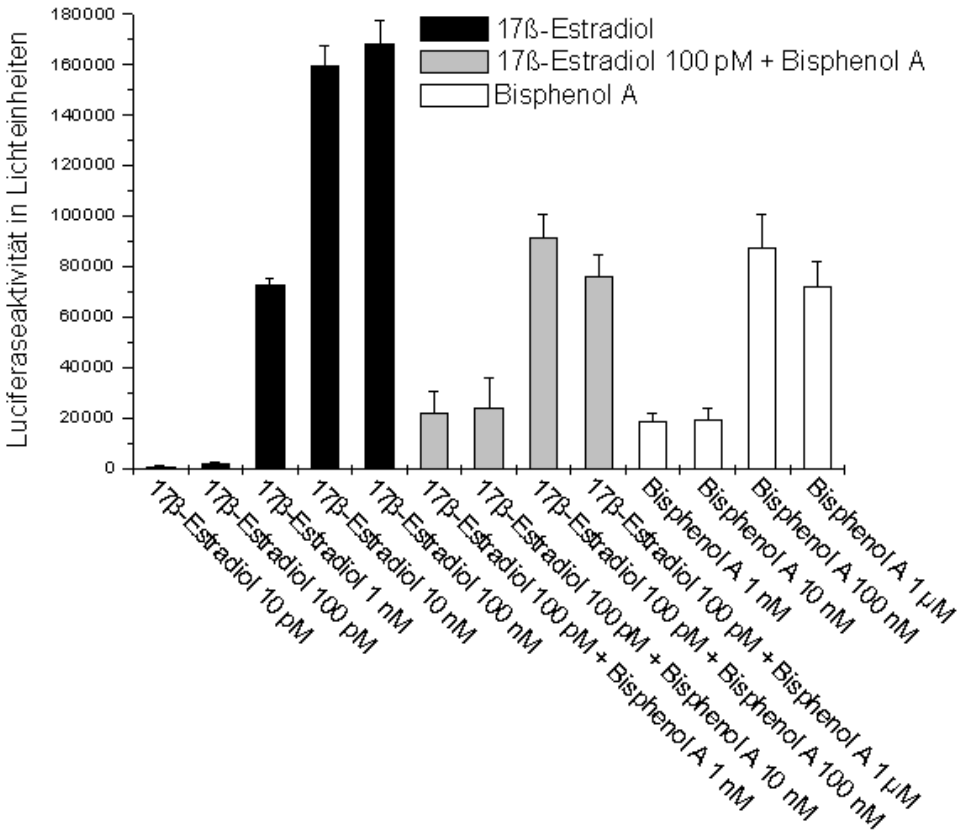


Abbildung 136: Reportergeninduktion durch 17ß-Estradiol, Bisphenol A und Kombinationen von 100 pM 17ß-Estradiol mit zunehmender Konzentration von Bisphenol A

White et al. berichten von estrogener Aktivität einiger Alkylphenole wie z. B. p-Octylphenol und p-Nonylphenol in Fischen, Vögeln und Säugetieren. (White et al., 1994)

Nach Exposition männlicher erwachsener Fische mit p-*tert*-Octylphenol konnten Gronen et al. eine signifikante Korrelation zur Bioakkumulation, zur Vitellogenin-A2-Expression in männlichen Fischen, zur Prozentzahl befruchteter Eier und zur Überlebensrate von Embryonen feststellen. Für Octylphenol ist eine erhöhte Rate

abnormaler Entwicklung an sich entwickelnden Embryonen beschrieben. Es wird für Octylphenol neben estrogener auch genotoxische Aktivität angenommen. (Gronen et al., 1999)

Für weibliche Ratten wurden infolge neonataler Octylphenolexposition spontane Unterbrechungen der cyclischen preovulatorischen LH-Ausschüttung und der Estradiol-induzierten abendlichen Erhöhung von LH, FSH und Prolactin in erwachsenen Tieren beobachtet. Herath et al. vermuten eine mögliche daraus hervorgehende Störung im Verhalten bei sexueller Empfänglichkeit im Erwachsenenalter. (Herath et al., 2000)

Nonylphenol ist ebenfalls in der Lage, estradiolabhängige Genexpression in Fischen zu induzieren und dauerhafte Effekte auf die sexuelle Differenzierung zu bewirken. Daneben ist für Nonylphenol ebenso wie für Octylphenol die estrogenabhängige Geninduktion in verschiedenen Reportergensystemen beschrieben. (Arukwe et al., 1997; Fairchild et al., 1999; Madigou et al., 2001; Raun Andersen et al., 1999)

Im verwendeten Reportergenassay in MCF-7-Luc-Zellen induzieren isomerenreines p-*tert*-Octylphenol (Abbildung 137) und technisches Nonylphenol (Abbildung 138) in Kombination mit 100 pM 17ß-Estradiol durchweg rein additive Reportergenantworten.

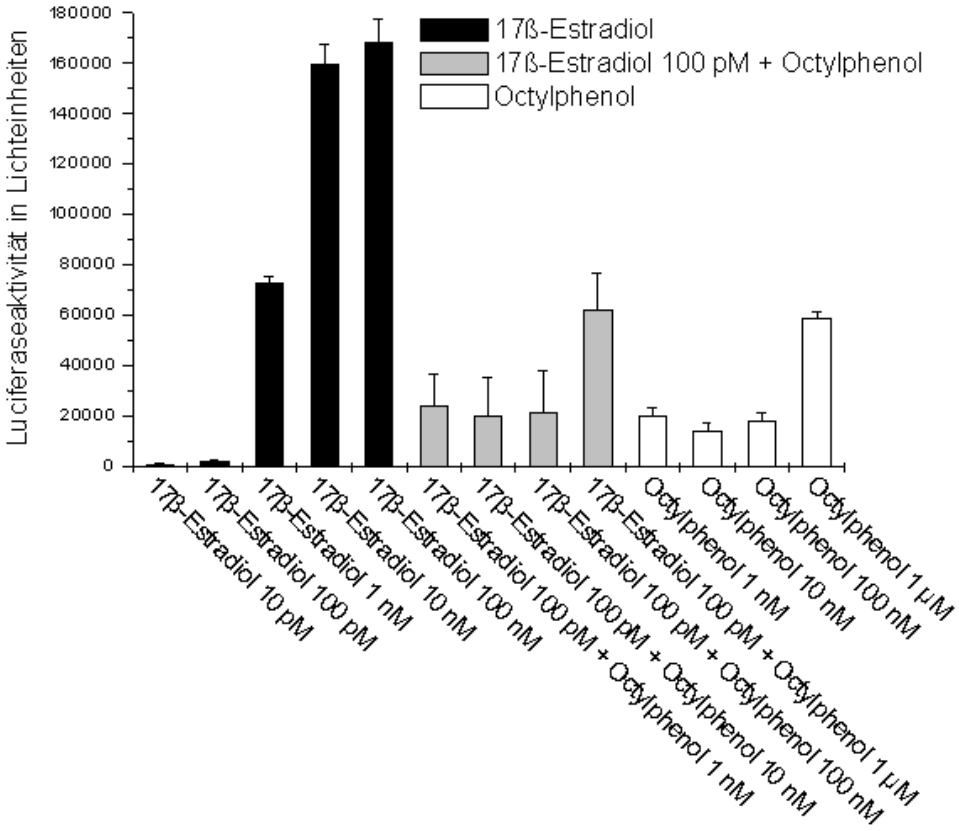


Abbildung 137: Reportergeninduktion durch 17ß-Estradiol, p-*tert*-Octylphenol und Kombinationen von 100 pM 17ß-Estradiol mit zunehmender *p-tert*-Octylphenol-Konzentration

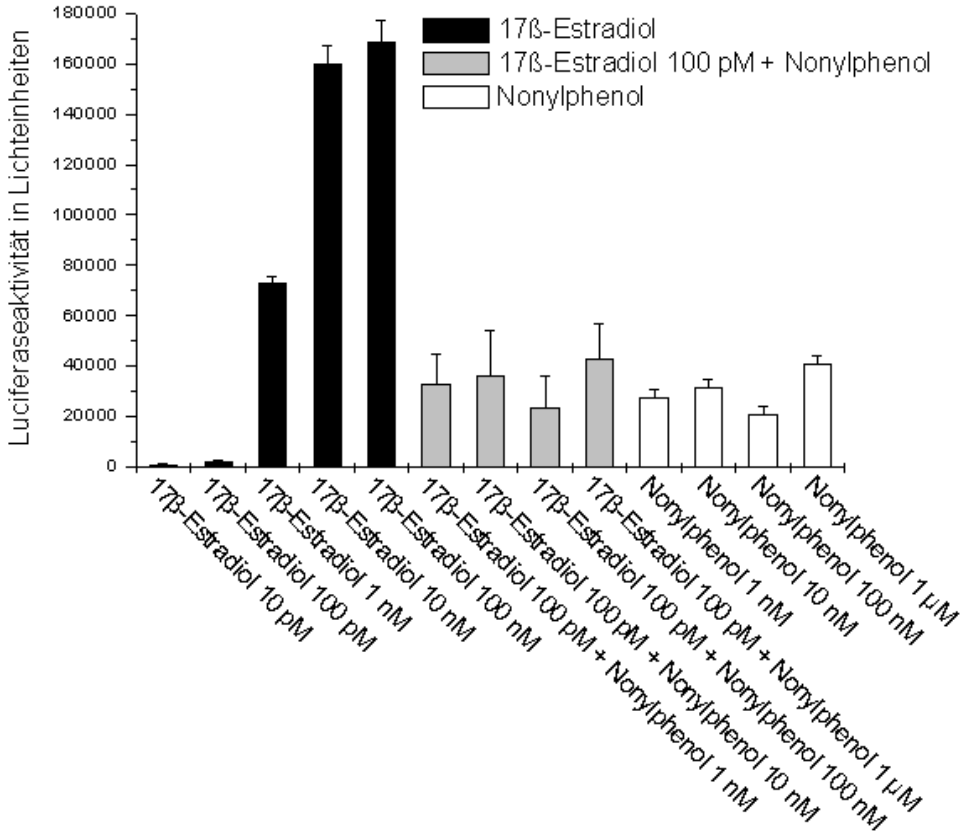


Abbildung 138: Reportergeninduktion durch 17ß-Estradiol, Nonylphenol (techn.) und Kombinationen von 100 pM 17ß-Estradiol mit zunehmender Nonylphenol-(techn.)-Konzentration

Für o,p`-DDT ist kompetitive Bindung an den ER und Induktion einer Reihe estrogenabhängiger Gen- und Reportergenantworten beschrieben. Ulrich et al. ermittelten nach kontinuierlicher Gabe niedriger Dosen o,p`-DDT über subkutan implantierte Kapseln in ovarektomierten Mäusen Gewebe- und Blutspiegel für Organochlorverbindungen, die im Tierversuch bereits estrogene Effekte auslösten und sich nicht wesentlich von dem Niveau unterscheiden, das im Menschen gefunden werden kann. (Bigsby et al., 1997; Ulrich et al., 2000; Raun Andersen et al., 1999; Steinmetz et al., 1996)

Cheek et al. berichteten nach *In-vivo*-Untersuchungen an Fischen über einen Zeitraum von acht Wochen schon bei niedrigen Dosierungen von 500 mg o,p`-DDT/l belastetem Wasser über eine Vitellogenin-A2-Expression und Feminisierungseffekte. (Cheek et al., 2001)

Die in Abbildung 139 dargestellten Ergebnisse der Kombinationen von 100 pM 17ß-Estradiol mit zunehmender o,p`-DDT-Konzentration zeigen auch in diesem Fall rein additive Wirkung.

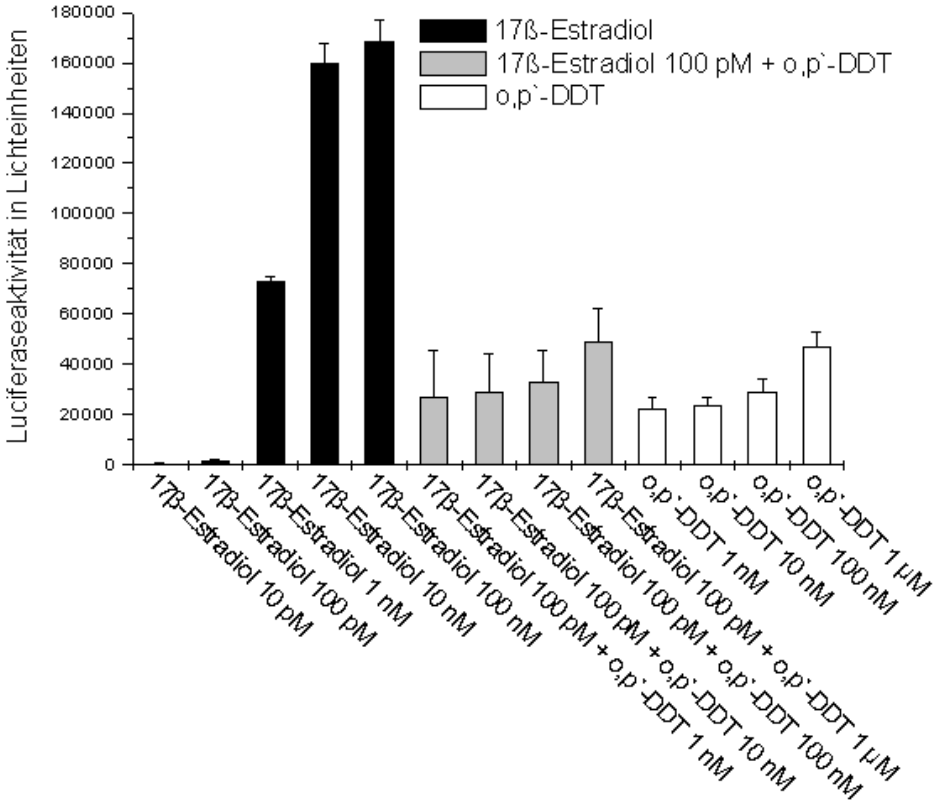


Abbildung 139: Reportergeninduktion durch 17ß-Estradiol, o,p`-DDT und Kombinationen von 100 pM 17ß-Estradiol mit zunehmender o,p`-DDT-Konzentration

Für das Soja-Isoflavon Daidzein ist die Bindung mit dem ER ebenso beschrieben wie die *In-vitro*-Induktion der estrogenabhängigen Reportergene Vitellogenin A2 und pS2. (Hopert et al., 1998; Nokov et al., 2000; Song et al., 1999)

In den gewählten Konzentrationen weist Daidzein als Einzelverbindung eine relativ schwache estrogene Aktivität auf und induziert in den Kombinationsexperimenten mit 100 pM 17ß-Estradiol rein additive Reportergenantworten (Abbildung 140).

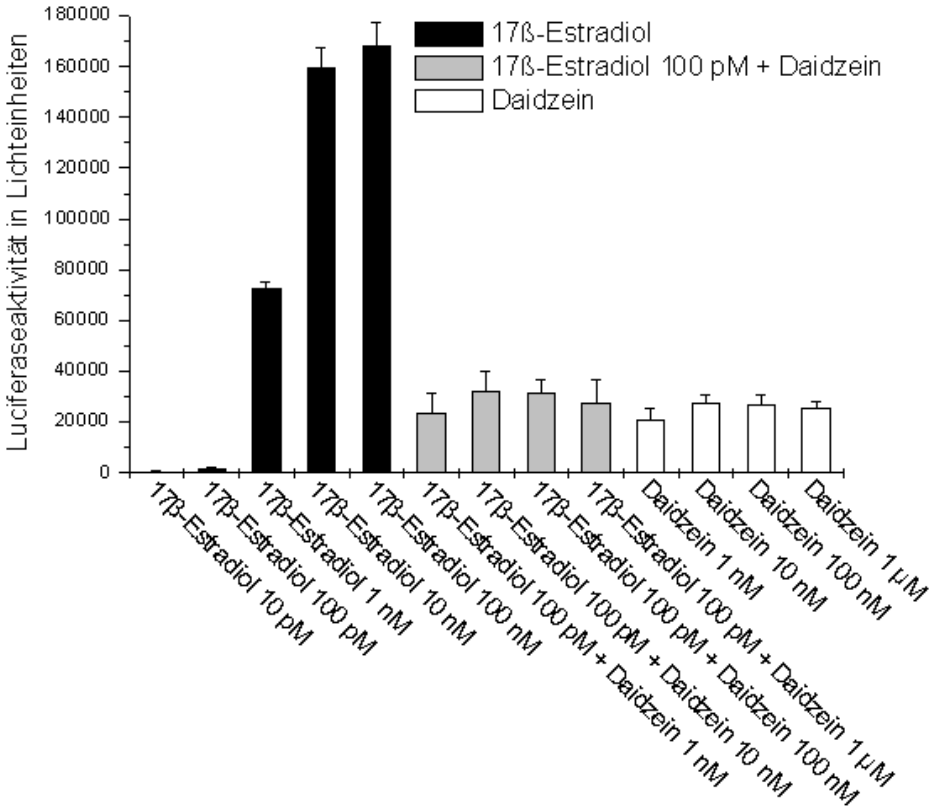


Abbildung 140: Reportergeninduktion durch 17ß-Estradiol, Daidzein und Kombinationen von 100 pM 17ß-Estradiol mit zunehmender Daidzein-Konzentration

Die Ergebnisse für Gemische von jeweils zwei Fremdstoffen zeigen eine bestenfalls als additiv zu interpretierende Wirkung (Abbildung 141 bis Abbildung 143).

Kombinationen äquimolarer Konzentrationen von Daidzein mit Bisphenol A ab 100 nM (Abbildung 141) und mit p-*tert*-Octylphenol bei 1µM (Abbildung 142) zeigten eine geringere Reportergeninduktion als die übrigen Gemische dieser Verbindungen, was als Hinweis für schwache antagonistische Wirkung von Daidzein oder Toxizität interpretiert werden könnte.

Für die äquimolare Konzentration von 1 µM Bisphenol A mit p-*tert*-Octylphenol wurde ebenfalls eine vergleichsweise geringe Reportergeninduktion ermittelt (Abbildung 143). Sie kann ebenso Hinweis für schwach antagonistische Wirkung der zweiten Komponente p-*tert*-Octylphenol oder auch für Toxizität sein.

Wie für die anderen Kombinationen (Abbildung 136 bis Abbildung 140) gibt es keine Anhaltspunkte für eine potenzierende Wirkung der Xenoestrogene in Gemischen.

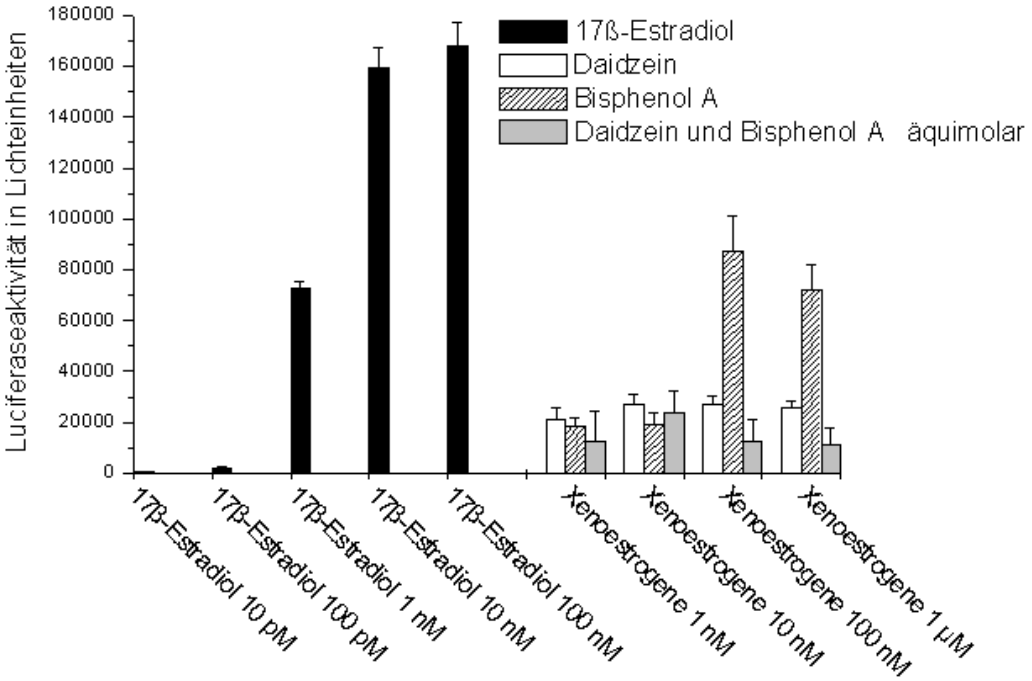


Abbildung 141: Reportergeninduktion durch 17ß-Estradiol, Daidzein, Bisphenol A und äquimolaren Kombinationen von Daidzein und Bisphenol A

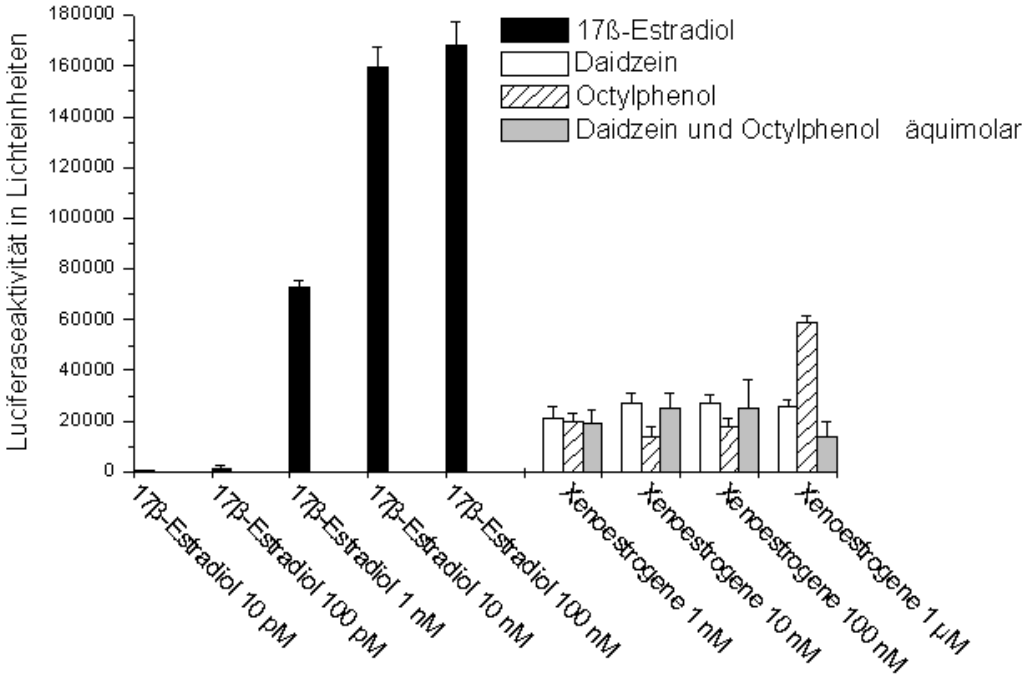


Abbildung 142: Reportergeninduktion durch 17ß-Estradiol, Daidzein, Octylphenol und äquimolaren Kombinationen von Daidzein und Octylphenol

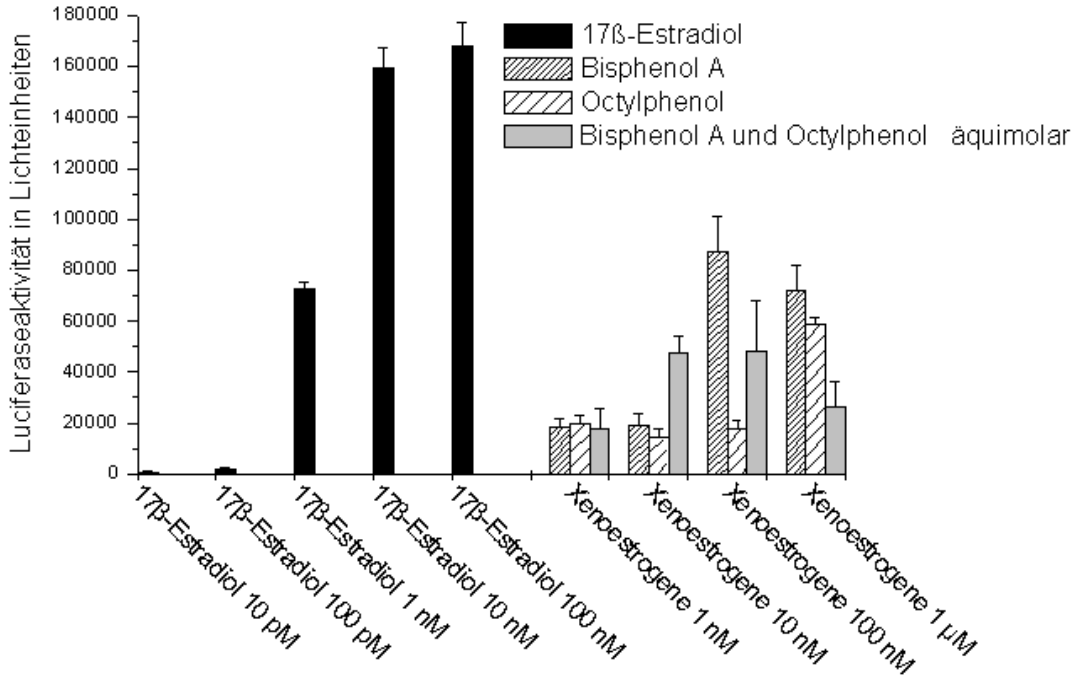


Abbildung 143: Reportergeninduktion durch 17ß-Estradiol, Bisphenol A, Octylphenol und äquimolaren Kombinationen von Bisphenol A und Octylphenol

4.4.1 Zusammenfassung der *In-vitro*-Untersuchungen zur Kombinationswirkung ausgewählter Verbindungen im MCF-7-Luc-Assay

Für die repräsentativen Umweltchemikalien Bisphenol A, p-*tert*-Octylphenol, Nonylphenol und o,p`-DDT, das Phytoestrogen Daidzein und das physiologische Hormon 17ß-Estradiol wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen und binäre Gemische untersucht. Ergebnisse aus Kombinationsexperimenten von 100 pM 17ß-Estradiol mit verschiedenen Fremdstoffen in Konzentrationen von 1 nM bis 1 µM deuten auf rein additive Wirkungen hin. Hinweise für überadditive Effekte aus früheren Untersuchungen mit Kombinationen von 1 nM 17ß-Estradiol konnten nicht verifiziert werden. Bei Kombinationen von zwei Xenoestrogenen äquimolarer Konzentrationen von 1 nM bis 1 µM erhält man bestenfalls eine additive Wirkung auf die Reportergeninduktion. Die Ergebnisse können so interpretiert werden, dass bei Kombination von estrogenartig wirkenden Substanzen die Wirkung im Wesentlichen additiv ist.

Die angewendete Betrachtungsweise setzt allerdings eine lineare Dosis-Wirkungs-Kurve der Einzelverbindungen voraus. Zur Unterscheidung additiver und nicht-additiver Kombinationswirkungen von Verbindungen mit nicht-linearer Dosis-

Wirkungs-Beziehung empfehlen Kortenkamp und Altenburger die Auswertung von Isobolen. Diese Methode setzt jedoch eine größere Anzahl von Messpunkten voraus, als mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ermittelt wurden. (Kortenkamp and Altenburger, 1998)

4.5 Transgene Hefe-Assays

Die Untersuchung hormoneller/antihormoneller Effekte erfolgte anhand rekombinanter Hefestämme, die mit humanem Estrogenrezeptor/Androgenrezeptor interagieren. Für das Reportergensystem wurden modifizierte Phosphoglycerinkinase-(PGK)-Gen-Promotoren in Verbindung mit dem β-Galactosidase kodierenden *lacZ*-Gen in *Saccharomyces cerevisiae* verwendet.

Die β-Galactosidase-Aktivität ist direktes Maß rezeptorvermittelter Aktivität von Testsubstanzen. Der Nachweis ligandinduzierter Transkriptionsaktivierung kann nach 48 Stunden Inkubation in einem Farbtest durch Umsetzung von Chlorphenolrot-β-D-galactopyranosid photometrisch vermessen werden. Die normierte β-Galactosidase-Aktivität wird durch Abgleich mit der Zelldichte bestimmt.

Vorteil transgener Transaktivierungsassays in Hefen ist die größere Unempfindlichkeit gegenüber Inkubationsverbindungen. Dadurch besteht die Möglichkeit, Aktivitäten von Substanzen in deutlich höheren Konzentrationen zu untersuchen als in Säugerzellen. Zu berücksichtigen ist jedoch ein zuweilen differierender Effekt einzelner Verbindungen in den verschiedenen Zellsystemen.

4.5.1 Etablierung und Validierung des Hefe-Assays mit humanem AR

Androgene/antiandrogene Aktivität wurde in einem stabil transfizierten Subklon von *Saccharomyces cerevisiae* mit hAR-Expressionsplasmid und einem Reportergenplasmid mit androgenresponsivem Promotorelement des MMTV-Promotors und einem für β-Galactosidase kodierenden *lacZ*-Gen untersucht.

Die Hefen exprimieren den AR konstitutiv. Das Reportergen kann durch Androgenbehandlung der Zellen rezeptorvermittelt aktiviert werden. Behandlung mit einem Antiandrogen blockiert diesen Prozess.

Inkubation mit dem physiologischen Hormon Dihydrotestosteron ergab die erwartete Dosis-Wirkungs-Beziehung über einen mehrere Größenordnungen umfassenden Dosisbereich. Halblogarithmische Auftragung und logistischer Fit zeigen den für rezeptorvermittelte Prozesse typischen sigmoidalen Kurvenverlauf vom subphysiologischen Bereich (10 pM) bis zum Sättigungsbereich des Rezeptors (1 µM) (Abbildung 144). Der EC_{50}-Wert, bei dem die rezeptorvermittelte Induktion des Reportergens halbmaximal ist und dem Wendepunkt der Kurve entspricht, liegt mit 4,3 nM etwa eine halbe Größenordnung unterhalb der physiologischen DHT-Konzentration. Der Übergang vom unteren zum oberen Plateau ist im Vergleich zu den etablierten transgenen Transaktivierungsassays in Säugerzellen steiler. Dadurch ist der Hefe-Assay vergleichsweise präziser.

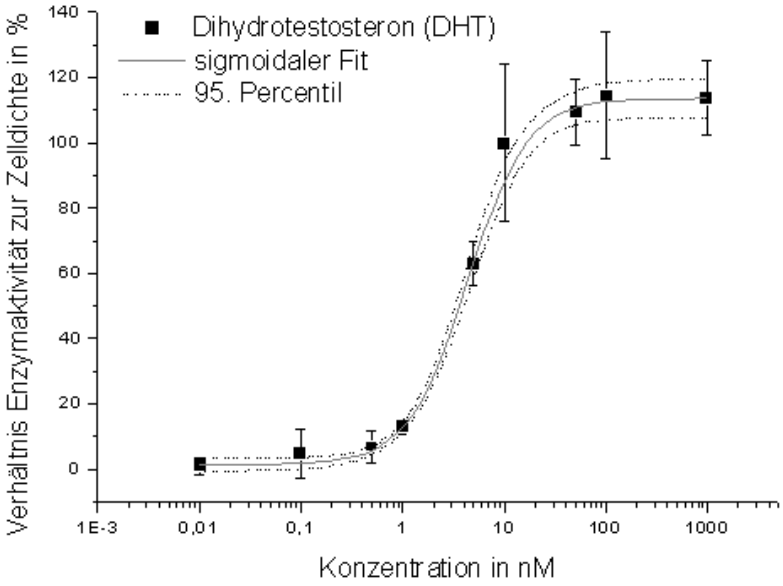


Abbildung 144: Validierung des transgenen Hefe-Assays mit hAR mit dem physiologischen Agonisten Dihydrotestosteron (DHT)

Die weiterführende Validierung des transgenen Hefe-Assays erfolgte durch Kompetitionsexperimente mit etablierten Antagonisten. Die zu hemmende DHT-Konzentration wurde anhand des Kurvenverlaufs dicht unterhalb vom Sättigungsbereich des Rezeptors gewählt. Eingesetzt wurde jeweils die physiologische DHT-Konzentration von 10 nM. Sie stellt bei allen Messungen den Bezugspunkt von 100 % dar. Alle Messreihen sind mit Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Messpunkte angegeben.

Die Signifikanzschwelle im Hefe-Assay mit hAR gibt für agonistische Aktivität das 95. Percentil des unteren Plateaus A1 mit 7 %, für antagonistische Aktivität das untere

95. Percentil der verwendeten Hemmkonzentration von 10 nM DHT mit 83 % der durch 10 nM DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität an.

In Antagonisierungsexperimenten mit Hydroxyflutamid wurde eine potente Hemmung der durch DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität gemessen. 50 µM Hydroxyflutamid hemmten die durch 10 nM DHT induzierte β-Galactosidase-Aktivität um 85 %. Die 50%ige Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität wurde nach logistischem Fit mit 3,1 µM bestimmt (Abbildung 145). Die Sensitivität des Assays gegenüber dem potenten Androgenrezeptorantagonisten erwies sich somit als vergleichbar mit etablierten Transaktivierungsassays in COS-7- und T-47D-Zellen.

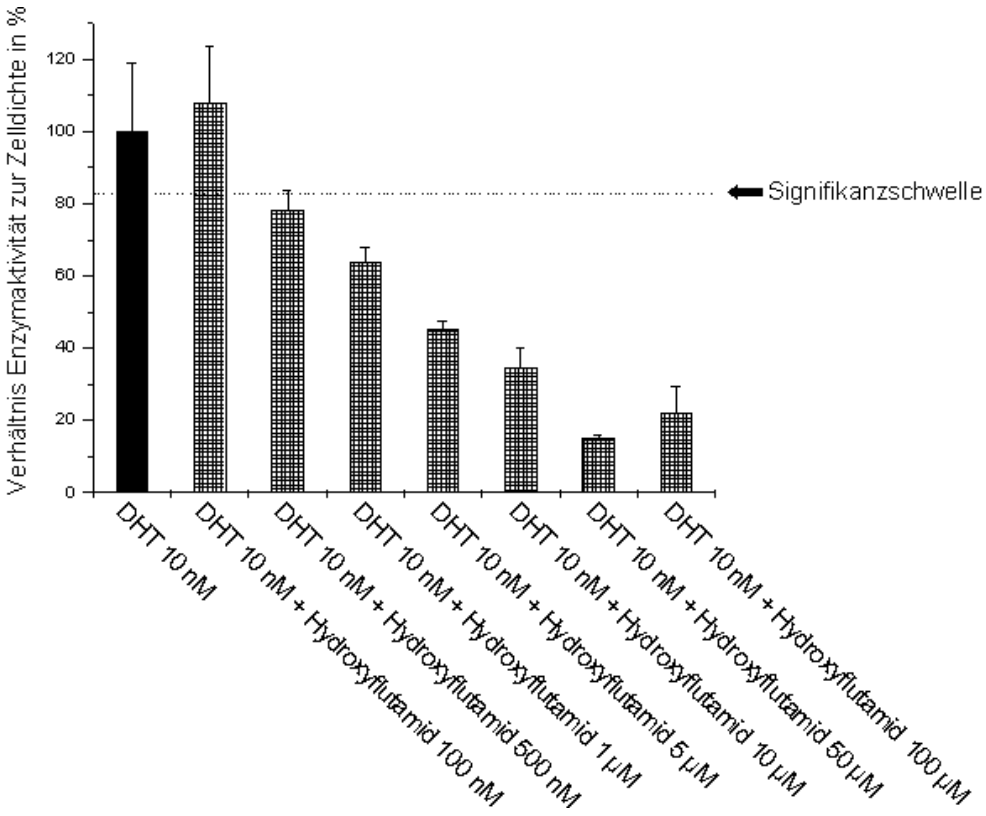


Abbildung 145: Validierung des transgenen Hefe-Assays mit hAR: Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität durch Hydroxyflutamid

Im Folgenden sollte Vinclozolin als bekanntes Antiandrogen im Hefe-Assay untersucht werden. Für Vinclozolin und seine potenteren Metaboliten 2-[[(3,5-Dichlorphenyl)-carbamoyl]oxy]-2-methyl-3-butylsäure (M1) und 3`,5`-Dichlor-2-hydroxy-2-methylbut-3-enanilid (M2) sind antiandrogenes Potential sowie die Beeinflussung der sexuellen Entwicklung männlicher Ratten durch Inhibierung AR-vermittelter Genaktivierung beschrieben. (Kelce and Wilson, 1997)

Selbst für die Muttersubstanz Vinclozolin wurde im Hefe-Assay antiandrogene Aktivität von vergleichbarer Potenz wie für Hydroxyflutamid nachgewiesen. Die durch 10 nM DHT induzierte β-Galactosidase-Aktivität konnte durch 50 µM Vinclozolin um 84 % gehemmt und nach logistischem Fit ein IC_{50}-Wert von etwa 6,4 µM ermittelt werden (Abbildung 146).

In Abwesenheit von DHT berichten Kelce und Wilson bei hoher M2-Konzentration zusätzlich von agonistischer Aktivität am AR. In dem Zusammenhang sollte auch die Ausgangsverbindung Vinclozolin auf mögliches agonistisches Potential untersucht werden. Für Vinclozolin jedoch wurde im transgenen Hefe-Assay mit hAR keine androgene Aktivität festgestellt (ohne Graphische Darstellung). (Kelce and Wilson, 1997)

Die Untersuchung der Vinclozolin-Metabolite M1 und M2 steht im transgenen Hefe-Assay mit hAR noch aus.

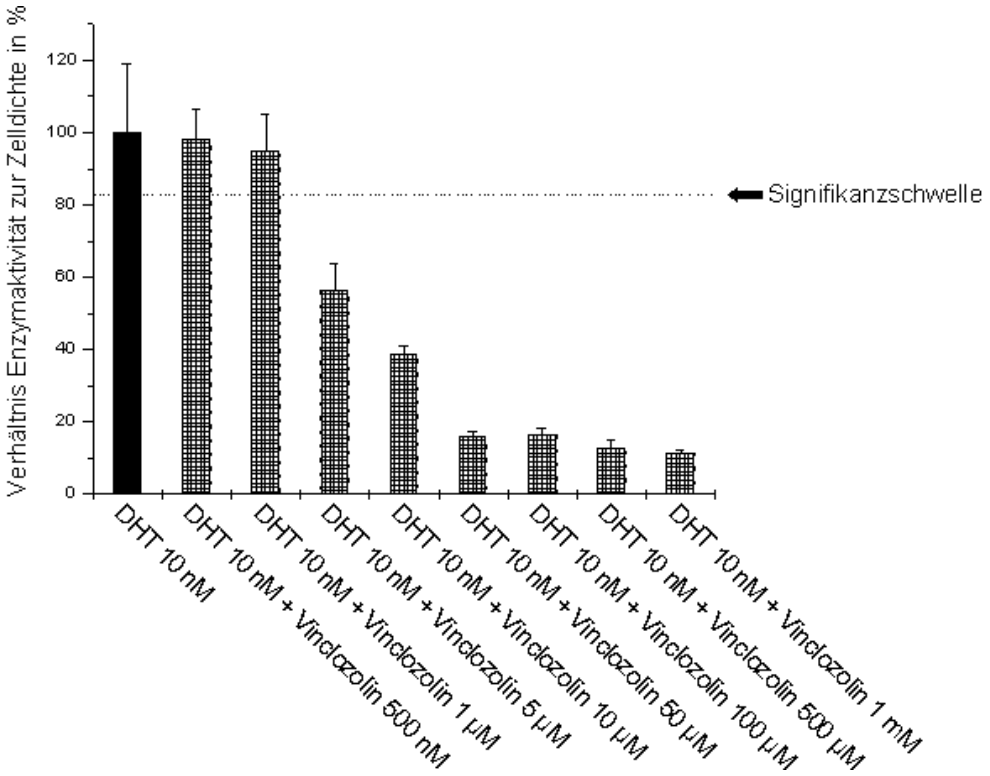


Abbildung 146: Validierung des transgenen Hefe-Assays mit hAR: Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität durch Vinclozolin

Für den beschriebenen Androgenrezeptorantagonisten Linuron wurde im transgenen Hefe-Assay nach logistischem Fit ein IC_{50}-Wert von 8,3 µM ermittelt. Die durch 10 nM DHT induzierte β-Galactosidase-Aktivität wurde durch 50 µM Linuron um etwa 90 % gehemmt (Abbildung 147).

Die abschließende Validierung des Hefe-Assays mit hAR erfolgte mit p,p`-DDE. Die durch 10 nM DHT induzierte β-Galactosidase-Aktivität wurde durch p,p`-DDE konzentrationsabhängig gehemmt. Für p,p`-DDE konnte nach logistischem Fit ein IC_{50}-Wert von 1,2 µM festgstellt werden (Abbildung 148).

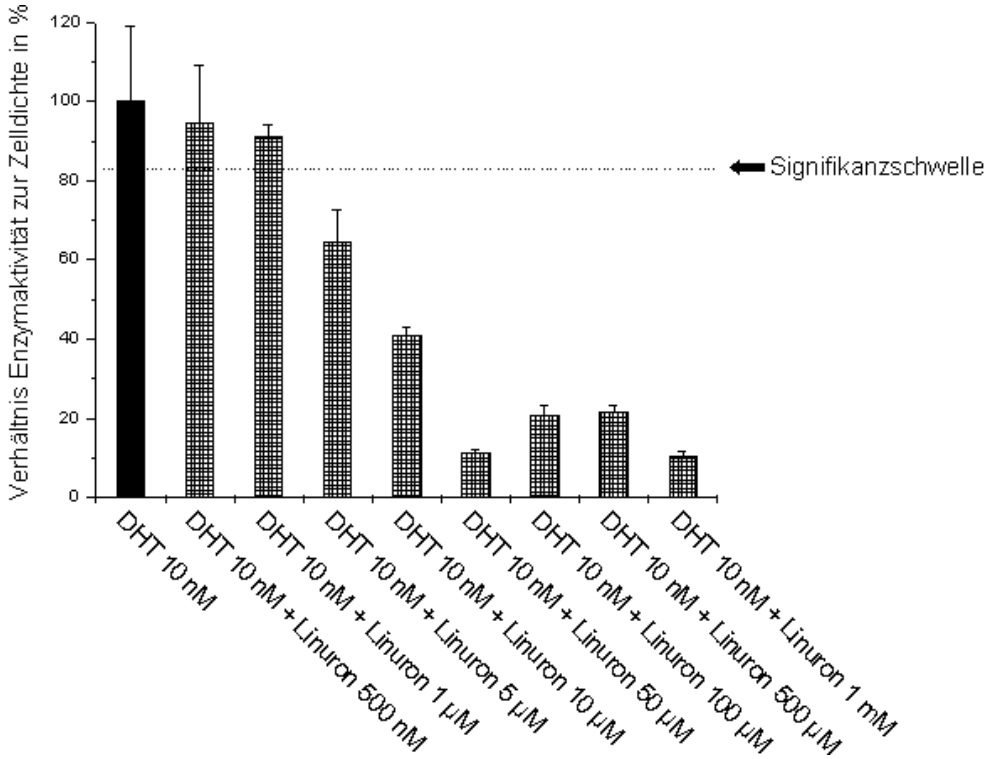


Abbildung 147: Validierung des transgenen Hefe-Assays mit hAR: Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität durch Linuron

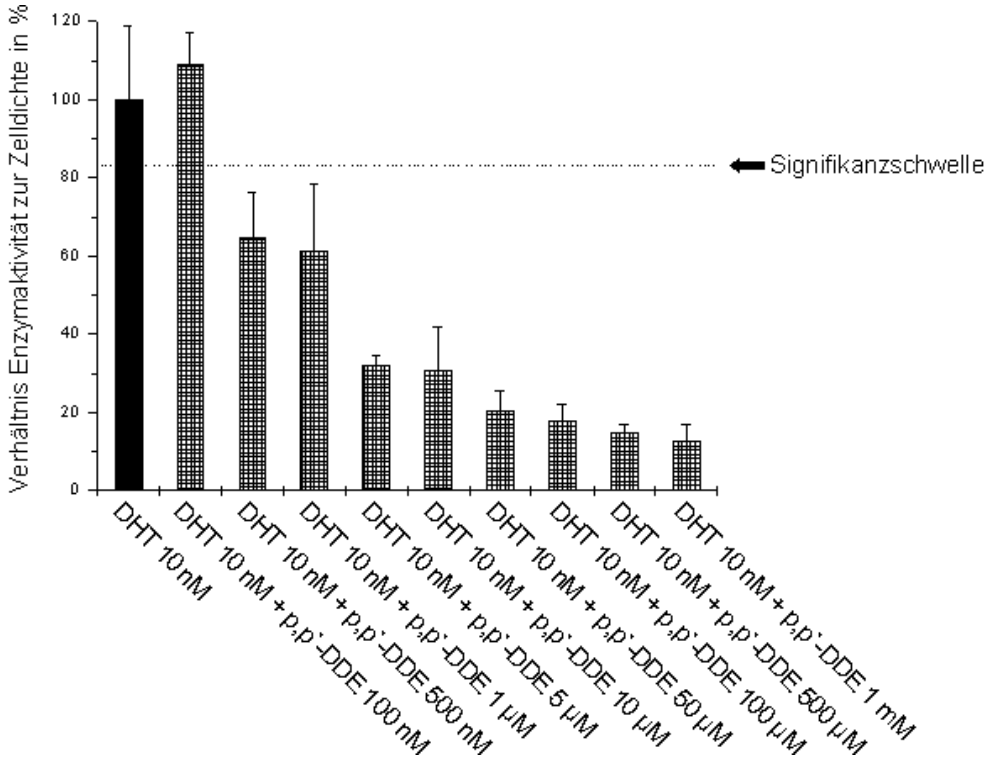


Abbildung 148: Validierung des transgenen Hefe-Assays mit hAR: Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität durch p,p`-DDE

Im Hefe-Assay mit hAR erwiesen sich p,p`-DDE und Hydroxyflutamid mit IC_{50}-Werten von 1,2 µM und 3,1 µM als potenteste Antiandrogene. Für Vinclozolin wurde die 50 %ige Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität mit 6,4 µM, für Linuron mit 8,3 µM bestimmt.

Der transgene Reportergenassay in Hefen mit hAR konnte anhand des physiologischen Hormons DHT und der vier etablierten Antiandrogene Hydroxyflutamid, Vinclozolin, Linuron und p,p`-DDE erfolgreich validiert werden. Das Testsystem kann als etabliert angesehen werden und steht für Untersuchungen potentieller Androgene/Antiandrogene zur Verfügung.

4.5.2 Untersuchungen ausgewählter Verbindungen auf androgenes/antiandrogenes Potential im Hefe-Assay mit hAR

Im Folgenden sollten die Benzophenon-Analoga Oxybenzon und Dichlorbenzophenon im transgenen Hefe-Assay auf antiandrogene Aktivität untersucht werden.

Für 11 µM Oxybenzon konnte eine 50%ige Hemmung der durch 10 nM DHT induzierten β-Galactosidase-Aktivität festgestellt werden. Die Hemmkurve zeigte

einen steilen Verlauf und ermöglicht dadurch eine präzise Aussage. Durch 50 µM Oxybenzon wurde die durch 10 nM DHT induzierte β-Galactosidase-Aktivität um 94 %, durch 100 µM vollständig gehemmt (Abbildung 149).

Ab einer Konzentration von 50 µM p,p`-Dichlorbenzophenon wurde im transgenen Hefe-Assay mit hAR eine Antagonisierung der durch 10 nM DHT induzierte β-Galactosidase-Aktivität um etwa 73 % festgestellt. Der $IC_{50}$-Wert wurde nach logistischem Fit für p,p`-Dichlorbenzophenon mit 4,9 µM ermittelt (Abbildung 150).

Die relative Potenz (Verschiebung des IC_{50}-Wertes) konnte für p,p`-Dichlorbenzophenon in einem niedrigeren Dosisbereich ermittelt werden als für Oxybenzon. Dagegen wurde für Oxybenzon eine deutlich höhere relative Effizienz (maximale Hemmwirkung) beobachtet als für p,p`-Dichlorbenzophenon.

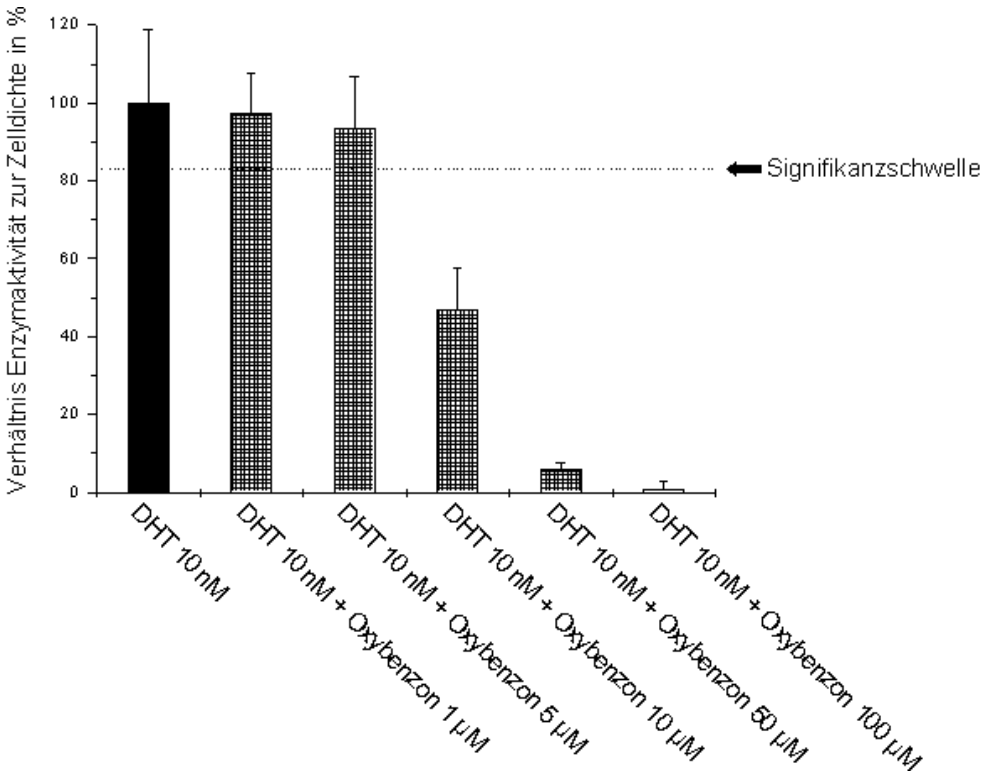


Abbildung 149: Antiandrogene Aktivität von Oxybenzon im transgenen Hefe-Assay mit hAR

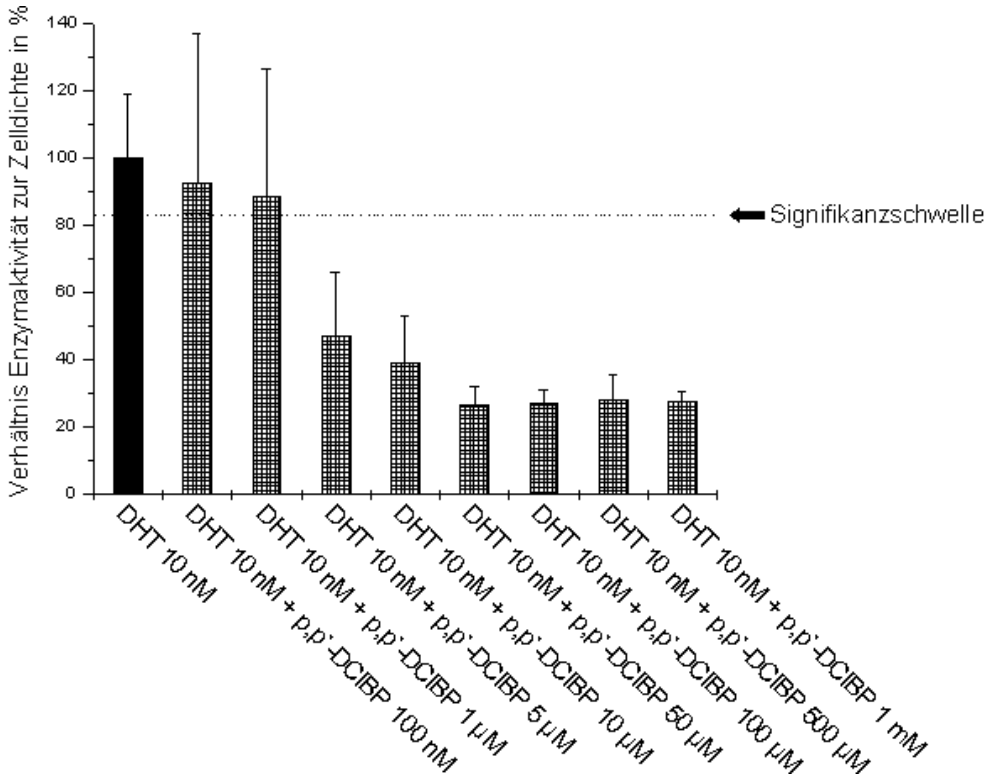


Abbildung 150: Antiandrogene Aktivität von p,p`-Dichlorbenzophenon (p,p`-DClBP) im transgenen Hefe-Assay mit hAR

4.5.3 Etablierung und Validierung des Hefe-Assays mit humanem ER

Detektion estrogener/antiestrogener Aktivität erfolgte in einem Subklon mit stabil transfiziertem hERα Expressionsplasmid und einem Reportergenplasmid mit estrogenresponsivem Promotorelement und einem für β-Galactosidase kodierenden *lacZ*-Gen.

Bei konstitutiver Expression des hERα wird die Bildung von β-Galactosidase durch die Inkubationsansätze rezeptorvermittelt aktiviert oder blockiert.

Nach Inkubation mit dem physiologischen Hormon 17β-Estradiol (E_2) zeigte sich die erwartete Dosis-Wirkungs-Beziehung über einen mehrere Größenordnungen umfassenden Konzentrationsbereich. Bei halblogarithmischer Auftragung und logistischem Fit ergibt sich der für rezeptorvermittelte Prozesse typische sigmoidale Kurvenverlauf vom subphysiologischen Bereich (5 pM) bis zum Sättigungsbereich des Rezeptors (100 nM) (Abbildung 151). Der Wendepunkt der Kurve liegt mit 0,5 nM

etwa eine halbe Größenordnung unterhalb der physiologischen 17β-Estradiol-Konzentration.

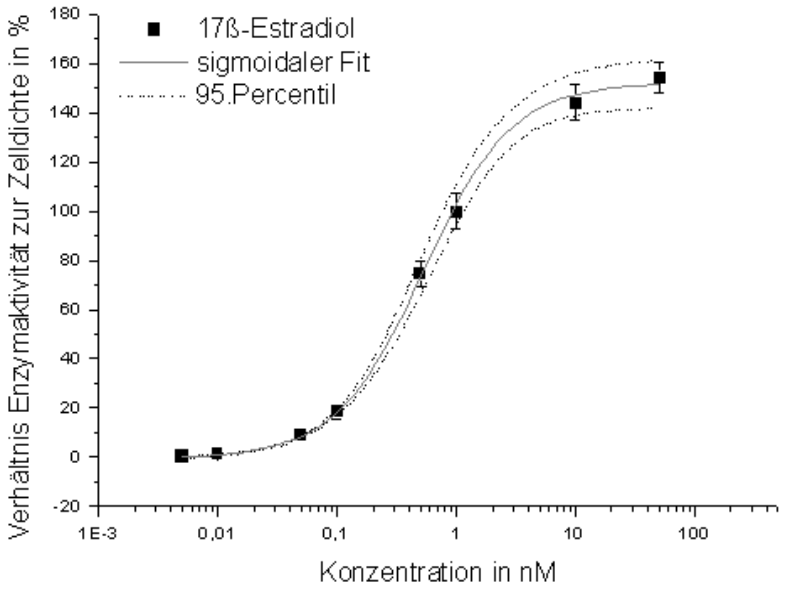


Abbildung 151: Validierung des Hefe-Assays mit hER mit dem physiologischen Agonisten 17β-Estradiol (E_2)

Weitere Validierungsexperimente des transgenen Hefe-Assays erfolgten durch Kompetition der durch 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität mit etablierten Antagonisten. Die zu hemmende 17β-Estradiol-Konzentration wurde anhand des Kurvenverlaufs gewählt. Eingesetzt wurde jeweils die physiologische 17β-Estradiol-Konzentration von 1 nM. Sie stellt bei allen Messungen den Bezugspunkt von 100 % dar. Mittelwert und Standardabweichung einzelner Messpunkte sind für alle Messreihen angegeben.

Die Signifikanzschwelle für agonistische Aktivität gibt im Hefe-Assay mit hER das 95. Percentil des unteren Plateaus A1 mit 10 % der durch 1 nM 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität an. Die Signifikanzschwelle für antagonistische Aktivität gibt das untere 95. Percentil der verwendeten Hemmkonzentration von 1 nM 17β-Estradiol mit 95 % der durch 1 nM 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität an.

Raun Andersen et al. berichteten, dass eine Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten in estrogensensitiven Hefe-Assays nicht immer möglich ist. Für den reinen Antagonisten ICI 182 780 und den partiellen Antagonisten Tamoxifen sind im Hefe-Assay erhöhte Induktion der β-Galactosidase-Aktivität beschrieben. Dudley et al. beschreiben für Tamoxifen und ICI 182 780 die Fähigkeit zur ER-Dimerisation

und ER-abhängigen Transkription. Tamoxifen scheint über die HBD zu agieren, während für ICI 182 780 Rezeptoraktivierung über eine allosterische Bindungsstelle angenommen wird. Sie kommen nach Untersuchungen an drei Expressionssystemen in Hefen zu dem Schluss, dass antiestrogene Aktivität nicht ausschließlich durch kompetitive Antagonisierung der Estradiolbindung an der HBD zustande kommt, sondern möglicherweise auch durch Induktion ER-abhängiger Transkription reguliert wird, die sich in Säugerzellen infolge einer Feed-back-Reaktion durch Herunterregulierung des Rezeptors äußert. In Säugerzellen wird die Aktivierung eines endogenen Metabolismus von Rezeptoren angenommen, der in Hefen nicht vorhanden ist. (Dudley et al., 2000; Raun Andersen et al., 1999)
Es ist durchaus möglich, dass säugerspezifische Mechanismen für antiestrogene Effekte verantwortlich sind. Diese können sich in Unterschieden bei der Rezeptorbindung durch differierende cytoplasmatische Komponenten, anderen Cytoplasma-Kern-Transportsystemen und Zelllinien-spezifischen Variationen äußern. (Dudley et al., 2000; Nishikawa et al., 1999)

Als Erstes sollte das in Säugerzellen potente Antiestrogen ICI 182 780 im vorliegenden estrogensensitiven Hefe-Assay untersucht werden. Durch ICI 182 780 (1 µM) wurde eine maximal 10%ige Hemmung der durch 1 nM 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität festgestellt (Abbildung 152).

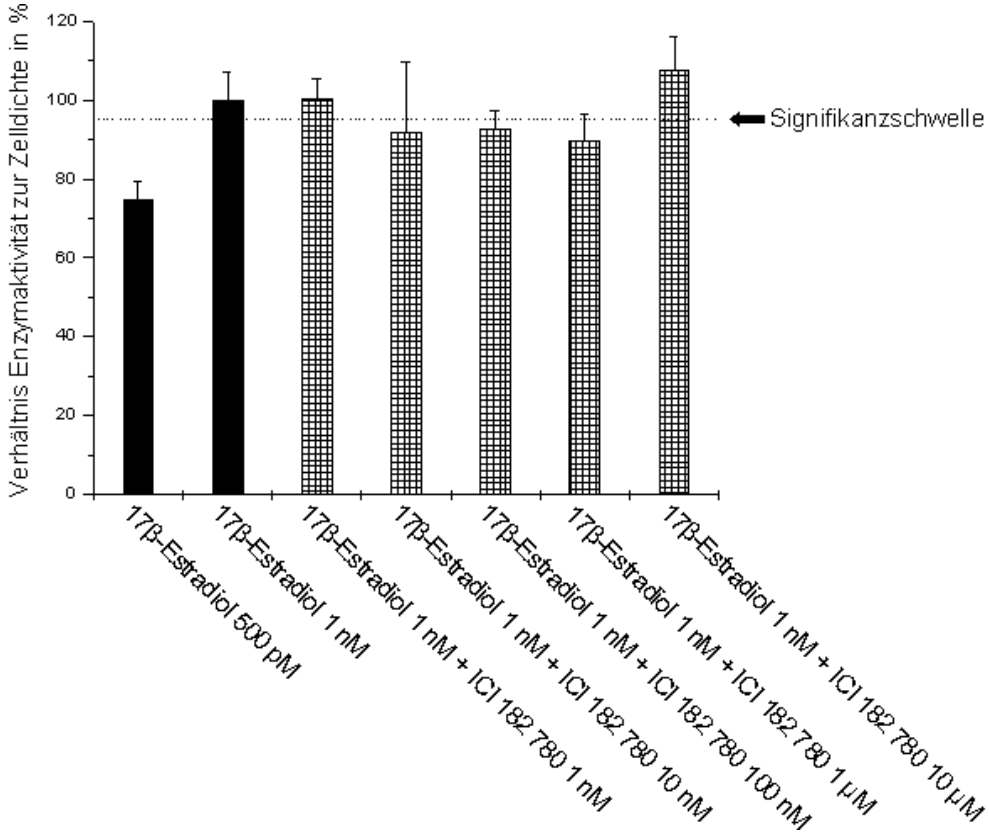


Abbildung 152: Validierung des transgenen Hefe-Assays mit hER: Hemmung der durch 1 nM 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität durch ICI 182 780

Der Hintergrund für agonistisches/antagonistisches Verhalten des nichtsteroidalen Antiestrogens Tamoxifen ist noch nicht vollständig verstanden. In Abhängigkeit vom Zelltyp reicht sein Wirkpotential von dem eines vollständigen Agonisten bis zu dem eines Antagonisten. Beispielsweise antagonisiert Tamoxifen die Wirkung von Estradiol auf Brustdrüsen, zeigt aber agonistische Aktivität im Endometrium. Im Vergleich zu ICI 182 780 ist für Tamoxifen eine signifikant effizientere Destabilisierung von Rezeptordimeren bzw. Prävention der Dimerisierung beschrieben. (Graumann and Jungbauer, 2000; Wakeling, 1995; Wang et al., 1995)
Im verwendeten Hefe-Assay wurde im Gegensatz zum ICI 182 780 mit Tamoxifen eine Hemmung der durch 1 nM 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität erreicht und ein IC_{50}-Wert von etwa 1 µM bestimmt (Abbildung 153). Coinkubation ab 10 µM Tamoxifen bewirkte bereits starke Cytotoxizität.

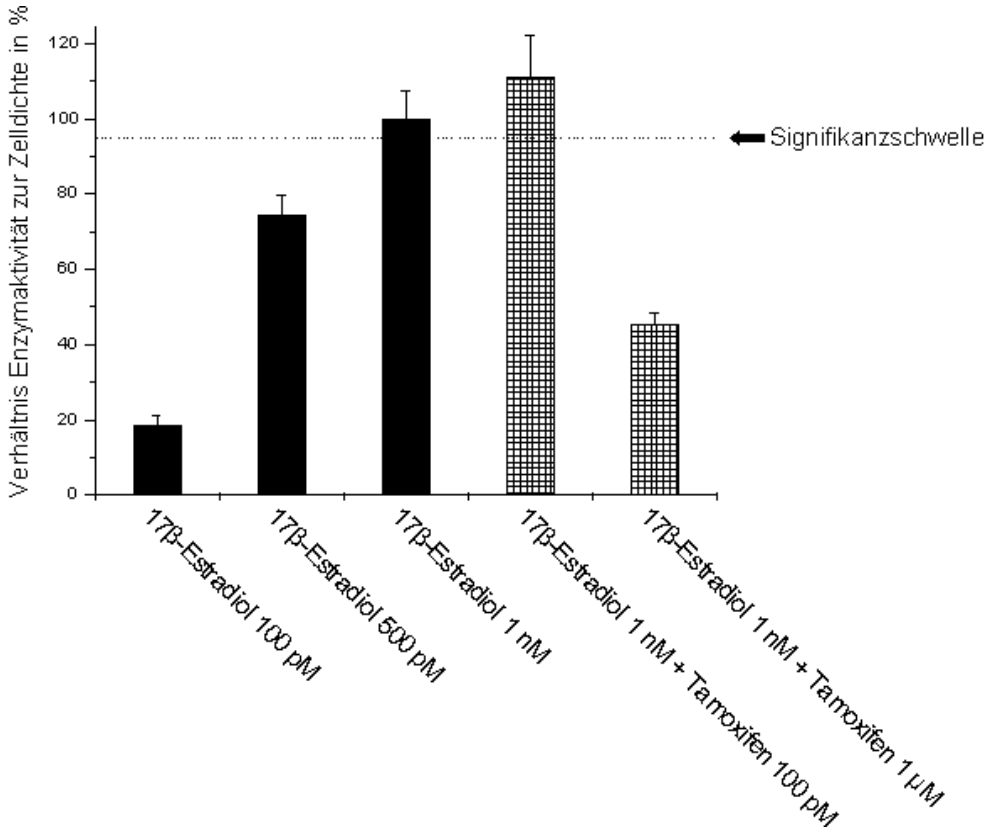


Abbildung 153: Validierung des transgenen Hefe-Assays mit hER: Hemmung der durch 1 nM 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität durch Tamoxifen

Auf agonistische Aktivität wurden ICI 182 780 und Tamoxifen in diesem Zusammenhang nicht getestet.

Ergebnisse vorliegender Untersuchungen stimmen weitestgehend mit Studien aus der Literatur überein, sodass das vorliegende Testsystem als etabliert betrachtet werden kann. Für die Bewertung der Ergebnisse sollte beachtet werden, dass Unterscheidungen zwischen Agonisten und Antagonisten aufgrund von Hefe-Assays nicht immer möglich ist.

4.5.4 Untersuchungen ausgewählter Verbindungen auf estrogenes/antiestrogenes Potential im Hefe-Assay mit hER

Im Folgenden sollten einige ausgewählte Verbindungen auf potentielle agonistische/antagonistische Aktivität untersucht werden.

Für das Phytoalexin Resveratrol wurde im transgenen Hefe-Assay mit hER signifikant agonistische Aktivität ab 100 µM detektiert. 500 µM Resveratrol induzierten die β-Galactosidase-Aktivität vergleichbar mit dem oberen Plateau der 17β-Estradiol-Induktion, dem Sättigungsbereich des Rezeptors (Abbildung 154).

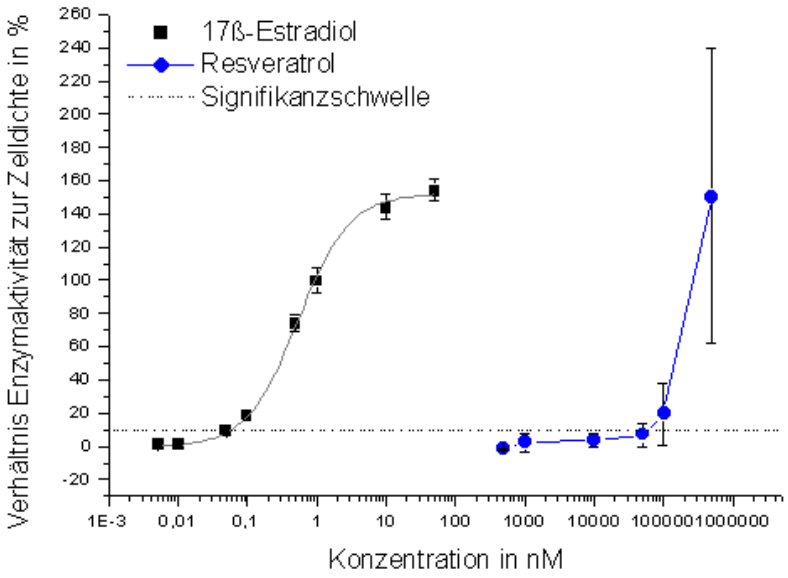


Abbildung 154: Estrogene Aktivität von Resveratrol im transgenen Hefe-Assay mit hER

Für Resveratrol in Coinkubation mit der physiologischen Konzentration an 17β-Estradiol von 1 nM wurde im Hefe-Assay keine Hemmung der induzierten β-Galactosidase-Aktivität nachgewiesen. In Analogie zu Ergebnissen im MCF-7-Luc-Reportergenassay von Höll und im pS2 Assay (Kapitel 4.1.2.2) ist ein leicht V-förmiger Kurvenverlauf zu erkennen. Die geringste Reportergeninduktion wurde im transgenen Hefe-Assay bei Coinkubation von 1 nM 17β-Estradiol mit 10 µM Resveratrol festgestellt. Der ermittelte Kurvenverlauf könnte ein Hinweis für partiell agonistische/antagonistische Aktivität von Resveratrol sein. 100 µM Resveratrol in Coinkubation mit 1 nM 17β-Estradiol erhöhten die β-Galactosidase-Aktivität zusätzlich signifikant um 28 %, während Coinkubationen von 500 µM Resveratrol mit 1 nM 17β-Estradiol die β-Galactosidase-Aktivität um 92 % steigerte (Abbildung 155). (Höll, 2000)

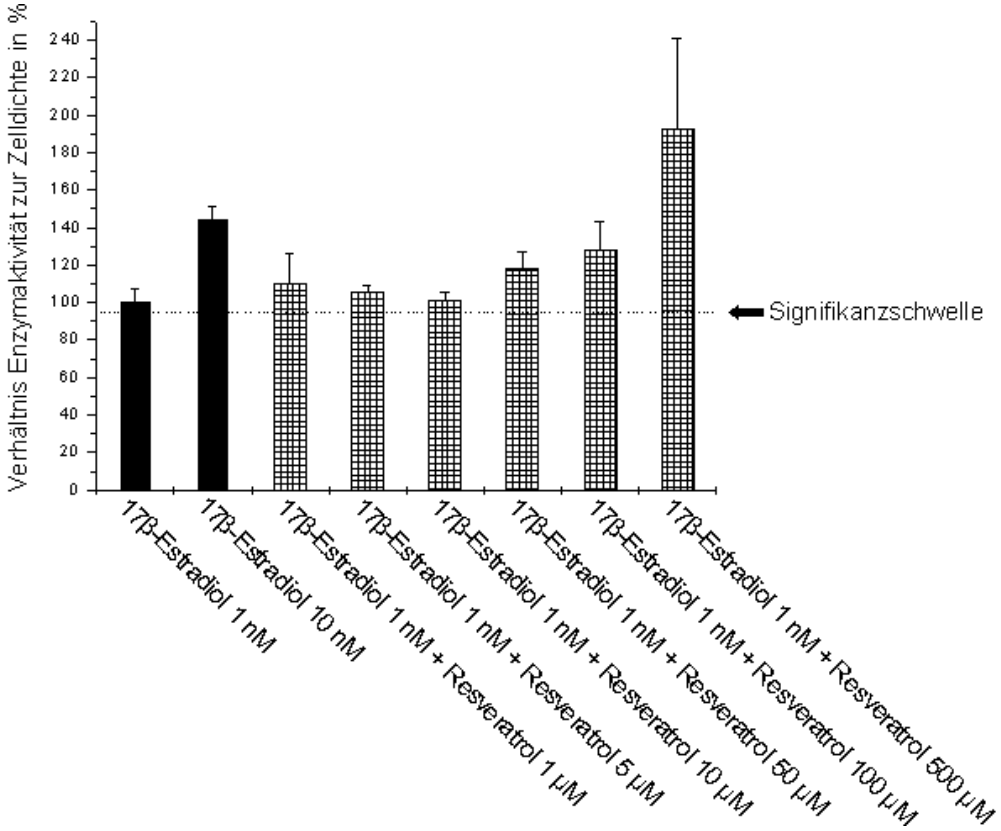


Abbildung 155: Untersuchungen potentieller antiestrogener Aktivität von Resveratrol im transgenen Hefe-Assay mit hER

Für Daidzein wurde im transgenen Hefe-Assay mit hER kein signifikant agonistisches Potential ermittelt (

Abbildung 156).

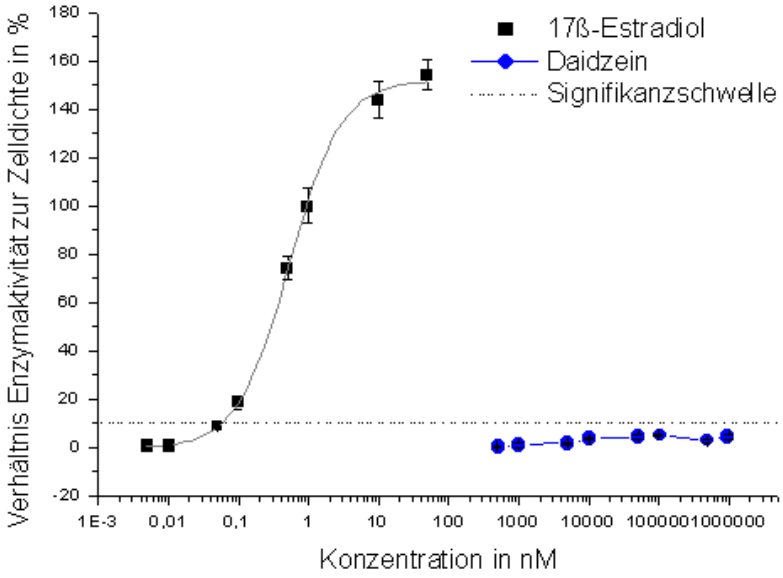


Abbildung 156: Estrogene Aktivität von Daidzein im transgenen Hefe-Assay mit hER

Coinkubationen von 1 und 10 nM Daidzein hemmten die durch 1 nM 17β-Estradiol induzierte β-Galactosidase-Aktivität um etwa 30 %. Höhere Konzentrationen an Daidzein hatten dagegen keinen Effekt auf die Aktivität der β-Galactosidase (Abbildung 157). Dieses Ergebnis im transgenen Hefe-Assay mit hER kann als Hinweis für ein mögliches antiestrogenes Potential von Daidzein bei niedrigen Konzentrationen betrachtet werden.

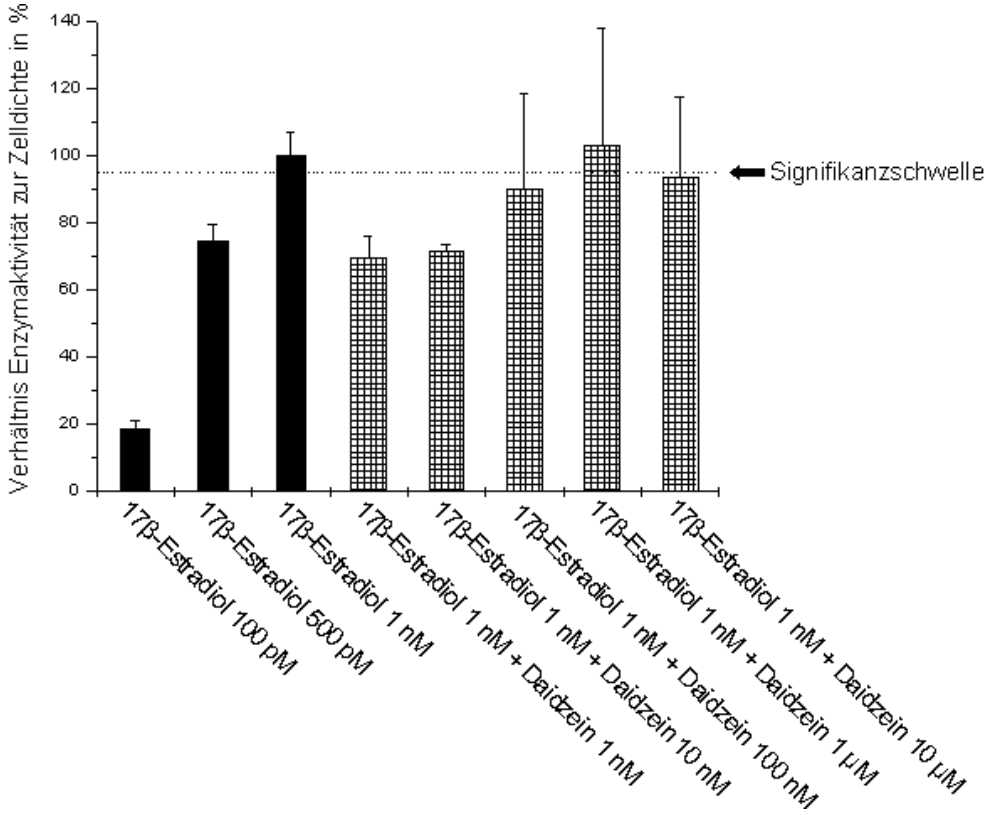


Abbildung 157: Untersuchungen potentieller antiestrogener Aktivität von Daidzein im transgenen Hefe-Assay mit hER

Des Weiteren sollte die agonistische Aktivität der beschriebenen Xenoestrogene Bisphenol A, Octylphenol, Nonylphenol, Oxybenzon und o,p`-DDT im transgenen Hefe-Assay mit hER untersucht werden.

10 µM Bisphenol A induzierten die β-Galactosidase-Aktivität im transgenen Hefe-Assay bis auf das Niveau der maximalen β-Galactosidase-Induktion durch 17β-Estradiol, während 100 µM Bisphenol A die doppelte β-Galactosidase-Aktivität bewirkten (Abbildung 158). Unter Nichtberücksichtigung des letzten Wertes konnte nach logistischem Fit für Bisphenol A ein EC_{50}-Wert von etwa 6 nM berechnet werden. Die großen Standardabweichungen ab 10 µM Bisphenol A können möglicherweise auf die Fähigkeit der Verbindung zur Diffusion durch den Kunststoff der Titerplatten zurückgeführt werden.

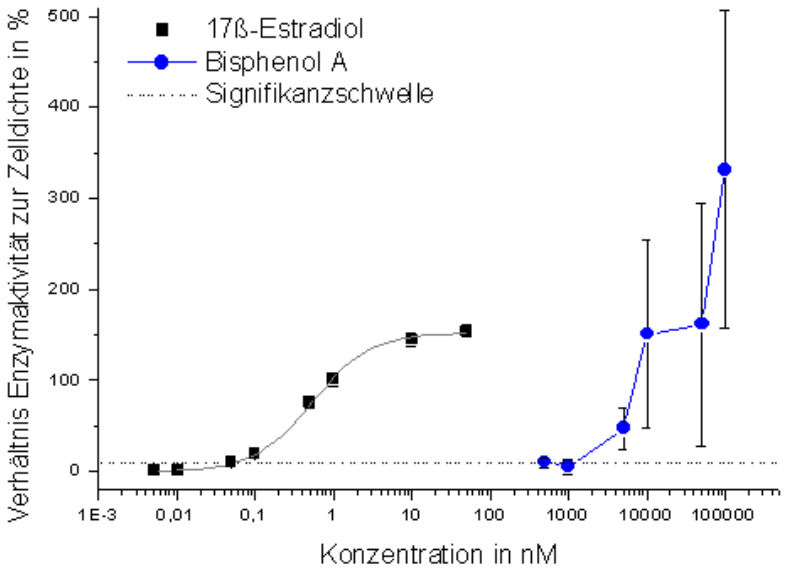


Abbildung 158: Estrogene Aktivität von Bisphenol A im transgenen Hefe-Assay mit hER

Nach logistischem Fit der durch Octylphenol induzierten β-Galactosidase-Aktivität wurde ein EC_{50}-Wert von 1,8 µM ermittelt. Der Sättigungsbereich der durch 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität wurde ab einer Konzentration von 10 µM Octylphenol erreicht (Abbildung 159).

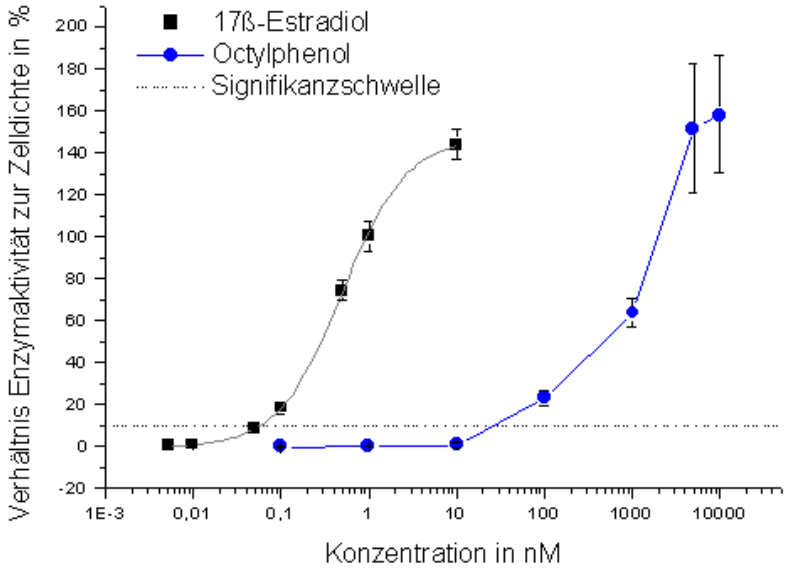


Abbildung 159: Estrogene Aktivität von Octylphenol im transgenen Hefe-Assay mit hER

Für Nonylphenol wurde nach logistischem Fit der induzierten β-Galactosidase-Aktivität ein EC_{50}-Wert von etwa 1 µM festgestellt. Die relative Effizienz der maximalen β-Galactosidase-Induktion entsprach der Induktion durch 1 nM 17β-Estradiol (Abbildung 160).

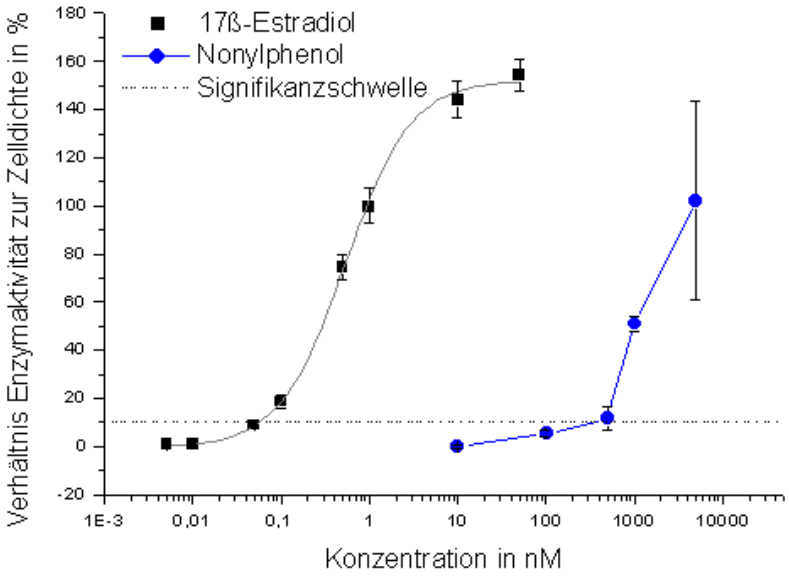


Abbildung 160: Estrogene Aktivität von Nonylphenol im transgenen Hefe-Assay mit hER

1 mM Oxybenzon induziert im transgenen Hefe-Assay mit hER die β-Galactosidase-Aktivität 50 % über das Niveau der maximalen Induktion durch 17β-Estradiol (Abbildung 161). Für Oxybenzon konnte nach logistischem Fit ein EC_{50}-Wert von 230 µM bestimmt werden.

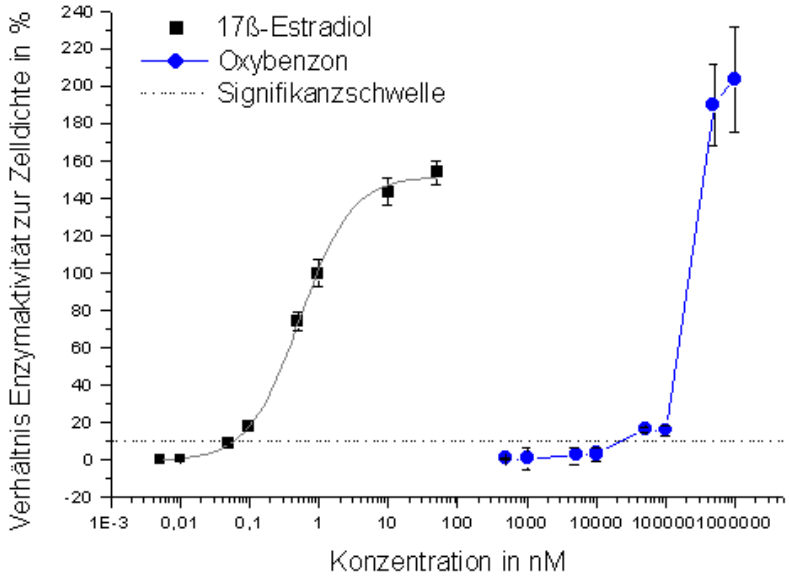


Abbildung 161: Estrogene Aktivität von Oxybenzon im transgenen Hefe-Assay mit hER

Die durch o,p`-DDT induzierte β-Galactosidase-Aktivität ergab keinen typisch sigmoidalen Kurvenverlauf. Trotzdem konnte nach logistischem Fit ein $EC_{50}$-Wert von etwa 2,8 µM ermittelt werden. Signifikant agonistische Aktivität von o,p`-DDT wurde ab 5 µM festgestellt. Die maximale durch o,p`-DDT induzierte β-

Galactosidase-Aktivität entsprach 57 % der durch 1 nM 17β-Estradiol induzierten Aktivität (Abbildung 162).

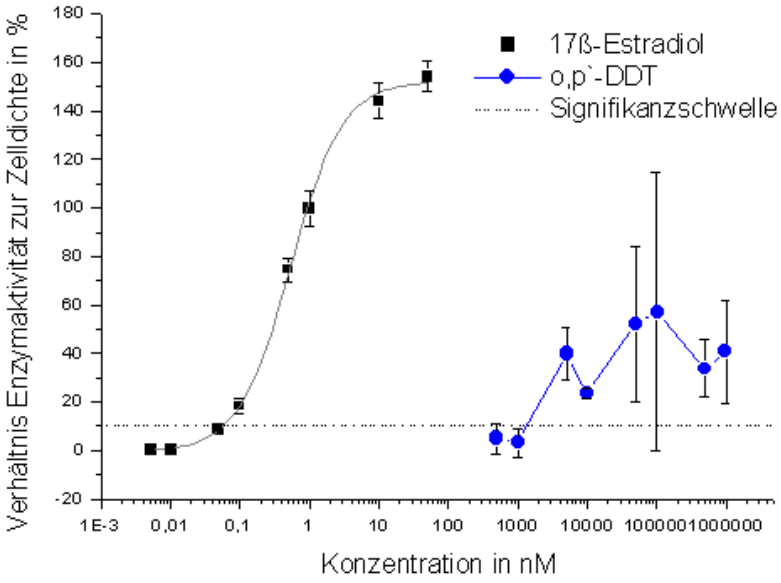


Abbildung 162: Estrogene Aktivität von o,p`-DDT im transgenen Hefe-Assay mit hER

4.5.5 Zusammenfassung: transgene Hefe-Assays

In der vorliegenden Arbeit gelangen Etablierung und Validierung von estrogen- und androgensensitiven Hefe-Assays.

Transgene Expressionssysteme in Hefen bieten den Vorteil eines schnellen, kostengünstigen Screenings und eines robusten Systems mit hoher Unempfindlichkeit gegenüber Inkubationssubstanzen. Demgegenüber wird von Dudley et al. die Fähigkeit zur Penetration der Hefezellwand für einige Verbindungen im Vergleich zu Säugerzellen als geringer diskutiert. Unterschiede in der relativen Potenz von Testsubstanzen zwischen Hefe-Systemen und Assays in Säugerzellen könnten darin begründet sein. (Dudley et al., 2000)

Der Mechanismus der Transkriptionsaktivierung unterscheidet sich in verschiedenen Spezies. Da das endokrine System für Hefen nicht notwendig ist, besitzen sie keine Steroidhormonrezeptoren. Die verwendeten Hefesysteme in *Saccharomyces cerevisiae* enthalten neben Expressionsplasmiden mit hER bzw. hAR Reportergenplasmide mit hormonresponsiven Promotorelementen und dem β-Galactosidase kodierenden *lacZ*-Gen. Während das androgensensitive Promotorelement AREs des nativen MMTV-Promotors enthält, besteht das estrogensensitive aus zwei Tandem-Consensus-EREs. Coaktivatoren, die Signale

vom Rezeptor zum basalen Transkriptionsmechanismus vermitteln, können in Hefen und Wirbeltieren erheblich differieren. Die Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten anhand von Hefe-Assays ist somit nicht immer möglich. Die Verwendung transgener Hefe-Systeme erlaubt lediglich einen Eindruck von Ligand-Rezeptor-Interaktionen ohne die Einflussnahme säugerspezifischer Komponenten.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der untersuchten Verbindungen zusammengefasst diskutiert werden.

Im androgensensitiven Hefe-Assay mit hAR liegt der Wendepunkt der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve von DHT mit 4,3 nM etwas unterhalb des physiologischen Bereichs. Der Wendepunkt der von Guth etablierten androgensensitiven Reortergensysteme in Säugerzellen wurde mit 0,71 nM für den endogenen PSA-Assay in T-47D-Zellen, mit 1,2 nM für den stabilen Transaktivierungsassay in T-47D-Luc-Zellen und mit 10 nM für den transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen ermittelt. Im Vergleich zu den etablierten Assays in Säugerzellen konnten im deutlich robusteren transgenen Hefe-Assay zwei Größenordnungen höhere Substanz-Konzentrationen eingesetzt werden, bevor toxische Effekte zum Tragen kamen. Dadurch konnte für die eingesetzten Verbindungen der vollständig sigmoidale Kurvenverlauf und ein IC_{50}-Wert anhand des logistischen Fits ermittelt werden. (Guth, 2000)

Die im transgenen Hefe-Assay mit hAR ermittelte antiandrogene Aktivität der Testsubstanzen lässt sich anhand der IC_{50}-Werte in eine Reihe mit abnehmender Aktivität gliedern (Abbildung 163): p,p`-DDE (1,2 µM) > Hydroxyflutamid (3,1 µM) > p,p`-Dichlorbenzophenon (4,9 µM) > Vinclozolin (6,4 µM) > Linuron (8,3 µM) > Oxybenzon (11 µM).

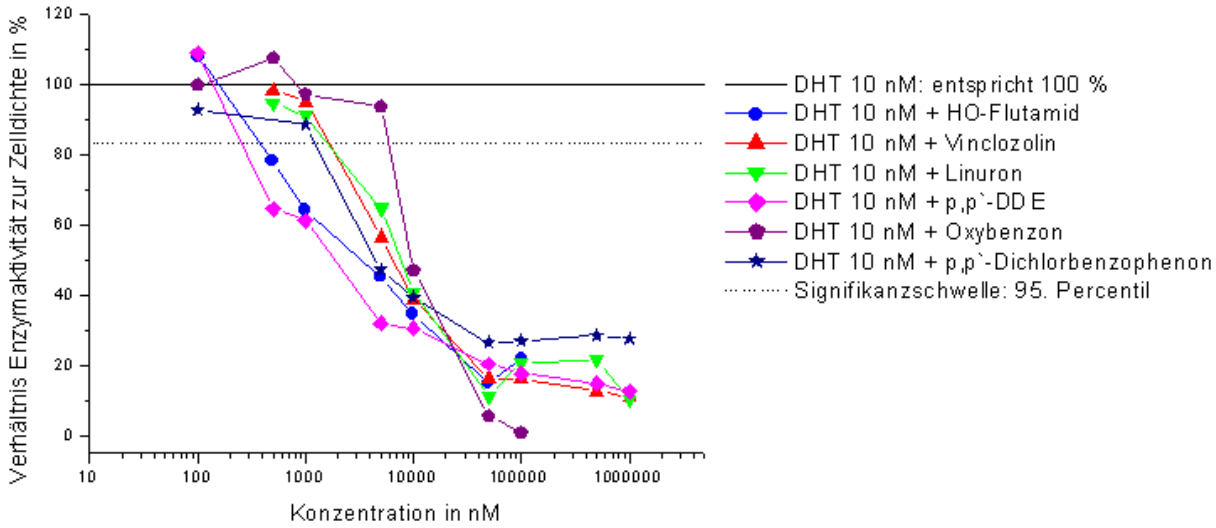


Abbildung 163: Antiandrogene Aktivität im Überblick: transgener Hefe-Assay mit hAR

Verglichen mit den von Guth ermittelten IC_{30}-Werten im stabilen T-47D-Luc-Assay und im transienten Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen sowie den IC_{50}-Werten im endogenen PSA-Assay in T-47D-Zellen weichen die mittels Hefe-Assay eruierten IC_{50}-Werte nicht mehr als um eine halbe Größenordnung von den in Säugerzellen generierten Daten ab. Der transgene Hefe-Assay mit hAR kann somit als geeignete Ergänzung androgensensitiver Reportergenassays in Säugerzellen betrachtet werden. (Guth, 2000)

Im estrogensensitiven Hefe-Assay mit hER liegt der Wendepunkt der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve von 17β-Estradiol mit 0,5 nM eine halbe Größenordnung unterhalb des physiologischen Bereichs. Der Wendepunkt des von Mußler etablierten MCF-7-Luc-Reportergenassays wurde mit 1,2 nM festgestellt. Der Hefe-Assay zeigte sich somit gegenüber dem physiologischen Liganden etwas sensitiver. (Mußler, 1999)

Die im transgenen Hefe-Assay mit hER auf antiestrogene Aktivität untersuchten Verbindungen sind in Abbildung 164 zusammengefasst. Von den getesteten Substanzen konnte ausschließlich für Tamoxifen der IC_{50}-Wert bestimmt werden. Die durch 1 nM 17β-Estradiol induzierte β-Galactosidase-Aktivität wurde durch eine drei Größenordnungen höhere Konzentration Tamoxifen um die Hälfte gehemmt.

Für ICI 182 780 konnte im verwendeten Hefe-Assay keine signifikant antagonistische Aktivität am Estrogenrezeptor nachgewiesen werden. In der Literatur wird ICI 182 780 als Agonist in verschiedenen estrogenresponsiven Hefesystemen beschrieben.

Der antiestrogene Effekt in Säugerzellen wird durch einen endogenen Metabolismus des Rezeptors angenommen, der in Hefen nicht vorhanden ist. (Dudley et al., 2000; Raun Andersen et al., 1999)

Resveratrol zeigt im Hefe-Assay mit hER in Coinkubation mit 1 nM 17β-Estradiol keine antagonistische Aktivität. Es konnte jedoch in Analogie zu Ergebnissen im MCF-7-Luc-Reportergenassay von Höll und im pS2-Assay (Kapitel 4.1.2.2) ein leicht V-förmiger Kurvenverlauf festgestellt werden, der ein Hinweis für partiell agonistische/antagonistische Aktivität von Resveratrol sein könnte. (Höll, 2000)

Für niedrige Konzentrationen von 1 und 10 nM Daidzein wurde im estrogenresponsiven Hefe-Assay eine signifikante Hemmung von etwa 30 % der durch 1 nM 17β-Estradiol induzierten β-Galactosidase-Aktivität festgestellt. Auch Kombinationsexperimente von Daidzein mit äquimolaren Konzentrationen Bisphenol A und p-*tert*-Octylphenol in MCF-7-Luc-Zellen (Kapitel 4.4) lassen antiestrogenes Potential von Daidzein vermuten. Kompetitionsexperimente mit dem physiologischen Liganden 17β-Estradiol stehen in der estrogenresponsiven Säugerzelllinie noch aus.

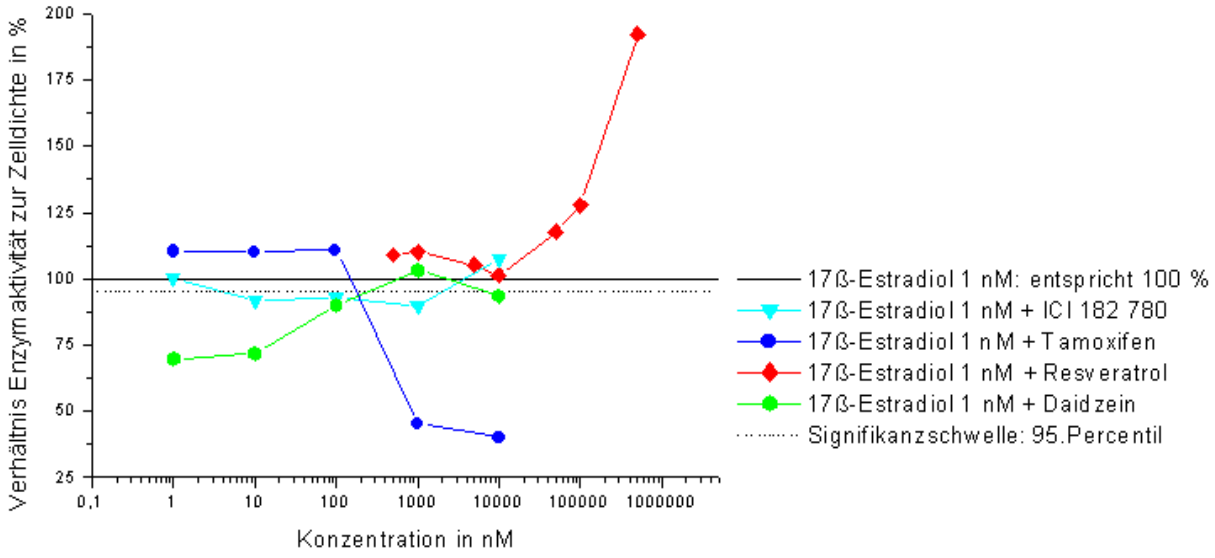


Abbildung 164: Antiestrogene Aktivität im Überblick: transgener Hefe-Assay mit hER

Abschließend soll die im transgenen Hefe-Assay mit hER ermittelte estrogene Aktivität zusammengefasst werden. Zur Auswertung wurde eine Signifikanzschwelle eingeführt. Sie gibt das obere 95. Percentil des unteren Plateaus der logistischen Dosis-Wirkungs-Beziehung von 17β-Estradiol bei 50 pM an. Verbindungen, deren androgene Wirkung die Signifikanzschwelle überschreitet, können als estrogen aktiv bezeichnet werden.

In Abbildung 165 sind die untersuchten Verbindungen nach logistischem Fit anhand der EC_{50}-Werte in einer Reihe mit abnehmender Aktivität angeordnet: Nonylphenol (1 µM) > Octylphenol (1,8 µM) > o,p`-DDT (2,8 µM) > Bisphenol A (6 µM) > Oxybenzon (230 µM) > Resveratrol (250 µM). Für Daidzein konnte im transgenen Hefe-Assay keine estrogene Aktivität festgestellt werden.

Während für Nonylphenol, Octylphenol, Bisphenol A, Oxybenzon und Resveratrol Reportergeninduktionen bis in den Sättigungsbereich des Rezeptors ermittelt werden konnten, wurde für o,p`-DDT eine deutlich geringere relative Effizienz festgestellt.

Verglichen mit Ergebnissen des transgenen Reportergenassays in MCF-7-Luc-Zellen (Kapitel 4.4) und Untersuchungen von Raun Andersen et al. im E-Screen-Assay wurden im estrogensensitiven Hefe-Assay durch die Möglichkeit, höhere Substanz-Konzentrationen zu inkubieren, allgemein höhere relative Effizienzen erreicht. Im Ranking der Substanzen sind auch erhebliche Unterschiede zwischen Hefe- und Säugerzellen festzustellen. Bisphenol A zeigte beispielsweise von den untersuchten Xenobiotika in Säugerzellen die höchste Potenz. (Raun Andersen et al., 1999)

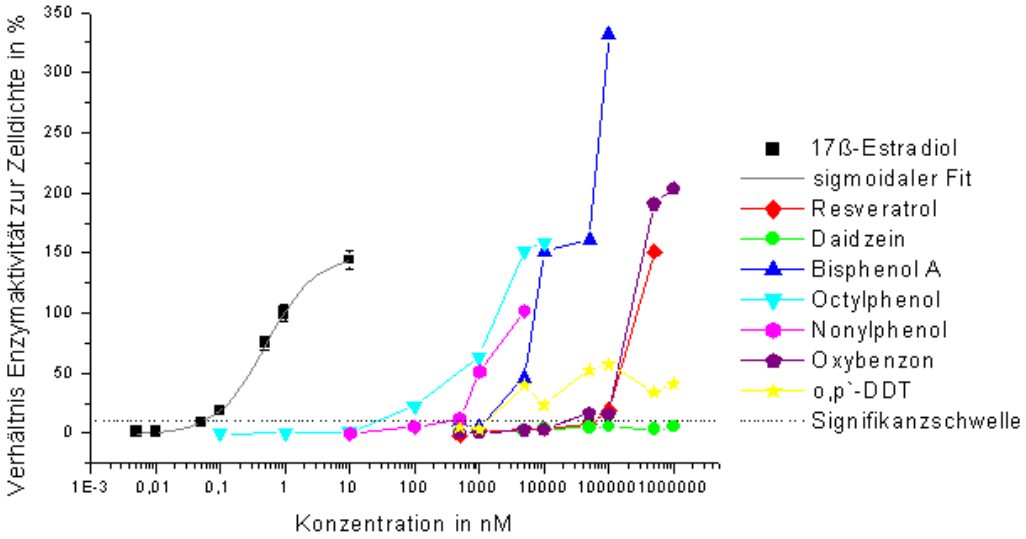


Abbildung 165: Estrogene Aktivität im Überblick: transgener Hefe-Assay mit hER

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der transgene Hefe-Assay mit hAR für androgene/antiandrogene Untersuchungen gut geeignet scheint. Ermittelte Daten des transgenen Hefe-Assays stimmen mit Ergebnissen der etablierten androgenresponsiven Transaktivierungsassays in T-47D-Luc- und COS-AR-Luc-Zellen sowie dem endogenen PSA-Assay überein.

Der transgene Hefe-Assay mit hER eignet sich hingegen nur bedingt für Untersuchungen estrogener/antiestrogener Aktivität. Durch die Möglichkeit,

vergleichsweise hohe Substanz-Konzentrationen zu inkubieren, können Effekte detektiert werden, die zum Teil in Säugerzellen bei niedrigeren Dosierungen ermittelt werden können. Untersuchungen antiestrogener Effekte in Hefen können gravierend von Ergebnissen in Säugerzellen abweichen, da estrogenresponsive Hefe-Assays nicht immer zwischen Agonisten und Antagonisten unterscheiden können. Säugerspezifische Mechanismen werden für einige antiestrogene Effekte diskutiert. (Dudley et al., 2000; Nishikawa et al., 1999)

5 ZUSAMMENFASSUNG

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von *In-vitro*-Testsystemen zur Erfassung hormoneller/antihormoneller Aktivität. Es gelang, vier neue, unterschiedliche *In-vitro*-Testsysteme zu etablieren und anhand bekannter Agonisten/Antagonisten zu validieren.

Zunächst konnte ein Reportergenassay auf Basis des endogenen Reporters TRPM-2 aufgebaut werden. Für die Quantifizierung mittels kompetitiver RT-PCR wurde eine Deletionsmutante des zu amplifizierenden Gens als interner exogener Standard konstruiert. Dadurch wurden Untersuchungen von Testsubstanzen auf potentielle androgene/antiandrogene Aktivität in T-47D-Brustkrebszellen und auf estrogene/antiestrogene Aktivität in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 anhand eines einzigen Parameters ermöglicht. Analog zum TRPM-2-Assay wurde ein Testsystem zur kompetitiven Quantifizierung estrogenabhängiger pS2-Induktion in MCF-7-Zellen etabliert.

Der TRPM-2-Assay in T-47D-Zellen wies mit den von Guth etablierten Transaktivierungsassays in COS-7- und T-47D-Luc-Zellen vergleichbare Sensitivität auf. Der von Guth etablierte Assay auf Basis des endogenen Reporters PSA erwies sich jedoch als deutlich präziser. Die weitergeführte Validierung des PSA-Assays zeigte andererseits aber deutlich geringere Selektivität gegenüber etablierten Antagonisten als in der Literatur beschrieben. (Guth, 2000; Rosenberg et al., 1998)

In MCF-7-Zellen wurde für die endogenen Reporter TRPM-2 und pS2 mittels kompetitiver RT-PCR deutlich höhere Sensitivität erreicht als für bereits etablierte Assays. Ein Nachteil solcher endogener Reportergenassays auf RNA-Ebene ist die vergleichsweise aufwendige Versuchsdurchführung.

Mit zwei neu bei uns etablierten transgenen β-Galactosidase-Expressionssystemen in *Saccharomyces cerevisiae* wurden robuste und effiziente Screeningmethoden zur Untersuchung androgener/antiandrogener bzw. estrogener/antiestrogener Aktivität aufgebaut.

Während Untersuchungsergebnisse im transgenen Hefe-Assay mit hAR mit Ergebnissen etablierter androgensensitiver Transaktivierungsassays in T-47D-Luc- und COS-AR-Luc-Zellen sowie dem endogenen PSA-Assay übereinstimmen, ergaben im transgenen Hefe-Assay mit hER generierte Ergebnisse, gegenüber jenen

in estrogensensitiven Transaktivierungsassays in Säugerzellen ermittelten, mitunter erhebliche Unterschiede. Im Hefe-Assay mit hER wurde beispielsweise für Daidzein keine estrogene, in niedrigen Konzentrationen dagegen antiestrogene Aktivität festgestellt. Für diese Differenzen werden säugerspezifische Mechanismen und Unterschiede bei der Fähigkeit zur Penetration der Zellwand diskutiert. (Dudley et al., 2000; Raun Andersen et al., 1999)

In den von Guth etablierten Transaktivierungsassays (transienter Transaktivierungsassay in COS-7-Zellen, Transaktivierungsassay in stabilen T-47D-Luc-Zellen) und dem endogenen PSA-Assay wurden in dieser Arbeit, ausgehend von zwei vorselektierten Leitstrukturen, die mittels online-Strukturdatenbank-Recherche identifizierten Benzophenon-Derivate Benzophenonimin, p,p`-Dimethylbenzophenon, Benzophenon-3,3`,4,4`-tetracarbonsäuretetraundecylester (Selectophor®) und Ketoprofen, die weiteren Pharmaka Imipramin und Ketoconazol, der natürliche Süßstoff aus *Stevia rebaudiana* Steviosid und sein Aglycon Steviol sowie 19-Nortestosteron und N-(2-Chlorethyl)-N-nitroso-carbamoyl-L-alanyl-17-nortestosteron (CNC-ala-NT, E173) auf potentielle androgene/antiandrogene Aktivität untersucht. (Guth, 2000)

Um das Zusammenwirken estrogener Effekte von Verbindungen zu ermitteln, wurden Kombinationsexperimente im estrogensensitiven MCF-7-Luc-Reportergenassay durchgeführt. Ergebnisse aus Untersuchungen binärer Gemische repräsentativer Industriechemikalien bzw. dem Phytoestrogen Daidzein und dem physiologischen Hormon Estradiol zeigten rein additive Wirkungen.

Insgesamt wurde mit dieser Arbeit ein Beitrag zur Identifizierung endokriner Disruptoren geleistet. Die in dieser Arbeit neu etablierte kompetitive RT-PCR auf endogene Reporter ermöglicht Untersuchungen früher Signale im natürlichen Hintergrund der Zelle. Bei der erweiterten Validierung des sensitiven PSA Assays jedoch wurde geringe Selektivität gegenüber etablierten Antagonisten festgestellt. Neue und bereits etablierte transgene Reportergenassays in Hefen und Säugerzellen ermöglichten effektive Untersuchungen potentiell hormonell aktiver Verbindungen. Die Anwendungsgebiete der sich ergänzenden Testsysteme liegen in der Charakterisierung möglicher toxikologisch relevanter Verbindungen wie auch in der Wirkstofffindung.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Zellkultur

Lösungen und Chemikalien

Fötales Kälberserum (FKS, Gibco)

Charcoal Dextran FKS (CDFKS)

0,5 % Norit A (Serva) und 0,05 % Dextran (Sigma) werden in einer 0,14 M NaCl-Lösung gelöst. Von der Lösung werden 50 ml abgenommen, in 500 ml FKS gegeben und 45 Minuten bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Nach zweimaligem Zentrifugieren (800 G, zwanzig Minuten) wird der Überstand bei -20 °C gelagert.

Penicillin/Streptomycin (Gibco)

10 000 I.E./ml Penicillin; 10 000 µg/ml Streptomycin

L-Glutamin (Gibco)

200 mM Lösung von L-Glutamin

Kulturmedien für MCF-7-, LNCaP-, T-47D- und COS-7-Zellen

serumhaltiges Kulturmedium:

- RPMI 1640 mit Phenolrot und L-Glutamin (500 ml, Gibco); 50 ml FKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin
- Dulbecco`s DMEM ohne Phenolrot und L-Glutamin (500 ml, Gibco); 50 ml CDFKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin; 3,6 ml L-Glutamin

Phosphate Buffer Saline (PBS)

5 g NaCl; 0,72 g Na_2HPO_4; 0,25 g KCl; 0,125 g KH_2PO_4; pH 7,3 - 7,4; bidest. H_2O ad. 500 ml; autoklavieren

Trypsin-Lösung

125 mg Trypsin (Serva); 62,5 mg EDTA; mit PBS auf 25 ml auffüllen; über Nacht gekühlt rühren; Filtersterilisation (0,22 µm)

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

Trypanblau-Lösung

0,4 g Trypanblau (Serva); 0,81 g NaCl; 0,06 g KH_2PO_4; pH 7,2; bidest. H_2O ad.100 ml

Materialien

Combitips plus, steril (Eppendorf)
Cryotubes (Greiner)
Einwegkanülen, steril (Roth)
Einwegröhrchen, steril, 10, 15 und 50 ml (Greiner, Sarstedt)
Einwegspritzen, steril (Roth)
Kulturflaschen 25, 75 und 182 cm^2 (Greiner, Sarstedt)
Petrischalen 58, 100 und 140 mm Ø (Nunclon, Sarstedt, Greiner)
Reaktionsgefäße 1,5 ml (Greiner)
Spritzenfilter, steril, Porengröße 0,22 und 0,45 µm (Roth)
Sterile Pipetten
24- und 96-Loch-Titerplatten (Greiner, Nunc)
Zählkammer: Typ Neubauer (Fischer)

Geräte

Analysenwaage (AE 163 Mettler)
Automatische Pipetierhilfe (Pipettus)
Biofuge fresco (Heraeus)
Biofreezer (Heraeus)
Brutschrank BBD 6220, Cytoperm Typ 8088 (Heraeus)
Bunsenbrenner
Waage (Sartorius)
Kolbenhubpipetten (Abimed, Eppendorf)
Lamin-Air HLB 2472BS, HS12 (Heraeus)
Megafuge 1.0 R (Heraeus)
Multipette plus (Eppendorf)
Neubauer-Zählkammer
pH-Meter (pH 521 WTW)

Umkehrmikroskop (Zeiss)
Vakuumpumpe (KNF-Neuberger)
Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik)
Wasserbad
Zentrifuge Mode J2-21 (Beckmann)

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, Bauer, 1987)
In der Regel wird serumhaltiges Medium verwendet. Dem Medium wird nach dem Temperieren auf 37 °C Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Penicillin/Streptomycin dient zur Kontaminationsprophylaxe gegen Prokaryonten. (Lindl, Bauer, 1987)

Mediumwechsel

Alle drei bis vier Tage wird das Kulturmedium gewechselt, um eine Übersäuerung des Milieus zu vermeiden. Als Indikator kann bei phenolrothaltigen Medien der Farbumschlag von Rot nach Orange-Gelb herangezogen werden.
Nach dem Abgießen oder Absaugen des alten Mediums wird mit PBS gewaschen und frisches Medium auf die Zellen gegeben.

Passagieren

Ist die Kulturflasche zu ca. 70 % konfluent bewachsen, werden die Zellen in eine größere oder in mehrere Flaschen oder Petrischalen überführt. Der Boden der Kulturflasche wird nach dem Entfernen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS mit Trypsin-Lösung bedeckt. Nach einigen Minuten Inkubation im Brutschrank kommt es zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgt anschließend durch Zugabe von serumhaltigem Medium.
Die Zellen werden steril abzentrifugiert (200 G, zehn Minuten), in serumfreiem oder CDFKS-haltigem Medium aufgenommen, aliquotiert und in die neuen Flaschen oder Petrischalen mit entsprechendem Kulturmedium überführt.

Einfrieren von Zellen

Zellen sind in flüssigem Stickstoff lange lagerfähig. Etwa 10^6 abzentrifugierte Zellen werden in 1 ml Kulturmedium, unter Beimengung von 10 % DMSO, stufenweise eingefroren (-20 °C, -70 °C, flüssiger Stickstoff).

Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden in einem Wasserbad von 37 °C möglichst schnell aufgetaut, zu FKS-haltigem Medium gegeben und bei 200 G eine Minute zentrifugiert, um das cytotoxische DMSO zu entfernen. Das in FKS-haltigem Medium resuspendierte Zellsediment wird zur Kultivierung eingesetzt. (Lindl, Bauer, 1987)

Auszählen von Zellen

Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer sterilen Pipette lassen sich die Zellen vereinzeln. Die Zellen werden mit Trypanblau-Lösung angefärbt. Lebende Zellen erscheinen hellgelb, tote Zellen färben sich blau.
Unter dem Mikroskop wird mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei ein Feld einem Volumen von 0,1 µl entspricht (Verdünnung durch Färbelösung berücksichtigen). (Lindl, Bauer, 1987)

6.2 Transformation prokaryontischer Zellen

Prinzip

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

6.2.1 Bakterienkultur

Lösungen und Chemikalien

Ampicillin-Stammlösung

0,5 g Ampicillin (Sigma); bidest. H_2O ad. 10 ml; sterilfiltrieren (0,22 µm); aliquotieren; bei -20 °C lagern

Luria Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g Caseinhydrolysat (Gibco); 5 g Bactohefeextrakt (Gibco); 10 g NaCl; pH 7,5; bidest. H_2O ad. 1000 ml; autoklavieren

Luria Bertani-Agar (LB-Agar)

7,5 g Agar (Gibco); LB-Medium ad. 500 ml; autoklavieren; jeweils ca. 20 ml in Petrischalen (Ø 100 mm) geben; bei 4 °C lagern

Selektivmedium/-agar mit 50 µg/ml Ampicillin

LB-Medium bzw. LB-Agar nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 40 °C mit Ampicillin-Stammlösung versetzen

$CaCl_2$-Lösung

50 mM $CaCl_2$; autoklavieren

Glycerol-Lösung

86–88 % Glycerol; autoklavieren

Glycerolstock E.coli sure, E.coli $DH_{5\alpha}$

Materialien

Petrischalen 100 mm Ø (Sarstedt, Greiner)
Erlenmeyer-Kolben 250 ml (steril)
Übernachtkultur-Röhrchen (steril)

Geräte

Schüttelinkubator
Brutschrank

Übernachtkultur von E.coli

5 µl Bakterienglycerolstock-Lösung in 5 ml LB-Medium (Übernachtkultur-Röhrchen) suspendieren. Zellen unter Schütteln (ca. 160 rpm, 37 °C) über Nacht bis zu einer Dichte von 1 bis 2 x 10^8/ml kultivieren.

Anlegen eines Glycerolstocks

Zu 850 µl E.coli Übernachtkultur werden 150 µl Glycerol-Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und bei -20 °C bzw. -70 °C gelagert.

6.2.2 Herstellung von transformationskompetenten E.coli-Zellen

30 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium mit 300 µl Übernachtkultur in einem 250-ml-Erlenmeyer-Kolben animpfen. Zellen für zweieinhalb Stunden bis zu einer Dichte von 4 bis 7 x 10^7/ml bei 37 °C unter Schütteln (160 rpm) kultivieren.
Ab diesem Zeitpunkt alle Arbeiten auf Eis und mit vorgekühlten (4 °C) Materialien durchführen.
Kulturen in steriles SS-34-Zentrifugenröhrchen überführen und im SS-34-Rotor einer Sorvallzentrifuge bei 5000 rpm und 4 °C für zehn Minuten sedimentieren. Überstand dekantieren und Zellpellet in 12,5 ml 4 °C kalter $CaCl_2$-Lösung resuspendieren. Suspension fünfzehn Minuten auf Eis inkubieren. Danach erneut zentrifugieren (5000 rpm), $CaCl_2$-Überstand vorsichtig abgießen und Bakterien in 2,5 ml $CaCl_2$-Lösung resuspendieren. Die kompetenten Zellen können direkt zur Transformation verwendet werden.

6.2.3 Transformation von kompetenten Zellen

Pro Transformationsansatz 200 µl kompetente E.coli-Suspension in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen. 1 bis 30 ng des jeweiligen Plasmids zugeben und vorsichtig mischen. Eine Kontrolle (kompetente E.coli ohne Plasmidzugabe) mitführen. Transformations- und Kontrollansätze für 30 Minuten auf Eis inkubieren, anschließend einem Hitze-Schock unterziehen: Inkubation der Ansätze für zwei Minuten bei 42 °C (ohne Schütteln), danach für fünf Minuten auf Eis.

Je Ansatz 1 ml LB-Medium zugeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubieren. 100 µl der Zellsuspensionen auf je einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattieren. Als Kontrollen entsprechend ampicillinfreie Agarplatten mitführen.
Aus Kolonien der ampicillinhaltigen LB-Agarplatten wird die Plasmid-DNA isoliert (Mini-Präparation bzw. Maxi-Präparation, siehe 6.3.1 bzw. 6.3.2) und analysiert.

6.3 Isolierung von Plasmiden

6.3.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Mini-Präparation ermöglicht die schnelle Gewinnung kleiner Plasmidmengen und ist vor allem für analytische Reihenuntersuchungen (Restriktionsanalysen) vieler Plasmide geeignet. (Gassen, Bertram, 1991)
Diese Methode dient der schnellen qualitativen Überprüfung transformierter E.coli.
Prinzip: siehe 6.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Lösungen und Chemikalien

Lösungen I bis III vor Gebrauch frisch ansetzen

Lösung I:
1,66 ml 0,3 M Glucose; 0,25 ml 1 M TrisHCl (pH 8,0); 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); bidest. H_2O ad. 10 ml; autoklavieren

Lösung II:
0,2 ml 10 M NaOH; 1 ml 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS); bidest. H_2O ad. 10 ml

Lösung III:
6,0 ml 5 M Kaliumacetat; 1,15 ml Eisessig (99,7 %); bidest. H_2O ad. 10 ml; autoklavieren

Tris/EDTA-Puffer (TE-Puffer)
10 mM TrisHCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0); autoklavieren

1,5 ml der transformierten Bakteriensuspension in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen und 30 Sekunden bei 14 000 rpm zentrifugieren.

Überstand verwerfen und Pellet in 100 µl Lösung I resuspendieren. Fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. 200 µl Lösung II zugeben, kurz vortexen und direkt für fünf Minuten auf Eis stellen. Proben nach Zugabe von 150 µl Lösung III schnell mischen und weitere fünf Minuten auf Eis inkubieren. Weißen Niederschlag zehn Minuten bei 14 000 rpm abzentrifugieren.
Plasmidhaltigen Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen und mit 2,5-fachem Volumenanteil Ethanol p.A. versetzen. DNA bei -20 °C für mindestens eine Stunde fällen. DNA bei 13 000 rpm für zehn Minuten abzentrifugieren. Pellet mit 100 µl gekühltem (4 °C) 70 %igen Ethanol waschen. Lösung erneut bei 13 000 rpm für fünf Minuten zentrifugieren. Überstand vorsichtig abpipettieren. Pellet im Vakuum trocknen, anschließend in 30 µl TE-Puffer lösen. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgt bei -20 °C.

6.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Maxi-Präparation erlaubt die Isolierung größerer Plasmidmengen. Aufgrund des hohen Reinheitsgrades ist die DNA für zahlreiche Zwecke wie Sequenzierung, Klonierung und Transfektion geeignet.

Prinzip

Die Plasmidaufreinigung aus Bakterien basiert auf einer zeitlich limitierten alkalischen Lyse mit NaOH und Natriumdodecylsulfat. NaOH denaturiert Proteine sowie chromosomale und Plasmid-DNA, während Natriumdodecylsulfat Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembranen solubilisiert. Nach genau definierter Lysedauer erfolgt die Neutralisation mittels Kalium-Acetat-Puffer. Durch die hohe Salz-Konzentration kommt es zur Ausbildung von SDS-Präzipitaten mit Einschlüssen denaturierter Proteine, chromosomaler DNA und Zellbruchstücken. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert und bleibt in Lösung.
Die Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionen-Austauscher-Säule erfolgt unter geeigneten Niedersalz- und pH-Bedingungen. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden mittels Mittelsalz-Puffer herausgewaschen. Nach der Elution mit einem Hochsalz-Puffer kann die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt werden. (QIAGEN, 1998)

Lösungen, Materialien und Methode

QIAGEN® Plasmid Maxi Kit

6.3.3 Restriktionsverdau der präparierten Plasmide und elektrophoretische Auftrennung

Prinzip

Die Kontrolle der nach Transformation gewonnenen Plasmide erfolgt anhand gelelektrophoretischer Auftrennung. Dazu wird die isolierte Plasmid-DNA einer Hydrolyse durch Restriktionsendonucleasen unterzogen. Die durch den enzymatischen Verdau linearisierte Plasmid-DNA kann in einem 0,7%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Als Längenvergleich dienen mitgeführte Marker.

Lösungen und Chemikalien

DNA-Probe

Plasmid-DNA aus Mini- bzw. Maxi-Präparation

Restriktionsendonucleasen mit All-for-one-buffer (10x) (Pharmacia)

Eco RI	20 000 units/ml
Hind III	10 000 units/ml
Kpn I	14 400 units/ml

DNA-Längenstandard (MBI Fermentas)

λ-DNA , Hind III geschnitten

Gene ruler 100 bp ladder plus

Agarose (Gibco)

50 x Tris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

242 g Tris-Base; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); bidest. H_2O ad. 1000 ml

Gelladepuffer

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

Ethidiumbromid-Stocklösung

10 mg Ethidiumbromid/ml

Ethidiumbromid-Bad

2,5 µg Ethidiumbromid/ml

Geräte

Thermomixer (Eppendorf)
Horizontal-Gelelektrophoresekammer (Mini Protean II und SubCell, Biorad)
Powersupply (Power Pac 300, Biorad)
Lumi-Imager (Boehringer Mannheim)

Methode

Für den Restriktionsverdau werden je Ansatz 5 µl Plasmid-Lösung, 1 µl All-for-one-buffer (10x), 1 µl Restriktionsenzym mit bidest. Wasser auf 10 µl ergänzt und etwa zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.
Für das 0,7%ige Agarose-Gel wird die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer unter Rühren aufgekocht und mit 50 bis 60 °C in die Gelkammer gegossen. Die Polymerisation erfolgt mit dem Abkühlen innerhalb von 30 Minuten.
Proben aus dem Restriktionsverdau und Marker werden mit 1 µl Ladepuffer versetzt und in die Ladetaschen des auspolymerisierten Gels pipettiert. Das Gel wird vollständig mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgt in Abhängigkeit von Gelgröße und -dicke bei konstanter Spannung zwischen 10 und 70 V.
Zur Detektion wird das Gel im Ethidiumbromid-Bad inkubiert. Die Identifikation der Banden erfolgt mittels Lumi-Imager im UV-Licht bei 600 nm.

6.3.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Für einige Methoden wie Sequenzierung, Klonierung, Transfektion (siehe 6.4), PCR und RT-PCR (siehe 6.8) ist es Voraussetzung, bestimmte Konzentrationen an Nucleinsäuren einzusetzen. Die Quantifizierung erfolgt photometrisch.

Prinzip

Die Nucleinsäure-Konzentration wird über die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht

1 A_{260}-Einheit 50 µg/ml doppelsträngiger DNA
40 µg/ml einzelsträngiger RNA

Für die Berechnung der Nucleinsäure-Konzentration gilt:

DNA-Konzentration [µg/ml] = A_{260} x 50 x Verdünnungsfaktor

RNA-Konzentration [µg/ml] = A_{260} x 40 x Verdünnungsfaktor

(Maniatis et al., 1989)

Materialien

Halbmikro-Quarzküvetten

Geräte

UV-Spektrometer Uvikon 810 (Kontron)

Methode

Nucleinsäureproben werden mit Wasser verdünnt. Dabei sollte der Extinktionsunterschied zu Wasser mindestens 0,15 betragen.

6.4 Transfektion eukaryontischer COS-7-Zellen mittels Elektroporation

Als Transfektion wird die Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen bezeichnet. Die Insertion von Genen ermöglicht die Expression in der Zelle sowie die Untersuchung der Geninduktion bzw. -repression.

Es wird zwischen stabiler und transienter Transfektion unterschieden. Nur eine von 10^5 Zellen integriert die aufgenommene DNA stabil ins Genom. Liegt die transfizierte DNA ausschließlich extrachromosomal in der Wirtszelle vor, kann sie sich nicht vermehren und geht infolge der Zellteilung verloren (transiente Transfektion). Zur Transfektion verwendete Plasmide enthalten häufig Resistenzgene gegen Antibiotika, die eine Selektion transfizierter Zellen ermöglichen. (Gassen, Bertram, 1991)

Prinzip

Die Elektroporation ist eine rein physikalische Methode zur Einbringung von DNA in eine Wirtszelle. Die Permeabilität der Zellmembran wird durch einen kurzen elektrischen Impuls oberhalb der kritischen Feldstärke so erhöht, dass DNA-Moleküle durch die Membran in die Zelle eindringen können. (Koch-Brandt, 1993)

Materialien

Plasmide

pMamneoLuc (Clontech)
pSG5AR (Stratagene)
pSVβ (Clontech)

Elektroporationsküvetten (Invitrogen)

Geräte

Electrophoresis Power Supply-EPS 3500 (Pharmacia)
Elektroporator II (Invitrogen)

Methode

Zu 80 % konfluent gewachsene COS-7-Zellen werden abtrypsiniert, zentrifugiert (1500 rpm, fünf Minuten, 4 °C), mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird in eiskaltem PBS mit einer Dichte von 4 x 10^6 Zellen/500 µl resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Nach Zugabe von jeweils 10 µg Plasmid (pMamneoLuc, pSG5AR und pSVβ) wird der Ansatz zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgt unter folgenden Bedingungen:

Elektrisches Feld	1000 µF
Spannung	330 V
Stromstärke	25 mA
Leistung	25 W
Widerstand	∞ Ω

Es folgt eine weitere Inkubation für zehn Minuten auf Eis. Im Anschluss wird die Zellsuspension in 1 ml FKS-haltigem Medium aufgenommen und in definierter

Menge auf Petrischalen (Ø 58 mm) ausplattiert. Nach 18 bis 24 Stunden kann die Inkubation mit Testsubstanzen erfolgen (siehe 6.5).

6.5 Transgene Reportergenassays in Säugerzellen

Transgene Reportergensysteme werden zur Untersuchung steroidhormonregulierter Genexpression bzw. -regulation herangezogen.

6.5.1 Luciferase-Assay

Das codierende Gen der verwendeten Luciferase stammt aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Das Enzym katalysiert effektive Biolumineszenz-Reaktionen.

Prinzip

Die Luciferase-Expression erfolgt nach Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes an das „Responsive Element" der DNA. Die im Zelllysat vorliegende Luciferase kann aufgrund der Umsetzung des zugesetzten Substrats Luciferin mittels Platten-Luminometer quantifiziert werden.

Lösungen und Chemikalien

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 $(MgCO_2)_4Mg(OH)_2*5H_2O$; 2,67 mM $MgSO_4$; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT; 270 µM Coenzym A; 470 µM Luciferin; 530 µM ATP; pH 7,8

Luciferase-Assay-Substrat (Promega)

Materialien

Weiße 96-Loch-Titerplatten (Nunc)
Zellschaber (Greiner)

Geräte

Platten-Luminometer (BMG)

Methode

MCF-7-Luc, T-47D-Luc (stabiler Transaktivierungsassay)

Stabil transfizierte MCF-7-Luc- bzw. T-47D-Luc-Zellen werden in CDFKS-haltigem Dulbecco`s Medium auf Petrischalen (Ø 58 mm) ausgesät und 24 Stunden kultiviert.

COS-AR-Luc (transienter Transaktivierungsassay)

Vier Elektroporationsansätze werden gemischt, auf fünfzehn Petrischalen verteilt und für 18 bis 24 Stunden inkubiert.

Nach einmaligem Spülen mit PBS werden die Ansätze (MCF-7-Luc serumfrei; T-47D-Luc und COS-AR-Luc in CDFKS-haltigem Medium) für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Es folgt eine Nachinkubation für weitere 24 Stunden in CDFKS-haltigem Medium.

Zur Herstellung der Zellextrakte werden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums zweimal mit PBS gewaschen und mit 250 µl (MCF-7-Luc, T-47D-Luc) bzw. 150 µl (COS-AR-Luc) Lysepuffer versetzt. Die lysierten Zellen werden nach zwanzig Minuten Inkubation bei Raumtemperatur abgeschabt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellhomogenate werden eine Minute bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält die cytosolische Luciferase. Er kann direkt zur Messung eingesetzt oder bei -80 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.

Für die Messung sollten Proben und Substrat-Lösung auf etwa 20 °C temperiert werden, da die Enzymaktivität bei niedrigeren Temperaturen herabgesetzt ist. (Promega, 1998)

Pro Loch werden 60 µl Zelllysat in weiße 96-Loch-Titerplatten pipettiert. Die Zugabe von 180 µl Substrat-Reagenz erfolgt computergesteuert im Luminometer. Die Messung der emittierten Photonen erfolgt über 50 Intervalle innerhalb von 250 Sekunden.

6.5.2 β-Galactosidase-Messung

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

Lösungen und Chemikalien

Luminescent β-galactosidase Detection Kit II (Clontech)
Reaktionspuffer-Mixtur: 4 µl Reaktionssubstrat und 196 µl Reaktionspuffer

Zelllysate

Methode

30 µl der unter 6.5.1 gewonnenen Zelllysate werden in weiße 96-Loch-Titerplatten pipettiert, mit 200 µl Reaktionspuffer-Mixtur versetzt und 60 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. In 25 Messintervallen über einen Zeitraum von 125 Sekunden erfolgt die Detektion der emittierten Lumineszenz. Das Signal ist nach der Inkubation für ca. eine Stunde stabil. (Clontech, 1999)

Zur Normalisierung der gemessenen Luciferase-Werte gilt:
Normalisierte Luciferase = Luciferase-Aktivität / β-Galactosidase-Aktivität

6.6 PSA-Assay

Für Untersuchungen antiandrogener Aktivität mittels endogenen Reporters bietet sich das Prostataspezifische Antigen (PSA) an.

Prinzip

PSA wird in der Brustkrebszelllinie T-47D in Anwesenheit von Androgenen und Progestinen produziert und ins Kulturmedium sezerniert. Da die Genexpression in Abwesenheit der Hormone ausbleibt, ist PSA ein geeigneter endogener Reporter zum Nachweis AR- und PR-agonistischer und -antagonistischer Wirkung. Die Quantifizierung der PSA-Konzentration im Mediumüberstand erfolgt mittels ELISA.

Lösungen und 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

Chemilumineszenz-Substrat: Lumigen® PPD: 4-Methoxy-4-(3-phosphatphenyl)-spiro-(1,2-dioxethan-3,2`-adamantan)

Tumormarker-Kontrollen (DPC Biermann)

Waschpuffer

Geräte

Immulite-Analyzer (DPC Biermann)

Methode

T-47D-Zellen werden in CDFKS-haltigem Dulbecco`s Medium auf 24-Loch-Titerplatten (5 x 10^4 Zellen/Loch) ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgt die Inkubation im gleichen Medium mit den Testsubstanzen:

I) Inkubation des Hormons in DMSO aus Stammlösungen verschiedener Konzentrationen

II) Inkubation mit dem potentiellen Hemmstoff in DMSO für vier Stunden; anschließend Zweitinkubation mit dem zu antagonisierenden Hormon in DMSO

Die DMSO-Konzentration beträgt in allen Ansätzen 0,2 %.

Bei jedem Testansatz werden mehrere Negativ- (0,2 % DMSO) und Positivkontrollen (Hormon) mitgeführt. Aufgrund der langen Inkubationszeit von fünf Tagen müssen die Ansätze direkt vor der Inkubation steril filtriert werden.

Die Messung der PSA-Konzentration erfolgt aus einem unverdünnten Aliquot des Kulturmediums mittels PSA-Immulite-3.-Generation-Assays an einem Immulite-Analyzer.
Um cytotoxische Effekte auszuschließen, werden die Zellen mit Sulforhodamin-B gefärbt und nach dem unter 6.7 beschriebenen Verfahren quantifiziert.

6.7 Wachstumstest (modifizierter Sulforhodamin-B-Assay)

Um allgemein cytotoxische Wirkungen von Substanzen auf Zellen abschätzen zu können, bietet sich die einfache Wachstumskontrolle an. Die Art des toxischen Einflusses kann durch diesen Test nicht bestimmt werden.

Prinzip

Beim Sulforhodamin-B-Assay werden die mit Trichloressigsäure am Boden der Kulturplatten fixierten Zellen mit dem anionischen Farbstoff Sulforhodamin-B angefärbt. Die Sulfidgruppen von Sulforhodamin-B binden in leicht saurem Milieu an basische Aminosäuren der Proteine. Unter schwach basischen Bedingungen wird der Farbstoff quantitativ von den Proteinen extrahiert. Die Extinktion der Farbstofflösung, die proportional zur Zellzahl ist, wird photometrisch detektiert. (Skehan et al., 1990)

Lösungen und Chemikalien

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 Tris-Base (Roche); pH 10,5

Materialien

24-Loch-Titerplatten (Greiner)

Halbmikro-Einwegküvetten (Brand)

Methode

Proteinfällung sowie Fixierung der unter 6.6 ausgestreuten und inkubierten Zellen erfolgt durch 60 Minuten Inkubation bei 4 °C nach Zugabe 4 °C kalter 50%iger Trichloressigsäure-Lösung (10 % TCA Endkonzentration). Nach vier- bis fünfmaligem Waschen mit kaltem Leitungswasser werden die Platten an der Luft getrocknet.
Pro Loch werden die Zellen mit 250 µl einer 0,4%igen Sulforhodamin-B-Lösung (in 1%iger Essigsäure) angefärbt. Nach 30 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C wird überschüssige Farbstofflösung abgegossen und die Platten vier- bis fünfmal mit 1%iger Essigsäure gewaschen, bis kein Farbstoff mehr ins Waschwasser übergeht. Nach erneutem Trocknen wird pro Loch mit je 1 ml 4 °C kaltem Tris-Puffer (pH 10,5) der proteingebundene Farbstoff solubilisiert und innerhalb von 15 Minuten bei 564 nm photometrisch vermessen. Beim Überschreiten des Extinktionswertes von 1,2 wird die Farbstofflösung mit Tris-Puffer verdünnt, damit die gemessene Extinktion im linearen Bereich des Photometers liegt.
Die gemessenen Extinktionen sind zur Proteinmenge und somit zur Lebendzellzahl proportional.

6.8 RT-PCR

PCR („Polymerase Chain Reaction“) wird zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt. Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert zu einer DNA-Matrize komplementäre DNA-Stränge. Künstliche, aus den flankierenden Bereichen der Matrize abgeleitete Oligonucleotidprimer dienen dabei als Startmoleküle.
Auch RNA-Sequenzen können als Matrize herangezogen werden. Dazu muss die RNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Die so genannte RT-PCR kann zur Bestimmung von Mengenverhältnissen einer mRNA herangezogen werden, da die mRNA-Menge die Aktivität des zugehörigen Gens in der Zelle widerspiegelt. Durch quantitative Erfassung der mRNA lassen sich somit Veränderungen der Genaktivität nachweisen. (Brown, 1996; Gassen et al., 1994)

6.8.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wird mithilfe eines RNeasy Mini Kits (QIAGEN) isoliert.

Prinzip

Die Zellen werden in Anwesenheit eines stark denaturierenden Guanidinium-Isothiocyanat (GITC)-haltigen Puffers lysiert und homogenisiert. Die gleichzeitige RNase-inaktivierende Wirkung des Puffers verhindert den Abbau der RNA.
Die Zentrifugation des Lysats durch QIAshredder-Säulen dient der weiteren Probenhomogenisierung und reduziert die Viskosität des Lysats.
Ein Hoch-Salz-Puffer erlaubt die Bindung von bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von mehr als 200 bp. Ethanol verbessert ebenfalls die Bindungseigenschaften der RNA auf den Rneasy-mini-spin-Säulen. Während die Gesamt-RNA an das Kieselgel-Säulenmaterial bindet, können Kontaminanten ausgewaschen werden. Die Elution erfolgt mit RNase-freiem Wasser. (QIAGEN, 1999)

Lösungen und Materialien

QIAshredder® (QIAGEN)
RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)
RNase- und DNase-freie Filterspitzen (Greiner)

Methode

10^6 T-47D- bzw. MCF-7-Zellen werden pro Petrischale (Ø 58 mm) in CDFKS-haltigem Dulbecco`s Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgt die Inkubation der zu testenden Verbindungen für 20 Stunden in serumfreiem Medium mit einem DMSO-Gehalt (als Lösungsvermittler) von 0,1%.
Nach exakt eingehaltener Inkubationsdauer wird das Medium entfernt. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS folgt die Aufarbeitung der Gesamt-RNA, wie im RNeasy®-Mini-Handbuch (QIAGEN) beschrieben.

6.8.2 DNase-Verdau

Genomische DNA kann bei der RT-PCR mit dem gewünschten Amplifikat um Primer und Enzym konkurrieren. Um die Ausbeute zu maximieren, wird ein DNase-Verdau durchgeführt.

Lösungen

DNase 10 000 units/ml (Pharmacia)

Methode

Die für den RT-PCR-Assay einzusetzende RNA (1 µg) wird in Wasser mit 1 µl DNase versetzt und zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Denaturierung der DNase für zehn Minuten bei 80 °C. Dieser Ansatz kann direkt zur RT-PCR eingesetzt werden.

6.8.3 Durchführung der RT-PCR

Die beschriebenen Pipettierschritte werden zur Vermeidung von Kontaminationen mit sterilen, DNase- und RNase-freien Filterspitzen durchgeführt. Des Weiteren wird ausschließlich RNase-freies DEPC-behandeltes Wasser verwendet.
Alle zur RT-PCR benötigten Komponenten werden nach dem Auftauen und Durchmischen auf Eis gehalten. Pipettierschritte werden auf Eis durchgeführt.
Nach der RT-PCR werden die Proben einem RNase-Verdau unterzogen und mithilfe eines 1,3%igen Agarosegels analysiert. Alternativ ist die Lagerung der Proben bei -20 °C möglich.

Lösungen und Chemikalien

H_2O, DEPC-behandelt
0,1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) ad. 100 ml bidest. H_2O; über Nacht bei RT rühren (alternativ zwölf Stunden bei 37 °C); autoklavieren

DEPC (Sigma)

Primer (MWG-Biotech GmbH)
Erste Primer für RT-PCR (Quantifizierung über endogenen Standard β-Actin)

β-Actin forward 5`-CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C-3`

β-Actin reverse 5`-CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G -3`

TRPM-2 forward 5`-GAG ACC AGG GAA TCA GAG ACA-3`

TRPM-2 reverse 5`-CTA TGA TGC TGG ACG CGC GGC-3`

Primer für kompetitive RT-PCR (mit internem exogenen Standard)

pS2 forward 5`-TGC AGC AGA GAG GAG GCA ATG-3`

pS2 reverse 5`-CAA AGT CAG AGC AGT ACC TCT G-3`

TRPM-2 forward 5`-AAT CCC TCC AGG TCG CTG AGA-3`

TRPM-2 reverse 5`-TTC CCA TGA GCA GCA GAG TCG-3`

Titan™ One Tube RT-PCR System (Boehringer Mannheim)

- Enzym-Mix: Expand™ High Fidelity Enzyme-Mix; Reverse Transkriptase; AMV; in Lagerpuffer
- RT-PCR-Puffer (5x): 7,5 mM $MgCl_2$; 1,0 ml DMSO
- DTT-Lösung: Dithiothreitol-Lösung 100 mM

PCR Nucleotide Mix (Boehringer Mannheim)

dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 10 mM in 200 µl H_2O (pH 8,3)

QIAGEN® OneStep RT-PCR Kits (QIAGEN)

- OneStep RT-PCR-Enzym-Mix: Omniscript™ Reverse Transkriptase; Sensiscript™ Reverse Transkriptase und HotStarTaq™ DNA Polymerase
- OneStep RT-PCR-Puffer (5x): enthält Tris*Cl; KCl; $(NH_4)_2SO_4$; 12,5 mM $MgCl_2$; DTT; pH 8,7
- dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dGTP
- H_2O, RNase-frei

RNase-Inhibitor

- RNase-Inhibitor (Boehringer Mannheim): 10–50 x 10^3 units/ml
- Prime RNase Inhibitor™ (Eppendorf): 30 units/µl

Materialien

RNase-und DNase-freie Filterspitzen für Gilson-Kolbenhubpipetten (Greiner)

RNase-und DNase-freie PCT-Reaktionsgefäße (Biozym)

Programmable Thermal Controller PTC-100™ (MJ Research, Inc.)

Methode

Gemäß dem Pipettierschema werden alle Komponenten der Reihe nach in sterile, DNase- und RNase-freie PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Die RT-Reaktion und die PCR erfolgen nach angegebenem Protokoll.

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei verschiedene RT-PCR-Systeme verwendet.

Pipettierschemen entsprechend dem Titan™ One Tube RT-PCR System nach Boehringer Mannheim™

Tabelle 1: Pipettierschema des Master Mix 1 nach dem Titan™ One Tube RT-PCR System (Boehringer Mannheim)

Komponente	*Volumen*	*Endkonzentration*
H_2O (DEPC-behandelt)	variabel	-
Nucleotidmix (je 10 mM)	1 µl	0,2 mM
Primer forward (5 µM)	3 µl	0,3 µM
Primer reverse (5 µM)	3 µl	0,3 µM
DTT (100 mM)	2,5 µl	5 mM
Interner Standard	1 µl	variabel
RNase-Inhibitor (30–50 units/µl)	0,5 µl	15–25 units/Ansatz
Template-RNA	variabel	1 µg Gesamt-RNA
Gesamtvolumen	25 µl	-

Tabelle 2: Pipettierschema des Master Mix 2 nach dem Titan™ One Tube RT-PCR System (Boehringer Mannheim)

Komponente	*Volumen*	*Endkonzentration*
H_2O (DEPC-behandelt)	14 µl	-
RT-PCR-Puffer (5x)	10 µl	-
Enzym-Mix	1 µl	-
Gesamtvolumen	25 µl	-

Master Mix 2 wird erst unmittelbar vor Beginn der RT-Reaktion zu den übrigen Komponenten (Master Mix 1) gegeben. Das Gesamtvolumen beträgt 50 µl.

Tabelle 3: Temperaturprotokoll für die RT-PCR nach dem Titan™ One Tube RT-PCR System (Boehringer Mannheim)

1x	RT-Reaktion bei 50 °C 30 min
1x	Denaturierung des Templates bei 94°C 2 min
10x	Denaturierung bei 94 °C 30 s Annealing bei 55 °C 30 s Verlängerung bei 68 °C 3 min
15x	Denaturierung bei 94 °C 30 s Annealing bei 55 °C 30 s Verlängerung bei 68 °C 3 min + Zyklusverlängerung von 5 s für jeden Zyklus
1x	Im letzten Zyklus Verlängerung bei 68 °C 7 min

Pipettierschema entsprechend dem QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit nach QIAGEN®

Tabelle 4: Pipettierschema nach dem QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)

Komponente	*Volumen*	*Konzentration*
H_2O (DEPC-behandelt)	variabel	-
OneStep RT-PCR-Puffer (5x)	10 µl	-
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	2 µl	0,4 mM
Primer forward (5 µM)	3 µl	0,3 µM
Primer reverse (5 µM)	3 µl	0,3 µM
Interner Standard	1 µl	variabel
RNase-Inhibitor (30–50 units/µl)	0,5 µl	15–25 units/Ansatz
Template-RNA	variabel	1 µg Gesamt-RNA
OneStep RT-PCR-Enzym-Mix:	2 µl	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

Tabelle 5: Temperaturprotokoll für die RT-PCR nach dem QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)

1x	RT-Reaktion bei 50 °C 31 min
1x	Denaturierung des Templates bei 95 °C 15 min

10x	Denaturierung bei 94 °C 30 s Annealing bei 55 °C 1 min Verlängerung bei 72 °C 1 min
15x	Denaturierung bei 94 °C 30 s Annealing bei 55 °C 1 min Verlängerung bei 72 °C 1 min + Zyklusverlängerung von 5 s für jeden Zyklus
1x	Im letzten Zyklus Verlängerung bei 72 °C 10 min

6.8.4 RNase-Verdau

RNA kann die Detektion von DNA-Banden auf dem Agarosegel durch Schmier oder Schatten erschweren. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wird ein RNase-Verdau durchgeführt.

Lösungen und Chemikalien

RNase-Stammlösung

0,1 mg RNase in 1ml TE-Puffer mit zusätzlichem NaCl (1,5 mM) fünfzehn Minuten kochen; nach dem Abkühlen aliquotieren und bei -20 °C lagern

Methode

Die zur Agarosegel-Elektrophorese einzusetzende Probe (RT-PCR-Produkt oder auch Plasmid-DNA aus Minipräparation) wird mit einer adäquaten Menge (0,5 bis 2 µl) RNase versetzt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des Gelladepuffers kann die Probe direkt zur Elektrophorese verwendet werden.

6.9 Konstruktion eines Vektors als interner exogener Standard für TRPM-2

Zur Quantifizierung der TRPM-2-Expression nach Inkubation von Zellen mit dem physiologischen Hormon sowie in Kombination mit potentiellen Antihormonen wurde ein interner nichtgenomischer Standard konstruiert. Dieser wird mit den Primern der genomischen TRPM-2-Sequenz amplifiziert und unterscheidet sich durch eine

Deletion von 96 bp. Dafür wurde ein TRPM-2-Fragment in einen Vektor (pUC 18) kloniert, dem mithilfe eines Restriktionsverdaues die Deletion zugeführt wurde. Nach erfolgter Ligation kann der Vektor in linearisierter Form direkt zur PCR eingesetzt werden.

Materialien

pUC-18-Vektor (Pharmacia)

6.9.1 Isolierung von Plasmiden

(siehe 6.3)

6.9.2 Restriktionsverdau

(siehe 6.3.3)
des Weiteren:

Lösungen und Chemikalien

Restriktionsendonucleasen mit All-for-one-buffer (10x) (Pharmacia)

Pst I	15 000 units/ml
Xba I	12 000 units/ml

6.9.3 PCR/RT-PCR

(siehe 6.8)
des Weiteren:

Lösungen und Chemikalien

Primer (MWG-Biotech GmbH) zur Konstruktion des internen exogenen Standards:

TRPM-2 forward mit Hind-III-Schnittstelle:
5`-ATC AAG CTT GCC GGG AGA TCT TGT CTG TGG-3`
TRPM-2 reverse mit Xba-I-Schnittstelle:
5`-AGT TGC ATG CAG GAG CAA TTC TCT AGA GGA-3`
TRPM-2 forward (ohne Schnittstelle):

5`-GCC GGG AGA TCT TGT CTG TGG-3`

TRPM-2 reverse (ohne Schnittstelle):

5`-AGT TGC ATG CAG GAG CAA TTC-3`

Taq-PCR-Polymerase (QIAGEN)

- Taq-DNA-Polymerase
- PCR-Puffer (10x): Tris·Cl; KCl; $(NH_4)_2SO_4$; 15 mM $MgCl_2$; pH 8,7
- dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dGTP
- H_2O, RNase-frei

Methode

Gemäß dem Pipettierschema werden alle Komponenten der Reihe nach in sterile, DNase- und RNase-freie PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Die PCR erfolgt nach angegebenem Protokoll.

Pipettierschema entsprechend dem Taq PCR Polymerase Kit nach QIAGEN®

Tabelle 6: Pipettierschema nach dem Taq PCR Polymerase Kit (QIAGEN)

Komponente	*Volumen*	*Konzentration*
H_2O (DEPC-behandelt)	variabel	-
PCR-Puffer (10x)	10 µl	-
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	2 µl	0,4 mM
Primer forward (5 µM)	3 µl	0,3 µM
Primer reverse (5 µM)	3 µl	0,3 µM
Template-RNA	variabel	1 µg Gesamt-RNA
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

Tabelle 7: Temperaturprotokoll für die PCR nach dem Taq PCR Polymerase Kit (QIAGEN)

1x	Denaturierung des Templates bei 94 °C 2 min
10x	Denaturierung bei 94 °C 30 s Annealing bei 50 °C 30 s Verlängerung bei 74 °C 3 min
25x	Denaturierung bei 94 °C 30 s

	Annealing bei 50 °C 30 s Verlängerung bei 74 °C 3 min + Zyklusverlängerung von 5 s für jeden Zyklus
1x	Im letzten Zyklus Verlängerung bei 74 °C 7 min

6.9.4 Aufreinigung von DNA mittels Ethanolfällung

Die Aufreinigung von DNA kann nach einem Restriktionsverdau dann notwendig sein, wenn nur ausgewählte DNA-Abschnitte für die weitere Versuchsdurchführung benötigt werden.

Prinzip

Der Ansatz des Restriktionsverdaus wird elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt (siehe 6.3.3), die DNA der benötigten Bande durch Ethanolfällung aufgereinigt.

Lösungen und Chemikalien

Natriumacetat-Lösung 3 M
Ethanol p.A.(Roth)
Ethanol 70%ig

Materialien

RNase- und DNase-freie PCR-Reaktionsgefäße (Greiner)
Silanisierte Glaswolle

Methode

Die unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnittene Bande wird in ein Reaktionsgefäß gegeben, das zuvor mit einem feinen Loch als Auslass versehen und zu etwa einem Drittel mit silanisierter Glaswolle dicht bepackt wurde. Das verschlossene Gefäß wird mindestens zwei Stunden bei -20 °C oder kurz in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, danach in ein größeres Reaktionsgefäß gehängt und für zehn Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Anschließend kann die sich im größeren Gefäß befindende DNA mit einem Zehntel Volumenanteil 3 M Natriumacetat-Lösung und einem zwei- bis dreifachen Volumenanteil Ethanol p. A.

bei -20 °C (mindestens zwei Stunden) gefällt werden. Es folgt erneut ein zehnminütiges Zentrifugieren bei 14 000 rpm. Der Überstand wird verworfen, die DNA fünf Minuten an der Luft getrocknet und in 10 µl DEPC-behandeltem Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

6.9.5 Ligation von DNA

Die Verknüpfung des Vektors mit dem zu klonierenden Fragment bezeichnet man bei der Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls als Ligation.

Prinzip

Die verwendete T4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung zwischen zwei benachbarten 3`-Hydroxy- und 5`-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA. ATP dient dabei als Energieträger. Das molare Verhältnis von Insert zum Vektor sollte bei kohäsiven Enden 1:1 bis 2:1 betragen. (Maniatis et al., 1989; Brown, 1996)

Lösungen und Chemikalien

T4-DNA-Ligase	5 units/µl (BMI)
Ligasepuffer	(10x) (BMI)

Methode

Plasmid, Insert, Ligasepuffer und T4-DNA-Ligase werden eine Stunde bei 22 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Ligase (zehn Minuten bei 65 °C) kann der Ansatz direkt zur Transformation von E.coli (siehe 6.2) verwendet werden.

6.10 Transgener Reportergenassay in Hefen

Zum Screening von Genexpression und -regulation ist die Verwendung stabil transfizierter Hefen eine leicht durchführbare und kostengünstige Alternative zu Untersuchungen in Säugerzellen.

6.10.1 Hefekultur

Lösungen und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, wenn nicht extra erwähnt, wurden von Sigma-Aldrich Chemie bezogen.

Minimalmedium

13,61 g KH_2PO_4; 1,98 g $(NH_4)_2SO_4$ (Merck); 4,2 g KOH; 0,2 g $MgSO_4$; 1 ml $Fe_2(SO_4)_3$-Lösung (40 mg $Fe_2(SO_4)_3$/50 ml H_2O); 50 mg L-Leucin; 50 mg L-Histidin; 50 mg Adenin (Fluka); 20 mg L-Arginin*HCl; 20 mg L-Methionin; 30 mg L-Tyrosin; 30 mg L-Isoleucin; 30 mg L-Lysin*HCl; 25 mg L-Phenylalanin; 100 mg L-Glutaminsäure (Merck); 150 mg L-Valin (Merck); 375 mg L-Serin (Merck); bidest. H_2O ad. 1000 ml; Sterilfiltration (0,2 µm); Lagerung in Glasflaschen bei 4 °C

Vitaminlösung

8 mg Thiamin*HCl; 8 mg Pyridoxin; 8 mg D-Pantothensäure; 40 mg meso-Inositol; 20 ml Biotin-Lösung (2 mg Biotin/100 ml H_2O); bidest. H_2O ad. 180 ml; Sterilfiltration (0,2 µm); Lagerung in Glasflaschen bei 4 °C

D-(+)-Glucose-Lösung

20%ige D-(+)-Glucose-Lösung in bidest. H_2O; Sterilfiltration (0,2 µm); Lagerung in Glasflaschen bei 4 °C

L-Asparaginsäure-Lösung

4 mg L-Asparaginsäure (Merck)/ml bidest. H_2O; Sterilfiltration (0,2 µm); Lagerung in Glasflaschen bei 4 °C

L-Threonin-Lösung

24 mg L-Threonin (Merck)/ml bidest. H_2O; Sterilfiltration (0,2 µm); Lagerung in Glasflaschen bei 4 °C

Kupfersulfat-Lösung

20 mM $CuSO_4$-Lösung (159,6 mg $CuSO_4$/50 ml bidest. H_2O); Sterilfiltration (0,2 µm); Lagerung in Glasflaschen bei 4 °C

Wachstumsmedium

5 ml Glucose-Lösung; 0,5 ml Vitaminlösung; 125 µl $CuSO_4$-Lösung; 1,25 ml Asparaginsäure-Lösung; 0,4 ml L-Threonin-Lösung mit 45 ml Minimalmedium mischen

Hefe-Stämme

Saccharomyces cerevisiae mit Expressionsplasmid für hER bzw. hAR und β-Galactosidase kodierendem *lacZ*-Gen (Glaxo)

Materialien

sterilisierte Erlenmeyerkolben (250 ml)
sterilisierte Pipetten

Geräte

Sterilbank (ant air HB6)
HT-Schüttelinkubator

Methode

Heranziehen von Hefekulturen

Die aufgetaute Hefe-Stammkultur wird als Übernachtkultur für 24 Stunden in 52 ml Wachstumsmedium unter Schütteln (160 bis 200 rpm) bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte von 1 herangezogen.

Anlegen einer Stammkultur

Die mittels Zentrifugation (200 G, zehn Minuten) zehnfach aufkonzentrierte Suspension aus der Übernachtkultur wird mit 15 % Glycerol bei -20 °C (> 3 Monate bei -80 °C) gelagert.

6.10.2 Yeast-Screen-Assay

Die Hefe-Stämme *Saccharomyces cerevisiae* hER bzw. hAR ermöglichen ein schnelles Screening auf estrogene/antiestrogene bzw. androgene/antiandrogene Aktivität von Testverbindungen.

Prinzip

Neben hER bzw. hAR enthalten die Hefen das Hormon Responsive Promotorelement mit dem β-Galactosidase codierenden *lac-Z*-Gen. Gemessen wird die enzymatische Aktivität der β-Galactosidase als Farbumschlag von Gelb nach Rot durch die Umsetzung des Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosids.

Lösungen und Chemikalien

Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid (CPRG) (Boehringer Mannheim)
10 mg Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid/ml bidest. H_2O; Sterilfiltration (0,2 µm); Lagerung in Glasflaschen bei 4 °C

Testmedium
0,5 ml CPRG-Lösung + 50 ml frisch angesetztes Wachstumsmedium

Materialien

96-Loch-Titerplatten

Geräte

Brutschrank B5100 E (Heraeus)
IKA®-Schüttler MTS4 electronic
LKB Biochrom Novaspec II-Photometer
Lambda Spectral 340 (MWG-Biotech)

Methode

In 96-Loch-Titerplatten werden jeweils 1 bis 2 µl der in Ethanol gelösten Substanz pipettiert. 17β-Estradiol (5×10^{-8} bis 5×10^{-12} M) bzw. DHT (10^{-6} bis 10^{-11} M) dienen als Positivkontrolle.
Die Testkultur setzt sich aus 50 ml Testmedium und 0,5 ml Übernachtkultur (optische Dichte von 1) zusammen. 200 µl der Testkultur werden in jedes Loch der Titerplatten pipettiert und 48 Stunden unter Schütteln (500 rpm) bei 30 °C inkubiert.
Die enzymatische Aktivität der β-Galactosidase wird als Rotfärbung bei 540 nm, die Zelldichte als Trübung bei 620 nm mittels Plattenphotometer gemessen.

6.11 Glucosidaseverdau

Der Glucosidaseverdau ermöglicht die enzymatische Abspaltung der Glucose vom Aglycon.

Lösungen und Chemikalien

β-Glucosidase (Serva)

β-Glucosidase 8,3 units/mg

Natriumacetat-Puffer

0,1 M Natriumacetat; pH 5

Geräte

Schüttelwasserbad

Methode

Für den Glucosidaseverdau wird ein Aliquot des in DMSO gelösten Glucosids mit einem mg β-Glucosidase pro ml Natriumacetat-Puffer für 60 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Der Ansatz kann direkt für Inkubationen in der Zellkultur eingesetzt werden.

7 LITERATUR

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

Ardies, C.M. and Dees, C. (1998): Xenoestrogens significantly enhance risk for breast cancer during growth and adolescence. Medical Hypotheses, **50**, 457–464.

Arukwe, A.; Knudsen, F.R. and Goksøyr, A. (1997): Fish zona radiata (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. Environmental Health Perspectives, **105**, 418–422.

Ashby, J. and Tinwell, H. (1998): Uterotrophic activity of Bisphenol A in the immature rat. Environmental Health Perspectives, **106**, 719–720.

Ashby, J.; Tinwell, H.; Pennie, W.; Brooks, A.N.; Lefevre, P.A.; Beresford, N. and Sumpter, J.P. (1999): Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects. Journal of Applied Toxicology, **19**, 39–45.

ATCC (2000): Cell line designation: T-47D. American Type Culture Collection, Catalog No.HTB–133.

Attali, G.; Weizman, A.; Gil-Ad, I. and Rehavi, M. (1997): Opposite effects of ovarian hormones on rat brain dopamine and serotonin transporters. Brain Research, **756** (1-2), 153–159.

Bagheri, H.; Lhiaubet, V.; Montastruc, J.L. and Chouini-Lalanne, N. (2000): Photosensitivity to ketoprofen: Mechanisms and pharmacoepidemiological data. Drug Safety, **22** (5), 339–349.

Baker, V.A.; Hepburn, P.A.; Kennedy, S.J.; Jones, L.J.; Sumpter, J.P. and Ashby, J. (1999): Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of *in vivo* and *in vitro* assays. Food and Chemical Toxicology, **27**, 13–22.

Balleine, R.L. and Clarke, C.L. (2001): Expression of the oestrogen responsive protein pS2 in human breast cancer. Histol. Histopathol., **14**, 571–578.

Barkay, J.; Harpaz-Kerpel, S.; Ben-Ezra, S.; Gordon, S. and Zuckerman, H. (1984): The prostaglandin inhibitor effect of antiinflammatory drugs in the therapy of male infertility. Fertility and Sterility, **42**, 406–411.

Basley, J.-P.; Marre-Fournier, F.; Le Bail, J.-C.; Habrioux, G. and Chulia, A.J. (2000): Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (*E*)- and (*Z*)-resveratrol. Life Sciences, **66** (9), 769–777.

Beato, M. (1989): Gene regulation by steroid hormones. Cell, **56**, 335–344.

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

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

Beato, M. (1996): Chromatin structure and the regulation of gene expression: remodeling at the MMTV promotor. Journal of Molecular Medicine, **74**, 711–724.

Beato, M.; Herrlich, P. and Schütz, G. (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Cell, **83**, 851–857.

Beato, M. and Klug, J. (2000): Steroid hormone receptors: an update. Human Reproduction Update, **6** (3), 225–236.

Belikov, S.; Gelius, B. and Wrange, Ö. (2001): Hormone-induced nucleosome positioning in the MMTV promoter is reversible. The EBBO Journal, **20** (11), 2802–2811.

Bergstrom, R.; Adami, H.O.; Mohner, M.; Zatonski, W.; Storm, H.; Ekbom, A.; Tretli, S.; Teppo, L.; Akre, O. and Hakulinen, T. (1996): Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. Journal of National Cancer Institute, **88** (11), 727–733.

Bigsby, R.M.; Caperell-Grant, A. and Madhukar, B.V. (1997): Xenobiotics released from fat during fasting produce estrogenic effects in ovarectomized mice. Cancer Research, **57**, 865–869.

Bowers, J.L.; Tyulmenkov, V.V.; Jernigan, S.C. and Klinge, C.M. (2000): Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors α and β. Endocrinology, **141** (10), 3657–3667.

Bolt, H.M. und Degen, G.H. (2000): Hormoneffekte von Chemikalien in Nahrung und Umwelt. Chemie in unserer Zeit, **34** (1), 30–37.

Boxenbaum, H. (1999): Cytochrome p450 3A4 *in vivo* ketoconazole competitive inhibition: determination of Ki and dangers associated with high clearance drugs in general. J Pharm Pharmaceut Sci, **2** (2), 45–52.

Brown, T.A. (1996): Gentechnologie für Einsteiger, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg – Berlin – Oxford.

Brzozowski, A.M.; Pike, A.C.W.; Dauter, Z.; Hubbard, R.E.; Bonn, T.; Engström, O.; Öhman, L.; Greene, G.L.; Gustafsson, J.Å. and Carlquist, M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature, **389**, 753–758.

Buchner, J. (1999): Hsp90 & Co. - a holding for folding. TIBS, **24**, 136–141.

Buckholz, R.G. (1993): Yeast systems for the expression of heterologous gene products. Current Opinion in Biotechnology, **4**, 538–542.

Cadepond, F.; Gasc, J.-M.; Delahaye, F.M; Jibard, N.; Schweizer-Groyer, G.; Segard-Maurel, I.; Evans, R. and Baulieu, E.-E. (1992): Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticoid receptor. Experimental Cell Research, **201**, 99–108.

Carlsen, E.; Giwereman, A.; Keiding, N. and Skakkebaek, N. (1992): Evidence of decreasing quality of semen during the past 50 years. Br Med J, **305**, 609–613.

Cheek, A.O.; Brouwer, T.H.; Carroll, S.; Manning, S.; McLachlan, J.A. and Brouwer, M. (2001): Experimental evaluation of vitellogenin as a predictive biomarker for reproductive disruption. Environmental Health Perspectives, **109**, 681–690.

Chen, H.; Tritton, T.R.; Kenny, N.; Absher, M. and Chiu, J.-F. (1996): Tamoxifen induces TGF-β1 activity and apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells in vitro. Journal of Cellular Biochemistry, **61**, 9–17.

Church Landel, C.; Kushner, P.J. and Greene, G.L. (1995): Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interaction. Environmental Health Perspectives, **103** (Suppl. 7), 23–28.

Clontech (1999): Luminescent β-gal – User Manual.

Colborn, T. and Clement, C. (1992): Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. Princeton Scientific Publishing Co., Princeton-New Jersey.

Colborn, T.; vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environmental Health Perspectives, **101**, 378–384.

Coldham, N.G. and Sauer, M.J. (2001): Identification, quantification and biological activity of phytoestrogens in a diatary supplement for breast enhancement. Food Chem Toxicol, **39** (12), 1211–1124.

Couette, B.; Le Ricousse, S.; Fortin, D.; Rafestin-Obelin and Richard-Foy, H. (1994): The establishment of the long terminal repeat of the mouse mammary tumor virus into CV-1 cells allows a functional analysis of steroid receptors. Biochimica et Biophysica Acta, **1219** (3), 607–612.

Dalton, J.T.; Mukherjee, A.; Zhu, Z.; Kirkovsky, L. and Miller, D.D. (1998): Discovery of nonsteroidal androgens. Biochemical and Biophysical Research Communications, **244**, 1–4.

Daneshmend, T.K. and Warnock, D.W. (1988): Clinical pharmacokinetics of ketoconazol. Clinical Pharmacokinetics, **14**, 13–34.

Danzo, B.J. (1998): The effects of environmental hormones on reproduction. CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences, **54**, 1249–1264.

Daston, G.P.; Gettings, S.D.; Carlton, B.D.; Chudkowski, M.; Davis, R.A.; Kraus, A.L.; Luke, C.F.; Oellette, R.E.; Re, T.A.; Hoberman, A.M. and Sambuko, C.P. (1993): Assessment of the reproductive toxic potential of dermally applied 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone to male B6C3F1 mice. Fundam Appl Toxicol, **20** (1), 120–124.

Daughton, C.G. and Ternes, T.A. (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? Environmental Health Perspectives, **107** (Suppl. 6), 907–938.

DeHart, R.M. and Morehead, M.S. (2001): Mifepristone. The annals of Pharmacotherapy, **35**, 707–719.

DiPaola, R.S.; Zhang, H.; Lambert, G.H.; Meeker, R.; Licitra, E.; Rafi, M.M.; Zhu, B.T.; Spaulding, H.; Goodin, S.; Toledano, M.B.; Hait, W.N. and Gallo, M.A. (1998): Clinical and biologic activity of an estrogenic herbal combination (PC-SPES) in prostate cancer. The New England Journal of Medicine, **339** (12), 785–791.

Dobson, M.J.; Tuite, M.F.; Roberts, N.A.; Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M.; Perkins, R.E.; Conroy, S.C.; Dunbar, B. and Fothergill, L.A. (1982): Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Research, **10** (8), 2625–2637.

DSMZ (1999): Information sheet for cell lines: LNCaP. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Abt. Menschliche und Tierische Zellkulturen.

Dudley, M.W.; Sheeler, C.; Wang, H. and Khan, S. (2000): Activation of the human estrogen receptor by the antiestrogen ICI 182 780 and tamoxifen in yeast genetic systems: Implications for their mechanism of action. PNAS, **97** (7), 3696–3701.

EDSTAC (1998): EDSTAC Final Report, Chapter Five: Screening und Testing, 1–95.

Ercoli, A.; Battaglia, A.; Raspaglio, G.; Fattorossi, A; Alimonti, A.; Petrucci, F.; Caroli, S.; Mancuso, S. and Scambia, G. (2000): Activity of cisplatin and ICI 182 780 on estrogen receptor negative ovarian cancer cells: cell cycle and cell replication rate perturbation, chromation texture alteration and apoptosis induction. International Journal of Cancer, **85**, 89–103.

Ercoli, A.; Scambia, G.; Fattorossi, A; Raspaglio, G.; Battaglia, A.; Cicchillitti, L.; Malorni, W.; Rainaldi, G.; Benedetti, P. and Mancuso, S. (1998): Comparative study on the induction of cytostasis and apoptosis by ICI 182 780 and tamoxifen in an estrogen receptor-negative ovarian cancer cell line. International Journal of Cancer, **76**, 47–54.

Fairchild, W.L.; Swansburg, E.O.; Arsenault, J.T. and Brown, S.B. (1999): Does an association between pesticides use and subsequent declines in catch of atlantic

Salmon (*Salmo salar*) represent a case of endocrine disruption? Environmental Health Perspectives, **107**, 349–358.

Fang, H.; Tong, W.; Shi, L.M.; Blair, R.; Perkins, R.; Branham, W.; Hass, B.S.; Xie, Q.; Dial, S.L.; Moland, C.L. and Sheehan, D.M. (2001): Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. Chemical Research of Toxicology, **14**, 280–294.

Ferguson, S.A.; Scallet, A.; Flynn, K.M.; Meredith, J.M. and Schwetz, B.A. (2000): Development neurotoxicity of endocrine disruptors: focus on estrogens. Neurotoxicology, **21** (6), 947–956.

Ferguson, R.A.; Yu, H.; Kalyvas, M.; Zammit, S. and Diamandis, E.P. (1996): Ultrasensitive detection of prostate-specific antigen by a time-resolved immunofluorometric assay and the Immulite® immunochemiluminescent third-generation assay: potential applications in prostate and breast cancers. Clinical Chemistry, **42** (5), 675–684.

Fisch, H.; Goluboff, E.T.; Olson, J.H.; Feldshuh, J.; Broder, S.S. and Barad, D.H. (1996): Semen analyses in 1283 men from the United States over 25-year period: no decline in quality. Fertil Steril, **65**, 1009–1014.

Forman, B.M. and Samuels, H.H. (1990): Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. Molecular Endocrinology, **4**, 1293–1301.

Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K. (1996): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7., völlig neu bearbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin – Oxford.

Frühwald, S.; Löffler, H. und Baumhackl, U. (1999): Depressionen nach zerebrovasculären Ereignissen. Fortschr. Neurol. Psychiat., **67**, 155–162.

Furlong, E.E.M.; Keon, N.K.; Thornton, F.D.; Rein, T. and Martin, F. (1996): Expression of a 74-kDa nuclear factor 1 (NF1) protein is induced in mouse mammary gland involution. The Journal of Biological Chemistry, **271** (47), 29688–29697.

Garcia-Rodriguez, J.; Garcia-Martin, M.; Nogueras-Ocaña, M.; de Dios Luna-del-Castillo, J.; Garcia, M.E.; Olea, N. and Lardelli-Claret, P. (1996): Exposure to

pesticides and chryptorchism: Geographical evidence of a possible association. Environmental Health Perspectives, **104**, 1090–1095.

Gassen, H.G.; Bertram, S. (1991): Gentechnische Methoden. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

Gassen, H.G.; Sachse, G.E.; Schulte, A. (1994): PCR: Grundlagen und Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion. Gustav Fischer Verlag Stuttgart – Jena – New York.

Gensler, M. (1999): *In-vitro*-Untersuchungen estrogener Effekte mit Hilfe der zell- und molekularbiologischen Methoden RT-PCR, Reportergenassay und Bandshiftassay. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.

Gluzman, Y. (1981): SV-40-transformed simian cells support the replication of early SV-40 mutants. Cell, **23**, 175–182.

Gotthardis, M. und Jordan, C. (1988): Development of Tamoxifen stimulated growth of MCF-7 tumors in thymic mice after long-term antiestrogen administration. Cancer Research, **48**, 5183–5187.

Graumann, K. and Jungbauer, A. (2000): Agonistic and synergistic activity of tamoxifen in a yeast model system. Biochemical Pharmacology, **59**, 177–185.

Gray, L.E., Jr; Ostby, J.; Furr, J.; Wolf, C.J.; Lambright, C.; Parks, L.; Veeramachaneni, D.N.; Wilson, V.; Price, M.; Hotchkiss, A.; Orlando, E. and Guillette, L. (2001): Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. Human Reproduction Update, **7** (3), 248–264.

Gray, L.E., Jr; Wolf, C.J.; Lambright, C.; Mann, P.; Price, M.; Cooper, R.L. and Osby, J. (1999): Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p`-DDE, and ketoconazol) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. J. Toxicol. Ind. Health, **15**, 94–118.

Green, S. and Chambon, P. (1988): Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. Trends in Genetic, **4** (11), 309–314.

Gronemeyer, H. (1992): Control of transcription activation by steroid hormone receptors. The FASEB Journal, **6**, 2524–2529.

Gronen, S.; Denslow, N.; Manning, S.; Barnes, S.; Barnes, D. and Brouwer, M. (1999): Serum vitellogenin levels and reproductive Impairment of male japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. Environmental Health Perspectives, **107**, 385–390.

Guiochon-Mantel, A.; Loosfelt, H.; Lescop, P.; Sar, S.; Atger, M.; Perrot-Applanat, M. and Milgrom, E. (1989): Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. Cell, **57**, 1147–1154.

Gundermann; McCapra (1987): Chemiluminescence in Organic Chemistry. Springer Verlag Berlin – Heidelberg – New York – Paris – Tokyo.

Günzburg, W.H. and Salmons, B. (1992): Factors controlling the expression of mouse mammary tumor virus. Biochem. J., **283**, 625–632.

Guth, S. (2000): Etablierung von *In-vitro*-Testsystemen zur Erfassung androgener/antiandrogener Wirkung und rechnergestützte Identifizierung hormonell relevanter Strukturelemente. Dissertation, Universität Kaiserslautern.

Hanby, A.M.; McKee, P.; Jeffrey, M.; Grayson, W.; Dublin, E.; Poulsom, R. and Maguire, B. (1998): Primary mucinous carcinomas of the skin express TFF1, TFF3, estrogen receptor, and progesterone receptors. The American Journal of Surgical Pathology, **22** (9), 1125–1131.

Hartmann, A. (1991): Luciferase als Reportergen der genetischen Regulation. BioTech Fachmagazin für Biotechnologie, **5**, Sonderdruck.

Harris, C.A.; Henttu, P.; Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1997): The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. Environmental Health Perspectives, **105** (8), 802–811.

Hedden, A.; Müller, V. and Jensen, E.V. (1995): A new interpretation of antiestrogen action. Annals of the New York Academy of Science, **761**, 109–120.

Heery, D.M.; Kalkhoven, E.; Hoare, S. and Parker, M.G. (1997): A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. Nature, **387**, 733–736.

Herath, C.B.; Watanabe, G.; Katsuda, S.; Yoshida, M.; Suzuki, A.K. and Taya, K. (2000): Exposure of neonatal female rats to *p-tert*-octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood. Biology of Reproduction, **64**, 1216–1224.

Hill, C.S. and Treisman, R. (1995): Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specifity. Cell, **80**, 199–211.

Höll, A. (2000): *In-vitro*-Untersuchungen estrogener Effekte von Phyto- und Xenoestrogenen vermittelt durch die Estrogenrezeptorsubtypen α und β. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.

Hopert, A.-C.; Beyer, A.; Frank, K.; Strunck, E.; Wünsche, E. and Vollmer, G. (1998): Characterisation of estrogenicity of phytoestrogens in an endometrial-derived experimental model. Environmental Health Perspectives, **106**, 581–586.

Horoszewicz, J.S.; Leong, S.S.; Kawinski, E.; Karr, J.P.; Rosenthal, H.; Chu, T.M.; Mirand, E.A. and Murphy, G.P. (1983): LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Research, **43**, 1809–1818.

Huang, W.; Shostak, Y.; Tarr, P.; Sawyers, C. and Caray, M. (1999): Cooperative assembly of androgen receptor into a nucleoprotein complex that regulates the prostate-specific antigen enhancer. The Journal of Biological Chemistry, **274** (36), 25756–25768.

Hsieh, T.-C.; Chen, S.S.; Wang, X. and Wu, J.M. (1997): Regulation of androgen receptor (AR) and prostate specific antigen (PSA) expression in the androgen-responsive human prostate LNCaP cells by ethanolic extracts of the Chinese herbal preparation, PC-SPES. Biochemistry and Molecular Biology International, **42** (3), 535–544.

Hsieh, T.-C. and Wu, J.M. (2000): Grape-derived chemopreventive agent resveratrol decreases prostate-specific antigen (PSA) expression in LNCaP cells by an androgen receptor (AR)-independent mechanism. Anticancer Research, **20**, 225–228.

Irvine, S.; Cawood, E.; Richardson, D.; MacDonald, E. and Aitken, J. (1996): Evidence for deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. Brit Med J, **312**, 467–471.

Jager, M. (1992): Untersuchungen zum Wirkmechanismus und zum pharmakokinetischen Verhalten von n-(2-Chlorethyl)-N-nitrosocarbamoyl-L-alanyl-17-dihydrotestosteron. Dissertation, Universität Kaiserslautern.

Jenster, G.; van der Korput, H.A.G.M.; van Vroonhoven, C.; van der Kwast, T.H.; Trapman, J. and Brinkmann, A.O. (1991): Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. Molecular Endocrinology, **5**, 1396–1404.

Jenster, G.; Trapman, J. and Brinkmann, A.O. (1993): Nuclear import of the human androgen receptor. Biochem. J., **293**, 761–768.

Jobling, S.; Reynolds, T.; White, R.; Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1995): A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. Environmental Health Perspectives, **103** (6), 582–587.

John Radcliffe Hospital Study Group (1986): Cryptorchism: an apparent subtantial increase since 1960. Br Med J, **293** (2), 97–102.

Jordan, V.C. (1998): Antiestrogenic action of raloxifene and tamoxifen: today and tomorrow. Journal of the National Cancer Institute, **90** (13), 967–971.

Kanai, H.; Barrett, J.C.; Metzler, M. and Tsutsui, T. (2001): Cell-transforming activity and estrogenicity of bisphenol-A and 4 of its analogs in mammalian cells. International Journal of Cancer, **93**, 20–25.

Kato, S.; Masuhiro, Y.; Watanabe, M.; Koboyashi, Y.; Takeyama, K.-I.; Endoh, H. and Yanagisawa, J. (2000): Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. Genes to Cells, **5**, 593–601.

Katzenellenbogen, B.S. (2000): Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways. Journal of Society for Gynecologic Investigation, **7**, 33–37.

Katzenellenbogen, B.S. and Katzenellenbogen, J.A. (2000): Estrogen receptor transcription and transactivation; estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. Breast-Cancer Research, **2**, 335–344.

Kelce, W.R.; Gray, L.E. and Lambright, C.R. (2001): Antiandrogens as environmental endocrine disruptors. Reprod. Fertil. Dev., **10**, 105–111.

Kelce, W.R.; Lambright, C.R.; Gray, L.E., Jr; and Roberts, K.P. (2001): Vinclozolin and p,p`-DDE alter androgen-dependant gene expression: *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. Toxicology and Applied Pharmacology, **142**, 192–200.

Kelce, W.R.; and Wilson, E.M. (1997): Environmental antiandrogens: development effects, molecular mechanisms, and clinical implications. J Mol Med, **75**, 198–207.

Kemppainen, J.A.; Lane, M.V.; Sar, M. and Wilson, E.M. (1992): Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. The Journal of Biological Chemistry, **267** (2), 968–974.

Kemppainen, J.A.; Langley, E.; Wong, C.-I.; Bobseine, K.; Kelce, W.R. and Wilson, E.M. (1999): Distinguishing androgen receptor agonists and antagonists: distinct metabolisms of activation by medroxyprogesterone acetate and Dihydrotestosterone. Molecular Endocrinology, **13**, 440–454.

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

Kim, J.; Petz, L.N.; Ziegler, Y.S.; Wood, J.R.; Potthoff, S.J. and Nardulli, A.M. (2000): Regulation of the estrogen-responsive pS2 gene in MCF-7 human breast cancer cells. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, **74**, 157–168.

Klein-Hitpaß, L.; Schorpp, M.; Wagner, U. and Ryffel, G.U. (1986): An estrogen-responsive element derived from the 5`-flanking region of the Xenopus Vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. Cell, **46**, 1053–1061.

Klijn, J.G.M.; Setyono-Han, B. and Foekens, J.A. (2000): Progesterone antagonists and progesteron receptor modulators in the treatment of breast cancer. Steroids, **65**, 825–830.

Klinge, C.M. (2001): Estrogen receptor interaction with estrogen responsive elements. Nuclear Acid Research, **29** (14), 2905–2919.

Koch-Brandt, C. (1993): Gentransfer: Prinzipien – Experimente – Anwendungen bei Säugern. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York.

Kopp, P. (1998): Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the „French paradoxon“? European Journal of Endocrinology, **138**, 619–620.

Kortenkamp, A.; Altenburger, R. (1998): Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. The Science of the Total Environment, **221**, 59–73.

Kyprianou, N.; English, H.F.; Davidson, N.E. and Isaacs, J.T. (1991): Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. Cancer Research, **51**, 162–166.

Lamb, D.J.; Weigel, N.L. and Marcelli, M. (2001): Androgen receptors and their biology. Vitamins and Hormons, **62**, 199–230.

Lambright, C.; Ostby, J.; Bobseine, K.; Wilson, V.; Hotchkiss, A.K.; Mann, P.C. and Gray, L.E., Jr (2000): Cellular and molecular mechanisms of action of Linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. Toxicological Sciences, **56**, 389–399.

Lee, C.; Janulis, L.; Ilio, K.; Shah, A.; Park, I.; Kim, S.; Cryns, V.; Pins, M. and Bergan, R. (2000): In vitro models of prostate apoptosis. Clusterin as an antiapoptotic mediator. The Prostate Supplement, **9**, 21–24.

Lindl, T., Bauer, J. (1987): Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

Liu, Z.; Wong, J.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.-J. and O`Malley, B.W. (1999): Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) enhances ligand dependent and receptor-dependent cell-free transcription of chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 9485–9490.

Lu, R. and Serrero, G. (1999): Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. Journal of Cellular Physiology, **179**, 297–304.

Madigou, T.; Le Goff, P.; Salbert, G.; Cravedi, J.P.; Segner, H.; Pakdel, F and Valotaire, Y. (2001): Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, **53**, 173–186.

Magklara, A.; Scorilas, A.; López-Otín, C.; Vizoso, F.; Ruibal, A. and Diamandis, E.P. (1999): Human glandular kallikrein in breast milk, amniotic fluid, and breast cyst fluid. Clinical Chemistry, **45** (10), 1774–1780.

Maniatis, T.; Sambrook, J.; Fritsch, E. (1989): Molecular Cloning, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview.

Martin, V.; Ribieras, S.; Rio, M.-C. and Dante, R. (1998): The estrogen responsive element of the pS2 gene is recognized by a methylation sensitive DNA binding protein. Biological Chemistry, **379**, 409–416.

McDonnell, D.P.; Dana, S.L.; Hoener, P.A.; Lieberman, B.A.; Imhof, M.O. and Stein, R.B. (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. (2001): Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. Endocrine Reviews, **22** (3), 319–341.

Melis, M.S. (1999): Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. Journal of Ethnopharmacology, **167**, 157–161.

Michel, D.; Chatelain, G.; Herault, Y. and Brun, G. (1995): The expression of the avian clusterin gene can be driven by two alternative promoters with distinct regulatory elements. European Journal of Biochemistry, **229**, 215–223.

Michel, D.; Chatelain, G.; North, S. and Brun, G. (1997): Stress-induced transcription of the *clusterin/apoJ* gene. Journal of Biochemistry, **328**, 45–50.

Miljøproject nr.290 (1995): Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Ministry of Environment and Energy, Denmark, Danish Environmental Projection Agency, Miljø- og Energiministeriet Miljøstyrelsen.

Milligan, S.R.; Kalita, J.C.; Heyerick, A.; Rong, H.; de Cooman, L. and de Keukeleire, D. (1999): Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus L.*) and beer. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **83** (6), 2249–2252.

Milligan, S.R.; Kalita, J.C.; Pocock, V.; Heyerick, A.; de Cooman, L.; Rong, H. and de Keukeleire, D. (2002): Oestrogenic activity of the hop phytooestrogen, 8-prenylnaringenin. Reproduction, **123** (2), 235–242.

Milligan, S.R.; Kalita, J.C.; Pocock, V.; van de Kauter, V.; Stevens, J.F.; Dainzer, M.L.; Rong, H. and de Keukeleire, D. (2000): The endocrine activity of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus L.*) flavonoids. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **85** (12), 4912–4915.

Milpied-Homsi, B. (2001): Allergies aux gels de kétoprofène. La Presse Médicale, **30**, 605–609.

Mußler, B. (1999): Etablierung von *In-vitro*-Methoden zur Erfassung von endokrinen Disruptoren. Dissertation, Universität Kaiserslautern.

Mutschler, E. (1981): Arzneimittelwirkungen – Ein Lehrbuch der Pharmakologie für Pharmazeuten, Chemiker und Biologen. 4., völlig neu bearbeitete Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Nakagawa, Y. and Suzuki, T. (2002): Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells. Chem Biol Interact, **139** (2), 115–128.

National Toxicological Programme (1992): NTP-Studie TOX-21.

Nijman, J.M.; Schraffordt Koops, H.; Oldhoff, J.; Kremer, J. and Jager, S. (1987): Sexual function after bilateral retroperitoneal lymph node dissection for nonseminomatous testicular cancer. Arch Androl, **18** (3), 255–267.

Nikov, G.N.; Hopkins, N.E.; Boue, S. and Alworth, W.L. (2000): Interaction of diatary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor - estrogen responsive element complex formation. Environmental Health Perspectives, **108** (9), 867–872.

Nimrod, A. and Benson, W. (1996): Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. Critical Reviews in Toxicology, **26** (3), 335–364.

Nishikawa, J.; Saito, K.; Goto, J.; Dakeyama, F.; Matsuo, M. and Nishihara, T. (1999): New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. Toxicology and Applied Pharmacology, **154**, 76–83.

Ochsenkuhn, R.; Kamischke, A. and Nieschlag, E. (1999): Imipramine for successful treatment of retrograde ejaculation caused by retroperitoneal surgery. Int J Androl, **22** (3), 173–177.

OECD (1996): European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Report of Proceedings, 2-4 December, Weybridge, UK.

Okereke, C.S.; Abdel-Rhaman, M.S. and Friedman, M.A. (1994): Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats. Toxicological Letters, **73** (2), 113–122.

Okubo, T.; Yokoyama, Y.; Kano, K. and Kano, I (2001): ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR. Food Chem Toxicol, **39** (12), 1225–1232.

Olea, N.; Pulgar, R.; Pérez, P.; Olea-Serrano, F.; Ravis, A.; Noviollo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (1996): Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in density. Environmental Health Perspectives, **104** (3), 298–305.

Oliveira-Filho, R.M.; Uehara, O.A.; Minetti, C.A.S.A. and Valle, L.B.S. (1989): Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni in rats: endocrine effects. Gen. Pharmac., **20** (2), 187–191.

Ouyang, X.S.; Wang, X.; Lee, D.T.W.; Tsao, S.W. and Wong, Y.C. (2001): Up-regulation of TRPM-2, MMP-7 and ID-1 during sex hormone-induced prostate carcinogenesis in the noble rat. Carcinogenesis, **22** (6), 965–973.

Packham, E.A.; Graham, I.R. and Chambers, A. (1996): The multifunctional transcription factors Abf1p, Rap1p and Reb1p are required for full transcriptional activation of the chromosomal *PGK* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet, **250**, 348–356.

Paganetto, G.; Campi, F.; Varani, K.; Piffanelli, A.; Giovannini, G. and Borea, A. (2000): Endocrine-disrupting agents on healthy human tissues. Pharmacology & Toxicology, **86**, 24–29.

Pankhurst, G.J.; Bennett, C.A. and Easterbrook-Smith, S.B. (1998): Characterisation of the heparin-binding properties of human clusterin. Biochemistry, **37**, 4823–4830.

Pariante, C.M.; Pearce, B.D.; Pisell, T.L.; Su, C. and Miller, A.H. (2001): The steroid receptor antagonists RU40555 and RU486 activate glucocorticoid receptor translocation and are not excreted by the steroid hormones transporter in L929 cells. Journal of Endocrinology, **169**, 309–320.

Pathak, V.; Shirota, O.; Sekita, S.; Hirayama, Y.; Hakamata, Y.; Hayashi, T.; Yanagawa, T. and Satake, M. (1997): Antiandrogenic phenolic constituents from *Dalbergia cochinchinensis*. Phytochemistry, **46** (7), 1219–1223.

Paulozzi, L.J. (1999): International trends in rates of hypospadias and cryptorchism. Environmental Health Perspectives, **107**, 297–302.

Pérez, P.; Pulgar, R.; Olea-Serrano, F.; Villalobos, M.; Ravis, A.; Metzler, M.; Pedraza, V. and Olea, N. (1998): The estrogenicity of bisphenol A - related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. Environmental Health Perspectives, **106** (3),167–174.

Picard, D. and Yamamoto, K.R. (1987): Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. The EMBO Journal, **6** (11), 3333–3340.

Planas, G.M. and Kuć, J. (1968): Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. Science, **162** (857), 1007.

Pons, M.; Gagne, D.; Nicolas, J.C. and Mehtali, M. (1990): A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules. BioTechniques, **9**, 450–459.

Poujol, N.; Wurtz, J.-M.; Tahiri, B.; Lumbroso, S.; Nicolas, J.-C.; Moras, D. and Sultan, C. (2000): Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. The Journal of Biological Chemistry, **275** (31), 24022–24031.

Pratt, W.B.; Sanchez, E.R.; Bresnick, E.H.; Meshinichi, S.; Scherrer, L.C.; Dalman, F.C. and Welsh, M.J. (1989): Interaction of the glucocorticoid receptor with the M_r 90,000 heat shock protein: an evolving model of ligand-mediated receptor; transformation and translocation. Cancer Research, **49** (Supplement), 2222–2229.

Prins, G.S. (2000): Molecular biology of the androgen receptor. Mayo Clin. Proc., **75**, (Supplement), 32–35.

Promega (1998): Luciferase Assay System. Technical Bulletin.

Purvis, I.J.; Chotai, D.; Dykes, C.W.; Lubahn, D.B.; French, F.S.; Wilson, E.M. and Hobden, A.N. (1991): An androgen-inducible expression system for *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, **106**, 35–42.

QIAGEN (1998): QIAGEN® Plasmid Purification Handbook.

QIAGEN (1999): RNeasy® Mini Handbook.

Rafi, M.M.; Rosen, R.T.; Vassil, A.; Ho, C.T.; Zhang, H.; Ghai, G.; Lambert, G.H. and DiPaola, R.S. (2000): Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid. Anticancer Research, **20** (4), 2653–2658.

Raun Andersen, H.R.; Andersson, A.-M.; Arnold, S.F.; Autrup, H.; Barfoedd, M.; Beresford, N.A.; Bjerregaard, P.; Christiansen, L.B.; Gissel, B.; Hummel, R.; Bonefeld Jørgensen, E.; Korsgaard, B.; Le Guevel, R.; Leffers, H.; McLachlan, J.; Møller, A.; Bo Nielsen, J.; Olea, N.; Oles-Karasko, A.; Pakdel, F.; Pedersen, K.L.; Erik Skakkebœk, N.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Sumpter, J.P.; Thorpe, S.M. and Grandjean, P. (1999): Comparson of short-term estrogenicity tests for identification of hormon-disrupting chemicals. Environmental Health Perspectives, **107** (Suppl. 1), 89–108.

Redondo, M.; Villar, E.; Torres-Muñoz, J.; Tellez, T.; Morell, M. and Petito, C.K. (2000): Overexpression of clusterin in human breast cancer carcinoma. American Journal of Pathology, **157** (2), 393–399.

Rhodes, D. und Klug, A. (1993): Zinkfinger. Spektrum der Wissenschaft, April, 54–61.

Ribieras, S.; Tomasetto, C. and Rio, M.-C. (1998): The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. Biochimica et Biophysica Acta, **1378**, F61–F77.

Rochefort, H. (1995): Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer. Non-reproductive actions of sex steroids. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 191), 254–268.

Rosemblit, N.; Feng, Z.-M. and Chen, C.-L.C. (1996): Analysis of the rat clusterin gene promoter and cyclic AMP-regulated mRNA stability in testicular cells. Journal of Molecular Endocrinology, **16**, 287–296.

Rosenberg, R.S.; Grass, L.; Jenkins, D.J.A.; Kendall, C.W.C. and Diamandis, E.P. (1998): Modulation of androgen and progesterone receptors by phytochemicals in breast cancer cell lines. Biochemical and Biophysical Research Communications, **248**, 935–939.

Rosenberg Zand, R.S.; Grass, L.; Magklara, A.; Jenkins, D.J.A. and Diamandis, E.P. (2000): Is ICI 182 780 an antiprogestin in addition to being an antiestrogen?. Breast Cancer Research and Treatment, **60**, 1–8.

Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assassed using a recombinant yeast screen. Environmental Toxicology and Chemistry, **15** (3), 241–248.

Sadar, M.D. (1999): Androgen-independent induction of prostate-specific antigen gene expression via cross-talk between the androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways. The Journal of Biological Chemistry, **274** (12), 7777–7783.

Sadar, M.D.; Hussain, M. and Bruchovsky, N. (1999): Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence. Endocrine-Related Cancer, **6**, 487–502.

Safe, S.H. (2000): Endocrine disruptors and human health – Is there a problem? An Update. Environmental Health Perspectives, **108**, 487–493.

Schlumpf, M.; Cotton, B.; Conscience, M.; Haller, V.; Steinmann, B. and Lichtensteiger, W. (2001): In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. Environmental Health Perspectives, **109** (3), 239–244.

Schreiber, J. (1985): Darstellung steroidverknüpfter N-(2-chlorethyl)-N-nitroso-harnstoffe und Untersuchungen ihrer biologischen Wirkung. Dissertation, Universität Heidelberg.

Schultz, J.E.; Rosch, H. (1991): Differential effects of ovarian steroid hormones on beta-adrenoreceptor downregulation caused by the antidepressants imipramine and rolipram. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **344** (4), 437–441.

Shah, J.K.; Sayles, G.D.; Suidan, M.T.; Mihopoulos, P. and Kaskassian, S. (2001): Anaerobic bioventing of unsaturated zone contaminated with DDT and DNT. Water Science and Technology, **42** (2), 35–42.

Sharpe, R.M. and Skakkebœk, N.E. (1993): Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet, **341**, 1392–1394.

Shet, M.S.; McPhaul, M.; Fisher, C.W.; Stallings, N.R. and Estabook, R.W. (1997): Metabolism of the antiandrogenic drug (Flutamide) by human CYP1A2. Drug Metab Dispos, **25** (11), 1298–1303.

Silbernagel, S.; Despopoulos, A. (1991): Taschenbuch der Physiologie. 4., überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenny, S. and Boyd, M.R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of the National Cancer Institute, **872**, 1107–1112.

Slater, I.; Odum, J. and Ashby, J. (1999): Resveratrol and red wine consumption. Human & Experimental Toxicology, **18**, 625–626.

Sobolev, V.S. and Cole, R.J. (1999): *trans*-Resveratrol in commercial peanuts and peanut products. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **47**, 1435–1439.

Sohoni, P. and Sumpter, J.P. (1998): Several environmental oestrogens are also anti-androgens. Journal of Endocrinology, **158**, 327–339.

Song, T.T.; Hendrich, S. and Murphy, P.A. (2000): Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. J. Agric. Food Chem., **47**, 1607–1610.

Sonnenschein, C. and Soto, A.M. (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, **65** (1-6), 143–150.

Soto, A.M.; Justica, H.; Wray, J.W. and Sonnenschein, C. (1991): p-Nonylphenol: anestrogenic xenobiotic released from „modified“ polystyrene. Environmental Health Perspectives, **92**, 167–173.

Soto, A.M.; Sonnenschein, C.; Chung, K.L.; Fernandez, M.F.; Olea, N. and Olea Serrano, F. (1995): The E-SCREEN Assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. Environmental Health Perspectives, **103** (Suppl. 7), 113–122.

Soule, H. (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. Journal of the National Cancer Institute, **51**, 1409–1413.

Sperry, T.S. and Thomas, P. (1999): Identification of two nuclear androgen receptors in kelp bass (*Paralabrax clathratus*) and their binding affinities for xenobiotics: comparison with atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) androgen receptors. Biology of Reproduction, **61**, 1152–1161.

Spitz, I.M. and Chwalisz, K. (2000): Progesterone receptor modulators and progesterone antagonists in women`s health. Steroids, **65**, 807–815.

Spitz, I.M. and Coelingh Bennink, H.J.T. (2000): Progesterone receptor modulators at the start of a new millennium. Steroids, **65**, 837–838.

Stack, G.; Kumar, V.; Green, S.; Ponglikitmongkol, M.; Berry, M.; Rio, M.C.; Nunez, A.M.; Roberts, M.; Koehl, C.; Bellocq, P.; Gairard, B.; Renaud, R. and Chambon, P. (1988): Structure and function of the pS2 gene and estrogen receptor in human breast cancer cells. Breast Cancer: Cellular and Molecular Biology, Kluwer Academic Publishers, Bostton – Dordrecht – London, 185–206.

Staton, J.M.; Thomson, A.M. and Leedman, P.J. (2000): Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituiary. Journal of Molecular Endocrinology, **25**, 17–34.

Steinmetz, R.; Young, P.C.M.; Caperell-Grant, A.; Gize, E.A.; Madhukar, B.V.; Ben-Jonathan, N. and Bigsby, R.M. (1996): Novel estrogenic action of the pesticide

residue beta-hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. Cancer Research, **56**, 5403–5409.

Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Haberer, K. und Baumann, W. (1996): Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. Vom Wasser, **87**, 251–261.

Sun, J.; Huang, Y.R.; Harrington, W.R.; Sheng, S.; Katzenellenbogen, J.A. and Katzenellenbogen, B.S. (2002): Antagonists selective for estrogen receptor alpha. Endocrinology, **143** (3); 941–947.

Suominen, J. and Vierula, M. (1993): Semen quality of Finnish men. Br Med J, **306**, 1579.

Swan, S.H.; Elkin, E.P. and Fenster, L. (2000): The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. Environmental Health Perspectives, **108**, 961–966.

Tabak, H.H.; Bloomhuff, R.N. and Bunch, R.L. (1981): Steroid hormones as water pollutants. II. Studies on the persistance and stability of naturary and synthetic ovulation-inhibiting hormones in untreated and treated wastewaters. Developments in Industrial Microbiology, **22**, 497–519.

Takahashi, O. und Oishi, S. (2000): Disposition of orally administered 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. Environmental Health Perspectives, **108**, 931–935.

Tenniswood, M.; Wang, Z.; Lakins, J.; Morrissey, C.; O`Sullivan, J. and Tang, H. (1998): Clusterin in the male reproductive tract. Journal of Andrology, **19** (5), 508–516.

Tohei, A.; Suda, S.; Taya, K.; Hashimoto, T. and Kogo, H. (2001): Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. Experimental Biology and Medicine, **226** (6), 216–221.

Toppari, J.; Larsen, J.C.; Christiansen, P.; Giwereman, A.; Grandjean, P.; Guilette, L.J., Jr.; Jegou, B.; Jensen, T.K.; Jouannet, P.; Keiding, N.; Leffers, H.; McLachlan, J.A.; Meyer, O.; Muller, J.; Raipert-De Meytts, E.; Scheike, T.; Sharpe, R.; Sumpter, J. and Skakkebaek, J. (1996): Male reproductive health and environmental xenoestrogens. Environmental Health Perspectives, **104**, 741–803.

Torchia, J.; Glass, C. and Rosenfeld, M.G. (1998): Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. Current Opinion in Cell Biology, **10**, 373–383.

Torchia, J.; Rose, D.W.; Inostroza, J.; Kamei, Y.; Westin, S.; Glass, C. and Rosenfeld, M.G. (1997): The transcriptional co-activator p/Cip binds CBP and mediates nuclear-receptor function. Nature, **387**, 677–684.

Truss, M.; Bartsch, J.; Schelbert, A.; Haché, R.J.G. and Beato, M. (1995): Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promotor *in vivo*. The EMBO Journal, **14** (8), 1737–1751.

Tsai, M.-J. and O`Malley, B.W. (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annual Reviews of Biochemistry, **63**, 451–486.

Turner, R.T.; Evans, G.L.; Zhang, M.; Maran, A. and Sibonga, J.D. (1999): Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? Endocrinology, **140**, 50–54.

Uehara, O.A.; Minetti, C.A.S.A.; Valle, L.B.S. and Oliveira-Filho, R.M. (1993): Stevioside inhibition of R1881 binding on androgen-target organs. 2nd Nat. Symp. Natural Products and Pharmacology, São Paulo, **1**, 420.

Uehara, O.A.; Utino, V.H.; Miyata, I.; Valle, L.B.S. and Oliveira-Filho, R.M. (1992): Stevioside-androgen interactions. 7th Symp. Brazilian Medicinal Plants, Manaus, **1**, 74.

Ulrich, E.M.; Caperell-Grant, A.; Jung, S.-H.; Hites, R.A. and Bigsby, R.M. (2000): Environmentally relevant xenoestrogen tissue concentrations correlated to biological responses in mice. Environmental Health Perspectives, **108**, 973–977.

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

Van Steenbrugge, G.J.; Groen, M.; van Dongen, J.W.; Bolt, J.; van der Korput, H.; Trapman, J.; Hasenson, M. and Horoszewicz, J. (1989): The human prostatic carcinoma cell line LNCaP and its derivates. Urological Research, **17**, 71–77.

Veldscholte, J.; Ris-Stalpers, C.; Kuiper, G.G.J.M.; Jenster, G.; Berrevoets, C.; Claassen, E.; van Rooij, H.C.J.; Trapman, J.; Brinkmann, A.O. and Mulder, E. (1990): A mutation in the binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. Biochemical and Biophysical Research Communications, **173** (2), 534–540.

Verma, S.P.; Goldin, B.R. and Lin, P.S. (1998): The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. Environmental Health Perspectives, **106** (12), 807–812.

Vladusic, E.A.; Hornby, A.E.; Guerra-Vladusic, F.K.; Lakins, J. and Lupu, R. (2000): Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines. Oncol Rep, **7** (1), 157–167.

Voet, D.; Voet, J.G. (1994): Biochemie. 1., korrigierter Nachdruck der 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.

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

Wakeling, A.E. (1995): Tissue-specific actions of antiestrogens. Mutation Research, **333**, 45–49.

Wang, H.; Peters, G.A.; Zeng, X.; Tang, M.; Ip, W. and Khan, S.A. (1995): Yeast two-hybrid system demonstrates that estrogen receptor dimerisation is ligand-dependent *in vivo*. The Journal of Biological Chemistry, **270** (40), 23322–23329.

Whitaker, M.D.; MD, FRCPC (2001): Selective estrogen receptor modulators: from bench to the bedside and back. Endocrine Practice, **7** (2), 113–119.

White, R.; Jobling, S.; Hoare, S.A.; Sumpter, J.P. and Parker, M.G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic Compounds are estrogenic. Endocrinology, **135**, 175–182.

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

Wiedemann, K.; Lauer, C.; Loycke, A.; Pollmächer, T.; Durst, P.; Machér, J.-P. and Holsboer, F. (1992): Antiglucocorticoid treatment disrupts endocrine cycle and noctunal sleep pattern. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosi, **241**, 372–375.

Wilson, J.W.; Wakeling, A.E.; Morris, I.D.; Hickman, J.A. and Dive, C. (1995): MCF-7 human mammary adenocarcinoma cell death in vitro in response to hormone-withdrawal and DNA damage. International Journal of Cancer, **61** (4), 502–508.

Wilson, M.R. and Easterbrook-Smith, S.B. (2000): Clusterin is a secreted mammalian chaperone. TIBS, **25**, 95–98.

Wine, R.N.; Li, L.-H.; Hommel Barnes, L.; Gulati, D.K. and Chapin, R.E. (1997): Reproductive toxicity of di-*n*-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprangue-Dawley rats. Environmental Health Perspectives, **105** (1), 102–107.

Wolffe, A.P. (1994): Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. TIBS, **19**, 240–244.

Wood, K.V. (1990): Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists. Promega Notes, **28**, 1.

Wrenn, C.K. and Katzenellenbogen, B.S. (1993): Structure-function analysis of the hormone binding domain of the human estrogen receptor by region-specific mutagenesis and phenolic screening in yeast. The Journal of Biological Chemistry, **268** (32), 24089–24098.

Wu, S.-Y.; Thomas, M.C.; Hou, S.Y.; Likhite, V. and Chiang, C.-M. (1999): Isolation of mouse TFIID and functional characteristization of TBP and TFIID in mediating estrogen receptor and chromatin transcription. The Journal of Biological Chemistry, **274** (33), 23480–23490.

Xili, L.; Chengjiany, X.; Eryi, S.; Reiming, S.; Yuengming, W.; Haodong, S. and Zhiyian, H. (1992): Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. Fd. Chem. Toxic., **30** (11), 957–965.

Yamahita, S. (2001): Histochemistry and cytochemistry of nuclear receptors. Progr. Histochem. Cytochem., **36** (2), 91–176.

Yeap, B.B.; Krueger, R.G. and Leedman, P.J. (1999): Differential posttranscriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells. Endocrinology, **140**, 3282–3291.

Yeh, S.; Chang, H.-C.; Miyamoto, H.; Takatera, H.; Rahman, M.; Kang, H.-Y.; Thin, T.H.; Lin, H.-K. and Chang, C. (1999): Differential induction of the androgen receptor transcriptional activity by selective androgen receptor coactivators. Keio Journal of Medicine, **48** (2), 87–92.

Yeh, S.; Miyamoto, H. and Chang, C. (1997): Hydroxyflutamid may not always be a pure antiandrogen. The Lancet, **349**, 852–853.

Yeh, S.; Sampson, E.R.; Lee, D.K.; Kim, E.; Hsu, C.-L.; Chen, Y.-L.; Chang, H.-C.; Altuwaijri, S.; Huang, K.-E. and Chang, C. (2000): Functional analysis of androgen receptor N-terminal and ligand binding domain interaction coregulation in prostate cancer. J. Formos. Med. Assoc., **99** (12), 885–894.

Ylikomi, T.; Wurtz, J.-M.; Syvälä, H.; Passinen, S.; Pekki, A.; Haverinen, M.; Bläuer, M.; Tuohimaa, P. and Gronemeyer, H. (1998): Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, **33** (6), 437–466.

Yodyingyuad, V. and Bunyawong, S. (1991): Effect of stevioside on growth and reproduction. Human Reproduction, **6** (1), 158–165.

Zimmerli, B. und Schlatter, J. (1997): Vorkommen und Bedeutung der Isoflavone Daidzein und Genistein in der Säuglingsanfangsnahrung. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., **88**, 219–232.

ZKBS (1994): Stellungnahme der Zentralen Kommission für die biologische Sicherheit. Bundesgesundheitsblatt 319/320.

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Seng, D.; Yussuf, A.; Böhm, S.; Guth, S.; Mußler, B.; Eisenbrand, G. (1998) Untersuchungen zur hormonellen/antihormonellen Aktivität verschiedener Lebensmittelinhaltstoffe in funktionellen *In-vitro*-Assays. Lebensmittelchemie, **52**, 34.

Guth, S.; Seng, D.; Böhm, S.; Mußler, B. and Eisenbrand, G.
Identification of antiandrogens with functional transactivation *In-vitro*-Assays and molecular modeling analyses.
In: **Eisenbrand, G. et al.** (1999) Carcinogenic and anticarcinogenic factors in food. Symposium, Senate Commission on Food Safety, DFG, Wiley-VCH, 481–484.

Böhm, S.; Guth, S.; Mußler, B. and Eisenbrand, G. (2001) Testsystems to identify androgenic/antiandrogenic effects *in vitro*. 42. Frühjahrstagung der DGPT, 13. bis 15. März 2001.

Guth, S.; Böhm, S.; Mußler, B. and Eisenbrand, G. (2001) Identification and characterisation of antiandrogenic compounds on the basis of in vitro transactivation assays and molecular modeling. Statusseminar Umwelthormone des BMBF/BMU/UBA, Berlin, 2. bis 4. April 2001.

Böhm, S.; Guth, S. and Eisenbrand, G. (2002) Etablierung eines endogenen Reportergensystems zur Erfassung von antihormonellem Potential mittels kompetitiver RT-PCR. Regionalverband Süd-West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft – Fachgruppe der GDCh, Arbeitstagung 2002, 18./19. März 2002 (Vortrag).

Dank

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

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. Bernd Mußler für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, für seine sehr gute unterstützende und motivierende Betreuung, für anregende fachliche und private Diskussionen

Frau Dr. Sabine Guth für ihre Freundschaft, viele Aufmunterungen, motivierende Worte beim Verfassen der Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskripts

Frau Dr. Kerstin Schulte für ihre Freundschaft, viele Aufmunterungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts

Frau Dr. Christiane Seus für ihre Freundschaft und die vielen gemeinsam verbrachten Abende und Wochenenden

Meinem Forschungspraktikanten Stephan Mühlbeyer sowie den Diplomanden Miriam Gensler und Ralph Tomsitz für ihr Engagement, die zuverlässige Mitarbeit und Diskussionsbereitschaft

Meinen Laborkollegen Anette Höll, Hennike Kamp, Daniela Seng und Akani Yussuf für die gute Zusammenarbeit im Labor

Meinen Kollegen Volker Glaab, Frankie Hippe, Susanne Meiers und Ute Sträßer für den Spaß in Kaffeepausen und ihre Hilfsbereitschaft

Frau Christine Knerr für ihre Unterstützung bei der Zellkultur und vielen unterhaltsamen Stunden bei sehr guter Zusammenarbeit

Herrn Dr. Eric Fabian für seine Freundschaft, die Aufmunterungen und Unterstützung bei Problemen aller Art

Frau Dr. Gudrun Pahlke und ihrer Familie für wertvolle Anregungen in molekularbiologischen Fragestellungen wie auch in privaten Diskussionen

Herrn Dr. Matthias Baum für seine stetige Hilfsbereitschaft

Frau Ingrid Romani, Frau Ingrid Hemm, Frau Jutta Schermer und Frau Heike Syring für die Erledigung der Post und Verwaltungsangelegenheiten

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

Herrn Dr. Michael Zeiger für seine Hilfe bei Problemen am Computer

Der Firma Schering, Berlin, für die Substanzen Hydroxyflutamid, Dexamethason, Norgestimat und Mifepriston

Herrn Dr. Sumpter, Brunel University (UK), für die Erlaubnis, Arbeiten mit hER bzw. hAR stabil transfizierten *Saccharomyces-cerevisiae*-Stämmen (Glaxo), durchzuführen

Herrn Prof. Dr. Vollmer und Mitarbeitern, Universität Dresden, für das Überlassen von der *Saccharomyces-cerevisiae*-Stämmen (Glaxo) und die Einweisung in die Kultivierung von Hefen

Frau Prof. Dr. Anke, Herrn Prof. Dr. Cullum, Herrn Prof. Dr. Trommer und Herrn Prof. Dr. Dr. Schrenk sowie deren Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, Räume und Geräte bei Bedarf zu nutzen

Herrn Dr. Schäfer und Mitarbeitern, Klinikum Kaiserslautern, für das zur Verfügung gestellte Immulite-Messgerät, die Probenröhrchen und den Waschpuffer sowie die sehr nette Einführung und stetige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Messungen

Besonders danken möchte ich auch allen Freunden, die mich in den letzten Jahren unterstützt und so auch einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Großmutter, ohne deren Aufmunterungen und Unterstützungen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre