

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Identifizierung und Charakterisierung von antiandrogen aktiven
Fremdstoffen mittels Transaktivierungsassays und molecular
modeling Verfahren**

Eisenbrand, G., Guth, S., Böhm, S., Knerr, C. und Mußler, B.

Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Universität Kaiserslautern,
Erwin-Schrödinger-Str. 52, 67663 Kaiserslautern

Förderkennzeichen: BWB 99002

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des Landes
Baden-Württemberg gefördert

Dezember 2001

Identifizierung und Charakterisierung von antiandrogen aktiven Fremdstoffen mittels Transaktivierungsassays und molecular modeling Verfahren

Eisenbrand, G.; Guth, S.; Böhm, S. und Mußler, B.

Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Universität Kaiserslautern

Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden vier *in vitro* Testsysteme zur Erfassung antiandrogenen Aktivität etabliert und validiert: ein transgener transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen, ein transgener Transaktivierungsassay in stabil transfizierten T47D-Luciferase Zellen, ein endogener PSA Assay in T47D Zellen und ein endogener TRPM-2 m-RNA Assay in T47D Zellen. Alle vier Testansätze erlauben die Bestimmung antiandrogenen Aktivität.

Ausgehend von bereits bekannten Antiandrogenen wurden zwei Leitstruktur-Elemente entwickelt, anhand derer über die online Strukturdatenbank „Beilstein-Crossfire“ eine Reihe strukturell verwandter Verbindungen identifiziert werden konnten. Diese Verbindungen, vor allem Phenylharnstoff-Analoga und Benzophenon-Derivate, wurden zur Validierung der Auswahlstrukturelemente für die datenbankgestützte Struktursuche auf ihr antiandrogenes Potential untersucht. Die im Forschungsvorhaben erzielten Ergebnisse zeigen, dass die von uns ermittelten Leitstrukturen für Antiandrogene ein brauchbares Modell zur Identifizierung weiterer potentiell antiandrogen aktiver Verbindungen darstellen. Die meisten der über online Strukturdatenbanksuche ermittelten Verbindungen konnten mittels der etablierten *in vitro* Testsysteme tatsächlich als antiandrogene Verbindungen identifiziert werden. Die erhaltenen Daten wurden zur Berechnung von quantitativen Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) herangezogen. Zwei brauchbare Modelle zur Vorhersage antiandrogenen Aktivität konnten hieraus entwickelt werden.

Identification and characterization of antiandrogenic compounds on the basis of transactivation assays and molecular modeling

Summary

Within the scope of this research project, four test systems to identify antiandrogenic activity were established and validated: a transgenic transient transactivation assay in COS-7 cells, a

transgenic transactivation assay in stably transfected T47D-Luciferase cells, an endogenous PSA Assay in T47D cells and an endogenous TRPM-2 m-RNA assay in T47D cells. All four assays allow to measure antiandrogenic activity.

On the basis of known antiandrogens two lead structure elements were developed and utilized for the detection of structurally related compounds using the online structure database "Beilstein-Crossfire". These compounds, primarily phenylurea analogues and benzophenone derivatives, were investigated for their antiandrogenic activity in order to validate the structure elements selected for the database assisted structure search. The results obtained in the research project show, that the identified lead structures for antiandrogens represent a useful model for identifying further potentially antiandrogenic compounds. Most of the identified compounds indeed showed antiandrogenic potential in our established in vitro test systems. The biological data were used to compute quantitative structure-activity relationships (QSAR) and to develop two reliable prediction models for antiandrogenic activity.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.2. Stand der Wissenschaft	1
2. Planung, Ergebnisse und Diskussion	3
2.1. Etablierung funktioneller in vitro Testsysteme zur Erfassung androgener/ antiandrogener Aktivität	3
2.1.1. Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen	3
2.1.2. Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie T47D Luciferase	6
2.1.3. Etablierung von nicht transgenen Transaktivierungsassays	8
2.1.3.1. PSA Assay	9
2.1.3.2. TRPM-2 Assay	11
2.1.4. Zusammenfassung	14
2.2. Substanzauswahl: Identifizierung potentiell androgener/antiandrogener Verbindungen mittels Datenbank Recherche	17
2.3. Untersuchung des antiandrogeneren Potentials ausgewählter Verbindungen	18
2.3.1. Untersuchung ausgewählter Phenylharnstoff Analoga	19
2.3.1.1. Transienter Transaktivierungsassay	19
2.3.1.2. PSA Assay	20
2.3.2. Untersuchung ausgewählter Benzophenon Derivate	21
2.3.2.1. Transienter Transaktivierungsassay	21
2.3.2.2. PSA Assay	22
2.3.3. Fazit	25
2.4. Molecular modeling: 3D QSAR	25
3. Voraussichtlicher Nutzen, Beitrag der Ergebnisse zu den Zielen des Förderprogramms	27
4. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet	28
5. Veröffentlichung der Ergebnisse	29
6. Literatur	29
7. Anhang	I-IX

1. Einleitung

1.1 Projektziele/Aufgabenstellung (Motivation)

Ziel des Forschungsvorhabens war die Identifizierung und Charakterisierung antiandrogener Fremdstoffe mittels funktioneller in vitro Transaktivierungsassays. Hierzu sollten transiente und stabile transgene Testsysteme aufgebaut werden, die das Einbringen von Fremd-DNA in geeignete Zelllinien erfordern, sowie nicht transgene Testsysteme auf Basis von endogenen Androgenrezeptor-kontrollierten Markergenen. Neu etablierte Assay-Methoden sollten mittels bekannter Androgenrezeptor-Agonisten und –Antagonisten validiert werden um die spezifische und empfindliche Erfassung androgener/antiandrogener Wirkungen zu ermöglichen. Begleitend sollten durch Einsatz von molecular modeling Verfahren Leitstrukturelemente für androgene/antiandrogene Wirkungen ermittelt werden. Dies sollte eine strukturelementgeleitete online Datenbank Recherche und damit die Ermittlung bislang nicht beschriebener antiandrogener Verbindungen ermöglichen. Auf der Basis einer ausreichend großen Menge an biologischen Daten (> 10 Verbindungen), sollten mittels des molecular modeling Programms Sybyl erste Ansätze zur Berechnung von quantitativen Struktur-Aktivitätsbeziehungen durchgeführt werden.

1.2 Stand der Wissenschaft zu Beginn des Forschungsvorhabens

In den letzten 50 Jahren hat sich der Einsatz von Agrochemikalien (Xenobiotika) zur Verbesserung der landwirtschaftlichen Produktivität erheblich gesteigert. Ebenso ist ein substantieller Eintrag von Industriechemikalien in die Umwelt zu verzeichnen. Diese Xenobiotika, es handelt sich z.B. um Pestizide, Tenside, Kunststoffmonomere und –additive und andere Stoffe, die produktions- und zivilisationsbedingt anfallen, können sich, wenn sie hohe Lipophilie und lange Halbwertszeiten aufweisen, in Umweltkompartimenten aber auch im Organismus anreichern. [Danzo, 1998; Colborn et al., 1993]

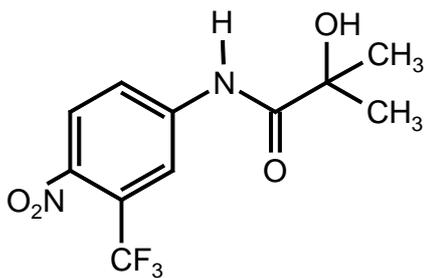
Vor allem Beobachtungen an Wildtierpopulationen haben die Aufmerksamkeit von Wissenschaft und Öffentlichkeit auf mögliche Einflüsse von Umweltchemikalien gelenkt. So zeigten Fische, Vögel, Reptilien, Säugetiere und andere Spezies in bestimmten, mit Xenobiotika (z.B. o,p'-DDT) belasteten Lebensräumen Störungen des Reproduktionstraktes

und der Embryonalentwicklung. [Toppari et al., 1996; Colborn et al., 1993; Colborn und Clement, 1992]

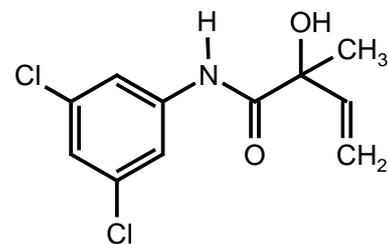
Die Frage, ob solche meist als „endokrine Disruptoren“ bezeichnete Verbindungen in der Lage sein könnten, ähnliche Effekte auch beim Menschen auszulösen und in dessen hormonelle Homöostase einzugreifen, ist derzeit noch nicht schlüssig zu beantworten.

Bislang standen hauptsächlich synthetische und natürlich vorkommende Stoffe („Phytoestrogene“) mit estrogener/antiestrogener Wirkung im Vordergrund von Forschungsvorhaben. Jedoch können vermutlich auch Verbindungen mit androgener/antiandrogener Aktivität zu den in belasteten Ökosystemen beobachteten Effekten beitragen. Bereits als Antiandrogene identifiziert waren zu Beginn unserer Arbeiten Pestizidmetabolite wie der Hauptmetabolit von DDT im Warmblüter, p,p'-DDE [Kelce et al., 1995] sowie Metabolite des Fungizids Vinclozolin [Wong et al., 1995].

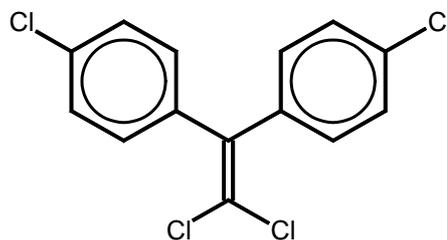
Abb. 1: Strukturen einiger etablierter Antiandrogene



Hydroxyflutamid



Vinclozolin M2



p,p'-DDE

2. Planung, Ergebnisse und Diskussion

2.1. Etablierung funktioneller in vitro Testsysteme zur Erfassung androgener/antiandrogener Aktivität

Hauptziel des Forschungsvorhabens war zunächst die Etablierung geeigneter in vitro Testsysteme, um ein effizientes Screening potentieller Androgene/Antiandrogene zu ermöglichen. Der Schwerpunkt sollte auf der Entwicklung transgener und nicht transgener Reportergensysteme liegen, um hochempfindliche und hochspezifische in vitro Systeme zur Erfassung androgener/antiandrogener Aktivität verfügbar zu machen.

2.1.1. Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen

Grundlage des Assays:

COS-7 Zellen sind Affenierenzellen, die endogen keine Steroidhormonrezeptoren exprimieren und sich sehr gut für Transfektionsexperimente und daher für den Aufbau eines hochspezifischen biologischen Meßsystems eignen. Erreicht wurde dies durch transiente Transfektion (Elektroporation) mit einem humanen Androgenrezeptor-Expressionsplasmid (pSG5AR, Abb. 2), in Verbindung mit gleichzeitiger Kotransfektion eines Reportergenplasmids, des Androgenrezeptor-kontrollierten Mouse Mammary Tumor Virus-Luciferase Plasmids (pMamneo-Luc, Abb.2). Zusätzlich wurde ein β -Galaktosidase Kontrollplasmid (pSV β , Abb.2) mittransfiziert, bei dem die β -Galaktosidase konstitutiv exprimiert wird. Hierdurch kann die Transfektionseffizienz kontrolliert werden, was besonders bei transienten Transfektionen unerlässlich ist.

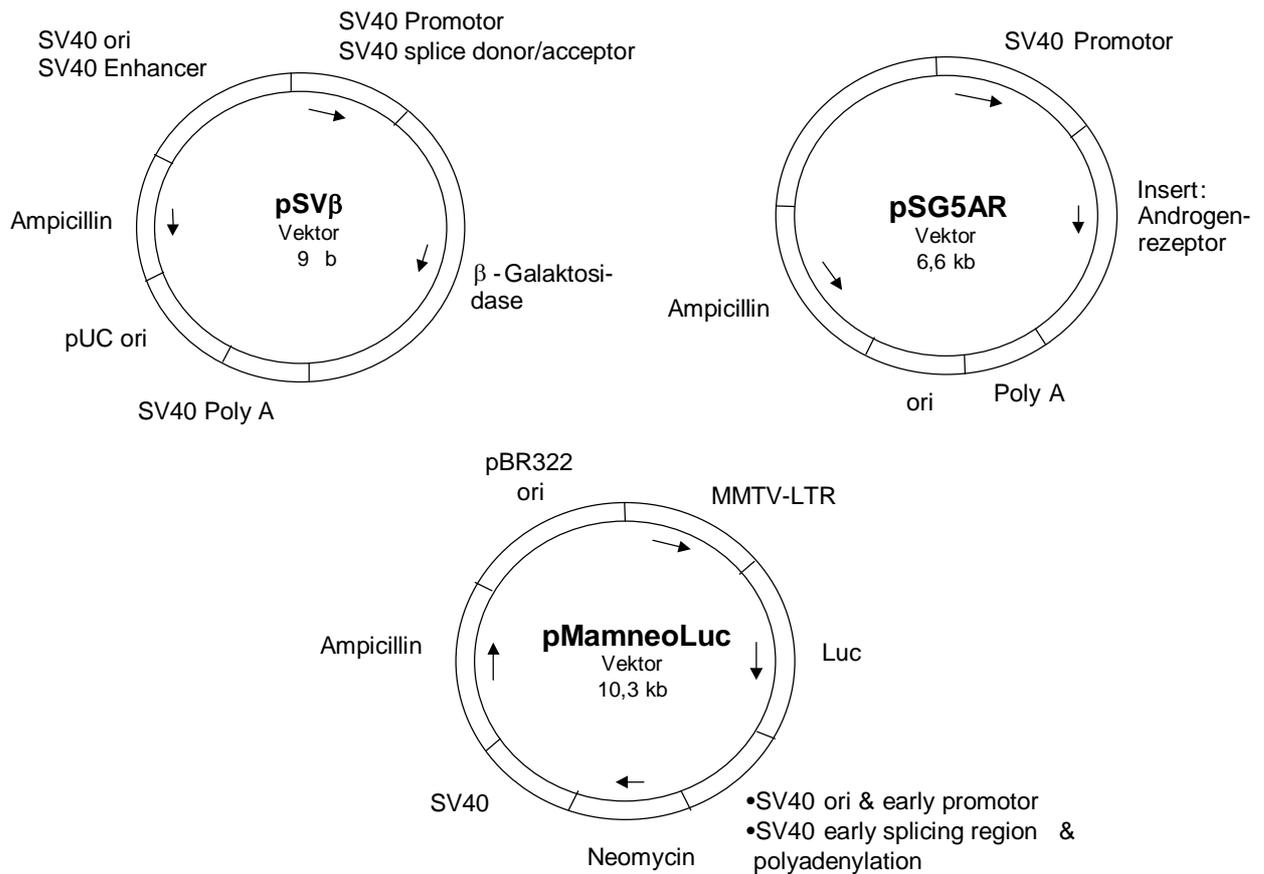


Abb.2: Schematische Darstellung der Plasmide pSG5AR (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Cato, Karlsruhe), pMamneoLuc (Clontech) und pSVβ (Clontech)

Durchführung:

80% konfluent gewachsene Zellen werden abtrypsiniert, zentrifugiert und in PBS auf eine Zelldichte von 4 Millionen Zellen/500 µl eingestellt. Die Transfektion erfolgt nach Zugabe von je 5 µg der einzusetzenden Plasmide pMamneo-Luc, pSG5AR und pSVβ mittels Elektroporation (Elektroporationsbedingungen: 1000 µF, 330 V, 25 mA, 25 W). Die Ansätze werden für 24 h mit den Testsubstanzen in CDFKS-Medium inkubiert. Es folgt eine Nachinkubation in CDFKS-Medium für weitere 24 h. Danach wird eine Zellyse (Lysepuffer: Promega) durchgeführt und die Luciferase (Detektionskit: Promega) bzw. β-Galaktosidase Aktivität (Detektionskit: Clontech) der Zellysate in einem Plattenluminometer (Firma BMG) vermessen. Die gemessenen Lichteinheiten für Luciferase Aktivität, dividiert durch die gemessenen Lichteinheiten für β-Galaktosidase Aktivität, ergaben die um die Transfektionseffizienz korrigierten Meßwerte. Die so erhaltenen Einzelmeßwerte wurden, normiert auf den Aktivitätswert von DHT (100 nM) in Prozent dieses Wertes angegeben. Die Standardabweichungen wurden anhand der so erhaltenen Prozentwerte berechnet. Für den

Bezugspunkt DHT 100 nM = 100% war die Angabe einer Standardabweichung nicht möglich. Diese Vorgehensweise ergab über einen längeren Zeitraum gut reproduzierbare Werte.

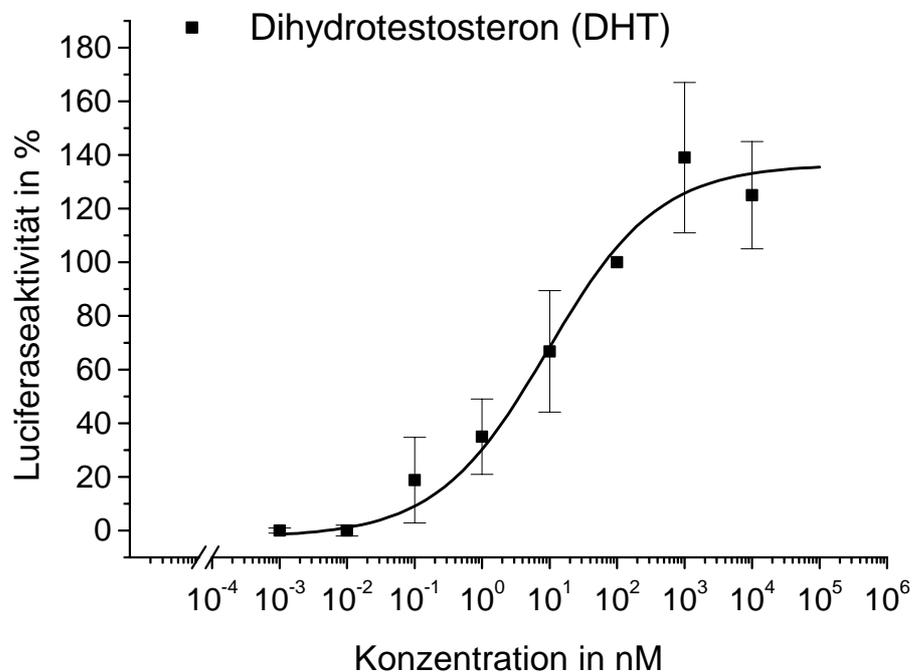


Abb. 3: Validierung des transienten Transaktivierungsassays in COS-7 Zellen mit DHT
(Mittelwert \pm SD, n = 6)

Validierung

DHT induzierte die Luciferaseaktivität konzentrationsabhängig. Bei halblogarithmischer Auftragung wurde der erwartete sigmoidale Kurvenverlauf erhalten (Abb. 3).

Bekannte Antiandrogene wie p,p'-DDE, Hydroxyflutamid und Vinclozolin Metabolit 2 inhibierten die durch DHT induzierte Luciferaseaktivität konzentrationsabhängig (Abb. 4). Das etablierte Testsystem erwies sich somit als valide und konnte zur Untersuchung weiterer potentieller Androgene/Antiandrogene herangezogen werden.

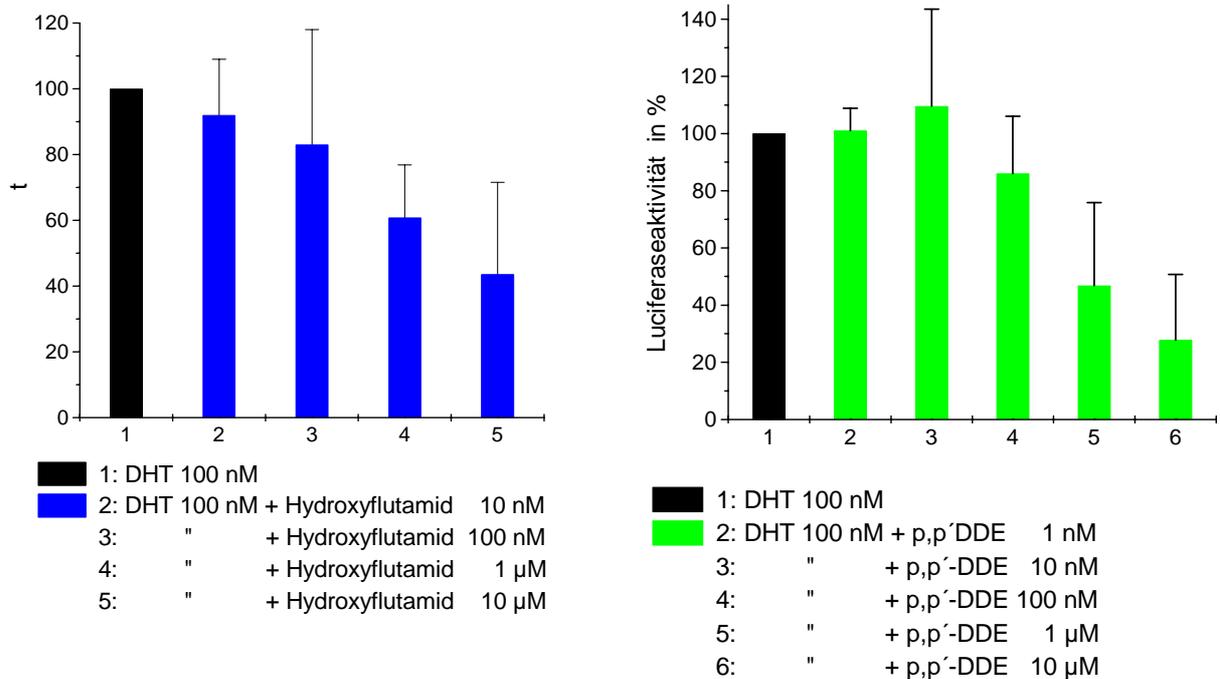


Abb. 4: Validierung des transienten Transaktivierungsassays mit p,p'-DDE und Hydroxyflutamid (Mittelwert \pm SD, n = 3)

2.1.2. Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie T47D-Luciferase

Grundlage des Assays

Der transiente Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen ist zwar sensitiv und spezifisch, jedoch durch die vor jedem Testansatz erneut erforderliche Transfektion auch zeit- und kostenaufwendig. Um ein schnelleres Screening zu ermöglichen wurde daher begleitend die Etablierung einer stabil transfizierten transgenen Zelllinie angestrebt. Eine ganze Reihe von Vorversuchen mit Zelllinien, die den AR natürlicherweise exprimieren, wurde durchgeführt, u.a. auch mit der humanen Osteosarkomazelllinie SaOS-2. Mittels RT-PCR wurde allerdings herausgefunden, dass der AR-Gehalt in diesen Zellen zu gering für den vorgesehenen Zweck war. Dagegen erwies sich eine Transfektion von T47D Brustkrebszellen mit einem MMTV-Luciferase Reporterplasmid als geeignet. Eine Koftransfektion mit einem Androgenrezeptor-Expressionsplasmid war in diesem Falle nicht erforderlich, da T47D Zellen intrinsisch AR exprimieren. Zusätzlich werden allerdings auch Progesteron- und Glucocorticoidrezeptoren exprimiert (Keydar et al., 1979).

Durchführung:

Die Transfektion wurde entsprechend dem beim transienten Transaktivierungsassay angewandten Verfahren durchgeführt. Zugegeben wurde 5 µg des Plasmids pMamneo-Luc (Abb.2), die Elektroporation erfolgte bei 500 µF und 330 V. Nach einer 18-stündigen Erholungsphase wurden die transfizierten Zellen mit 500 µg Geneticin/ml Medium über einige Wochen selektioniert. Die selektionierten Zellen, die das Plasmid pMamneoLuc enthalten, wurden für die Versuche eingesetzt. Im Gegensatz zum transienten Transaktivierungsassay konnten größere Versuchsansätze durchgeführt werden. Nach einer 24-stündigen Inkubationsphase mit den Testsubstanzen in CDFKS Medium und einer ebenfalls 24-stündigen Nachinkubation in CDFKS Medium wurden die Zellen analog dem transienten Transaktivierungsassays einer Zellyse unterzogen. Die Luciferaseaktivität der Zellysate wurde mittels Chemolumineszenz in einem Luminometer vermessen.

Validierung

Die Validierung des stabilen transgenen Reportergensystems konnte mittels DHT und etablierten Antiandrogenen erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 5 und 6). Die für die Hemmexperimente eingesetzte DHT Konzentration war in diesem Fall 10 nM DHT, die sich zwischen Wendepunkt und oberem Plateau der Kurve befindet. Die Ergebnisse der Hemmexperimente wurden auf DHT 10 nM = 100 % bezogen dargestellt.

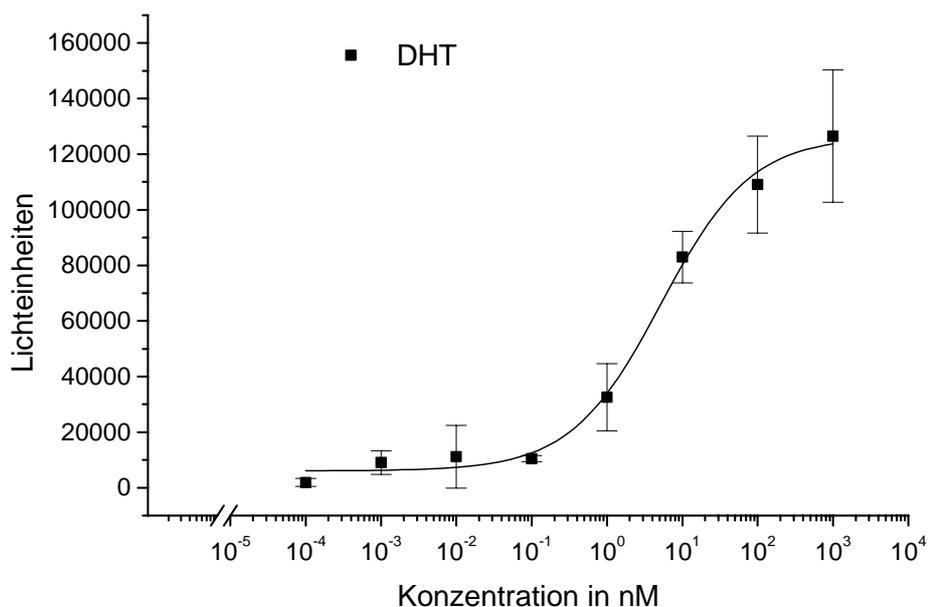


Abb.5: Validierung des stabil transfizierten T47D-Luciferase Reportergensystems mit DHT
(Mittelwert ± SD, n = 4)

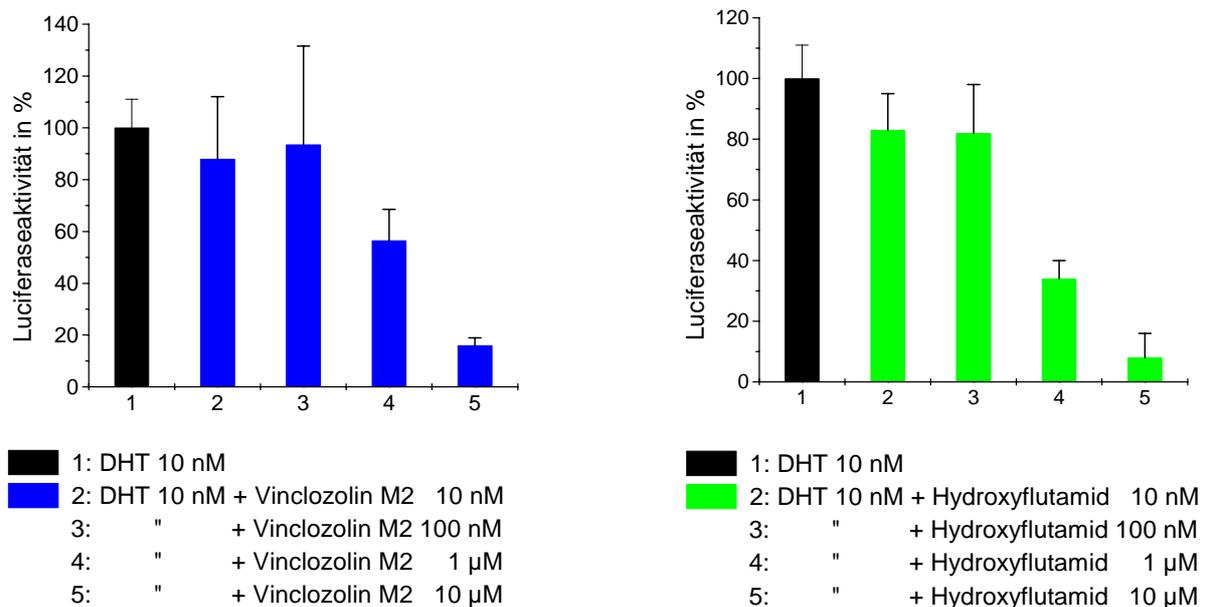


Abb.6: Validierung des stabil transfizierten T47D-Luciferase Testsystems mit Vinclozolin Metabolit 2 und Hydroxyflutamid (mean \pm SD, n = 3)

2.1.3. Etablierung von nicht transgenen Transaktivierungsassays

Einführung

Da die Ansätze der transgenen Reporterassays zwar spezifisch und sensitiv, aber auch relativ artifiziell sind, war zusätzlich geplant weniger artifizielle Testsysteme auf Basis endogener, durch humane physiologische Promotoren kontrollierte Reporterassays zu entwickeln und mit den transgenen zu vergleichen. Beispiele für solche endogenen Androgenrezeptor-kontrollierten Markergene sind das Gen für Prostata Spezifisches Antigen (PSA) bzw. das Gen für Testosterone Repressed Prostate Message 2 (TRPM-2). Ein weiterer potentieller Vorteil solcher Systeme könnte darin liegen, dass sie als in vivo Marker, z.B. in Tierversuchen oder Probandenstudien eingesetzt werden könnten. Damit wäre ein direkter Vergleich von zellulären Antworten aus in vitro Ansätzen mit jenen aus in vivo Versuchen möglich.

2.1.3.1. PSA Assays

Grundlage des Assays

PSA wird von T47D Brustkrebszellen unter Einwirkung sowohl von Androgenen als auch von Progestinen (Gestagenen) exprimiert (Rosenberg et al., 1998). Kontrolliert wird die Expression durch den humanen PSA Promotor, der zwei HREs und eine Hormon Responsive Region enthält (Sadar, 1999). Ein selektives Screening von Stoffen auf androgenes Potential ist in diesem Testsystem nicht möglich, da das System nicht nur auf androgene, sondern auch auf gestagene Reize anspricht. Jedoch kann der durch das Referenzandrogen DHT induzierte Effekt auf die PSA Expression durchaus genutzt werden, um antiandrogene Effekte zu messen. Werden T47D Zellen mit DHT inkubiert, so exprimieren die Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an DHT PSA, das ins Medium abgegeben und mittels ELISA nachgewiesen werden kann.

Der PSA Assay ist ein klinisch zur Bestimmung der PSA Konzentration im Serum eingesetzter Test. Ist das System geeicht, stimmen die bei den einzelnen Messungen erhaltenen Meßwerte sehr gut überein. Die Reproduzierbarkeit ist aufgrund der maschinellen Messung in einem Immunlite Analyzer, der auch alle Pipettierschritte durchführt, sehr hoch. Desweiteren ist der benötigte Test-Kit sehr teuer. Aus diesen Gründen wurden die Messungen im PSA Assay zunächst in zweifacher unabhängiger Wiederholung durchgeführt. Wurden hierbei gut übereinstimmende Meßergebnisse erhalten, so wurde auf eine weitere Wiederholung verzichtet. Nur bei abweichenden Meßergebnissen oder wenn sich Unterschiede zu den Ergebnissen aus dem transienten Transaktivierungsassay zeigten, wurden weitere Messungen durchgeführt.

Durchführung:

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

- a) Inkubation mit DHT in DMSO aus Stammlösungen verschiedener Konzentrationen (DMSO Konzentration pro Loch: 0,1%); DHT Konzentrationen im Medium: 0,01 nM bis 1 µM
- b) Inkubation mit potentiellen Hemmstoffen ohne DMSO (gelöst in Ethanol, abrotiert) für 4h (Hemmstoffkonzentrationen: 10 nM bis 10 µM); danach Inkubation mit DHT in 1 nM Konzentration, die wiederum zwischen Wendepunkt und oberem Plateau der Kurve anzusiedeln ist (DHT in DMSO gelöst; DMSO Konzentration pro Loch: 0,1%)

Bei jedem Versuchsansatz werden mehrere Negativkontrollen und die Positivkontrolle (DHT) mitgeführt. Nach 5 Tagen wird das Medium abgenommen und die PSA Konzentration im unverdünnten Medium mittels eines PSA ELISA (Firma DPC Biermann) in einem Immulite Meßgerät (DPC Biermann; zur Verfügung gestellt vom Westpfalz Klinikum Kaiserslautern) bestimmt. PSA Teströhrchen, die mit einem monoklonalen Anti-PSA Antikörper beschichtet sind, werden mit 50 µl Medium befüllt. Das PSA der Probe bindet an diesen Antikörper. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, kann die PSA Konzentration mittels Chemolumineszenz Reaktion bestimmt werden.

Zur Kontrolle auf potentielle behandlungsbedingte Zytotoxizität über die lange Inkubationsdauer werden die Zellen mit Sulforhodamin B gefärbt und quantifiziert. Die Schwankungen der Zellzahl lagen im Höchstfall bei ca. 10 % (bei Konzentrationen von je 10 µM an p,p'-Dichlorbenzophenon, p,p'-Dibrombenzophenon, p,p'-Dimethoxybenzophenon), und damit im Fehlerbereich der Kontrollwerte (Zellzahl nach 5 Tagen mit 0,1 % DMSO).

Validierung

Antiandrogene wie p,p'-DDE und Hydroxyflutamid hemmen konzentrationsabhängig die durch eine Standardkonzentration an DHT (1 nM) induzierte PSA Expression (Abb. 7) und können auf diese Weise als Gegenspieler zu DHT auch quantitativ erfaßt werden (Abb. 8).

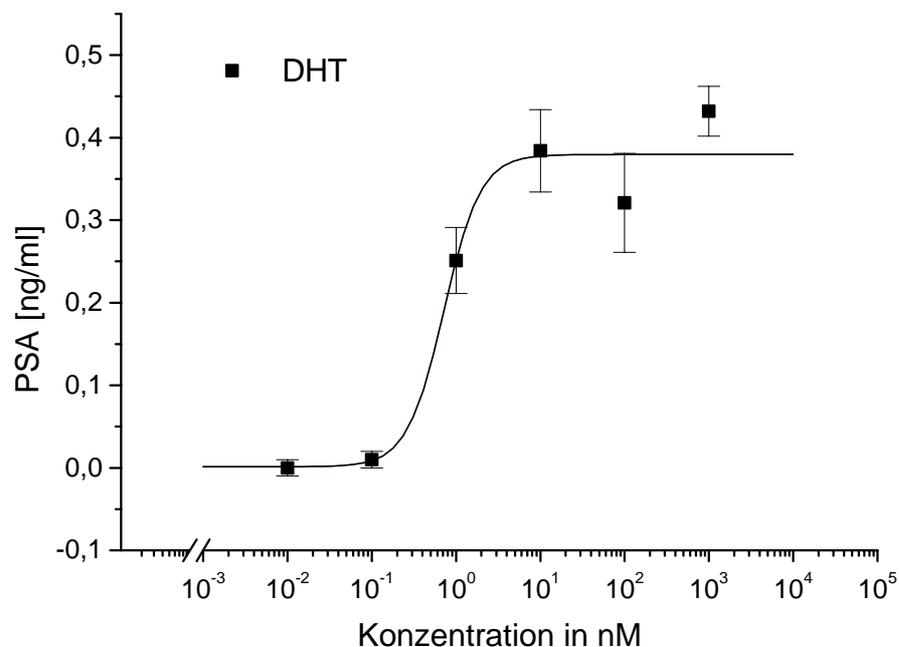


Abb.7: Validierung des PSA Assays mit DHT (Mittelwert ± SD, n = 3)

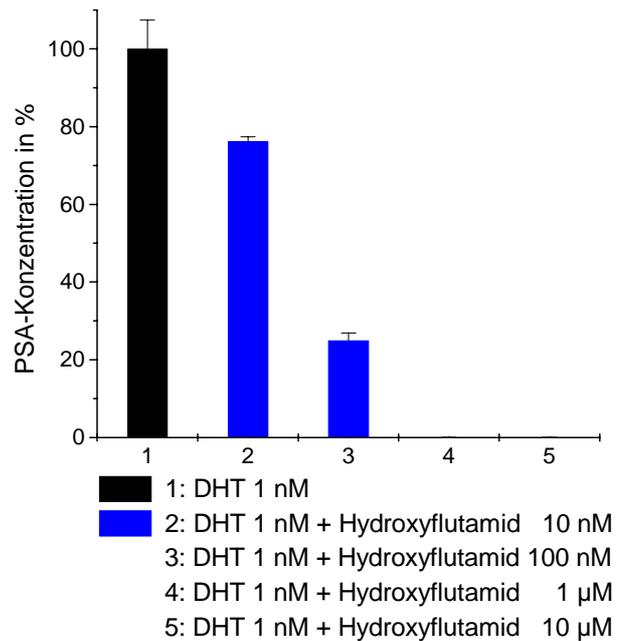


Abb. 8: Validierung des PSA Assays mit p,p'-DDE und Hydroxyflutamid (Mittelwerte \pm SD, n = 3)

2.1.3.2. TRPM-2 Assay

Einführung

Als weiterer endogener Marker wurde Testosterone-Repressed-Prostate-Message 2 (TRPM-2) gewählt, da bei diesem Markergen die Expression sowohl durch den AR als auch durch den ER reguliert wird. Dieser Assay kann außerdem zur Erfassung antiandrogener Aktivität in T47D Zellen sowie estrogener Aktivität in MCF-7 Zellen eingesetzt werden. Des Weiteren ist der TRPM-2 Assay bisher der einzige Assay, bei dem die Detektion eines positiven Signals für antiandrogene Wirkungen möglich ist.

Grundlagen des Assays

TRPM-2 ist ein multifunktionelles Protein, das am Lipoprotein-Metabolismus, der Samenreifung, der Gewebeumwandlung, der Hemmung der Komplement-vermittelten Zellyse und der Differenzierung von Epithelzellen beteiligt ist. Der humane TRPM-2 Promotor enthält eine ganze Reihe regulatorischer Elemente, u.a. auch vier AREs (Wong et al., 1993). Die Expression von TRPM-2 m-RNA in T47D Zellen wird in Anwesenheit von Androgenen inhibiert. Bei gleichzeitiger Inkubation mit einem Antiandrogen wird diese Hemmung

konzentrationsabhängig aufgehoben. Der Nachweis einer TRPM-2 m-RNA Expression erfolgte mittels kompetitiver RT-PCR unter Verwendung eines internen Standards. Hierzu hatten Vorversuche gezeigt hat, dass der normalerweise für semiquantitative PCR verwendete Standard β -Actin in den verwandten Zellen offenbar androgenabhängig reguliert wird. Aus diesem Grund war zunächst die Generierung eines geeigneten internen Standards erforderlich.

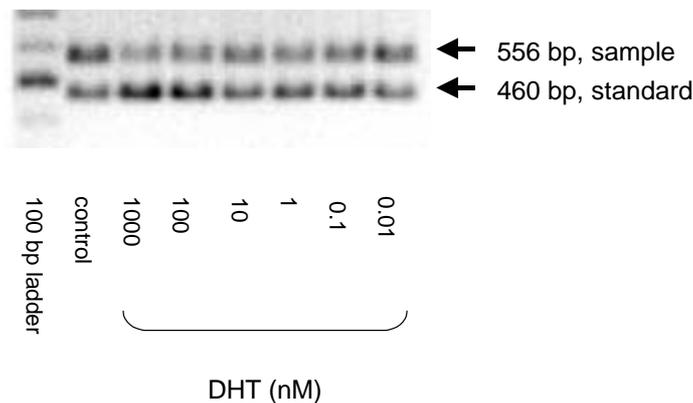


Abb.9: TRPM-2 m-RNA Assay in T47 D Zellen

Ergebnisse nach Agarose Gelelektrophorese und Detektion mit Ethidiumbromid:
Banden für Probe (556 bp) und Standard (460 bp)

Durchführung:

T47D Zellen werden in Petrischalen ausgestreut. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgt in CDFKS über 24 h. Die Zellen werden lysiert, die RNA mit Hilfe eines Kits aufgearbeitet und zur RT-PCR eingesetzt.

Zur Quantifizierung der TRPM-2-Expression wurde ein interner nichtgenomischer Standard konstruiert, der über dieselben Primer wie die genomische TRPM-2-Sequenz amplifiziert wird. Er unterscheidet sich von der genomischen Sequenz durch eine Deletion von 100 bp. Zum Aufbau des Standards wurde ein TRPM-2-Fragment, das die mittels der verwendeten Primer amplifizierbare Region enthält, in einen Vektor (pUC 18) kloniert. Mit Hilfe eines Restriktionsverdau wurde in der amplifizierbaren Region eine Deletion von 100 bp eingeführt. Nach erfolgter Ligation wurde dieser Vektor in linearisierter Form direkt als Standard zur PCR eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese, die Detektion der Banden mittels Ethidiumbromid. Die Intensitäten der erhaltenen Banden wurden mit einem Lumi-Imager Gerät (Boehringer) quantifiziert (Abb.9). Die Normierung erfolgte über eine Division der für die Probe erhaltenen Lichteinheiten durch die für den Standard erhaltenen Lichteinheiten. Der für die lösungsmittelbehandelte Kontrolle erhaltene

Wert wurde als Referenzpunkt gesetzt (Wert 1,0). Alle weiteren Werte wurden relativ zum Referenzpunkt berechnet.

Validierung

DHT reduziert die TRPM-2 m-RNA Expression konzentrationsabhängig (Abb. 10 und 11). Hydroxyflutamid und p,p'-DDE hemmen die DHT-induzierte Abnahme von TRPM-2 konzentrationsabhängig und führen somit zu einem Anstieg der TRPM-2 m-RNA (Abb. 10 und 11)

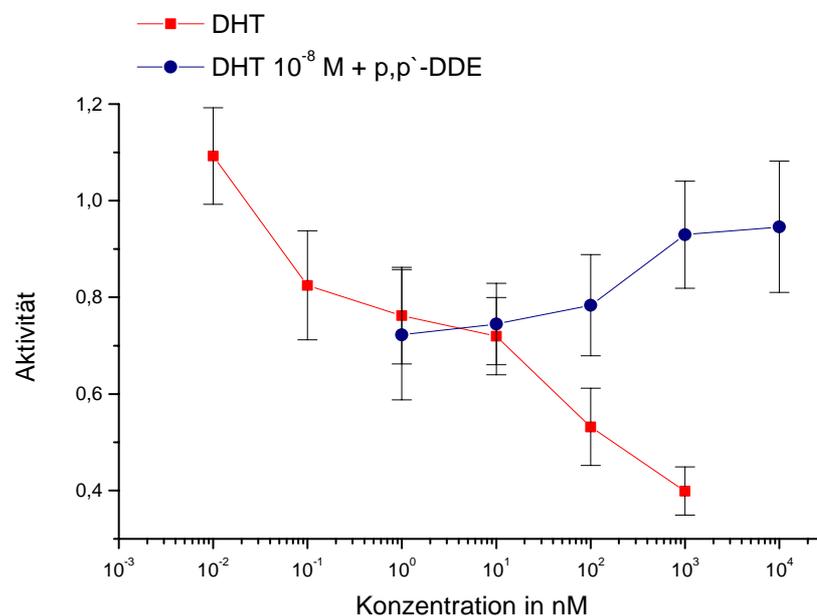


Abb. 10: Validierung des TRPM-2 Assays mit DHT und p,p'-DDE (Mittelwert \pm SD, DHT: n = 5; p,p'-DDE: n = 6).

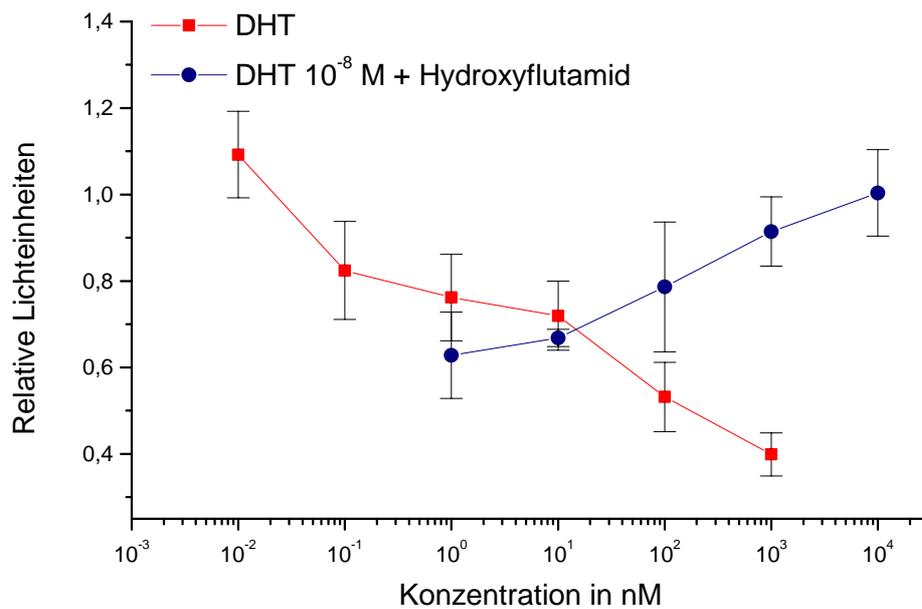


Abb. 11: Validierung des TRPM-2 Assays mit DHT und Hydroxyflutamid (Mittelwert \pm SD, DHT: n = 5; Hydroxyflutamid: n = 4)

2.1.4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden vier *in vitro* Testsysteme zur Erfassung antiandrogener Aktivität etabliert und validiert:

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

Am sensitivsten und präzisesten ist nach unseren Ergebnissen der PSA Assay. Der EC₅₀-Wert der steilen DHT Dosis-Wirkungskurve für DHT liegt bei 0,7 nM. Die DHT Dosis-Wirkungskurven der beiden transgenen Reporterassays sind dagegen um ca. eine Größenordnung nach rechts verschoben, diese Assays sind somit deutlich weniger sensitiv. Beim transienten Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen liegt der EC₅₀-Wert bei 9,7 nM, beim stabilen T47D-Luc Reporterassay bei 5,2 nM. Die Bestimmung eines IC₅₀-Wertes war im Falle des TRPM-2 Assays bisher nicht möglich, da noch nicht genügend Versuche

vorlagen, um eine Aussage über oberes und unteres Plateau der Dosis-Wirkungskurve treffen zu können. In Tab. 1 sind zusammenfassend die jeweiligen Vor- und Nachteile der einzelnen Testsysteme dargestellt. Sie werden im folgenden kurz diskutiert.

Der große Vorteil des transienten Transaktivierungsassays ist die Spezifität. Da nach der Transfektion ausschließlich Androgenrezeptoren in der Zelle exprimiert werden, ist auch der spezifische Nachweis androgener Aktivität möglich. Nachteilig ist die zeitaufwendige Versuchsdurchführung, da vor jedem Versuchsansatz erneut transfiziert werden muß. Dadurch ergeben sich auch größere Schwankungsbreiten der erhaltenen Ergebnisse. Ebenfalls ein Nachteil im Vergleich zu den anderen Testansätzen ist, dass die verwendete Zelllinie und der verwendete MMTV Promotor nicht humanen Ursprungs sind.

Diese Nachteile sind beim Transaktivierungsassay in stabil transfizierten T47D Zellen zum großen Teil nicht zu finden. Die Durchführung ist, sofern die Plasmide stabil in das Genom integriert sind, wesentlich einfacher und schneller. Die verwendeten Zellen sind humane Brustkrebszellen, der verwendete MMTV Promotor allerdings aus der Maus. Ein Nachteil ist, dass lediglich die Bestimmung antiandrogener Aktivität möglich ist, da neben dem AR andere Steroidhormonrezeptoren koexprimiert werden. Auch handelte es sich bei diesem Testsystem, wie auch beim transienten Transaktivierungsassay, als Folge der erforderlichen Transfektion um ein verhältnismäßig artifizielles *in vitro* System. Zur besseren Annäherung an die physiologisch relevante *in vivo* Situation wurden zwei Testsysteme auf der Basis endogener Markergene etabliert, die keine Transfektionen mehr erfordern. Beide Ansätze basieren auf humanen Zelllinien mit humanen, physiologischen, endogenen Promotoren. Sie bieten auch die Perspektive zur vergleichenden Bestimmung des antiandrogener Potentials *in vivo*. Gemeinsam sind beiden Assays allerdings auch bestimmte Nachteile. Durch die Koexpression von AR, GR und PR ist die spezifische Messung androgener Effekte schwierig. Auch handelt es sich um relativ teure Versuchsdurchführungen. Vorteil des PSA Assays ist allerdings, dass keine zusätzliche Aufarbeitung erforderlich ist, da das Protein direkt ins Medium sezerniert wird. Ein gewisser Nachteil des TRPM-2 Assays könnte darin liegen, dass im Gegensatz zum PSA Assay nicht auf Protein sondern auf m-RNA Ebene vermessen wird. Von Vorteil ist hingegen die Möglichkeit der Detektion eines Stimulus durch Antiandrogene.

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der etablierten Testsysteme

	Vorteile	Nachteile
Transienter Transaktivierungsassay (COS-7)	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifisch • Nur AR in den Zellen exprimiert → Bestimmung androgener Aktivität möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine humanen Zellen, sondern Affennierenzellen • Vor jedem Versuch erneut Transfektionen erforderlich: zeitaufwendig, artifiziell • Maus MMTV Promotor
Semistabiler Transaktivierungsassay (T47D)	<ul style="list-style-type: none"> • Bei etablierter Zelllinie: schnellere, kostengünstigere Durchführung • Humane Brustkrebszellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Koexpression anderer Steroidhormonrezeptoren → lediglich Bestimmung antiandrogener Aktivität möglich • Durch die Transfektion artifiziell • Maus MMTV Promotor
PSA Assay (T47D)	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Transfektionen, nicht artifiziell • Humane Brustkrebszellen • Humaner, endogener PSA Promotor • PSA wird ins Medium abgegeben, keine Aufarbeitung erforderlich, schnelle und einfache Durchführung • Messung auf Protein Ebene • Möglichkeit eines Einsatzes in vivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Koexpression anderer Steroidhormonrezeptoren → lediglich Bestimmung antiandrogener Aktivität möglich • Messung spezifischer androgener Effekte schwierig • Relativ teuer (PSA ELISA)
TRPM-2 Assay (T47D)	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Transfektionen, nicht artifiziell • Humane Brustkrebszellen • Humaner, endogener TRPM-2 Promotor • Möglichkeit eines Einsatzes in vivo • Detektion eines Stimulus durch Antiandrogene 	<ul style="list-style-type: none"> • Koexpression anderer Steroidhormonrezeptoren → lediglich Bestimmung antiandrogener Aktivität möglich • Aufwendig, relativ teuer (RT-PCR) • Nachweis auf m-RNA Ebene

2.2. Substanzauswahl: Identifizierung potentiell androgener/antiandrogener Verbindungen mittels Datenbank-Recherche

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

Die erste Leitstruktur wurde anhand der etablierten antiandrogeneren Phenylharnstoff-Analoga Hydroxyflutamid, Vinclozolin Metabolit M2 und Casodex konzipiert (Abb. 12). Rot eingezeichnet sind die diesen Verbindungen gemeinsamen Strukturelemente. Stoffe, deren androgenes/antiandrogenes Potential unbekannt ist, die aber diese Strukturelemente enthalten, werden z.B. über strukturelementgeleitete Datenbanksuche ermittelt und als Prüfkandidaten für eine Untersuchung auf androgene/antiandrogene Aktivität identifiziert. Wir haben uns in einem ersten „Testlauf“ auf Phenylharnstoff-Analoga konzentriert.

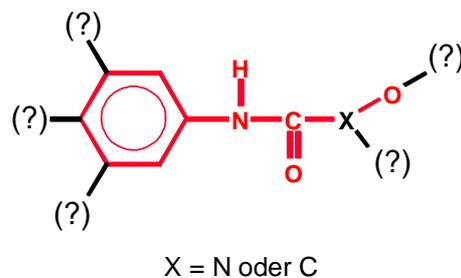


Abb.12: Erste Leitstruktur nicht-steroidaler Antiandrogene

Eine zweite Konsensusstruktur liess sich durch molecular modeling über eine Fit Option aus p,p'-DDE ableiten. Sie umfaßt Verbindungen, die der 1,1 Diphenylethenraumstruktur isoster sind, wie z. B. Benzophenone. Die diesen Verbindungen gemeinsamen Strukturelemente sind rot gezeichnet (Abb. 13).

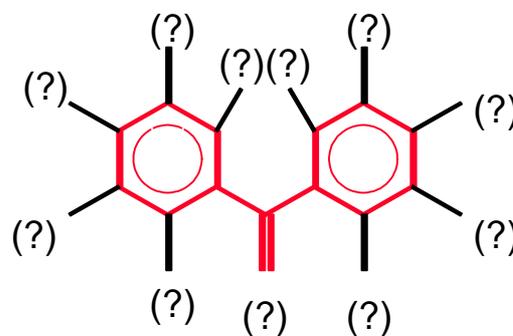


Abb.13: Zweite Leitstruktur nicht-steroidaler Antiandrogene

Anhand dieser beiden Leitstrukturen wurden über die online Strukturdatenbank Beilstein-Crossfire eine Reihe strukturell ähnlicher Verbindungen identifiziert:

Analoga, die Leitstruktur 1 enthalten: Phenylharnstoff-Analoga wie Linuron, Monolinuron, Metobromuron, Diuron, Fluometuron

Analoga, die Leitstruktur 2 enthalten: Benzophenone wie Oxybenzon, p,p'-Dihydroxybenzophenon, p,p'-Dichlorbenzophenon, p,p'-Dibrombenzophenon, p,p'-Dimethoxybenzophenon, Xanthon

Diese Verbindungen sollten zur Validierung der Auswahlstrukturelemente für die Datenbankgestützte Struktursuche auf ihr androgenes/antiandrogenes Potential untersucht werden. Dabei wurden Verbindungen mit relativ unterschiedlichen Substituenten einschließlich unsubstituierter Analoga herangezogen, um erste Aussagen über Struktur-Wirkungsbeziehungen zu gewinnen.

2.3. Untersuchung des antiandrogenen Potentials ausgewählter Verbindungen

Vorgehensweise

Das antiandrogene Potential ausgewählter, mittels online-Strukturdatenbanksuche identifizierter Strukturanaloga der Leitstrukturen 1 und 2 (siehe 2.2) wurden im transienten Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen und im nicht transgenen PSA Testsystem vergleichend untersucht.

Im transienten Transaktivierungsassay wurden alle neuen, mittels online Struktursuche ermittelten Verbindungen in mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen untersucht. Die beiden bereits in der Literatur beschriebenen Phenylharnstoff Analoga Vinclozolin M2 (Wong et al., 1995) und Linuron (Lambright et al., 2000) wurden zur weiteren Validierung des Systems mituntersucht, aufgrund der aufwendigen und im Rahmen des Projektes teureren Durchführung allerdings bisher nur in zwei unabhängigen Versuchsansätzen.

Die Einzelergebnisse der jeweiligen Messungen können dem beiliegenden Anhang entnommen werden. Bei nur zwei Messungen wurden die Einzelergebnisse angegeben. Bei drei oder mehr Meßergebnissen sind die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben.

In Abb. 14 bis 17 stellt jeweils die durchgezogene Linie den für DHT (100 nM im transienten Transaktivierungsassay; 1 nM im PSA Assay) ermittelten Ausgangswert des Systems dar, der als 100% Ausgangsniveau verwendet wird. Dies entspricht in der DHT Dosis-Wirkungskurve in etwa einem 80%igen Response im oberen Segment der Kurve, kurz vor Erreichen des

Sättigungsniveaus (vgl. u.a. Abb. 3 und 7). Dieser Punkt der DHT Kurve wurde gewählt, um möglichst hohe Empfindlichkeit des Systems zur Detektion antagonistischer Effekte sicherzustellen.

2.3.1. Untersuchung ausgewählter Phenylharnstoff Analoga

2.3.1.1. Transienter Transaktivierungsassay

Im transienten Transaktivierungsassay konnten im Zeitraum des Forschungsvorhabens vier Phenylharnstoff-Analoga untersucht werden (Abb. 14).

Die Ergebnisse lassen eine Einordnung der Stoffe nach abnehmender Hemmwirkung zu. Als Maß der Hemmwirkung werden die negativen Logarithmen der IC_{30} -Werten abgegeben, da in einer Reihe von Fällen IC_{50} -Werte nicht erreicht werden. Geordnet nach abnehmender Hemmwirkung ergibt sich: Monolinuron > Hydroxyflutamid > Linuron > Vinclozolin M2. Anhand der Kurvenverläufe ist allerdings zu erkennen, daß Monolinuron schon bei 100 nM eine 30%ige Inhibierung bewirkt. Bei höheren Konzentrationen ist die Hemmwirkung allerdings deutlich schwächer, was möglicherweise auf eine bei diesen hohen Konzentrationen sich auswirkende potentielle androgene Wirkkomponente zurückgeführt werden könnte. Die Hemmwirkung von Hydroxyflutamid nimmt dagegen konzentrationsabhängig zu. Beim Vergleich der Kurven erweist sich das etablierte Hydroxyflutamid im transienten Transaktivierungsassay als die am stärksten antiandrogene Verbindung.

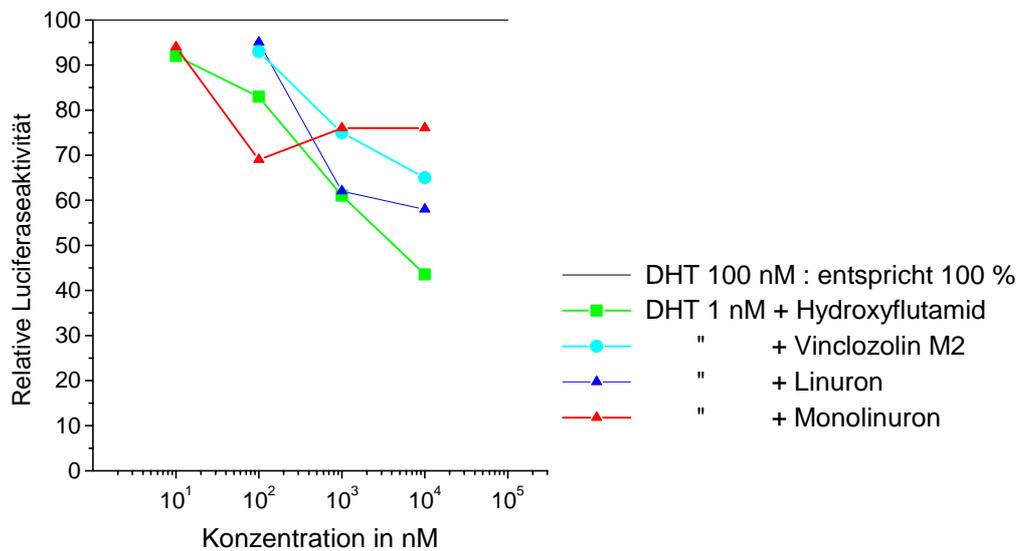


Abb.14: Antiandrogene Aktivität der getesteten Phenylharnstoff-Analoga im Überblick: Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen (Mittelwerte; Einzelergebnisse siehe Anhang)

2.3.1.2. PSA Assay

Da der Assay sensitiver und präziser ist, konnten in diesem Fall IC₅₀-Werte bestimmt werden. Das Ergebnis des PSA Assays weicht von dem des transienten Transaktivierungsassays ab. Nach IC₅₀-Werten geordnet ergibt die Reihung nach abnehmender Hemmwirkung: Vinclozolin M2 > Hydroxyflutamid > Linuron > Diuron > Fluometuron > Metobromuron > Monolinuron. Die stärkste Hemmwirkung weisen die beiden bekannten Antiandrogene Vinclozolin M2 und Hydroxyflutamid auf. Der unsubstituierte Phenylharnstoff zeigte bei 10 µM keine antiandrogene Wirkung, was mit dem vorgestellten Leitstrukturkonzept in Einklang ist (Abb. 15).

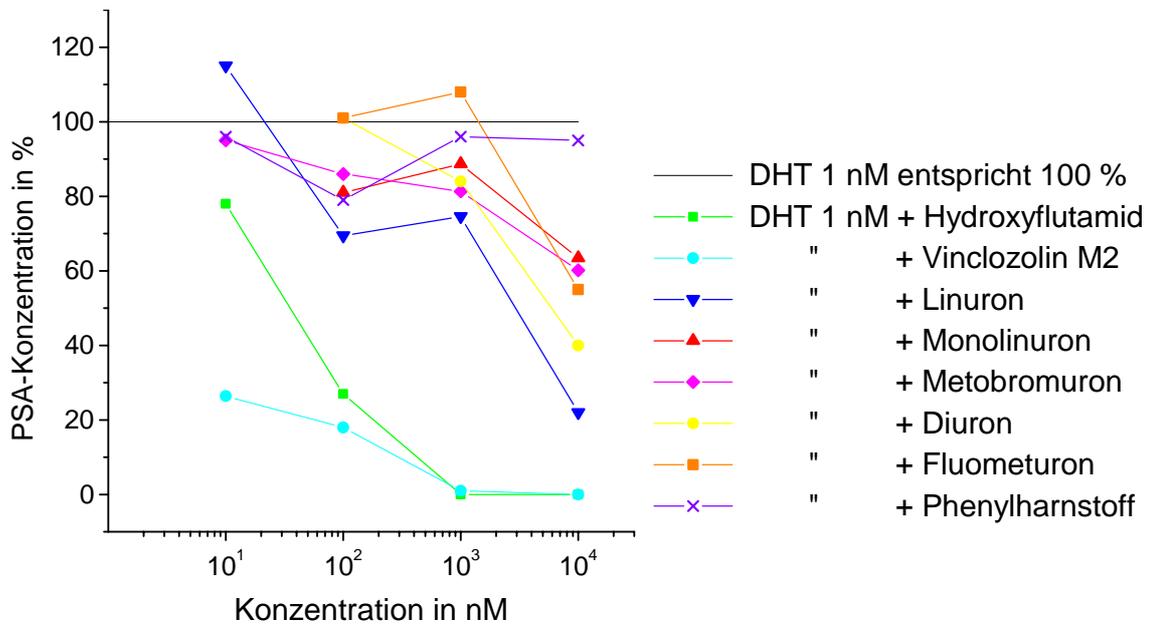


Abb.15: Antiandrogene Aktivität der Phenylharnstoff-Analoga im Überblick: PSA Assay (Mittelwerte; Einzelergebnisse siehe Anhang)

2.3.2. Untersuchung ausgewählter Benzophenon Derivate

2.3.2.1. Transienter Transaktivierungsassay

Die Ergebnisse lassen eine Einordnung der Stoffe nach abnehmender Hemmwirkung zu. Als Maß der Hemmwirkung werden die negativen Logarithmen der IC_{30} -Werten abgegeben, da in einer Reihe von Fällen IC_{50} -Werte nicht erreicht werden. Geordnet nach abnehmender Hemmwirkung ergibt sich: Benzophenon > Xanthon > p,p'-DDE > p,p'-Dichlorbenzophenon > p,p'-Dihydroxybenzophenon > Oxybenzon > p,p'-Dibrombenzophenon > p,p'-Dimethoxybenzophenon. In Abb. 16 ist zu erkennen, daß sich diese Reihe auch in etwa im Vergleich der Kurvenverläufe widerspiegelt. Die unsubstituierten Derivate Benzophenon und Xanthon zeigen schon bei einer Konzentration von 100 nM signifikante Hemmwirkung, die allerdings bei höheren Konzentrationen nicht mehr zunimmt. Bei p,p'-DDE dagegen setzt die Hemmwirkung erst bei 1 μ M ein, nimmt aber bis 10 μ M deutlich zu. In dieser relativ hohen Konzentration zeigt daher p,p'-DDE die stärkste Inhibierung. Dies verdeutlicht die Bedeutung der kompletten Kurveninformation.

Die Kurvenverläufe des p,p'-Dihydroxy- und p,p'-Dichlor-Derivats ähneln sich bis 1 μM . Bei 10 μM nimmt die Hemmwirkung des p,p'-Dihydroxy-Derivats anscheinend wieder ab, wohingegen die des p,p'-Dichlor-Derivats weiter zunimmt. Oxybenzon bewirkt im Vergleich dazu eine Inhibierung um 30% erst bei höherer Konzentration, die maximale Hemmwirkung bei 10 μM gleicht aber der von p,p'-Dichlorbenzophenon. Deutlich schwächere antiandrogene Aktivität weisen die beiden Derivate mit den räumlich größten Substituenten (Brom- und Methoxygruppe) auf.

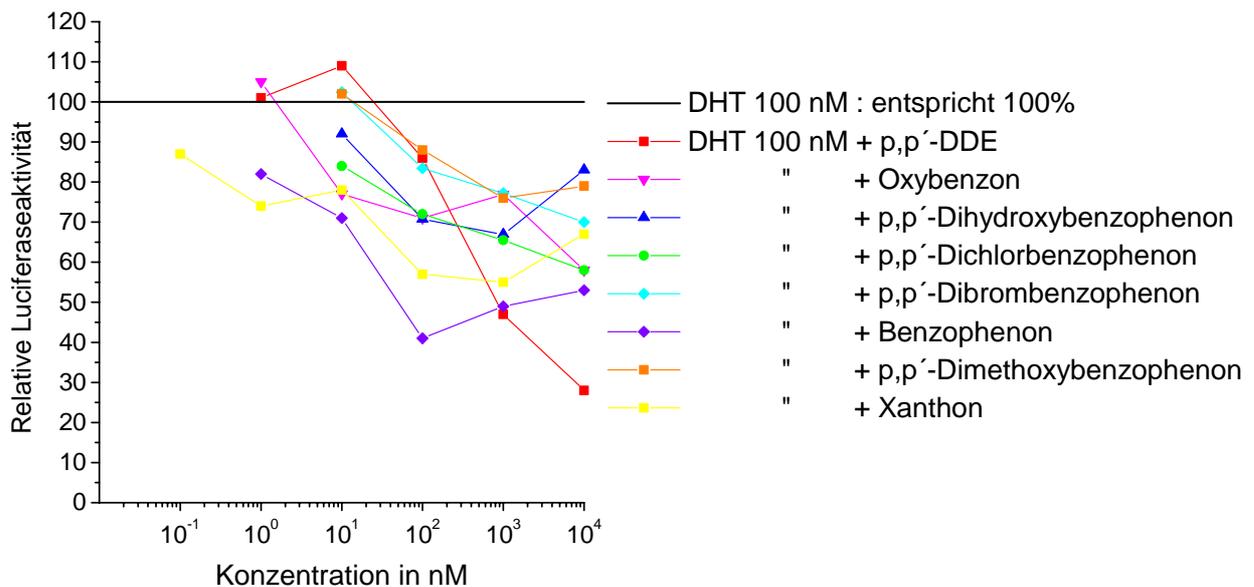


Abb.16: Antiandrogene Aktivität der Benzophenon Derivate im Überblick: transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen (Mittelwerte; Einzelergebnisse siehe Anhang)

2.3.2.2. PSA Assay

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

Dieses Ergebnis unterscheidet sich erheblich von dem mittels transientem Transaktivierungsassay gefundenen Resultat. Benzophenon gehört dort mit zu den stärksten Antiandrogenen. Deutlich stärkere Inhibierung als im transienten Transaktivierungsassay zeigt p,p'-Dihydroxybenzophenon, schwächer hemmt dagegen das bekannte Antiandrogen

p,p'-DDE. Oxybenzon, Xanthon, p,p'-Dimethoxybenzophenon und p,p'-Dibrombenzophenon weisen in etwa ähnliche Hemmwirkung auf (Abb. 17).

Dieses abweichende Ergebnis reflektiert möglicherweise die schon angesprochenen Gegebenheiten beim transienten Transaktivierungsassay und PSA Assay. Der im PSA Assay verwendete androgenabhängige Promotor liegt endogen in den T47D Zellen vor. Er enthält zwei HREs und eine Hormon Responsive Region, ist aber noch nicht vollständig charakterisiert, so daß weitere regulierende Elemente eine Rolle spielen könnten. Außerdem exprimieren die eingesetzten T47D Zellen zusätzlich zum AR auch größere Mengen an Progesteron- und Glucocorticoidrezeptor, die u.U. ebenfalls mit den untersuchten Verbindungen wechselwirken und so Einfluß auf die Reportergeninduktion bzw. -hemmung nehmen könnten. Beim transienten Transaktivierungsassay dagegen exprimieren die COS-7 Zellen nach Transfektion lediglich den Androgenrezeptor.

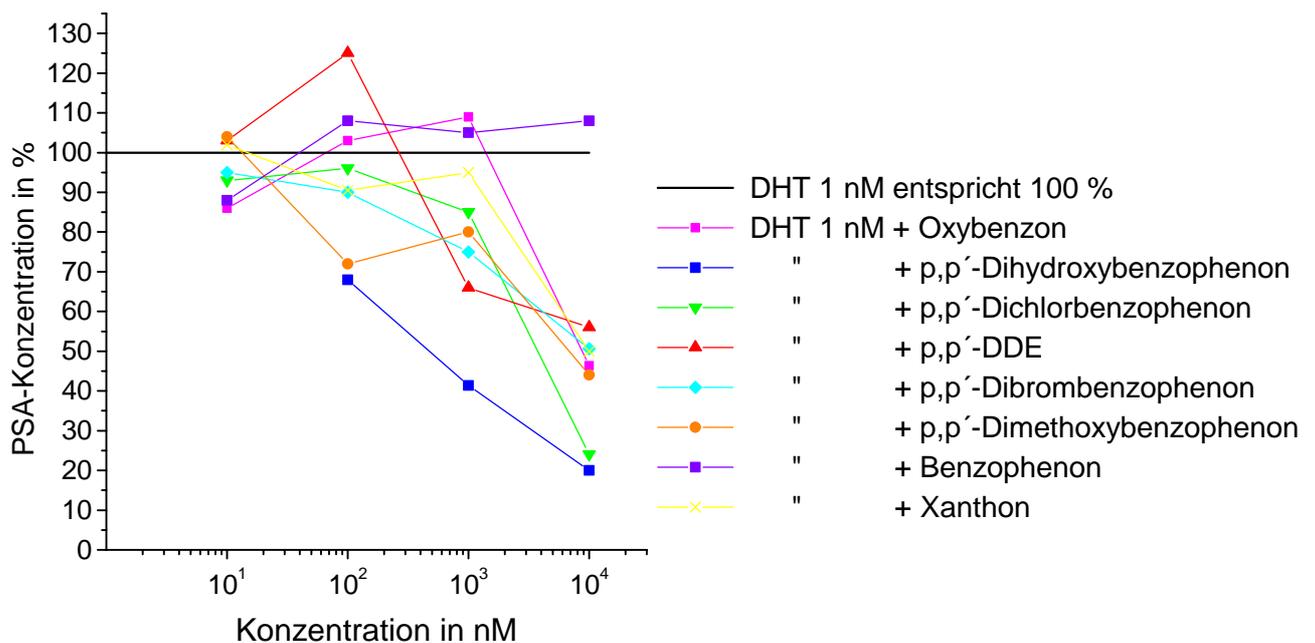


Abb.17: Antiandrogene Aktivität der Benzophenon Derivate im Überblick: PSA Assay in T47D Zellen (Mittelwerte, Einzelergebnisse siehe Anhang)

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse aller Versuche zusammenfassend dargestellt.

	Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen (-log IC ₃₀)	PSA Assay in T47 D Zellen (-log IC ₅₀)
<i>Benzophenone</i>		
p,p'-DDE	6,33	4,81
Oxybenzon	5,37	5,02
p,p'-Dihydroxy- benzophenon	6,11	6,15
p,p'-Dichlor- benzophenon	6,44	5,2
p,p'-Dibrom- benzophenon	5,0	4,99
p,p'-Dimethoxy- benzophenon	4,92	5,07
Xanthon	7,36	5,0
Benzophenon	7,89	negativ
<i>Phenylharnstoff- Analoga</i>		
Hydroxyflutamid	6,21	7,22
Vinclozolin M2	5,25	8,0
Linuron	6,1	5,28
Monolinuron	7,0	4,83
Diuron	nicht untersucht	5,01
Fluometuron	nicht untersucht	4,97
Metobromuron	nicht untersucht	4,84
Phenylharnstoff	nicht untersucht	negativ

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

2.3.3. Fazit

Die im Forschungsvorhaben erzielten Ergebnisse zeigen, dass die von uns ermittelten Leitstrukturen (siehe 2.2) für Antiandrogene ein vernünftiges und gut brauchbares Modell zur Identifizierung weiterer potentiell antiandrogen aktiver Verbindungen darstellen. Die meisten der über online Strukturdatenbanksuche (siehe 2.2) ermittelten Verbindungen konnten mittels der etablierten in vitro Testsysteme tatsächlich als antiandrogene Verbindungen identifiziert werden.

2.4. Molecular modeling: 3D-QSAR

Bei der dreidimensionalen QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) Methode werden mittels CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) abgeleitete dreidimensionale Eigenschaften der Moleküle mit den erhaltenen biologischen Daten wie z.B. IC₅₀- bzw IC₃₀-Werten korreliert. Voraussetzung ist ein Datensatz von mindestens 15 strukturell ähnlichen Verbindungen, deren biologische Daten sich über mehrere Zehnerpotenzen erstrecken. Dies war im begrenzten Rahmen dieser Arbeit nur teilweise erreichbar. Zwar konnten 16 Verbindungen im PSA Assay untersucht werden. Es handelt sich dabei aber strukturell um zwei unterschiedliche Verbindungsklassen (Benzophenon Derivate und Phenylharnstoff Analoga), die je acht Einzelsubstanzen beinhalten.

Im transienten Transaktivierungsassay konnten aus Zeitgründen im Rahmen des Forschungsvorhabens nur die Benzophenonderivate umfassend untersucht werden.

Für alle molecular modeling Berechnungen wurde Sybyl 6.5 (Tripos) eingesetzt. Alle Verbindungen wurden mittels des Standard Kraftfelds von Tripos energieminiert [Burkert und Allinger, 1982] und einer Konformationsanalyse unterzogen. Die Konformere mit der geringsten Energie wurden überlagert. Als Template diente Hydroxyflutamid: Über den Phenylring des Hydroxyflutamids wurden die Phenylringe der Phenylharnstoff-Analoga sowie je ein Phenylring der Benzophenon-Derivate gelegt. Die Orientierung wurde so gewählt, daß sich die restlichen Gruppen möglichst gut überlappen (Alignment Programm).

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

Die biologischen Daten wurden als $-\log$ der IC₅₀-bzw IC₃₀-Werte eingegeben. Für die beiden im PSA Assay nicht antiandrogen aktiven unsubstituierten Verbindungen Phenylharnstoff und Benzophenon war die Angabe eines Wertes schwierig und konnte nur unter Inkaufnahme von

größeren Fehlern erfolgen. Bei einer Konzentration von 10 μM war noch keine antiandrogene Aktivität zu erkennen. Verwendet wurde daher ein angenommener IC_{50} -bzw IC_{30} -Wert von 100 μM .

Eine statistische Auswertung erfolgte mittels Partial Least Squares (PLS) Analyse. Die kreuzvalidierten Werte q^2 (Berechnung siehe Abb. 18) sind in Tabelle 3 dargestellt. Ein signifikantes Modell zeichnet sich durch einen q^2 -Wert $> 0,4$ aus (Böhm et al, 1996; Waller et al., 1996).

$$q^2 = \frac{\text{SD -PRESS}}{\text{SD}}$$

Abb.18: Statistische Analyse; SD = Summe der Abweichungen zwischen gemessenem und durchschnittlichem Effekt im Quadrat ; PRESS = Summe der Abweichungen zwischen vorhergesagtem und gemessenem Effekt im Quadrat (Waller et al., 1996)

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

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

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

Ein Grund für die geringe Signifikanz der berechneten Modelle ist die noch nicht ausreichende Substanzanzahl pro Datensatz. Um aussagekräftigere Modelle zu erhalten, müssen die Daten in den einzelnen Testsystemen vervollständigt und vor allem erweitert werden. Dennoch können die beiden zuverlässigeren Modelle mit q^2 -Werten von 0,36 und 0,47 dazu genutzt werden, die biologische Aktivität neuer, noch nicht getesteter Verbindungen vorherzusagen. Die grundsätzliche Strukturvariation müßte allerdings im Rahmen des Struktur-Modells bleiben.

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

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

3. Voraussichtlicher Nutzen, Beitrag der Ergebnisse zu den Zielen des Förderprogramms

Im Verlauf des Forschungsvorhabens hat sich eindeutig gezeigt, dass zusätzlich zu den in vitro und in vivo bereits untersuchten estrogenen/antiestrogenen Wirkungen, mögliche androgene/antiandrogene Wirkungen nicht vernachlässigt werden dürfen. Systematische Untersuchungen auf diesem Gebiet befinden sich trotz einiger Fortschritte noch im Anfangsstadium. Die Identifizierung relevanter Verbindungen kann durch den Einsatz geeigneter in vitro Testansätze erfolgen, die eine schnelle und sensitive Erfassung hormonell

aktiver Verbindungen ermöglichen. Auch wenn bei diesen in vitro Ansätzen Metabolismus und Pharmakokinetik nicht berücksichtigt werden, geben sie doch Hinweise auf Verbindungen, die einer kosten- und zeitaufwendigen in vivo Untersuchung unterzogen werden sollten.

Die in diesem Forschungsvorhaben entwickelten in vitro Testansätze können einen substantiellen Beitrag zur Erfassung weiterer, bisher noch nicht berücksichtigter Antiandrogene liefern. Die ermittelten Struktur-Wirkungsbeziehungen können weiterhin eine erste Vorhersage des zu erwartenden antiandrogenen Potentials in vitro erlauben.

Insgesamt tragen die Ergebnisse des durchgeführten Forschungsvorhabens zur Identifizierung potentiell adverser Wirkmechanismen und damit zur Identifizierung eines möglichen Schädigungs- bzw. Gefährdungspotentials anthropogener, aber auch natürlicher Verbindungen bei.

4. Während der Durchführung des Vorhabens bekanntgewordene Fortschritte auf dem Gebiet

Zeitgleich mit den im Vorangehenden erläuterten Versuchen im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden auch von weiteren Gruppen in vitro Testsysteme zur Erfassung antiandrogener Wirkungen vorgestellt.

Während der Durchführung des Forschungsvorhabens wurden bereits zwei weitere Verbindungen, Procymidone und Linuron, in vitro und in vivo als antiandrogen aktiv identifiziert. Das Fungizid Procymidone weist dabei eine dem etablierten Antiandrogen Vinclozolin ähnliche Dicarboximid-Struktur auf (Ostby et al., 1999). Das Herbizid Linuron, das im Rahmen unseres Forschungsvorhabens ebenfalls als potentes Antiandrogen identifiziert werden konnte, entfaltet nach Lambright et al, 2000 auch in vivo antiandrogenes Potential.

Dies zeigt die Bedeutung des im Forschungsvorhaben verfolgten Ansatzes.

5. Veröffentlichung der Ergebnisse

Einreichung in *Environmental Health Perspectives* (Beginn 2002):

- Establishment of *in vitro* test systems to determine androgenic/antiandrogenic activity
Guth, S.E., Böhm, S., Mußler, B.H. and Eisenbrand, G.
- Antiandrogenic properties of oxybenzone and p,p'-dichlorobenzophenone in established *in vitro* reporter gene test systems
Guth, S.E., Böhm, S., Mußler, B.H. and Eisenbrand, G.

6. Literatur

- Böhm, H.J.; Klebe, G.; Kubinyi, H.: Wirkstoffdesign; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- Burkert, U. und Allinger, N.L.: Molecular Mechanics; ACS Monograph; 177; American Chemical Society; Washington (1982)
- Colborn, T.; vom Saal, F. S.; Soto, A. M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans; *Environmental Health Perspectives* 101(3); 378-384 (1993)
- Colborn, T. und Clement, C. (Ess.): Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection; Princeton Scientific Publishing Co.; Princeton, New Jersey (1992)
- Couette, B.; Le Ricousse, S.; Fortin, D.; Rafestin-Obelin, M.E.; Richard-Foy, H.: The establishment of the long terminal repeat of the mouse mammary tumor virus into CV-1 cells allows a functional analysis of steroid receptors; *Biochem Biophys Acta* 1219 (3); 607-12 (1994)
- Danzo, B.J.: The effects of environmental hormones on reproduction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54. 1249-1264 (1998)
- Kelce, W.R.; Stone, C.S; Laws, S.C. Gray, L.E. Kemppainen, J.A.; Wilson, E.M.: Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375. 581-585 (1995)
- Keydar, I.; Chen, L.; Karby, S.; Weiss, F.R.; Delarea, J.; Radu, M.; Chaitciks, S.; Brenners, H.J.: Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin; *Europ. J. Cancer* 15; 659-670 (1979)
- Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss AK, Mann PC, Gray LE. Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol Sci* 56: 389-399 (2000)

- Ostby, J.; Kelce, W.R.; Lambright, C.; Wolf, C.J.; Mann, P.; Gray, L.E.: The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicology and Industrial Health* 15. 80-93 (1999)
- Pathak, V. et al.: Antiandrogenic phenolic constituents from *dalbergia cochinchinensis*; *Phytochemistry* 46(7); 1219-1223 (1997)
- Rosenberg, R.S.; Grass, L.; Jenkins, D.J.A.; Kendall, C.W.C.; Diamandis, E.P.: Modulation of androgen and progesterone receptors by phytochemicals in breast cancer cell lines; *Biochem Biophys Res Comm* 248; 935-939 (1998)
- Sadar, M.D.: Androgen-independent induction of prostate-specific antigen expression via cross-talk between androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways; *Journal of Biological Chemistry* 274 (12); 7777-7783 (1999)
- Toppari, J.; Larsen, J.C.; Christiansen, P.; Giwereman, A.; Grandjean, P.; Guillette, L.J. Jr.: Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* 104. 741-803 (1996)
- Waller, C.L.; Booker, W.J.; Gray, L.E. JR., Kelce, W.R.: Three-dimensional quantitative structure-activity relationships for androgen receptor ligands; *Toxicology and Applied Pharmacology* 137; 219-227 (1996)
- Wong P; Pineault J, Lakins J, Taillefer D, Léger J, Wang C, Tenniswood M. Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *J Biol Chem* 268 (7): 5021-5031 (1993)
- Wong, C.; Kelce, W.R.; Sar, M.; Wilson, E.M.: Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide Vinclozolin relative to Hydroxyflutamid. *The Journal of Biological Chemistry* 270. 19998-20003 (1995)

7. ANHANG

Abkürzungen

AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen Responsive Element
CDFKS	mit Aktivkohle und Dextran behandeltes Fötale Kälberserum
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
DHT	Dihydrotestosteron
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GR	Glukokortikoidrezeptor
HRE	Hormone Responsive Element
IC ₅₀ bzw IC ₃₀	Inhibition Concentration 50% bzw. 30%
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
PBS	Phosphat Buffered Saline
PR	Progesteronrezeptor
PSA	Prostata Specific Antigen
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SD	Standardabweichung
TRPM-2	Testosterone Repressed Prostate Message 2

Darstellung der Einzelergebnisse

1. Phenylharnstoff-Analoga

1.1. Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen

DHT 100 nM war bei allen Messungen der Bezugspunkt.

Zu Abb. 14

Abb. 14 A

Antiandrogene Aktivität von Monolinuron im transienten Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen
(Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 3)

Zu Abb. 14:

Meßwerte für Linuron:

DHT 100 nM	= 100 %	
DHT 100 nM + Linuron 10 μ M	= 45,5 %, 70,8 %,	Mittelwert = 58 %
DHT 100 nM + Linuron 1 μ M	= 72,7 %, 52 %;	Mittelwert = 62 %
DHT 100 nM + Linuron 100 nM	= 118 %, 71%;	Mittelwert = 95 %

Meßwerte für Vinclozolin M2:

DHT 100 nM	= 100 %	
DHT 100 nM + Vinclozolin M2 10 μ M	= 65 %, 64 %;	Mittelwert = 65 %
DHT 100 nM + Vinclozolin M2 1 μ M	= 99 %, 52 %	Mittelwert = 76 %
DHT 100 nM + Vinclozolin M2 100 nM	= 96 %, 89 %	Mittelwert = 93 %

1.2. PSA Assay

Zu Abb. 15

Meßwerte für:

Linuron

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + Linuron 10 µM	= 22%; 21%	Mittelwert = 21,5%
DHT 1 nM + Linuron 1 µM	= 69%; 80%	Mittelwert = 74,5%
DHT 1 nM + Linuron 100 nM	= 67%; 74%	Mittelwert = 70,5%
DHT 1 nM + Linuron 10 nM	= 102%; 129%	Mittelwert = 115,5%

Vinclozolin M2

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + Vinclozolin M2 10 µM	= 0%; 0%	Mittelwert = 0%
DHT 1 nM + Vinclozolin M2 1 µM	= 1%; 0,6%	Mittelwert = 0,8%
DHT 1 nM + Vinclozolin M2 100 nM	= 19%; 17%	Mittelwert = 18%
DHT 1 nM + Vinclozolin M2 10 nM	= 28%; 25%	Mittelwert = 26,5%

Monolinuron

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + Monolinuron 10 µM	= 59%; 69%	Mittelwert = 64%
DHT 1 nM + Monolinuron 1 µM	= 92%; 85%	Mittelwert = 88,5%
DHT 1 nM + Monolinuron 100 nM	= 83%; 79%	Mittelwert = 81%
DHT 1 nM + Monolinuron 10 nM	= 59%; 77%	Mittelwert = 68%

Diuron

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + Diuron 10 µM	= 37%; 42%	Mittelwert = 39,5%
DHT 1 nM + Diuron 1 µM	= 87%; 80%	Mittelwert = 83,5%
DHT 1 nM + Diuron 100 nM	= 108%; 94%	Mittelwert = 101%

Fluometuron

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + Fluometuron 10 µM	= 53%; 56%	Mittelwert = 54,5%
DHT 1 nM + Fluometuron 1 µM	= 98%; 119%	Mittelwert = 108,5%
DHT 1 nM + Fluometuron 100 nM	= 89%; 112%	Mittelwert = 100,5%

Phenylharnstoff

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + Phenylharnstoff 10 µM	= 93%; 98%	Mittelwert = 95,5%
DHT 1 nM + Phenylharnstoff 1 µM	= 91 %; 66%	Mittelwert = 78,5%
DHT 1 nM + Phenylharnstoff 100 nM	= 85%; 107%	Mittelwert = 96%
DHT 1 nM + Phenylharnstoff 10 nM	= 101%; 88%	Mittelwert = 94,5%

Zu Abb.15:

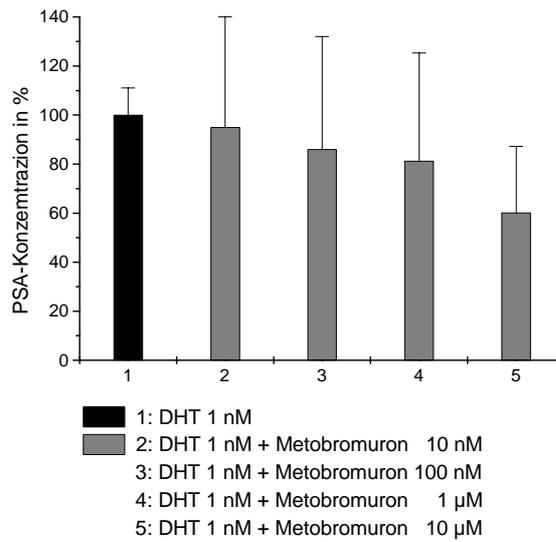


Abb. 15 A:

Antiandrogene Aktivität von Metobromuron im PSA Assay (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 3)

2. Benzophenon Derivate

2.1. Transienter Transaktivierungsassay in COS-7 Zellen

Zu Abb. 16

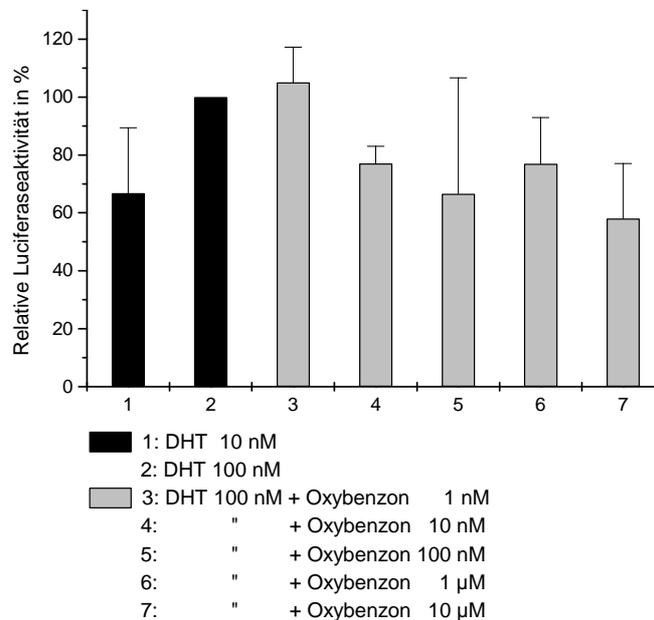


Abb. 16 A:

Antiandrogene Aktivität von Oxybenzon im transienten Transaktivierungsassay (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3)

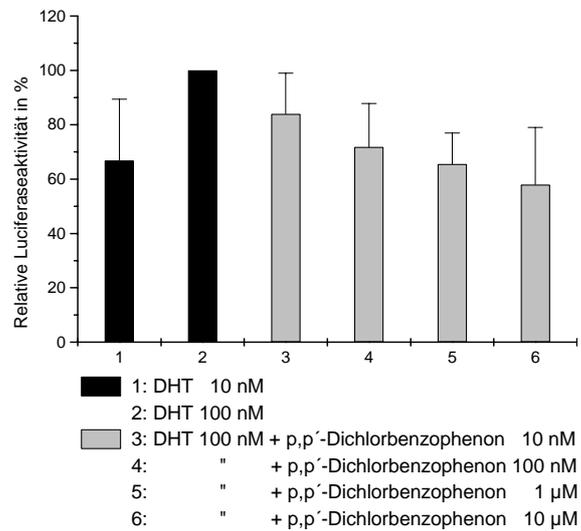


Abb. 16 B:

Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dichlorobenzophenon im transienten Transaktivierungsassay (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3)

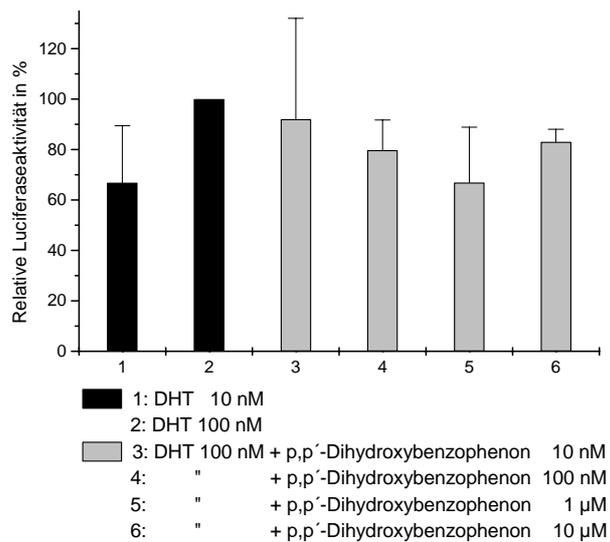


Abb. 16 C:

Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dihydroxybenzophenon im transienten Transaktivierungsassay (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3)

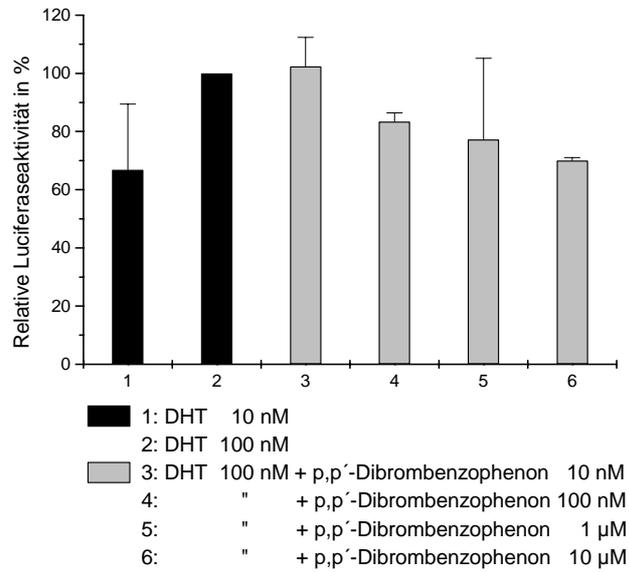


Abb. 16 D:

Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dibromobenzophenon im transienten Transaktivierungsassay (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3)

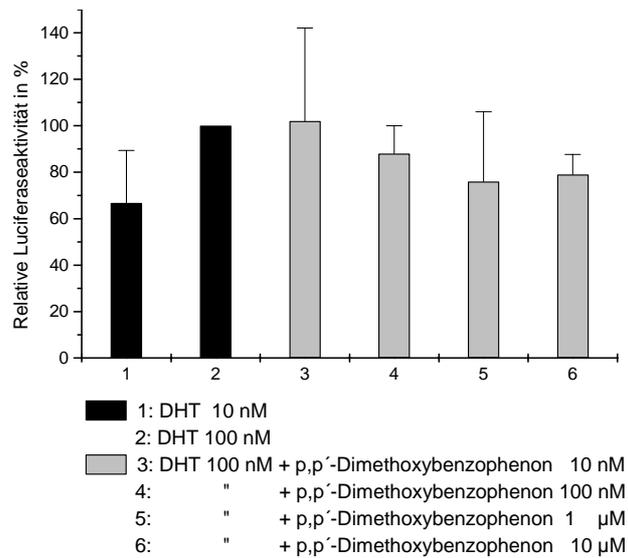


Abb. 16 E:

Antiandrogene Aktivität von p,p'-Dimethoxybenzophenon im transienten Transaktivierungsassay (Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 3)

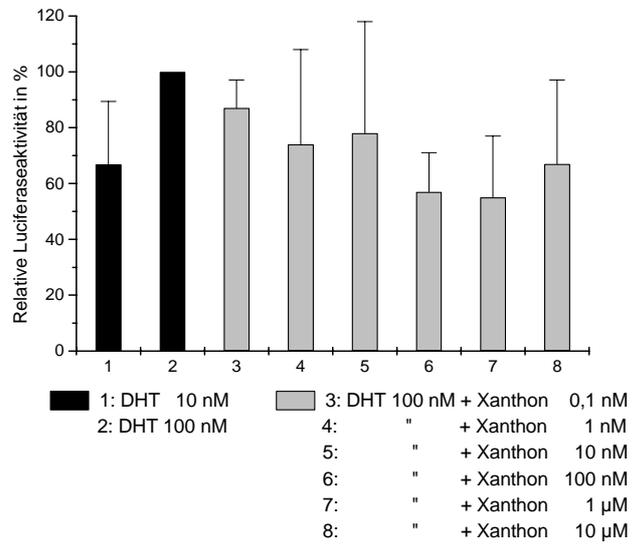


Abb. 16 F:

Antiandrogene Aktivität von Xanthon im transienten Transaktivierungsassay (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 5)

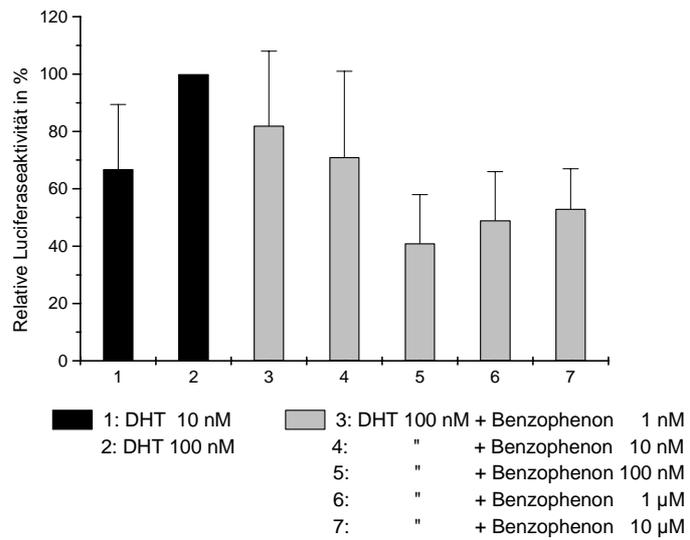


Abb. 16 G:

Antiandrogene Aktivität von Benzophenon im transienten Transaktivierungsassay (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 6)

2.2. PSA Assay

Zu Abb. 17:

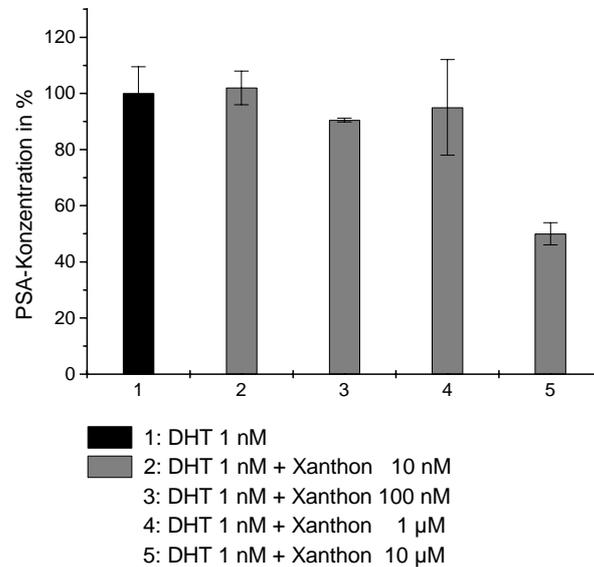


Abb. 17 A:

Antiandrogene Aktivität von Xanthon im PSA Assay (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 3)

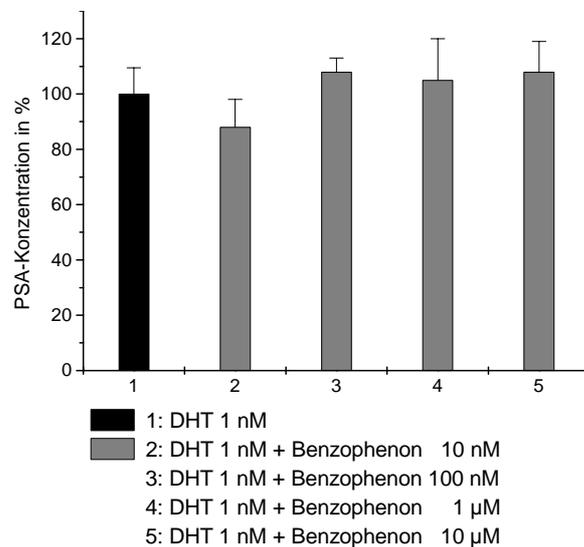


Abb. 17 B:

Untersuchung der antiandrogenen Aktivität von Benzophenon im PSA Assay (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 3)

Zu Abb. 17:

Meßwerte für:

Oxybenzon

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + Oxybenzon 10 µM	= 43%; 50%	Mittelwert = 46,5%
DHT 1 nM + Oxybenzon 1 µM	= 121%; 96%	Mittelwert = 108,5%
DHT 1 nM + Oxybenzon 100 nM	= 99%; 107	Mittelwert = 103%
DHT 1 nM + Oxybenzon 10 nM	= 85%; 87%	Mittelwert = 86%

P,p'-Dichlorbenzophenon

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + p,p'-Dichlorbenzophenon 10 µM	= 20%; 23%	Mittelwert = 21,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dichlorbenzophenon 1 µM	= 73%; 89%	Mittelwert = 81%
DHT 1 nM + p,p'-Dichlorbenzophenon 100 nM	= 88%; 97%	Mittelwert = 92,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dichlorbenzophenon 10 nM	= 82%; 107%	Mittelwert = 94,5%

P,p'-Dibrombenzophenon

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + p,p'-Dibrombenzophenon 10 µM	= 45%; 44%	Mittelwert = 44,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dibrombenzophenon 1 µM	= 78%; 65%	Mittelwert = 71,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dibrombenzophenon 100 nM	= 95%; 86%	Mittelwert = 90,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dibrombenzophenon 10 nM	= 95%; 89%	Mittelwert = 92%

P,p'-Dihydroxybenzophenon

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + p,p'-Dihydroxybenzophenon 10 µM	= 20%; 19%	Mittelwert = 19,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dihydroxybenzophenon 1 µM	= 39%; 44%	Mittelwert = 41,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dihydroxybenzophenon 100 nM	= 63%; 73%	Mittelwert = 68%

P,p'-Dimethoxybenzophenon

DHT 1 nM = 100 %		
DHT 1 nM + p,p'-Dimethoxybenzophenon 10 µM	= 44%; 36%	Mittelwert = 40%
DHT 1 nM + p,p'-Dimethoxybenzophenon 1 µM	= 73%; 76%	Mittelwert = 74,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dimethoxybenzophenon 100 nM	= 61%; 74%	Mittelwert = 67,5%
DHT 1 nM + p,p'-Dimethoxybenzophenon 10 nM	= 93%; 103%	Mittelwert = 98%