

Etablierung hormonaler Assays und Testung von Extrakten, Naturstoffen und synthetischen Verbindungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Apothekerin Claudia Bobach

geb. am 30.07.1977 in Köthen

Gutachter:

1. Prof. Dr. L. A. Wessjohann (Halle (Saale))
2. PD Dr. P. Thelen (Göttingen)

Halle (Saale), 12. April 2011

Danksagung

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater Herrn Professor Dr. Ludger A. Wessjohann richten. Er hat dieses Thema für mich bereitgestellt, mich während der Arbeit begleitet und mir viel Vertrauen bei der Erprobung und Bewältigung neuer Methoden und Ideen entgegengebracht. Gerade dieses Vertrauen seinerseits hat es mir ermöglicht ein Maß an selbständigem Arbeiten und wissenschaftlichem Selbstvertrauen zu erlangen, für das ich sehr dankbar bin. Hervorheben möchte ich das Verständnis und die Unterstützung, die er mir in meiner besonderen persönlichen Situation wie Schwangerschaft und Geburt entgegengebracht hat.

Ein besonderer Dank gilt der Wella AG, Darmstadt, die die Promotion finanziell unterstützt hat.

Vielen Dank auch an das Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Frau Professor Dr. Barbara Seliger hat mir die Möglichkeit gegeben, dort die Methoden der humanen Zellkultur zu erlernen. Für die Bereitstellung der Materialien, die Nutzung der Räumlichkeiten und Geräte und für das freundliche und entgegenkommende Arbeitsklima möchte ich mich ausdrücklich bedanken. Frau PD Dr. Dagmar Riemann möchte ich für die Einführung in die Gruppe danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Biochemiker Jens Wulfänger. Er hat mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden, bei Engpässen mit kreativen Lösungen geholfen und mit seinem Humor den Laboralltag zu einem Erlebnis gemacht. Vielen Dank auch an Frau Dr. Andrea Kiessling für die vielen Hilfestellungen und fachlichen Diskussionen. Es hat mir viel bedeutet, mit ihr zusammenarbeiten zu dürfen.

Besonders möchte ich den Kollegen am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle für die fachliche Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima danken. Danken möchte ich allen Gruppenleitern, die mir als Spezialisten ihres Gebietes immer helfend zur Seite standen. Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Wolfgang Brandt, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Trotzdem ich mich mit anderen Methoden beschäftigt habe, gab es für meine Probleme immer ein offenes Ohr. Zugleich hatte ich die einmalige Gelegenheit durch die Gruppenseminare viel über die Methoden der Computerchemie zu erlernen. Ich danke allen Mitgliedern der Gruppe Computerchemie, besonders Frau Dipl.-Bioinformatikerin Stephanie Tennstedt. Stephanie hat mich von Anfang an willkommen geheißen und durch die thematische Nähe hat sich eine sehr fruchtbare Zusammenarbeit entwickelt. Besonders möchte ich ihr für die Unterstützung bei den letzten Versuchen während der Schwangerschaft und kurz nach der Geburt danken. Für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor möchte ich Martina Lerbs danken. Mein Dank gilt auch dem Team vom Technikum. Allen voran Frau Dr. Andrea Porzel, nicht nur für die NMR-Messungen und die Erläuterungen dazu, sondern auch für das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen Anregungen und fruchtbaren Diskussionen. Ein Dank an die gesamte Mittagsrunde, an Maritta Süße, Dr. Susanne Aust und

Gisela Schmidt. Ein Dankeschön an die vielen Helfer im Labor, an Katharina Wolf und Nicole Hünnecke, an die Praktikantin Sonja Klement und die Diplomandin Kristin Palberg. Kristin war in der letzten Phase der Schwangerschaft bei einigen Versuchen der Retter in der Not. Annika Denkert und Dr. Katrin Franke danke ich ganz besonders für die Fortführung von Teilen des Themas. Dr. Norbert Arnold und Dr. Katrin Franke möchte ich für die Hilfe bei Extraktions- und Fraktionierungsproblemen danken, Dr. Jürgen Schmidt und Christine Kuhnt für die Durchführung der MS-Messungen und die Hilfe bei der Interpretation und Auswertung. Vielen Dank an Gudrun Hahn für die Durchführung der HPLC. Ein ganz großes Dankeschön geht an Ines Stein. Sie hat mit ihrem Organisationstalent und ihrem frischen Humor geholfen, die organisatorischen Klippen zu umschiffen.

Abstract

The androgen receptor and its signalling pathways are involved in many kinds of diseases. Androgen receptor signalling pathway inhibitors are used in the treatment of benign prostate hyperplasia, prostate cancer and skin disorders like acne, hirsutism or androgenetic alopecia. On the other hand androgenic anabolic compounds are used for the treatment of chronic wasting conditions due to AIDS or cancer cachexia because of their appetite-stimulating effect. They are also applied as male contraceptives, in hormone replacement therapies for elderly males and in gender dysmorphia. For detecting synthetic compounds, natural products and plant and fungi extracts/fractions for interfering with the androgen dependent signalling pathway, a cell proliferation assay using the androgen dependent growing LNCaP prostate carcinoma cell line and the androgen independent PC-3 prostate carcinoma cell line was established. Substances were predicted for their androgen receptor binding activity via *in silico* screening and tested on the androgen receptor binding domain. Plant and fungi extracts were prepared using the automated accelerated solvent extraction and fractionated with gradient extrography. 147 substances and 186 prepared fractions from 23 organisms were tested in the cell proliferation assay.

35 substances were detected with a proliferation stimulating activity on LNCaP cells, which can be associated with an androgenic as well as an antiandrogenic behaviour. After characterization of these substances in the fluorescence polarization androgen receptor binding assay, three of them were characterized as strong to moderate androgen receptor binders in the low nanomolar and low micromolar IC_{50} range. These nortestosterone derivatives (**70**, **71**) and the phytosterole β -sitosterol (**57**) were further analyzed for their androgenic or antiandrogenic potential using a gene expression assay. The two nortestosterone derivatives (**70**, **71**) could be clearly demonstrated to have androgenic potential, while β -sitosterol (**57**) has partial agonistic and partial antagonistic activities. They were checked for cross binding towards other steroid hormone receptors. None of them showed specific androgen receptor binding capabilities. 21 substances were found to reduce the testosterone stimulated LNCaP cell proliferation, which indicates the antiandrogenic property of those compounds. Subsequent testing at the fluorescence polarization androgen receptor binding assay revealed a low micromolar binding activity for one steroid and a micromolar binding activity for a steroid and a flavonoid substance. Four substances reduced both the growth of the LNCaP as well as the PC-3 cell line and were characterized as cytotoxic compounds.

47 fractions were found to stimulate the proliferation activity of LNCaP cells, while most of them also decreased PC-3 cell growth. Estrogens and glucocorticoids also stimulate LNCaP cell growth because of the mutated androgen receptor in LNCaP cells, but decrease PC-3 cell growth at the same time via their own receptors. 22 of those fractions showed a high proliferation stimulating activity without reducing PC-3 cell

growth, which indicates androgenic/antiandrogenic potential. *Cibotium barometz* seemed to be most promising for further analysis. Comparison with *Cibotium schiedei* and *Cibotium regale* species revealed similar but higher activities for *Cibotium barometz*. Further analyses using the gene expression assay showed an antiandrogenic behaviour via significant but weak reduction of PSA-mRNA levels and a significant decrease in AR-mRNA levels. The elucidation of the responsible substances remained without any success. 11 antiandrogenic fractions were detected, which reduced the testosterone stimulated LNCaP cell proliferation, but not the PC-3 cell growth. The proliferation data from *Bumelia sartorum* were most promising and should be analyzed further to elucidate structural information responsible for its activity.

Zusammenfassung

Der Androgenrezeptor und seine Signalwege spielen in einer Vielzahl von Erkrankungen eine wichtige Rolle. So werden Inhibitoren des Androgenrezeptors und seiner Signalwege therapeutisch gegen Prostatakrebs, benigne Prostatahyperplasie, Erkrankungen der Haut und Hautanhangsgebilde wie Akne, Hirsutismus und androgenetischer Alopezie eingesetzt. Androgene anabole Steroide werden dagegen bei der Behandlung von chronischen Erschöpfungszuständen wie AIDS und Krebskachexie durch Appetitsteigerung eingesetzt. Ebenso finden sie Anwendung als hormonelle Kontrazeptiva für den Mann, in Hormonersatztherapien bei älteren Männern und bei sexuellen Differenzierungsstörungen. Um sowohl synthetische Verbindungen bzw. Naturstoffe als auch Pflanzen- bzw. Pilzextrakte und Fraktionen derselben hinsichtlich ihres Einflusses auf den androgenabhängigen Signalweg untersuchen zu können, wurde unter Verwendung der androgenabhängig wachsenden Prostatakrebszelllinie LNCaP und der androgenunabhängig wachsenden Prostatakrebszelllinie PC-3 ein Zellproliferationsassay etabliert. Die Strukturen, hauptsächlich aus der hauseigenen Substanzdatenbank stammend, wurden durch Methoden des *in silico* Screening auf ihre Bindungsfähigkeit am Androgenrezeptor geprüft und zur Testung an der AR-Bindedomäne vorgeschlagen. Pflanzen- und Pilzextrakte wurden durch beschleunigte Lösemittelextraktion mit dem automatischen Extraktor Dionex ASE 200® präpariert und mittels Gradientenextrographie fraktioniert. 147 Substanzen und 186 Fraktionen aus 23 Organsimen wurden der Testung am Zellproliferationsassay unterzogen.

Für 35 Verbindungen wurde ein proliferationssteigernder Effekt an den LNCaP-Zellen beobachtet, was mit einer androgenen als auch antiandrogenen Aktivität in Verbindung gebracht werden kann. Nach näherer Charakterisierung durch Fluoreszenzpolarisationsbindungsassays dieser Verbindungen an der AR-Bindedomäne, konnten drei von ihnen als starke bis mäßig starke Binder des Androgenrezeptors im niedrig nanomolaren und niedrig mikromolaren IC_{50} -Bereich eingestuft werden. Diese zwei Nortestosteronderivate (**70**, **71**) und das Phytosterol β -Sitosterol (**57**) wurden hinsichtlich ihres androgenen bzw. antiandrogenen Potentials mit Hilfe eines Genexpressionsassays näher untersucht. Für die zwei Nortestosteronderivate (**70**, **71**) konnte eindeutig eine androgene Wirkung festgestellt werden und für β -Sitosterol (**57**) eine partiell agonistische und partiell antagonistische Aktivität. Die Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer Kreuzbindungsreaktivität gegenüber anderen Steroidhormonrezeptoren überprüft. Keine von ihnen zeigt eine spezifische Androgenrezeptorbindung. Für 21 Verbindungen konnte eine Hemmung der Testosteron-vermittelten LNCaP-Zellproliferation beobachtet werden, was für eine antiandrogene Wirkung der Substanzen spricht. Eine nachfolgende Analyse auf ihre Androgenrezeptorbindungsfähigkeit erbrachte für ein Steroid IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich und für ein Steroid und eine flavonoidartige Substanz IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich. Vier Verbindungen reduzierten sowohl das

Wachstum der LNCaP- als auch der PC-3-Zellen und wurden deshalb als zytotoxisch eingestuft.

Eine Stimulation der LNCaP-Zellproliferation konnte für 47 Fraktionen festgestellt werden, wobei die meisten davon die PC-3-Zellzahl erheblich reduzierten. Östrogene und Glukokortikoide können aufgrund des mutierten Androgenrezeptors in den LNCaP-Zellen ebenfalls eine Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen verursachen, gleichzeitig aber über ihre eigenen Rezeptoren eine Verminderung des Zellwachstums bei PC-3-Zellen bewirken. 22 Fraktionen zeigten eine alleinige LNCaP-Proliferationssteigerung, ohne Reduktion der PC-3-Zellzahl, was für eine androgene bzw. antiandrogene Aktivität spricht. *Cibotium barometz* wurde zur weiterführenden Analyse ausgewählt. Ein Vergleich der Aktivitäten mit *Cibotium schiedei* und *Cibotium regale* hat eine ähnliche, aber höhere Aktivität für *Cibotium barometz* gezeigt. Mittels Genexpressionsanalyse in VCaP-Zellen konnte für den *Cibotium barometz*-Extrakt eine schwache antiandrogene Wirkung durch Reduzierung des PSA- und AR-mRNA-Spiegels nachgewiesen werden. Die Isolierung und Strukturaufklärung der dafür verantwortlichen Substanzen blieben erfolglos. Es wurden 11 antiandrogene Fraktionen gefunden, die die Testosteronvermittelte Proliferation der LNCaP-Zellen, aber nicht die der PC-3-Zellen inhibierten. Die Proliferationsdaten von *Bumelia sartorum* waren am vielversprechendsten und sollten näher charakterisiert werden.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Abstract	IV
Zusammenfassung	VI
Inhaltsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XV
Abbildungsverzeichnis	XVII
Formelverzeichnis	XXI
1 Einleitung	1
1.1 Signaltransduktion durch Androgenrezeptorliganden	2
1.1.1 Androgenrezeptor	2
1.1.2 Wirkmechanismus des Androgenrezeptors	4
1.1.3 Cofaktoren	6
1.1.4 Androgenabhängig regulierte Gene	8
1.2 Androgenrezeptorliganden	9
1.2.1 Androgene	9
1.2.2 Endokrine Disruptoren	12
1.2.3 Klinisch relevante Androgenrezeptorliganden	17
1.3 Testsysteme zur Untersuchung hormoneller Aktivität	22
1.3.1 Zellproliferationsassays	22
1.3.2 Reportergenassays	23
1.3.3 Genexpressionsassays	25
1.3.4 Rezeptorbindungsassays	25
1.3.5 Coaktivator-Assays	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Extraktion und Fraktionierung	27
2.1.1 Extraktion	27
2.1.2 Fraktionierung	28
2.1.3 Pflanzen- und Pilzmaterial	30
2.2 Zellkultur	31
2.2.1 Verwendete Zelllinien	31
2.2.2 Kultivierung der Zellen	33
2.2.3 Kryokonservierung von Zellen	34
2.3 Zellproliferationsassay	35

2.3.1	Vorinkubation	35
2.3.2	Durchführung der Assays.....	35
2.3.3	Photometrische Detektion	36
2.4	Genexpressionsassay.....	36
2.5	Molekularbiologische Experimente	36
2.5.1	RNA-Extraktion	36
2.5.2	DNase-Verdau.....	37
2.5.3	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	37
2.5.4	Reverse Transkription	38
2.5.5	Quantitative Real-Time-PCR.....	38
2.6	Rezeptorbindungsassay	41
2.6.1	Funktionsweise der Fluoreszenzpolarisationsassays	41
2.6.2	Durchführung	42
2.6.3	Auswertung der Bindungsassays	43
2.7	Statistik	48
3	Ergebnisse und Diskussion	49
3.1	<i>In silico</i> Screening und Testsubstanzen	49
3.2	Testextrakte und Testfraktionen.....	50
3.2.1	Auswahl des Extraktionsverfahrens.....	50
3.2.2	Auswahl des Fraktionierungsschrittes	51
3.2.3	Extraktionsschema	51
3.2.4	Präparierte Extrakte und Fraktionen	52
3.3	Zellproliferationsassay	54
3.3.1	Etablierung und Validierung des Zellproliferationsassays	54
3.3.1.1	Ernährungseffekte	54
3.3.1.2	Wachstum in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Zellzahl....	58
3.3.1.3	Einfluss von Androgenen auf das Zellwachstum.....	61
3.3.1.4	Einfluss von antiandrogen wirksamen Substanzen auf die Zellproliferation	64
3.3.1.5	Einfluss von Östrogenen und Antiöstrogenen auf das Zellwachstum	68
3.3.1.6	Vergleich von Bicalutamid und Fulvestrant	72
3.3.1.7	Zusammenfassung.....	79
3.3.2	Potentielle androgene Effekte	80
3.3.2.1	Reinsubstanzen.....	80
3.3.2.2	QDM276, QDM255 und β -Sitosterol	82
3.3.2.3	Extrakte und Fraktionen.....	84
3.3.2.4	<i>Cibotium barometz</i>	88
3.3.3	Potentielle antiandrogene Effekte	94
3.3.3.1	Reinsubstanzen.....	94
3.3.3.2	Extrakte und Fraktionen.....	96
3.3.3.3	<i>Bumelia sartorum</i>	97

3.3.4	Zytotoxische Effekte	99
3.3.4.1	Reinsubstanzen.....	100
3.3.4.2	Extrakte und Fraktionen.....	101
3.4	Rezeptorbindungsassay	103
3.4.1	Validierung der Fluoreszenzpolarisations- Rezeptorbindungsassays	103
3.4.2	Testung der potentiellen Androgenrezeptorbinder	103
3.4.3	Bestimmung der IC ₅₀ - und K _i -Werte	107
3.4.4	Rezeptorbindungsassays an weiteren Steroidhormonrezeptoren	109
3.5	Genexpressionsassay.....	111
3.5.1	Bestimmung der PSA-mRNA-Expression in LNCaP-Zellen	111
3.5.2	Bestimmung der PSA-mRNA- und AR-mRNA-Expression in VCaP-Zellen.....	113
3.6	Zusammenfassende Diskussion	119
3.6.1	QDM276 und QDM255	119
3.6.2	β-Sitosterol.....	123
4	Schlussfolgerung.....	127
5	Anhang.....	129
A	Strukturformelverzeichnis.....	129
B	Verzeichnis der verwendeten Kits, Geräte und Materialien	157
C	Nachweise und Reagenzien	159
D	Wertetabellen	159
E	Strukturaufklärung der Substanz aus LAW540_E11 (Onitin).....	160
F	Extraktionsschemata	162
6	Index.....	167
	Lebenslauf	169
	Eidesstattliche Erklärung.....	171
	Literaturverzeichnis.....	172

Abkürzungsverzeichnis

17 β -OH-SDH	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
3 β -OH-SDH	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
AAS	Anabole Androgene Steroide
Abb.	Abbildung
ADFKS	Aktivkohle-Dextran behandeltes fötales Kälberserum
AF-1	Aktivierungsfunktion-1
AF-2	Aktivierungsfunktion-2
AR	Androgenrezeptor
ARA	Androgen Receptor Associated Protein
AR-A	Androgenrezeptor-Isoform-A
AR-B	Androgenrezeptor-Isoform-B
ARE	Androgen Response Elements
ARG	Androgenabhängig regulierte Gene
ATCC	American Type Culture Collection
BF-3	Binding Function-3
Bp-3	Benzophenon-3
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSS	β -Sitosterol
C2C12	Myoblasten-Zelllinie, Maus
CD ₃ OD	Deuteriertes Methanol
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese hamster ovary cells
COS	CV-1 cell origin, carrying the SV40 genetic material
CRPC	Castration resistant prostate carcinoma
CV-1	Nierenfibroblastenzellen, grüne afrikanische Meerkatze
CYP	Cytochrom P450
DBD	DNA-bindende Domäne
DC	Dünnschichtchromatographie
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DIM	3,3'-Diindolylmethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA-abbauendes Enzym
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DU145	Prostatakrebszelllinie

E2	17 β -Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERE	Estrogen Response Element
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ERR α	Estrogen Related Receptor alpha
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GR	Glukokortikoidrezeptor
GST-tag	Glutathion-S-transferase-Tag
HDL	High Density Lipoprotein
HEK293	Human Embryonic Kidney cells
HeLa	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HepG2	Hepatozelluläre Karzinomzellen
His-tag	poly-Histidin-Tag
HMS	Homosalat
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
HSP	Hitze-Schock-Proteine
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-6	Interleukin-6
IPB	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
<i>J</i>	Skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante, angegeben in Hz
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LH	Luteinisierendes Hormon
LNCaP	Prostatakrebszelllinie
m/z	Masse/Ladungszahl
MAP	Mitogen Activated Protein
MCF-7	Brustkrebszelllinie
MDA-kb2	Brustkrebszelllinie, abgeleitet von MDA-MB-453
MENT	7 α -Methyl-19-Nortestosteron
MeOH	Methanol
MMTV	Maus-Mammatumovirus
MOE	Molecular Operating Environment

MolID	Molekülidentitätsnummer der IPB-Substanzdatenbank
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	Messenger-RNA
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NBBS	N-Butylbenzensulfonamid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
OHF	Hydroxyflutamid
<i>p,p'</i> -DDE	Dichlordiphenyldichlorethen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC-3	Prostatakrebszelllinie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PR	Progesteronrezeptor
PSA	Prostatapezifisches Antigen
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
R1881	Methyltrienolon, Methyltrenbolon, Metribolon
RBA	Relative Bindungsaffinität
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute)
RT	Raumtemperatur
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SARM	Selektive Androgenrezeptormodulatoren
SD	Standardabweichung
Shc	Familie von Adaptor Proteinen (Shc = Src Homology and Collagen)
SMRT	Corepressor (Silencing Mediator for Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptors)
Src	Familie protoonkogener Tyrosinkinasen (Src = Sarcoma)
T	Testosteron
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TMS	Trimethylsilan
TR-FRET	Time Resolved - Fluorescence Resonance Energy Transfer
U2OS	Osteosarkomzellen
VCaP	Prostatakrebszelllinie
Wnt	Ligand des Wnt-Signalwegs (Wg – Wingless und Int – Gen)
wt	Wildtyp
wtAR	Wildtyp Androgenrezeptor
XTT	Na-3,3'-[1-(phenylamino)carbonyl-3,4-tetrazolium]- bis(4-methoxy-6-nitrobenzol)-sulfonsäurehydrat
δ	Chemische Verschiebung, angegeben in ppm

IPB-interne Buchstabencodes (3LC) für Extrakte, Fraktionen und Substanzen

BOC
DBC
DFK
DRT
GUG
LAW
MAD
MMK
NHV
QDM
TPT
XSA
ZAB
ZAC
ZHM

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SARMs in klinischer Entwicklung.....	19
Tabelle 2: Antiandrogene und ihre Anwendungen.....	21
Tabelle 3: Extraktionsparameter.....	27
Tabelle 4: Allgemeine Probenkennzeichnung der Extrakte und Fraktionen.....	28
Tabelle 5: Extrahierte Pflanzen	30
Tabelle 6: Extrahierte Pilze	31
Tabelle 7: Extrakte von Kooperationspartnern.....	31
Tabelle 8: Zusammensetzung Zellkulturmedien	33
Tabelle 9: Verwendete Primer.....	39
Tabelle 10: Messwellenlängen der Fluoreszenzpolarisationsassays	42
Tabelle 11: Assay-Rezeptorproteine, ihre eingesetzten Testkonzentrationen (R_T), Konzentrationen gelabelter Liganden (L_T) und ihre K_d -Werte	47
Tabelle 12: Anreicherung von Phytosterolen in Lösungsmittelkombinationen	50
Tabelle 13: Extrahierte Pflanzen und ihre Extraktausbeuten	53
Tabelle 14: Extrahierte Pilze und ihre Extraktausbeuten	53
Tabelle 15: Standardsubstanzen und ihre EC_{50} -LNCaP-Zellproliferationswerte mit ihren Funktionsparametern	71
Tabelle 16: Mögliche Effekte am Zellproliferationsassay	79
Tabelle 17: Prozentuale Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen durch Standardsubstanzen	80
Tabelle 18: Substanzen mit statistisch hochsignifikanter LNCaP- Zellproliferationssteigerung mit verminderter bzw. keiner signifikanten Proliferation der PC-3-Zellen	81
Tabelle 19: Substanzen mit statistisch signifikanter LNCaP-Zellproliferationssteigerung mit verminderter bzw. keiner signifikanten Proliferation der PC-3-Zellen.....	82
Tabelle 20: Substanzen mit hochsignifikanter Proliferationssteigerung der LNCaP- Zellen und gleichzeitiger Proliferationssteigerung der PC-3-Zellen.....	82
Tabelle 21: EC_{50} -Werte und LNCaP-Zellproliferationsparameter für QDM276 (71), QDM255 (70) und β -Sitosterol (57).....	84
Tabelle 22: Fraktionen mit der stärksten LNCaP-Proliferationssteigerung	85
Tabelle 23: Extrakte und Fraktionen mit statistisch signifikanter Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen und nicht signifikantem Effekt an PC-3- Zellen bzw. mit vermindertem Wachstum der PC-3-Zellen.....	86
Tabelle 24: Substanzen mit verminderter LNCaP-Zellproliferation während Testosteronzugabe 1nM.....	95
Tabelle 25: Extrakte und Fraktionen mit verminderter LNCaP-Zellproliferation während Testosteronzugabe 1 nM.....	96
Tabelle 26: Zellproliferationsdaten des wässrigen Extraktes von <i>Bumelia sartorum</i>	97

Tabelle 27: Zellproliferationsdaten der HPLC-Fractionen von <i>Bumelia sartorum</i>	98
Tabelle 28: Testung weiterer <i>Bumelia sartorum</i> Extrakte und Fraktionen	99
Tabelle 29: Zytotoxisch wirkende Substanzen	100
Tabelle 30: Zytotoxisch wirkende Extrakte bzw. Fraktionen	101
Tabelle 31: Bestimmung der IC ₅₀ -Werte für die Positivkontrollen	103
Tabelle 32: Relative AR-Bindungsaffinitäten der LNCaP-zellproliferationssteigernden Substanzen	104
Tabelle 33: Relative AR-Bindungsaffinitäten der potentiell antiandrogen wirkenden Substanzen	105
Tabelle 34: Am Androgenrezeptor bindende Substanzen mit ihren Bindungsparametern	108
Tabelle 35: Identifizierte Androgenrezeptorbinder und ihre Bindungsparameter an anderen Steroidhormonrezeptoren	110
Tabelle 36: Einstufung der AR-Binder in Agonisten bzw. Antagonisten	119
Tabelle 37: Strukturformelverzeichnis	129
Tabelle 38: Kits	157
Tabelle 39: Geräte	158
Tabelle 40: Materialien	158
Tabelle 41: Angabe der Minimum- und Maximum-Werte, die in die Berechnung der AR-IC ₅₀ -Werte mit der 4-Parameter-Logistikkurve eingeflossen sind	159
Tabelle 42: ¹ H- und ¹³ C-NMR-Daten von Onitin (100)	160

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gemeinsame strukturelle/funktionelle Domänen der Kernrezeptoren nach Mangelsdorf ⁷	3
Abbildung 2: Genotroper Wirkmechanismus des Androgenrezeptors (Typ I)	5
Abbildung 3: Nichtgenotroper Wirkmechanismus des Androgenrezeptors.....	6
Abbildung 4: Androstan Grundgerüst (10).....	9
Abbildung 5: Testosteron-Stoffwechsel nach Mutschler <i>et al.</i> ³⁹	10
Abbildung 6: Verstoffwechslung der Androgene zu Östrogenen nach Thews <i>et al.</i> ⁴⁰	11
Abbildung 7: Linuron (22)	12
Abbildung 8: Strukturelle Ähnlichkeit von a) Vinclozolin (23) zu b) Hydroxyflutamid (8)	12
Abbildung 9: UV-Filter a) Benzophenon-3 (Bp-3) (24) und b) Homosalat (25) (HMS) mit antiandrogener Aktivität.....	13
Abbildung 10: Euphol (26).....	13
Abbildung 11: Ganoderol B (28).....	14
Abbildung 12: 3,3`-Diindolylmethan (DIM) (29).....	15
Abbildung 13: N-Butylbenzensulfonamid (NBBS) (31).....	15
Abbildung 14: Atrarsäure (R ₁) (32) und die synthetisierten Derivate.....	16
Abbildung 15: Metabolisierung von a) Daidzein (27) zu b) Equol (36)	16
Abbildung 16: Flavonoide a) Naringenin (37) und b) Kämpferol (38) mit antiandrogener Aktivität.....	16
Abbildung 17: Prinzip der Fluoreszenzpolarisation	41
Abbildung 18: Dünnschichtchromatogramm der <i>n</i> -Hexan- (H), Ethylacetat- (E), Aceton- (A), Methanol- (M) und Aceton/HCl- (Ac/HCl) Fraktion des lipophilen <i>Carthamus tinctorius</i> -Extraktes im Vergleich zu β -Sitosterol (Sito) (57) und Stigmasterol (Stigm) (56)	51
Abbildung 19: Extraktions- und Fraktionierungsrouten.....	52
Abbildung 20: Einfluss des Mediums auf das Wachstum der LNCaP-Zellen (8×10^3 Zellen/100 μ l)	55
Abbildung 21: Einfluss des Mediums auf das Wachstum der PC-3-Zellen ($0,5 \times 10^3$ Zellen/100 μ l)	55
Abbildung 22: Einfluss der Ernährung auf Androgenrezeptor mRNA-Expression in LNCaP-Zellen.....	57
Abbildung 23: LNCaP-Zellen, 23. Passage, a) 7d serumfrei b) mit Serum	58
Abbildung 24: PC-3-Zellen, 21. Passage, a) 7d serumfrei b) mit Serum	58
Abbildung 25: Einfluss von DHT (1) auf das LNCaP-Zellwachstum nach 3 Tagen Inkubationszeit	59
Abbildung 26: LNCaP-Wachstum in ADFKS-Medium in Abhängigkeit von Zellzahl und Inkubationszeit.....	60

Abbildung 27: PC-3-Wachstum in ADFKS-Medium in Abhängigkeit von Zellzahl und Inkubationszeit	60
Abbildung 28: Dihydrotestosteron (1).....	61
Abbildung 29: Dihydrotestosteron-Einfluss (1) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen	62
Abbildung 30: Testosteron (2).....	62
Abbildung 31: Testosteron-Einfluss auf das Wachstum der LNCaP-Zellen.....	63
Abbildung 32: Methyltrienolon (R1881) (9).....	63
Abbildung 33: R1881-Einfluss (9) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen	64
Abbildung 34: racemisches Bicalutamid (30)	64
Abbildung 35: Bicalutamid-Einfluss (30) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen	65
Abbildung 36: Einfluss von Bicalutamid (30) auf durch Testosteron (2) stimulierte a) LNCaP- und b) PC-3-Zellen.....	65
Abbildung 37: Cyproteronacetat (6).....	66
Abbildung 38: Cyproteronacetat (6)-Einfluss auf das Wachstum von LNCaP-Zellen ..	67
Abbildung 39: Finasterid (58)	67
Abbildung 40: Einfluss auf das LNCaP-Zellwachstum a) Finasterid (58) b) Finasterid (58) + Testosteron (2) 1 nM	68
Abbildung 41: 17 α -Östradiol (59).....	68
Abbildung 42: 17 α -Östradiol-Einfluss (59) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen	69
Abbildung 43: 17 β -Östradiol (4).....	69
Abbildung 44: 17 β -Östradiol-Einfluss (4) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen	70
Abbildung 45: Fulvestrant (60)	71
Abbildung 46: Wirkung von a) Bicalutamid (30) und b) Fulvestrant (60) auf R1881-stimulierte (9) LNCaP-Zellen.....	72
Abbildung 47: Wirkung von Fulvestrant (60) auf durch Testosteron (2) stimulierte LNCaP-Zellen.....	73
Abbildung 48: Einfluss von Bicalutamid (30) und Fulvestrant (60) auf das 17 β -Östradiol-stimulierte (4) LNCaP-Zellwachstum	75
Abbildung 49: Strukturen von a) Genistein (63) und b) ICI 164 384 (64).....	76
Abbildung 50: Strukturen des Östrogens a) Diethylstilbestrol (65), der Antiöstrogene b) Fulvestrant (60), c) Tamoxifen (62), d) Toremifen (61) und des Antiprogestins e) Mifepriston (RU-486) (66).....	77
Abbildung 51: QDM276 [17 β -Hydroxy-19-norandrost-4,9-dien-3-on-7 α -carboxymethylester] (71).....	83
Abbildung 52: QDM255 [17 β -Hydroxy-19-norandrost-4,9-dien-3-on-7 α -carbonsäure] (70)	83
Abbildung 53: β -Sitosterol (57)	83
Abbildung 54: LNCaP-Zellproliferation unter Einfluss von <i>Salvia-miltiorrhiza</i> -Fraktionen.....	84
Abbildung 55: Fraktionen mit der stärksten LNCaP-Proliferationssteigerung	85
Abbildung 56: Wirkung von Bicalutamid (30), Fulvestrant (60) und Testosteron (2) auf die durch LAW540 vermittelte LNCaP-Zellproliferation	88

Abbildung 57: Einfluss der LAW540-HPLC-Fraktionen auf das LNCaP-Wachstum...	89
Abbildung 58: LNCaP- und PC-3-Zellproliferationswerte der LAW540-Fraktionen nach Säulenchromatographie	90
Abbildung 59: Einfluss der LAW540-Säulenchromatographiefraktionen auf durch Testosteron (2) stimulierte LNCaP-Zellen	91
Abbildung 60: Junger Baumfarn, <i>Cibotium barometz</i>	91
Abbildung 61: Rhizome von a) <i>Cibotium regale</i> und b) <i>Cibotium schiedei</i>	92
Abbildung 62: Vergleich der Wirkungen der <i>C. barometz</i> -, <i>C. regale</i> - und <i>C. schiedei</i> -Fraktionen auf die LNCaP-Zellproliferation	92
Abbildung 63: Shinbarometin (105)	93
Abbildung 64: Onitin (100)	94
Abbildung 65: MMK009 (130)	100
Abbildung 66: Übersicht LNCaP-Proliferationsdaten aller Testsubstanzen	106
Abbildung 67: Übersicht LNCaP-Proliferationsdaten aller Testsubstanzen mit Testosteron-Koinkubation	106
Abbildung 68: Einfluss des Androgens DHT (1) und des Antiandrogens OHF (8) auf die PSA-mRNA-Expression in LNCaP-Zellen	111
Abbildung 69: Wirkung der Androgenrezeptorbinder QDM276 (71), QDM255 (70) und β -Sitosterol (57) auf die PSA-Expression in LNCaP-Zellen	112
Abbildung 70: <i>Cibotium-barometz</i> -(LAW540)-Fraktionen und ihre Wirkung auf die PSA-Expression in LNCaP-Zellen (Extraktionsschema siehe Anhang Teil F)	113
Abbildung 71: VCaP-Zellen, 3. Passage	114
Abbildung 72: Suppression der PSA-Expression in VCaP-Zellen durch OHF (8) nach Stimulation mit DHT (1)	114
Abbildung 73: PSA-mRNA-Expression in VCaP-Zellen nach Behandlung mit QDM276 (71), QDM255 (70), β -Sitosterol (57), LAW540, Guggulsteron E (141) bzw. Z (140)	116
Abbildung 74: Suppression der AR-mRNA-Expression in VCaP-Zellen durch Dihydrotestosteron (1) und Antagonisierung durch Hydroxyflutamid (8)	117
Abbildung 75: AR-mRNA-Expression in VCaP-Zellen nach Behandlung mit QDM276 (71), QDM255 (70), β -Sitosterol (57), LAW540, Guggulsteron E (141) bzw. Z (140)	118
Abbildung 76: MENT (7 α -Methyl-19-nortestosteron) (143)	120
Abbildung 77: Docking von a) QDM276 (71) und b) QDM255 (70) in AR-Ligandenbindungstasche	122
Abbildung 78: Interaktion der 7 α -Methoxygruppe von QDM276 (71) mit dem Methionin 780 der AR-Ligandenbindungstasche	122
Abbildung 79: Docking von β -Sitosterol (57) in AR-Ligandenbindungstasche	126
Abbildung 80: Onitin (100)	160
Abbildung 81: Fraktionierungsschema <i>Bumelia sartorum</i>	162
Abbildung 82: Fraktionierungsschema <i>Cibotium barometz</i> (BOC270_CBA-Fraktionen)	163

Abbildung 83: Fraktionierungsschema <i>Cibotium barometz</i> (LAW540-Fraktionen) ...	164
Abbildung 84: Fraktionierungsschema <i>Cibotium barometz</i> (BOC414-Fraktionen)	165
Abbildung 85: Fraktionierungsschema <i>Cibotium barometz</i> zur Isolierung von Onitin (100)	166

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Anzahl der Plasmid-Kopien/ μl	40
Formel 2: Berechnung der Polarisierung unter Einbeziehung des G-Faktors	43
Formel 3: Berechnung der Totalintensität	43
Formel 4: IC_{50} -Berechnung mittels 4-Parameter-Logistikgleichung	44
Formel 5: K_i -Berechnung nach Cheng-Prusoff	45
Formel 6: K_i -Berechnung nach Nikolovska-Coleska	46
Formel 7: K_i -Berechnung nach Kenakin	46
Formel 8: Berechnung der Konzentration des Komplexes aus markiertem Ligand und Rezeptor nach Kenakin.....	47

1 Einleitung

Die Dissertation beschäftigt sich mit der Etablierung von Assaysystemen, die der Auffindung von synthetischen und natürlichen Verbindungen dienen, welche in das androgenabhängige Regulationssystem eingreifen. Androgenabhängige Regulationsmechanismen sind in die Entstehung bzw. das Fortschreiten vielfältiger Erkrankungen involviert, so z. B. bei dem Prostatakarzinom, der benignen Prostatahyperplasie, Akne, Hirsutismus und der androgenetischen Alopezie. Diese Erkrankungen werden u.a. mit Antagonisten des Androgenrezeptors therapiert. Androgene anabole Steroide werden dagegen bei der Behandlung von chronischen Erschöpfungszuständen wie AIDS und Krebskachexie durch Appetitsteigerung eingesetzt. Ebenso finden sie Anwendung in Hormonersatztherapien bei älteren Männern und bei sexuellen Differenzierungsstörungen und werden hinsichtlich einer Anwendung als hormonelle Kontrazeptiva für den Mann untersucht. Um sowohl synthetische Verbindungen bzw. Naturstoffe als auch Pflanzen- bzw. Pilzextrakte hinsichtlich ihres Einflusses auf den androgenabhängigen Signalweg untersuchen zu können, sollte ein Assaysystem etabliert werden, was die gleichzeitige Testung von Reinsubstanzen und Extrakten ermöglicht. Zugleich sollen mehrere potentielle Effekte dieser Verbindungen bzw. Extrakte detektiert werden können. Durch einen Zellproliferationsassay ist es möglich, sowohl die Einflüsse auf den Androgenrezeptor und seine Signalwege, als auch eine Zytotoxizität gegenüber den Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC-3 festzustellen.

Prostatakrebs ist der inzwischen häufigste Tumor bei Männern. Allein in Deutschland wird jährlich bei über 58.000 Männern Prostatakrebs diagnostiziert. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, Substanzen zu finden, die über Einflüsse in die Hormonregulation der Zellen oder andere Prozesse die Apoptose fördern. Interessanterweise steht sowohl die Mortalität des Prostatakrebses als auch die gutartige Vergrößerung der Prostata, die benigne Prostatahyperplasie (BPH), mit der Art der Ernährung in Zusammenhang^{1,2}. Als eine der Hauptrisikofaktoren ist demnach die Aufnahme von Fett über die Ernährung. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass sowohl die Häufigkeit von Prostatakrebs als auch die der BPH in Gesellschaften mit vorwiegend vegetarischer Ernährungsweise und niedrigem dietätischen Fettkonsum wie z. B. in asiatischen Ländern am geringsten ist. Unter diesem Aspekt ist es besonders interessant typische Pflanzeninhaltsstoffe, wie Phytosterole und Flavonoide, und ihre Derivate hinsichtlich ihres Einflusses auf die hormonelle Regulation der Prostatakrebszellen zu untersuchen. Die zum Screening verwendete IPB-eigene Substanzdatenbank enthält von diesen Substanzklassen besonders viele Derivate. Bei der Auffindung neuartiger Substanzen oder bekannter Substanzen mit erstmalig beschriebener Wirkung auf den Androgenrezeptorsignalweg bzw. einer zytotoxischen Wirkung auf die Prostatakrebszelllinien spielen Naturstoffe eine wichtige Rolle. Selbst in einer von der kombinatorischen Chemie dominierten Ära machen Arzneimittel pflanzlicher oder mikrobieller Herkunft mehr als 30 % der weltweit verkauften Produkte aus³. Naturstoffe decken im Vergleich zu kombinatorischen

Bibliotheken einen größeren chemischen Raum ab und verfügen über arzneistoffähnliche physikochemische Eigenschaften⁴. Nachteilig ist bei der Testung von Extrakten die geringe Diversität, die der chemischen und biologischen Redundanz geschuldet ist. Außerdem ist ein Großteil des hochdiversen chemischen Raumes innerhalb eines Extraktes pharmazeutisch irrelevant oder beinhaltet schwer zu trennendes biologisches Material, welches zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Das Screening von Extrakten in komplexen biologischen Assays und eine nachfolgende strukturelle Aufklärung der verantwortlichen Substanzen ist somit nach wie vor eine Herausforderung. Die Wirkung von Pflanzen- bzw. Pilzinhaltsstoffen auf den Androgenrezeptor und seine Signalwege ist im Vergleich zu der Wirkung auf den Östrogenrezeptor nur spärlich untersucht. Interessant ist hier folgende Fragestellung: Inwieweit interagieren Modulatoren des Östrogenrezeptorsignalweges mit dem Androgenrezeptorsignalweg? Dies wird in der Literatur kontrovers diskutiert und die komplexen zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden. Zum Auffinden neuer Androgenrezeptorliganden und für das gleichzeitige Verständnis dieser komplexen Vorgänge ist eine Kombination verschiedener Assaymethoden vorteilhaft. Die hier etablierte Screeningroute kann deshalb bei der Klärung der Frage, wie Substanzen auf die hormonellen Signalwege in den Prostatakrebszelllinien wirken, hilfreich sein.

1.1 Signaltransduktion durch Androgenrezeptorliganden

1.1.1 Androgenrezeptor

Androgene entfalten ihre Wirkung über Bindung an den Androgenrezeptor. Es existieren zwei Isoformen, AR-A und AR-B, des Androgenrezeptors. Sie unterscheiden sich durch die Anwesenheit eines N-terminalen Segmentes. AR-B besteht aus 917 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 110 kDa. Der Isoform AR-A fehlen auf der N-terminalen Seite die ersten 187 Aminosäuren. Sie besitzt demzufolge ein Molekulargewicht von nur 87 kDa. Funktionelle Unterschiede der Isoformen werden von Liegibel *et al.* beschrieben⁵. AR-A fehlt die Fähigkeit, die Zellproliferation in humanen Knochenzellen und Hautfibroblasten zu stimulieren. Die Ursache dafür liegt in der reduzierten Bindung von Coaktivatoren an die verkürzte N-terminale Region. Der Androgenrezeptor gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren, darunter zur Gruppe C der Subfamilie 3 der Östrogenrezeptor-ähnlichen Rezeptoren (NR3C4), und fungiert als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor^{6,7}. Zu der Gruppe C der Subfamilie 3 gehören auch der Glukokortikoidrezeptor, der Mineralokortikoidrezeptor und der Progesteronrezeptor. In Abbildung 1 sind die strukturellen bzw. funktionellen Domänen der Kernrezeptoren im Allgemeinen abgebildet.



- A/B = variable N-terminale Region
- C = konservierte DNA-bindende Domäne (DBD)
- D = variable Hinge-Region
- E = konservierte Ligandenbindungsdomäne (LBD)
- F = variable C-terminale Region

Abbildung 1: Gemeinsame strukturelle/funktionelle Domänen der Kernrezeptoren nach Mangelsdorf⁷

Die N-terminale Region A/B besitzt die Aktivierungsfunktion AF-1. Ihre transkriptionelle Aktivität ist ligandenunabhängig und normalerweise schwach ausgeprägt. Allerdings kann sie zusammen mit der Aktivierungsfunktion AF-2 der E-Domäne einen synergistischen Effekt ausüben⁸. Die DNA-bindende Domäne ist hochkonserviert und enthält zwei Zinkfinger, welche an spezifische DNA-Sequenzen binden. Im Falle des Androgenrezeptors sind das die Androgen-Response-Elemente (AREs). Die DBD und die LBD sind durch die flexible Hinge-Region miteinander verbunden. Die LBD besteht aus 11 Helices, welche die Bindetasche bilden. Der Eingang zu der Bindetasche wird durch die Helix 12 verdeckt, ähnlich einem beweglichen Deckel. Sie besitzt auch Aminosäurereste, die für die Funktion der AF-2 von Bedeutung sind. Die Orientierung der Helix 12 ergibt sich aus allosterischen Effekten, die durch die jeweilige spezifische Ligandenbindung entsteht. Nach Ligandenbindung trägt die LBD zusammen mit der DBD zur Dimerisierung des Rezeptors bei und bindet Coaktivatoren. Die Aktivierungsfunktion AF-2 der LBD ist ligandenabhängig.

Agonistische Effekte

Agonisten lösen durch Ligandenbindung die Transkription der rezeptortypabhängig regulierten Gene aus. Ein agonistischer Ligand vermittelt komplexe allosterische Effekte, die zu einer veränderten Position der Helix 12 der LBD führen. Diese Position der Helix 12 gestattet Coaktivatoren mittels sogenannter Kernrezeptor-Boxen eine Interaktion mit der LBD einzugehen. Kernrezeptor-Boxen bestehen aus kurzen LxxLL Motiven (L = Leucin, x = jede andere Aminosäure), welche häufig in Coaktivatoren vorkommen. Durch die agonistische Bindung wird eine Konformationsänderung bewirkt, die für ein Auslösen der Transkription notwendig ist⁹.

Antagonistische Effekte

Antagonisten inhibieren durch kompetitive Bindung an die LBD die durch Agonisten vermittelte Transkription der rezeptortypabhängigen Gene. Sie binden in der Ligandenbindetasche, so dass die Helix 12 keinen Deckel über der LBD bilden kann. Stattdessen

besetzt sie eine Stelle auf der Oberfläche des Rezeptors, so dass Coaktivatoren nicht binden können. Die Helix 12 kann dabei nicht nur eine „An“ oder „Aus“ Position beziehen, sondern es existieren je nach Ligand Zwischenpositionen. Diese erklären die unterschiedlich starke agonistische bzw. antagonistische Aktivität eines Liganden⁹.

Inverser Agonismus

Inverse Agonisten inhibieren die bei einem Rezeptor bestehende Grundaktivität, die ohne Ligandenbindung existiert. Nachgewiesen wurde eine solche Aktivität für den Kernrezeptor $ERR\alpha$, für den auch ein inverser Agonist gefunden wurde¹⁰. Für den Androgenrezeptor wurde weder eine transkriptionelle Aktivität bei Abwesenheit von Liganden noch ein inverser Agonismus nachgewiesen.

Vorkommen des Androgenrezeptors

Der Androgenrezeptor wird exprimiert in den Epithelzellen der Vagina, Zervix, der männlichen Geschlechtsorgane, der weiblichen Brust und in verschiedenen Zelltypen der Haut^{11;12}. So wurde der AR in den Zellen der Epidermis und in Fibroblasten nachgewiesen, ebenso wie in den Basal- und Drüsenzellen der Talgdrüsen, den Zellen der äußeren Wurzelscheide des Haarschaftes und in ekkrinen Schweißdrüsen¹². Der AR ist in weiblicher Haut ähnlich verteilt, wie in der männlichen. Eine AR-Expression im Schilddrüsengewebe, Bauchspeicheldrüse und im Gastrointestinal- und Blasengewebe konnte nicht bestätigt werden¹¹. Der Androgenrezeptor kommt nicht nur zytosolisch, sondern auch membrangebunden und in den Mitochondrien vor¹³.

1.1.2 Wirkmechanismus des Androgenrezeptors

Für die Steroidhormonrezeptoren sind zwei Wege der Signaltransduktion bekannt. Der zuerst entdeckte Weg ist der genotrope Wirkmechanismus. Hier fungiert der Steroidhormonrezeptor als Transkriptionsfaktor. Voraussetzung dafür ist die Bildung eines stabilen und langlebigen Rezeptor-Ligand-Komplexes. Die Effekte der genotropen Aktivität sind erst nach einiger Zeit messbar und haben Langzeitwirkung. Im Gegenzug dazu sind die Auswirkungen der nichtgenotropen Aktivität der Steroidhormonrezeptoren schon innerhalb von Minuten messbar. Sie werden auf kurzzeitige und nichtspezifische Ligand-Rezeptor-Interaktionen mit membranständig lokalisierten Steroidhormonrezeptoren zurückgeführt.

Genotrope Aktivität

Die Mitglieder der Subfamilie 3 entsprechen alle dem Ligandenbindungstyp I der Kernrezeptoren⁷. Diese befinden sich im Zytosol (Abb. 2). Der Androgenrezeptor wird durch die Zusammenlagerung mit Hitze-Schock-Proteinen (HSP) in seiner inaktiven Form stabilisiert und von der DNA-Bindung ausgeschlossen. Durch Ligandenbindung werden die inhibierenden Hitze-Schock-Proteine freigesetzt, der Rezeptor wird

phosphoryliert und wandert in den Zellkern. Dort bindet er als Homodimer an die Androgen-Response-Elemente der DNA. Der AR-DNA-Komplex rekrutiert dann Proteine, die die Transkription stromabwärts der ARE vollziehen. Die Regulierung dieser androgenabhängigen Gene führt anschließend zu Änderungen der Zellfunktionen.

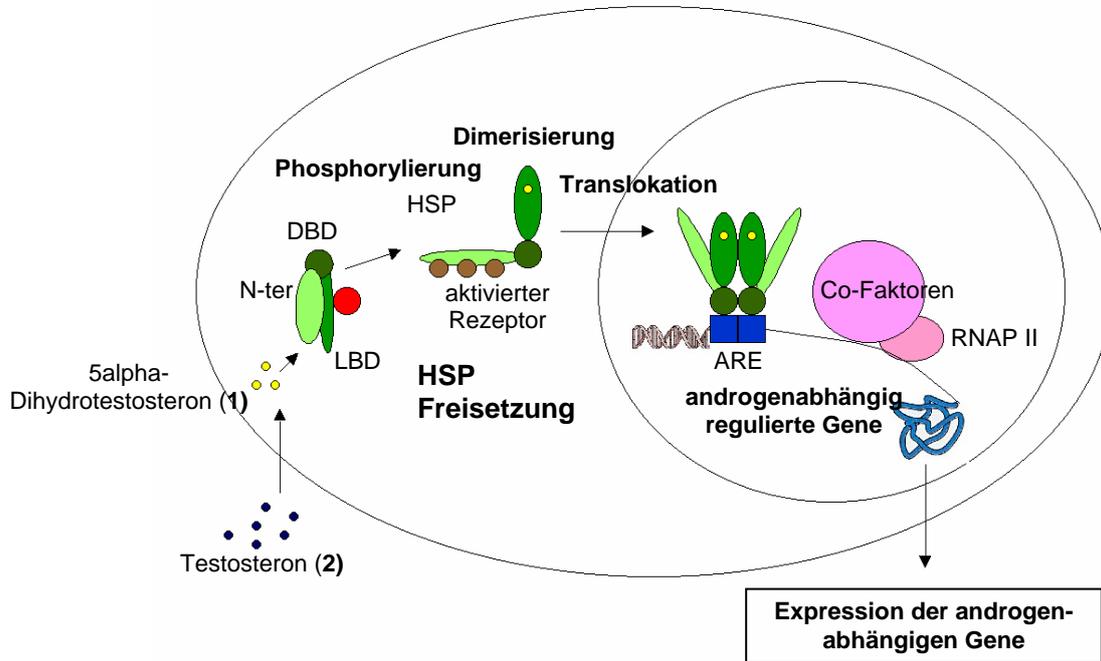


Abbildung 2: Genotroper Wirkmechanismus des Androgenrezeptors (Typ I)

Nicht-genotrope Aktivität

Liganden des Androgenrezeptors passieren bei der nichtgenotropen Reaktion die Zellmembran, um sofort an den Androgenrezeptor zu binden. Der Ligand-Rezeptor-Komplex bindet dann an Proteine aus der Familie der protoonkogenen Tyrosinkinasen Src und löst eine Kaskade über die Kinasen Src, die Adaptorproteine der Familie Shc und die Kinasen des ERK/MAP-Kinase-Signalweges aus (Abb. 3). Ein Effekt der nichtgenotropen Aktivität des Androgenrezeptors ist die Stimulation der Zellproliferation durch Erhöhung der Src-Kinaseaktivität. Die Proteine der Src-Familie bieten somit wichtige Angriffspunkte für neue Antikrebstherapeutika. Deshalb ist die Aufdeckung dieses Zusammenhangs durch Kousteni *et al.* und Kim *et al.* von besonderer Bedeutung

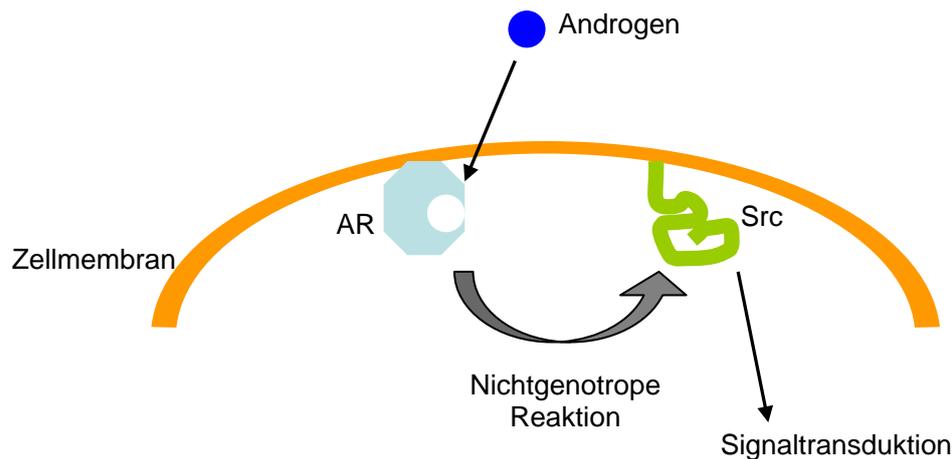


Abbildung 3: Nichtgenotroper Wirkmechanismus des Androgenrezeptors

Interessanterweise wird dieser Mechanismus auf andere Weise von Liganden des AR beeinflusst als der genotrope Weg. So zeigen DHT (1) und Testosteron (2) eine volle agonistische Aktivität sowohl im genotropen als auch im nichtgenotropen Signalweg, während das nichtsteroidale antiandrogene Fungizid Procymidon (3) eine agonistische Aktivität nur für den nichtgenotropen Weg zeigt¹⁵. E2 (4) und Progesteron (5) induzieren nur den genotropen Mechanismus. Cyproteronacetat (6) war in diesem Versuchsansatz ein effektiverer Antagonist im nichtgenotropen Signalweg als Flutamid (7). Diese Ergebnisse unterstreichen die Komplexität der Androgenrezeptorligandenbindung und ihrer Funktionsweise.

1.1.3 Cofaktoren

Die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors wird durch Cofaktoren moduliert. Cofaktoren sind Proteine, die als Coaktivatoren, Corepressoren oder brückenbildende Proteine agieren können. Ein Ungleichgewicht in der Expression verschiedener Cofaktoren kann zu einer veränderten Aktivität des AR in fortgeschrittenem Prostatakrebs führen. So wurde z. B. für ARA70 ein stärkerer Einfluss auf eine Erhöhung der transkriptionellen androgenen Aktivität des AR beobachtet als durch die Mutation T877A des AR¹⁶. Ebenso wurde festgestellt, dass die erweiterte Sensitivität des AR für andere Substanzen, wie Glukokortikoide, Östrogene, Progestine oder Antiandrogene in fortgeschrittenem Prostatakarzinom nicht nur von Mutationen wie AR877 oder AR708 in der LBD des AR abhängt, sondern auch von der Expression von Cofaktoren wie ARA70¹⁷. Der Cofaktor ARA70 wurde als Coaktivator sowohl des AR als auch des ER α in MCF-7-Zellen beschrieben¹⁸. Zusätzlich scheint seine Wirkung in einem Zellsystem, in dem beide Steroidhormonrezeptoren vorkommen, von deren Mengenverhältnis abzuhängen. Es konnte durch einen Coimmunopräzipitationsassay nachgewiesen

werden, dass bei einem ER α -Überschuß (ER α : AR = 5 : 1) ARA70 vorwiegend mit ER α eine Verbindung eingeht, bei einem AR-Überschuß (ER α : AR = 1 : 5) ausschließlich mit dem AR. Die Theorie von steroidhormonrezeptorübergreifenden Cofaktoren dürfte auch Erklärungen liefern für Kreuzreaktivitäten zwischen Androgenen bzw. Östrogenen und Antiandrogenen bzw. Antiöstrogenen im Zellproliferationsassay (Kapitel 3.3.1.6). Interessanterweise steigert der Cofaktor ARA54 die transkriptionelle Aktivität des AR nur bei Vorhandensein der Mutation T877A und nicht beim wtAR¹⁹. Das deutet auf eine komplexe Regulation der transkriptionellen Aktivität des AR durch seine Cofaktoren je nach Zellsystem und unterschiedlicher Expression der Cofaktoren bzw. Mutation des AR hin. Rahman *et al.* beschreiben eine Beteiligung des Cofaktors ARA55 an der Androgenrezeptoraktivität und der agonistischen Wirkung von Antiandrogenen²⁰. Der Coaktivator ARA55 zeigt eine sehr große Homologie zum Maus hic-5-Gen, welches durch TGF-beta 1 induziert wird²¹. Dies könnte folgenden Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren und PSA-Expression erklären: Bei Prostatakrebspatienten mit Metastasen wurde ein signifikant erhöhter Serumspiegel von IL-6 und TGF-beta 1 nachgewiesen²². Ebenso korrelierten IL-6 und TGF-beta 1 mit steigender Serum-PSA-Konzentration. Vermutlich entfalten die Wachstumsfaktoren ihre AR transkriptionssteigernde Aktivität über die Regulation der Expression von AR-Cofaktoren. Das Protoonkogen HER2/neu, was mit dem Fortschreiten von Brustkrebs in Zusammenhang steht, fördert die Interaktion von AR und AR-Coaktivatoren wie ARA70²³. Dieser Effekt wird über den MAP-Kinase-Weg vermittelt. Die daraus resultierende Steigerung der PSA-Expression über den Mechanismus HER2/Neu \rightarrow MAP-Kinase \rightarrow AR-ARA-Interaktion \rightarrow PSA-Expression funktioniert bei niedrigem Androgenspiegel und ist nicht durch das Antiandrogen Hydroxyflutamid (**8**) antagonisierbar. Nessler-Menardi *et al.* untersuchten die Expression von Steroidrezeptor-Cofaktoren in den Prostatakrebszelllinien PC-3, DU145, LNCaP und LNCaP-Subzelllinien²⁴. Von den 12 getesteten Cofaktoren konnten 10 in allen Zelllinien nachgewiesen werden (AIB1, ARA54, ARA70, CBP, cyclin DI, Her2/neu/erbB2, BAG-1/M/L, SRC-1, SMRT und TIF2). In LNCaP-Zellen konnte keine Expression von ARA55 und FHL2 nachgewiesen werden und in DU145 -Zellen ebenfalls keine ARA55 Expression. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Vorkommens der Cofaktoren in verschiedenen Zelltypen lassen sich eventuell die Ergebnisse von Zhu *et al.* bezüglich der TGF-beta 1 Regulation in LNCaP-T β RII und in mit wtAR transfizierten PC-3-Zellen erklären²⁵. Dort wurde eine apoptotische Wirkung von TGF-beta in LNCaP-T β RII (TGF-beta-responsiv) beschrieben, die aber in PC-3-Zellen, die mit dem wtAR transfiziert waren, nicht gefunden werden konnte. Eventuell könnte das an dem unterschiedlichen Vorkommen von ARA55 in LNCaP- und in PC-3-Zellen liegen. Da ARA55 wie oben beschrieben zu einem TGF-beta 1 induzierbaren Gen eine große Homologie aufweist und nur in PC-3-Zellen, aber nicht in LNCaP-Zellen vorkommt, könnte ARA55 in PC-3-Zellen von TGF-beta stimuliert werden und somit eine apoptotische Reaktion in den wtAR transfizierten PC-3-Zellen kompensieren. Ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Expression der AR Cofaktoren und Behandlung der Zellen wurde von Fujimoto *et al.* in

LNCaP-Subzelllinien, die durch verschiedene Kulturbedingungen oder Behandlung entstanden sind, untersucht²⁶.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Cofaktoren des Androgenrezeptors bei der Regulation der androgenabhängigen Gene eine große Rolle spielen. Sie interagieren sowohl mit dem ligandenabhängigen Mechanismus der Androgenrezeptor-Aktivierung als auch mit dem ligandenunabhängigen Mechanismus, indem ihre Expression und ihr Einfluss auf die Androgenwirkung von verschiedenen anderen zellulären Signalwegen, wie denen der Wachstumsfaktoren und der MAP-Kinase, abhängen. Ihr Expressionsmuster verändert sich auch mit Fortschreiten des Prostatakrebses und ist in *in vitro* Zellkulturen von der Behandlung der Zellen abhängig. Die Anwesenheit von Cofaktoren entscheidet über Sensitivität und Selektivität der Androgenrezeptorwirkung und bietet zusätzlich zu AR-Mutationen eine Erklärung für die veränderte Wirkung von Antiandrogenen in Prostatakrebszellen und die Entstehung des hormonresistenten Prostatakarzinoms.

1.1.4 Androgenabhängig regulierte Gene

Von Xu *et al.* wurde erstmals eine umfassende Analyse der androgenabhängigen Regulation von Genen in LNCaP-Zellen mittels SAGE-Analyse durchgeführt²⁷. Dabei wurde für 136 Gene eine Hochregulation der Expression nach Androgenbehandlung gezeigt, während 215 Gene in ihrer Expression gehemmt wurden. Die durch diese Analyse identifizierten ARG regulieren die Transkription, RNA-Translation, genomische Stabilität und Zellzyklus, den intrazellulären Proteintransport und Chaperonisierung, Energiemetabolisierung, Apoptose, Redoxregulation und Signaltransduktion.

Representative und gut charakterisierte ARG sind zum Beispiel das prostataspezifische Antigen PSA²⁸, das prostataspezifische Membranantigen PSMA²⁹, die prostataspezifische saure Phosphatase PAP³⁰, das Homeobox-Gen *NKX3.1*³¹, die membrangebundene Serinprotease TMPRSS2³², das Gen *PMEPA1*³³, der Androgenrezeptor und die 5 α -Reduktase.

Kürzlich wurde mittels Mikroarray-Analyse die veränderte Genexpression in LNCaP-Zellen nach der Behandlung mit dem synthetischen Androgen R1881 (**9**) untersucht³⁴. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass nach 24stündiger R1881-Behandlung 319 Gene verstärkt exprimiert werden, während 300 Gene herunterreguliert werden. Eine androgenabhängige Regulation wurde von Kiessling *et al.* für das Ubiquitin-ähnliche Interferon-stimulierte Gen 15 (ISG15) und die meisten der mit der ISG15-Konjugation in Verbindung stehenden Enzyme festgestellt³⁵. Das ISGylierungs-System kontrolliert im Gegenzug die AR-mRNA-Regulation und Proteinexpression. Dadurch beeinflusst es das Zellwachstum und die Überlebensfähigkeit von Prostatakrebszellen wesentlich und bietet aufgrund seiner verstärkten Expression in malignem Prostatagewebe eine neue Angriffsmöglichkeit für Antikrebstherapeutika oder könnte einen neuen diagnostischen Biomarker für Prostatakrebs darstellen.

Prostata-spezifisches Antigen

Das bekannteste androgenabhängig regulierte Gen PSA, auch humanes Kallikrein 3 oder Semenogelase genannt, ist ein 30 kD großes Glykoprotein. PSA fungiert biochemisch als Serinprotease und spaltet das Protein Semenogelin-1, so dass der Samen des Mannes dünnflüssig wird. Es wird in den Epithelzellen der Prostata und in den Brustdrüsen gebildet. Nachdem es 1981 von Wang *et al.* im Blut nachgewiesen und eine Erhöhung des PSA-Serumspiegels mit Prostatakrebs in Verbindung gebracht werden konnte, wurde es zunehmend als Biomarker für Prostatakrebs verwendet³⁶. Es ist jedoch kein reiner Tumormarker, da der Serumspiegel auch bei der benignen Prostatit, Prostatinfektionen, Irritationen und kürzlicher Ejakulation erhöht sein kann. 1998 wurden von Herrala *et al.* vier verschiedene Isoformen des Proteins PSA entdeckt. Sie variieren in der N-terminalen Region und damit in der Tertiärstruktur, so dass die Funktionalität der Proteine verändert wird³⁷. Die Expression des PSA wird in zellbasierten Bioassays als endogener Marker für eine androgene bzw. antiandrogene Wirkung verwendet.

1.2 Androgenrezeptorliganden

1.2.1 Androgene

Androgene sind Triterpene und gehören zur Gruppe der Sexualhormone. Sie werden in der Klassifikation der Lipide zu den C19-Steroiden der Gruppe Sterollipide zugeordnet³⁸. Das Grundgerüst der Androgene ist das Androstan (**10**, Abb. 4).

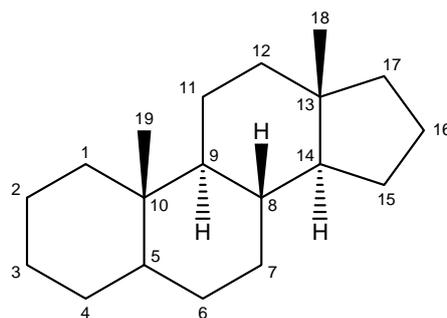


Abbildung 4: Androstan Grundgerüst (**10**)

Das wichtigste Androgen, Testosteron (**2**), wird in den Leydig-Zwischenzellen der Hoden über die Zwischenstufen Progesteron (**5**) und Androstendion (**11**) gebildet. In einigen endokrinen Erfolgsorganen wie z. B. den äußeren Genitalien, der Prostata, den Samenbläschen, den Talg bildenden Sebozyten und den Haarfollikeln wird Testosteron (**2**) durch die 5 α -Reduktase in 5 α -Dihydrotestosteron (**1**) umgewandelt. Letzteres hat eine deutlich höhere Affinität zum zytoplasmatischen Androgenrezeptor als Testosteron (**2**).

In der Leber erfolgt der Abbau von Testosteron (**2**) über Androstendion (**11**) und Androstandion (**12**) zu Androsteron (**13**), Aetiocholandion (**14**) und Aetiocholanolon (**15**) (Abb. 5). Androgene fördern pränatal die Entwicklung der männlichen Sexualorgane und in der Pubertät die der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale. Diese Wirkung wird im pharmakologischen Sinne als androgene Wirkung bezeichnet, während die anabole Wirkung der Androgene der Steigerung der Eiweiß- und Nukleinsäuresynthese entspricht. Das Muskel- und Knochenwachstum wird besonders in der Pubertät durch Androgene stimuliert. Sie bewirken aber nach dem Wachstumsschub auch das Ende des Knochenwachstums durch Schluß der Epiphysenfugen. Die Androgene regulieren zusammen mit dem follikelstimulierenden Hormon (FSH) die Spermienproduktion und sorgen so für die Funktionsfähigkeit der Sexualorgane. In hohen Dosen dagegen wird jedoch eine Hemmung der Spermiogenese verursacht. Neben Erhöhung der Libido und der Potenz sind sie mitbestimmend für die psychische Verhaltensweise des Mannes. Eine vermehrte Erythropoetinsynthese und damit eine gesteigerte Erythrozytenproduktion wird ebenfalls durch Androgene verursacht. In der Haut verstärken sie die Talgproduktion und führen bei entsprechender Veranlagung zu einer bestimmten Form des Haarausfalls, der androgenetischen Alopezie.

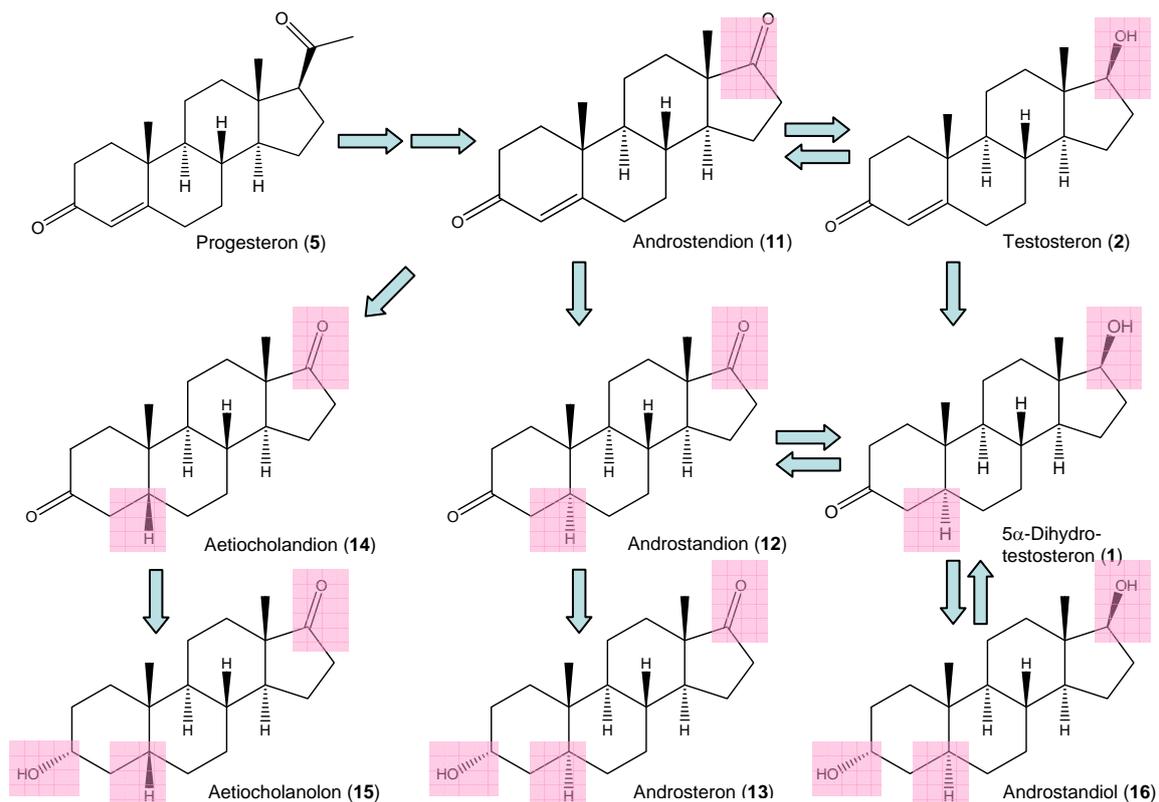


Abbildung 5: Testosteron-Stoffwechsel nach Mutschler *et al.*³⁹

In der *Zona reticularis* der Nebennierenrinde werden ebenfalls Androgene wie Dehydroepiandrosteron (**17**) (DHEA) und Androstendion (**11**) gebildet. Unter physiologi-

schen Bedingungen sind sie beim Mann von untergeordneter Bedeutung. Eine verstärkte Androgenproduktion der Nebennieren bzw. Ovarien ebenso wie eine länger andauernde Behandlung mit Androgenen führt bei Frauen zu Virilisierungserscheinungen, wie Stimmveränderungen, Zunahme der Körperbehaarung und Akne.

Ein kleiner Teil der Androgene wird in Östrogene durch Aromatisierung des A-Ringes unter oxidativer Entfernung der C19-Methylgruppe mithilfe der Aromatase umgewandelt (Abb. 6). Die Aromatase kommt besonders in den Ovarien, aber auch in der Muskulatur, im Fettgewebe und in der Haut vor und ihre Aktivität wird durch das follikelstimulierende Hormon (FSH) gesteuert. Vor allem nach der Menopause werden Östrogene aus DHEA (**17**) synthetisiert.

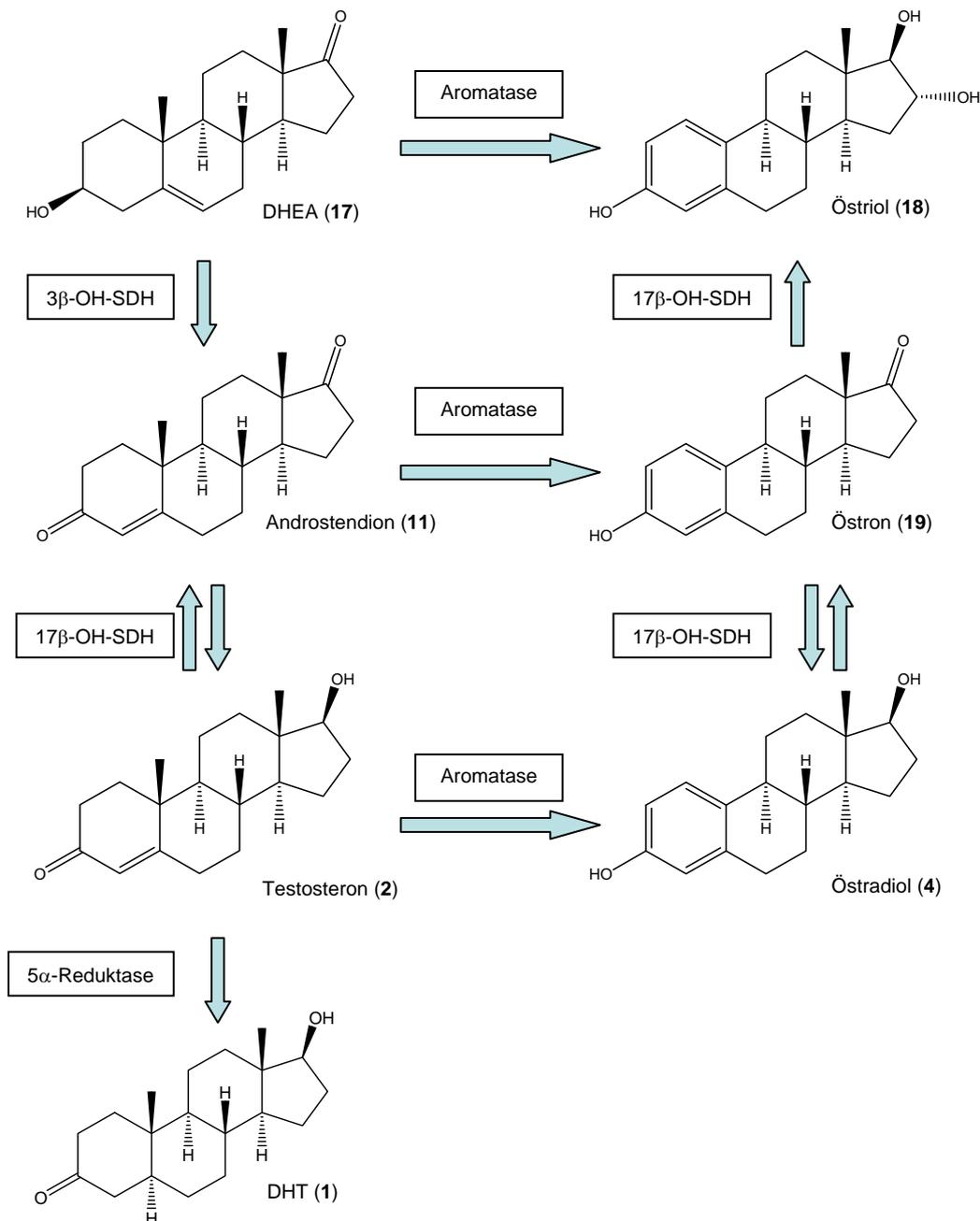


Abbildung 6: Verstoffwechslung der Androgene zu Östrogenen nach Thews *et al.*⁴⁰

1.2.2 Endokrine Disruptoren

Endokrine Disruptoren, auch Umwelthormone genannt, sind Stoffe, die in das endokrine System von Mensch und Tier eingreifen und dadurch unter anderem die Fortpflanzung beeinträchtigen können. Dazu zählen Substanzen wie Herbizide, Insektizide und Fungizide, aber auch Phytoöstrogene. Für eine Reihe von endokrinen Disruptoren sind antiandrogene Aktivitäten *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen worden.

Ein Metabolit des Insektizids DDT (**20**), *p,p'*-DDE (**21**), bindet an den AR und fungiert als Antiandrogen⁴¹. Für Substanzen, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe⁴², das Herbizid Linuron (**22**)⁴³ und das Fungizid Vinclozolin (**23**)⁴⁴⁻⁴⁷ wurde ebenfalls eine antiandrogene Aktivität festgestellt. Linuron (**22**, Abb. 7) besitzt in einem radioaktiven Verdrängungsassay mit AR-transfizierten COS⁻-Zellen eine mäßig starke Bindungsaktivität mit einem IC₅₀ = Wert von 20 μM, entfaltet aber sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine deutliche antiandrogene Aktivität⁴³.

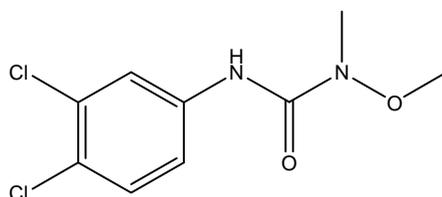


Abbildung 7: Linuron (**22**)

Für das racemische Vinclozolin (**23**, Abb. 8a)) bzw. seine Primärmetaboliten wurde eine teilweise Kreuzreaktivität zu den anderen Steroidhormonrezeptoren ER α , ER β , GR, PR und MR nachgewiesen^{47,48}. Eventuell spielen hier auch synergistische Effekte oder Wirkungen über alternative Mechanismen zusätzlich zu dem ligandenvermittelten AR-abhängigen Effekt eine Rolle. Sowohl Vinclozolin (**23**) als auch Linuron (**22**) weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem Antiandrogen Hydroxyflutamid (**8**) auf (Abb. 8b)).

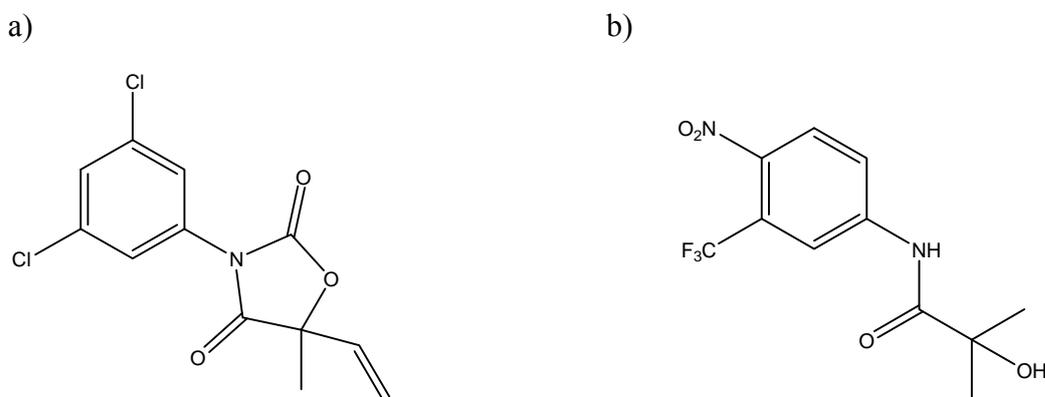
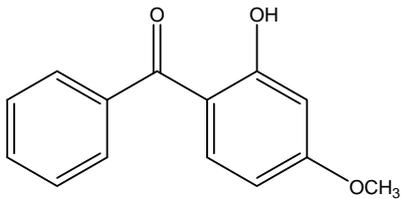


Abbildung 8: Strukturelle Ähnlichkeit von a) Vinclozolin (**23**) zu b) Hydroxyflutamid (**8**)

UV-Filter (Abb. 9), die in Kosmetika eingesetzt werden und eine östrogene Aktivität besitzen, inhibieren in dem MDA-kb2 zellbasierten Transkriptionsassay die transkriptionelle Wirkung des AR⁴⁹.

a)



b)

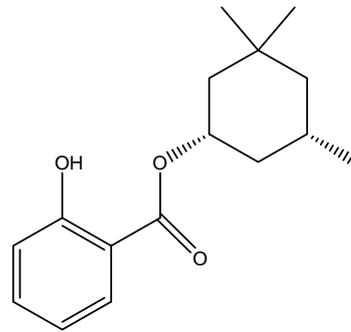


Abbildung 9: UV-Filter a) Benzophenon-3 (Bp-3) (**24**) und b) Homosalat (**25**) (HMS) mit antiandrogener Aktivität

Ihre IC_{50} -Aktivitäten liegen im niedrigen mikromolaren Bereich. Ihre bihormonale Funktion stützt die Vermutung, dass endokrine Disruptoren in die endokrine Regulation über mehr Mechanismen eingreifen.

Phytoandrogene

Pflanzliche Sekundärmetaboliten mit einer androgenen Wirkung wurden erstmals von Ong *et al.* im Jahr 2007 beschrieben⁵⁰. Für Triterpene, wie das Trisepilanoesterderivat Euphol (**26**, Abb. 10) aus der Rinde des Guttaperchabaumes *Eucommia ulmoides*, konnte die androgene Wirkung in AR-transient transfizierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

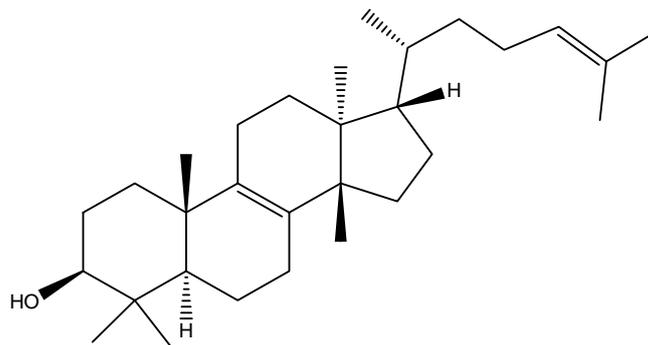


Abbildung 10: Euphol (**26**)

Allerdings wurde in dieser Publikation anhand eines radioaktiven Verdrängungsexperimentes eine testosteronverdrängende Wirkung am AR nur für den Extrakt und nicht für einzelne Verbindungen veröffentlicht. Die Autoren postulieren einen synergistischen Effekt von kurzkettigen Fettsäuren und Triterpenen in der lipophilen Fraktion des etha-

nolischen Extraktes der Rinde des Guttaperchabaumes bei gleichzeitiger Applikation mit Steroidhormonen wie Testosteron (**2**) und DHT (**1**).

Eine phytoandrogene Wirkung konnte 2007 von Chen *et al.* für das Phytoöstrogen Daidzein (**27**) in einem Zellassay mit zusätzlichen AR-Cofaktoren nachgewiesen werden⁵¹. Die Autoren verwendeten ein LNCaP-Assaysystem, in das die Cofaktoren ARA55 und ARA70 und ein PC-3-Zellsystem, in das die beiden Cofaktoren und der wtAR jeweils transient transfiziert wurden. Obwohl Cofaktoren mit verschiedenen Steroidhormonrezeptoren interagieren können und sowohl AR als auch ER in diesen Zellen präsent sind, kann eine Wirkung von Daidzein (**27**) nicht über den ER erfolgen. Der MMTV-Promotor verfügt nicht über ein Östrogen-Response-Element (ERE). Ebenso wurde durch Liu *et al.* nachgewiesen, dass der MMTV-Promotor weder direkt noch indirekt und weder *in vitro* noch *in vivo* durch E2 (**4**) aktiviert wird, weshalb eine Wirkung von Daidzein (**27**) über den Östrogenrezeptor auszuschließen ist⁵². Chen *et al.* konnten nachweisen, dass die Cofaktoren ARA70 und ARA55 die androgenen Effekte von E2 (**4**) steigern⁵¹. Somit kann Daidzein (**27**) nachweislich nur in einem ARA70/ARA55-Assaysystem phytoandrogene Effekte entfalten. Ob dies unter physiologischen Bedingungen möglich ist, hängt allerdings vom Cofaktorexpressionsmuster der Zielzellen ab.

Phytoantiandrogene

Eine antiandrogene Wirkung durch Inhibierung der Expression von androgenabhängigen Genen, wie PSA, wird für eine relativ große Anzahl an Extrakten und Naturstoffen beschrieben. Eine Bindungsaffinität am Androgenrezeptor für diese Naturstoffe ist jedoch nur in der Publikation von Liu *et al.* für Ganoderol B (**28**, Abb. 11) aus dem Fruchtkörper des Pilzes *Ganoderma lucidum* beschrieben⁵³. Ganoderol B (**28**) besitzt demzufolge einen IC₅₀-Wert am Androgenrezeptor von 15 µM.

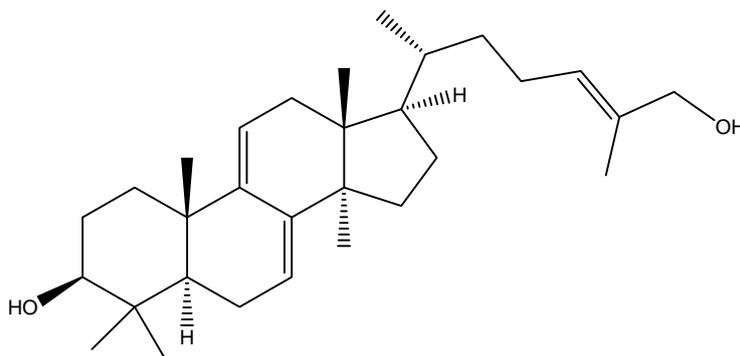


Abbildung 11: Ganoderol B (**28**)

Das Lanosterolderivat Ganoderol B (**28**) inhibiert die 5 α -Reduktase und das androgeninduzierte LNCaP-Zellwachstum und verhindert ein Testosteron-induziertes Wachstum der ventralen Rattenprostata.

3,3'-Diindolylmethan (DIM) (**29**, Abb. 12), das während der Verdauung aus dem vorwiegend in *Brassicaceen* vorkommenden Indol-3-Carbinol gebildet wird, verdrängt [³H]DHT sowohl vom mutierten AR der LNCaP-Zellen, als auch vom wtAR mit IC₅₀-Werten zwischen 1 und 10 μM⁵⁴. Die antiandrogene Aktivität von 3,3'-Diindolylmethan (**29**) wird durch die Reduktion der PSA-Expression, durch Inhibierung der androgeninduzierten Translokation des Androgenrezeptors in den Zellkern und durch Verminderung der LNCaP-Zellproliferation allein und bei gleichzeitiger DHT-Inkubation widergespiegelt⁵⁴. Nach Meinung der Autoren ist DIM (**29**) trotz des unterschiedlichen atomaren Aufbaus hinsichtlich der Geometrie seiner Konformation und der Oberflächenladungsverteilung mit Bicalutamid (**30**) vergleichbar.

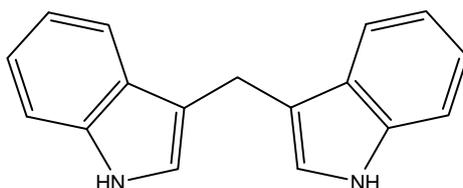


Abbildung 12: 3,3'-Diindolylmethan (DIM) (**29**)

N-Butylbenzensulfonamid (NBBS) (**31**, Abb. 13) wurde von Schleich *et al.* 2006 aus der Rinde des afrikanischen Pflaumenbaumes *Pygeum africanum* und aus dem Präparat des Extraktes Tadenan® isoliert⁵⁵.

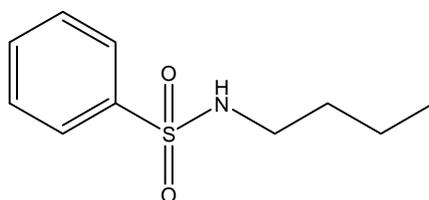
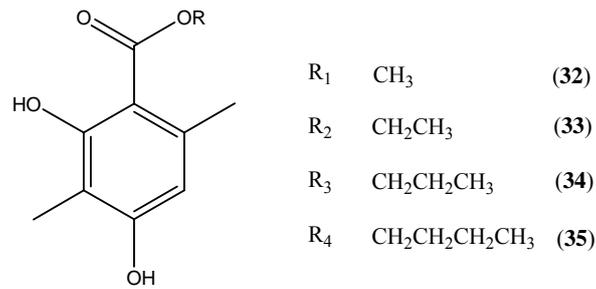


Abbildung 13: N-Butylbenzensulfonamid (NBBS) (**31**)

In einem mit wtAR transient transfizierten Zellsaysystem (CV1-Zellen) inhibiert NBBS (**31**) die Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors mit einem EC₅₀-Wert von 10 μM. Die Einstufung von NBBS (**31**) als Naturstoff ist jedoch kritisch zu sehen, da NBBS (**31**) gewöhnlich als Weichmacher und als Edukt bei der Sulfonylcarbamat-Herbizidsynthese verwendet wird. Bei der Bearbeitung der Rinde von *Pygeum africanum* wurde von Schleich *et al.* ein weiterer Stoff, die Atrarsäure (**32**, Abb. 14), isoliert. Sie weist im Zellsaysystem eine antiandrogene Wirkung auf. Esterderivate mit zwei und drei C-Atomen (**33-35**) konnten den antiandrogenen Effekt noch steigern⁵⁶.

Abbildung 14: Atrarsäure (R_1) (32) und die synthetisierten Derivate

Der Hauptmetabolit des Phytoöstrogens Daidzein (27), Equol (36, Abb. 15), zeigt eine antiandrogene Aktivität durch Reduktion des Gewichtes der ventralen Prostata und der Nebenhoden⁵⁷. Interessanterweise ist diese Wirkung nicht auf eine Bindung an den AR zurückzuführen⁵⁸, sondern es wurde eine Bindung von Equol (36) an DHT (1), aber nicht an Testosteron (2) festgestellt⁵⁷. Aufgrund der veröffentlichten Daten ist dieser von Lund *et al.* postulierte neue Mechanismus der antiandrogenen Wirkung allerdings kritisch zu bewerten.

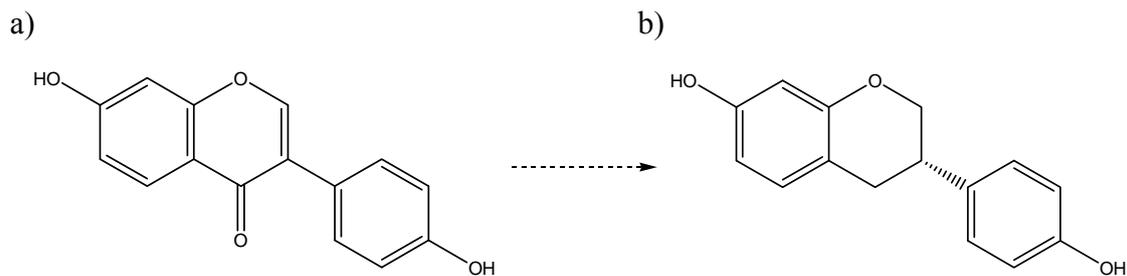


Abbildung 15: Metabolisierung von a) Daidzein (27) zu b) Equol (36)

Die u.a. aus dem Pollen von *Brassica napus* (Raps) isolierten Flavonoide Naringenin (37, Abb. 16a)) und Kämpferol (38, Abb. 16b)) antagonisieren die Transkriptionsaktivität des AR in einem zellbasierten Reporterassay⁵⁹.

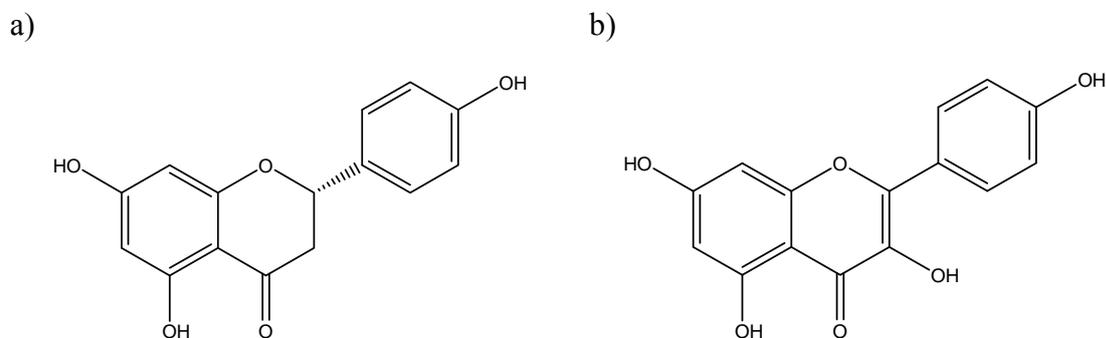


Abbildung 16: Flavonoide a) Naringenin (37) und b) Kämpferol (38) mit antiandrogener Aktivität

Die beiden Verbindungen inhibieren die PSA-Sekretion in LNCaP-Zellen. In den mit wtAR transient transfizierten Osteosarkomzellen U2OS zeigten Naringenin (**37**) und Kämpferol (**38**) eine antiandrogene Wirkung. Für flavonoidartige Strukturen werden nur sehr schwache AR-Bindungsaffinitäten zwischen 13 μM und 180 μM publiziert⁵⁸. U2OS-Zellen exprimieren nicht den AR und ER, aber die IGF I/II Rezeptoren⁶⁰. So könnte die antiandrogene Wirkung nicht nur über die vermutlich schwachen ligandenvermittelte Effekte am AR zustande kommen, sondern über die Wachstumsfaktorregulation, die wiederum in den AR-Signalweg eingreift.

In einem radioaktiven Verdrängungsassay wurde eine reduzierte Bindung von [³H]R1881 an zytosolische Rezeptorproteine humaner Prostatakrebszellen in Gegenwart von ungesättigten Fettsäuren festgestellt⁶¹. Gesättigte Fettsäuren wie Palmitinsäure (**39**) (C16:0) und Stearinsäure (**40**) (C18:0) beeinflussten die Bindung nicht. Unabhängig vom Sättigungsgrad der Fettsäuren verminderten Palmitoleinsäure (**41**) (C16:1), Linolsäure (**42**) (C18:2) und Arachidonsäure (**43**) (C20:4) die Bindung von R1881 (**9**) an AR-Protein, wobei für die Arachidonsäure (**43**) die höchste inhibitorische Aktivität nachweisbar war. Prostaglandine stimulierten in niedrigen Konzentrationen (9 nM) die Androgenbindung an den AR und in etwas höheren Konzentrationen (30 nM) trat der gegenteilige Effekt ein. Bei Mitsuhasi *et al.* konnte diese Wirkung der Arachidonsäure (**43**) zwar bestätigt werden, aber durch Scatchard-Analyse wurde ein kompetitiver Mechanismus ausgeschlossen⁶². Prinsloo *et al.* konnten einen Einfluss der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) auf die Bindung von Testosteron (**2**) bzw. E2 (**4**) in DU145-Zellen bestätigen⁶³. Die Bindungsaktivität von Testosteron (**2**) wurde vermindert, während die von Estradiol unter PUFA-Applikation stimuliert wurde. Ungesättigte Fettsäuren beeinflussen demzufolge die Wirkung von Androgenen auf den Androgenrezeptor, wobei der genaue Mechanismus derzeit ungeklärt ist.

1.2.3 Klinisch relevante Androgenrezeptorliganden

Androgene

Androgene können unterstützend bei der Sarkopenie, der Krebskachexie und bei anderen chronischen Verfallszuständen wie AIDS zum Aufbau der Muskel- und Knochenmasse eingesetzt werden. Ein therapeutischer Einsatz bei Osteoporose kann deshalb ebenso erfolgen. Androgensersatztherapien finden bei sexuellen Dysfunktionen und Hypogonadismus Anwendung.

Testosteron (**2**) ist durch seinen ausgeprägten First-pass-Effekt oral fast unwirksam und besitzt bei parenteraler Applikation nur eine sehr kurze Wirkdauer. Aus diesem Grunde wurden länger wirksame bzw. oral verfügbare Testosteronderivate wie Mesterolone (**44**), Nandrolondecanoat (**45**), Clostebolacetat (**46**), Metenolonacetat (**47**) und Testosteronester entwickelt.

Testosteron (**2**), Oxymetholon (**48**) und seine Derivate fanden früher bei der Therapie der angeborenen und erworbenen aplastischen Anämie ihre Anwendung⁶⁴, da anabole Steroide die Knochenmarkzellproliferation stimulieren. Diese Form der therapeutischen Anwendung wurde aber fast vollständig durch Substanzen wie Epoetin alpha, die selektiv die Erythropoese stimulieren, verdrängt. Anabole Steroide wie Oxandrolon (**49**) wurden früher von pädiatrischen Endokrinologen zur Therapie von Wachstumsstörungen verwendet. Seitdem aber synthetisches Wachstumshormon verfügbar ist, finden anabole Steroide wegen ihrer Nebenwirkungen kaum mehr Anwendung auf diesem Gebiet⁶⁵. Die Anwendung von C-17 alkylierten Testosteronderivaten bei der Therapie der aplastischen Anämie führten in manchen Fällen zu hepatozellulären Karzinomen und myeloischer Leukämie^{66;67}. Wie von Bhasin *et al.* durch Metaanalyse nachgewiesen, führt Testosteronergänzung zu gesteigerter Skelettmuskelmasse- und -stärke sowohl bei eugonadalen jungen Männern als auch bei Männern mit Androgendefizit, ebenso bei älteren Männern und Männern mit mehreren chronischen Krankheiten⁶⁸. Die Nebenwirkungen einer Langzeit-Testosteronergänzungstherapie beflügelten die Suche nach selektiven Androgenrezeptormodulatoren (SARM), die eine anabole Wirkung ohne die unerwünschten, durch Testosteron (**2**) vermittelten Nebenwirkungen zeigen. Trotz zunehmender wissenschaftlicher Aufklärung auf diesem Gebiet ist es in den letzten Jahren nicht gelungen, eine neue androgene Substanz mit Zulassung für eine anabole medizinische Indikation auf den Markt zu bringen. Die Ursache dafür liegt in den strengen regulatorischen Anforderungen auf diesem Gebiet.

Selektive Androgenrezeptor Modulatoren

Im letzten Jahrzehnt wurden nichtsteroidale SARMs entwickelt, die selektiv die Muskel- bzw. Knochenmasse stimulieren oder erhalten und die sich hinsichtlich einer Anwendung bei der Andropause, bei Krebskachexie, gegen Osteoporose oder als hormonelle Kontrazeptiva für den Mann in klinischer Entwicklung befinden. In Tabelle 1 sind die chemischen Klassen der sich aktuell in Entwicklung befindlichen SARMs aufgelistet. Bislang hat noch kein SARM die Marktreife erreicht. SARMs sind in die Verbotsliste der World Doping Agency aufgenommen worden⁶⁹.

Tabelle 1: SARMs in klinischer Entwicklung

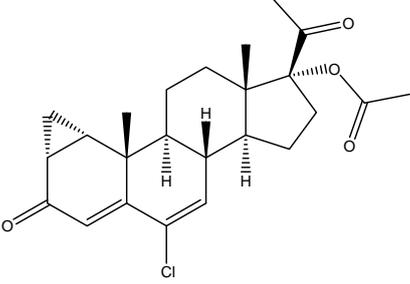
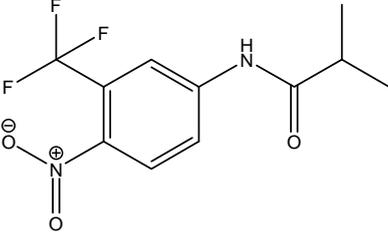
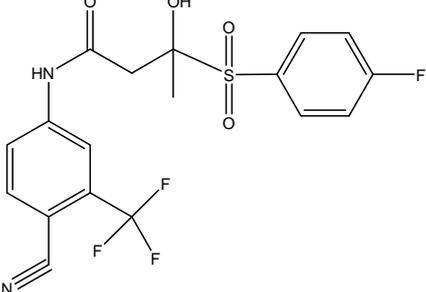
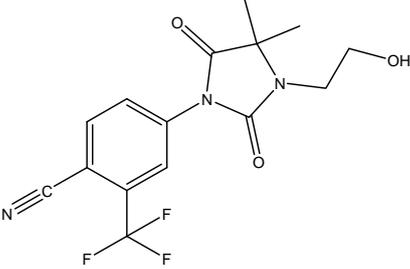
<i>Chemische Klasse</i>	<i>Allgemeine chemische Struktur</i>	<i>Bezeichnung der Leitstruktur</i>	<i>Firma</i>	<i>Phase der Entwicklung</i>
Arylpropionamid-Analoga		Ostarine Andarine ^{70,71} S-23	GTx Inc	Phase II ⁷² Phase I ⁷⁰ -----
Bizyklische Hydantoin-Analoga		BMS 564929 ^{73,74}	BMS	Phase I ⁷⁰
Chinolin-Analoga		LGD 2226 ^{75,76}	Ligand Pharmaceuticals	Phase I ⁷⁰
		LGD 3303 ^{70,71}	Ligand Pharmaceuticals	-----
Naphthalin-Analoga		AC 262356 ⁷⁷	Acadia Pharmaceuticals	-----

Antiandrogene

Androgenrezeptor-Antagonisten werden als Antiandrogene bezeichnet und verhindern die Bindung der natürlichen Androgene durch kompetitiven Antagonismus am Androgenrezeptor. Sie finden Anwendung bei der Therapie des Prostatakarzinoms, der Akne, androgenetischen Alopezie, des Hirsutismus und bei krankhaft gesteigerter Sexualität.

Verschiedenartige Antiandrogene greifen in unterschiedliche Schritte des Prozesses der Androgenrezeptortransformation und Transkriptionsaktivität ein. Das steroidale Antiandrogen Cyproteronacetat (**6**) besitzt zusätzlich zur antiandrogenen noch eine starke gestagene Wirkungskomponente und senkt deshalb über einen hormonellen Rückkopplungsmechanismus den Testosteronblutspiegel⁷⁸. Cyproteronacetat (**6**) interagiert im Gegensatz zu Flutamid (**7**) und Bicalutamid (**30**) mit dem Corepressor SMRT, der an den N-Terminus des AR bindet⁷⁹. Flutamid (**7**) wurde von Fenton *et al.* als schwacher partieller Agonist am wtAR beschrieben, während diese Substanz bei den meisten AR-Mutationen eine verstärkte Bindungsaktivität aufweist und agonistisch wirkt⁸⁰. Da viele Formen des fortgeschrittenen androgenresistenten Prostatakarzinoms eine Mutation am AR aufweisen, ist dieser Sachverhalt von besonderer Bedeutung. Bicalutamid (**30**) zeigt jedoch an den meisten mutierten ARs weiterhin eine antagonistische Aktivität⁸⁰. Auf der Suche nach dem spezifischen Wirkmechanismus wurde von Masiello *et al.* eine antagonistische Wirkung durch Verhinderung der Bindung des AR an die DNA nicht bestätigt⁸¹. Vielmehr wird eine Verbindung zwischen transkriptionell inaktivem Rezeptor und der DNA stimuliert. Worauf genau diese transkriptionell inaktive Form beruht, ist noch nicht ausreichend geklärt. Möglich wäre eine durch die Bicalutamidbindung veränderte Konformation und damit verhinderte Bindung von Coaktivatoren oder eine durch die Bicalutamidbindung hervorgerufene Rekrutierung von Corepressoren und damit verhinderte Bindung von Coaktivatoren. Von Bohl *et al.* wurde durch eine Röntgenkristallstruktur einer mutierten W741L AR-Ligandenbindungsdomäne mit gebundenem R-Bicalutamid eine Erklärung dafür gefunden, dass ein Austausch der Sulfonylgruppe in Bicalutamid (**30**) durch Ether- oder Thiobrücken eine Umwandlung der antagonistischen in eine agonistische Aktivität bewirkt⁸². Dies findet bei der Entwicklung neuer SARMS Anwendung. McGinley *et al.* nutzten die von Bohl *et al.* publizierte Röntgenkristallstruktur, um durch computergestütztes Moleküldesign antagonistische Bicalutamid-Derivate zu finden, die sowohl am wtAR, als auch an den AR-Mutationen wie Thr877 → Ala, Trp741 → Leu und Trp741 → Cys, die mit dem Androgenentzugssyndrom bei der Behandlung des Prostatakrebses in Verbindung gebracht werden, wirken⁸³. Durch Austausch des 4-Fluorophenyl-Ringes durch Naphthalen konnte ein solches aktives Bicalutamid-Derivat synthetisiert werden.

Tabelle 2: Antiandrogene und ihre Anwendungen

Name	Struktur	Aktivität	Therapie
Cyproteronacetat (6) (Androcur®)		antiandrogen, gestagen	Prostatakarzinom abnormale bzw. krankhaft gesteiger- te Sexualität androgenetische Alopezie, <i>Acne</i> <i>vulgaris</i> , bei Frauen Hirsutismus
Flutamid (7) (Fugerel®, Flumid®, Flutamex®)		antiandrogen, vor allem durch den Metaboliten 2- Hydroxyflutamid (8)	fortgeschrittenes Prostatakarzinom
Bicalutamid (30) (Racemat) (Casodex®)		antiandrogen	fortgeschrittenes Prostatakarzinom
RU58841 (50)		antiandrogen	Kandidat für topi- sche Applikation bei <i>Acne vulgaris</i> , Hirsutismus und androgenetischer Alopezie ⁸⁴⁻⁸⁶

Ein alternativer Wirkmechanismus der antiandrogenen Aktivität des Bisphenol A Derivats EPI-001 (51) besteht in der Blockade der N-terminalen Transaktivierung. Durch Interaktion mit der AF-1 Region und Verminderung der Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Androgenrezeptor wird die Interaktion des AR mit den ARE verhindert ⁸⁷. Interessanterweise wird die transkriptionelle Aktivität der anderen verwandten Steroidhormonrezeptoren durch diese Form der antiandrogenen Wirkweise nicht beeinträchtigt. Ein weiterer Mechanismus, der einer neuen antiandrogenen Wirkung zugrunde liegt, verhindert die Translokation des aktivierten Androgenrezeptors in

den Nukleus (RD162 (**52**), MDV3100 (**53**), SNARE-1 (**54**)) bzw. exportiert den aktivierten AR aus dem Nukleus (SNARE-1 (**54**))⁸⁸. Er ist für die antiandrogene Wirkung sowohl am wtAR als auch am mutierten Rezeptor der beiden Diarylthiohydantoine RD162 (**52**) und MDV3100 (**53**), sowie des Arylpropanamid-Derivates SNARE-1 (**54**) verantwortlich^{88;89}. Dadurch sind diese Antiandrogene potentielle Kandidaten für die Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (CRPC; alte Bezeichnung hormonrefraktär), das nach Androgenentzugstherapie auftritt.

1.3 Testsysteme zur Untersuchung hormoneller Aktivität

Zur Testung von Kernrezeptorliganden gibt es verschiedene Ansätze. Sie weisen alle Einschränkungen auf, so dass für eine umfassende Charakterisierung eines Liganden möglichst immer eine Kombination von Assaysystemen verwendet werden sollte. Rezeptorbindungsassays beschreiben nur die Bindungsaffinität eines Liganden zum Rezeptor, während funktionelle Assays wie Zellproliferationsassays, Reporterassays, Genexpressionsassays und neuere Assayformen wie der Coaktivatoren-Assay Liganden als Agonisten bzw. Antagonisten charakterisieren.

1.3.1 Zellproliferationsassays

Androgene kontrollieren die Zellproliferation durch drei unabhängige Wege: a) Inhibierung des Zelltods b) Induktion der Zellproliferation und c) Inhibierung der Zellproliferation, auch proliferativer „Shutoff“ genannt⁹⁰. Je nach Zelltyp und Kultivierungsbedingungen der Zellen variiert das Ansprechen der Zellen auf die Behandlung mit Androgenen.

Zellproliferationsassays die z. B. mit LNCaP-Zellen durchgeführt werden, basieren hauptsächlich auf der Induktion der Zellproliferation (Mechanismus b). Agonisten des Androgenrezeptors lösen eine Zellproliferationssteigerung aus. Dieser durch AR-Agonisten vermittelte Effekt, kann durch Antiandrogene inhibiert werden. Je nach Zelltyp oder Kultivierungsbedingungen ist ein biphasischer Verlauf des Ansprechens, d.h. ein Zusammenwirken von Mechanismus b) und c) sichtbar. Zellen, die endogen den AR exprimieren, sind bei der Durchführung von Zellproliferationsassays der *in-vivo*-Situation am ähnlichsten. Sie weisen eine physiologisch relevante Metabolisierung der Testsubstanzen auf und verfügen über Cofaktoren, die so auch tatsächlich in den Zielzellen vorkommen. Zellen mit ausschließlicher AR-Expression und fehlender Expression von GR, MR, PR und ER α bzw. ER β sind nicht bekannt.

Die am besten untersuchte Prostatakrebszelllinie ist die LNCaP-Zelllinie (genaue Beschreibung siehe 2.2.1). Sie exprimiert einen mutierten AR, mit Alanin in Position 868 anstelle von Threonin⁹¹. Dadurch wird die Aktivierung des Androgenrezeptors unspezifisch nicht nur durch Androgene sondern auch durch Östrogene, Progesterone oder An-

tiandrogene ausgelöst^{91;92}. Einige Antagonisten wie Bicalutamid (**30**) wirken in höheren Konzentrationen weiter antagonistisch, während Cyproteronacetat (**6**) oder Hydroxyflutamid (**8**) als Agonisten wirken. Somit ist bei Verwendung der LNCaP-Zelllinie eine Differenzierung in Agonisten bzw. Antagonisten nicht möglich, aber eine prinzipielle Einstufung in potentiell am AR wirksame bzw. unwirksame Substanzen kann erfolgen.

Neuere Krebszelllinien wie die VCaP-Zelllinie (Beschreibung siehe 2.2.1), die einen wtAR exprimieren, sind dadurch zwar geeigneter für die Durchführung eines Zellproliferationsassays, verfügen aber über so schlechte Wachstumseigenschaften, dass ein solcher Assay damit nicht zu empfehlen ist.

Ob die kürzlich veröffentlichten Prostatazellen BPH-1-AR, die über einen stabilen und funktionellen wtAR verfügen, geeigneter sind, muss sich noch erweisen⁹³.

Der von Szelei *et al.* entwickelte Proliferationsassay A-Screen bedient sich der Brustkrebszelllinie MCF-7, die stabil mit dem wtAR transfiziert wurde⁹⁴. Diese MCF-7-AR1-Zelllinie exprimiert ungefähr die fünffache Menge an AR als die MCF-7-Zelllinie. Interessanterweise zeigen Androgene in dieser Zelllinie keinen proliferationssteigernden Effekt, sondern eine Inhibierung der Proliferation, die durch das Antiandrogen Bicalutamid (**30**) wieder aufgehoben wird.

Zellproliferationsassays weisen den Vorteil auf, dass nicht nur die Aktivierung der genotropen Reaktion des AR untersucht, sondern auch komplexere Vorgänge, wie Beeinflussung des Steroidhormonstoffwechsels, der Cofaktor-Expression und Cofaktor-Bindung oder eine Inhibierung der Translokation des Ligand-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern neben der nichtgenotropen Regulierung erfasst werden. Allgemeine zytotoxische Effekte können ebenfalls detektiert werden. Der Zellproliferationsassay bietet sich als Vorscreening an, um einen möglichen androgenen, antiandrogenen oder zytotoxischen Einfluss festzustellen. Eine potentielle Interaktion mit dem Androgenrezeptor muss allerdings mit einem zusätzlichen AR-spezifischeren Test, wie einem Reportergenassay, bei dem nur die genotrope ligandenspezifische Reaktion erfasst wird, oder durch einen Rezeptorbindungsassay bestätigt werden.

1.3.2 Reportergenassays

Reportergene werden zur Quantifizierung der transkriptionellen genotropen Aktivität des AR eingesetzt. Sie werden von außen in Verbindung mit einem Promotor, der über androgenresponsive Elemente verfügt und somit durch den Ligand-Rezeptor-Komplex aktiviert werden kann, in das Genom der Zelle eingeschleust. Die Produkte der Reporter gene besitzen Eigenschaften, die leicht messbar sind. So kodieren viele bekannte Reporter gene Enzyme, die eine Farb- oder Lumineszenzreaktion hervorrufen. Das sehr häufig in diesem Zusammenhang verwendete Reporter gen ist die Leucht käfer-Luziferase, die die Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin katalysiert. Als AR-induzierbarer Promotor wird hauptsächlich der MMTV verwendet. Dieser wird zwar

nicht durch den ER⁵², aber durch den GR und PR stimuliert⁹⁵. Vorteil der Reporterassays ist, dass nur genotrope Aktivitäten des Androgenrezeptors erfasst werden und damit spezifisch eine Aussage über eine agonistische bzw. antagonistische Wirkung des Liganden getroffen werden kann. Die Spezifität des Assaysystems ist von der zugrunde liegenden Zelllinie abhängig. Zellen, die endogen einen wtAR exprimieren, besitzen zumindest in geringen Mengen mindestens einen der anderen Steroidhormonrezeptoren. Wird eine Zelllinie zur Transfektion ausgewählt, die keinen endogenen AR exprimiert, besteht das Risiko einer Zielzellen-untypischen Metabolisierung oder einer veränderten Aktivität durch Ligandenbindung am AR, da sonst in Zielzellen vorhandene Cofaktoren eventuell gar nicht exprimiert werden. Die Abhängigkeit der AR-Transkriptionsaktivität in Reporterassays von der Zellumgebung und vom verwendeten Promotor wurde von Simon *et al.* bestätigt⁹⁶. Auf Hefe basierende Reporterassays sind aufgrund der ungewöhnlichen Metabolisierung von Liganden, Problemen bei der zellulären Aufnahme und dem Transport von Steroiden bzw. Testsubstanzen nicht zu empfehlen.

Transient transfizierte Zelllinien

Transient transfizierte Zelllinien weisen den Vorteil auf, dass sie ein stärkeres Ansprechen auf eine Androgenbehandlung (50- bis 100-fache Induktion) im Vergleich zu stabil transfizierten Zelllinien (10-fache Induktion) zeigen. Dadurch sind sie sensitiver und ermöglichen die Detektion von schwachen Agonisten/Antagonisten. Nachteilig ist der höhere Aufwand durch die Transfektion vor jedem Assay. Ein Beispiel für transient transfizierte Assaysysteme sind die von Vingaard *et al.* transient mit dem pSVAR0 Expressionsvektor und dem MMTV-LUC Reporterplasmid transfizierten CHO-Zellen⁹⁷. Nachteilig ist hier die Präsenz des Glukokortikoidrezeptors in den CHO-Zellen, so dass eine Spezifität bei der Testung von unbekanntem Substanzen für den AR nicht sicherzustellen ist.

Stabil transfizierte Zelllinien

Neben der nur schwachen Induktion weisen stabil transfizierte Zelllinien meist den Nachteil auf, dass sie nicht dauerhaft stabil sind und integrierte Plasmide verlieren. Vorteilhaft ist die geringere Varianz der Signalinduktion. Beispiele für stabil transfizierte Assays sind die von T erouanne *et al.* (PC-3-Zellen transfiziert mit pSG5-puro-hAR und pMMTV-neo-Luc), Araki *et al.* (CHO-Zellen transfiziert mit ARE des Rattenprostate-C3-Gens verbunden mit dem Luziferasegen und dem AR) und Wilson *et al.* (MDA-kb2-Zellen mit endogenem AR transfiziert mit pMMTV-neo-Luc) entwickelten Zelllinien⁹⁸⁻¹⁰⁰. In unserem Labor wurde versucht die MDA-kb2-Zelllinie zu etablieren, doch es konnte nur ein maximal dreifaches Ansprechen nach Androgenbehandlung festgestellt werden. Damit wäre es nicht möglich, unbekanntem Substanzen auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität zu testen. Ursache dafür war ein Verlust des integrierten Plasmids. Das von Sonneveld *et al.* entwickelte AR-CALUX-Assaysystem basiert auf der Osteosarkomzelllinie U2OS mit einem stabil transfizierten AR¹⁰¹. Der Vorteil dieses Systems ist die Verwendung eines hochspezifischen Reporterkonstruktes, welches drei ARE ent-

hält, die mit einem minimalen TATA-Promoter und der Luziferase verbunden sind. Dadurch ist eine spezifische Detektion von Liganden des AR möglich.

1.3.3 Genexpressionsassays

Die Untersuchung der Expression von androgenabhängig regulierten Genen nach Androgenbehandlung ist eine zeitaufwendige Methode. Vorteilhaft ist die Möglichkeit, den Einfluss von Androgenen oder Antiandrogenen in Zielzellen von physiologischem Interesse ohne zusätzliches Einschleusen von Reportergenen zu untersuchen. Durch die Wahl der Inkubations- und Kultivierungsbedingungen kann so ein Milieu eingestellt werden, dass physiologischen Bedingungen sehr nahe kommt. In dieser Arbeit ist die Expression von PSA und AR in den LNCaP- und VCaP-Zellen untersucht worden.

1.3.4 Rezeptorbindungsassays

Die Bindungsaffinität eines Liganden an den AR kann mittels Rezeptorbindungsassays bestimmt werden. Das Prinzip dieser Assays basiert auf einer kompetitiven Verdrängung eines markierten hochaffinen Liganden des AR von der AR-LBD durch eine Testsubstanz. Vorteil der Rezeptorbindungsassays ist die Bewertung der reinen Bindungsaffinität. Kriterien wie Metabolisierung, Zellpermeabilität oder Zytotoxizität haben hier keinen Einfluss. So lässt sich eine gute Korrelation der IC_{50}/K_i -Werte mit den durch *in silico* Verfahren bestimmten Score-Werten herstellen (siehe 3.1). Allerdings kann mit einem Rezeptorbindungsassay keine Aussage über die funktionelle Einstufung eines Liganden in Agonisten bzw. Antagonisten getroffen werden.

Radioligandenassays gegenüber Fluoreszenzpolarisationsassays

Radioligandenassays werden mit Tritium-markierten R1881 (**9**), DHT (**1**) oder anderen Agonisten des AR durchgeführt. Im nanomolaren Bereich kann mit einem Radioligandenassay eine stärkere Differenzierung der Bindungsaffinität der Testsubstanzen erfolgen, während Fluoreszenzpolarisationsassays (Beschreibung siehe 2.6) bei der Detektion schwacher Binder von Vorteil sind. Fluoreszenzpolarisationsassays können in einem homogenen Assayformat durchgeführt werden, während bei einem kompetitiven Radioligandenassay zusätzliche Waschschrte involviert sind. Radioligandenassays sind relativ leicht selbst etablierbar und die Rezeptorproteinquelle kann durch Bestimmung der unspezifischen Bindung ein Gewebehomogenat sein. Nachteilig sind die Kosten durch Entsorgung radioaktiven Materials. Fluoreszenzpolarisationsassays sind in der Etablierung aufwendiger und als Kit für verschiedene Steroidhormonrezeptoren zu erwerben (z. B. PolarScreen von Invitrogen).

1.3.5 Coaktivator-Assays

Die Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) hat für eine Reihe von Steroidhormonrezeptoren Coaktivator-Assaysysteme entwickelt, mit denen es möglich ist, die Vorteile der Rezeptorbindungsassays wie hohe Spezifität, kurze Inkubationszeiten, Ausschalten von Metabolisierungs- und Zellpermeabilitätseinflüssen mit einer Aussage über funktionellen Agonismus bzw. Antagonismus von Liganden zu vereinen. Die Assays basieren auf TR-FRET Messungen, die sich aus der Interaktion eines fluoreszenzmarkierten Coaktivatorpeptids mit der durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper markierten AR-LBD ergeben. Durch Untersuchung der Testsubstanz alleine bzw. in Koinkubation mit einem Referenzandrogen kann die agonistische bzw. antagonistische Aktivität festgestellt werden.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Die Auflistung der in der Arbeit erwähnten Testsubstanzen mit Angabe der Strukturformeln befindet sich im Anhang (Teil A), ebenso wie die Zusammensetzung der Reagenzien, der verwendeten Kits und Geräte (Anhang, Teil B). Die Substanz R1881 (9) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Andrea Kiessling, Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt.

2.1 Extraktion und Fraktionierung

2.1.1 Extraktion

Die Extraktion wurde mit dem Verfahren der beschleunigten Lösemittelextraktion mit Hilfe des automatischen Extraktors Dionex ASE 200® durchgeführt. Das getrocknete bzw. lyophilisierte Pilz- und Pflanzenmaterial wurde gewogen und in die Filterhülsen der 22 ml Edelstahl-Extraktionszellen gefüllt und unter nachfolgenden Extraktionsbedingungen (Tab. 3) automatisch extrahiert. Die Extraktionsbedingungen wurden so optimiert, dass bei geringem Zeitaufwand und relativ niedriger Temperatur eine maximale Extraktausbeute zu erreichen ist.

Tabelle 3: Extraktionsparameter

<i>Parameter</i>	<i>Extraktionsbedingung</i>
Verweilzeit des Lösungsmittels in der Zelle	10 min
Temperatur	40 °C
Relatives Durchspülvolumen	60 %
Reinigungszeit (mit Stickstoff)	30 sec
Druck	70 bar
Vorheizzeit	2 min
Extraktionszyklen	3
Lösungsmittel	1. MtBE/EtOH (80/20 %) 2. MeOH 100 %

Für jede Pflanze bzw. Pilz wurde das Extraktionsverfahren in zwei Extraktionszellen durchgeführt, um ausreichende Mengen an Extrakt zu erhalten. Ein Teil des Extraktes wurde im Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt, in Probengläschen überführt und unter dem Stickstoffstrom getrocknet. Diese Rohextrakte sind in der Probenbezeichnung durch „R“ gekennzeichnet und wurden verwendet, um die Aktivitäten der Fraktionen mit der des Rohextraktes zu vergleichen. Der andere Teil des Extraktes wurde mittels Gradientenextrographie fraktioniert (Kap. 2.1.2).

2.1.2 Fraktionierung

Fraktionierung von Rohextrakten

Ein Aliquot der durch beschleunigte Lösemittlextraktion hergestellten Rohextrakte wurde mit Hilfe der Gradientenextrographie in Fraktionen unterschiedlicher Polarität unterteilt.

Bei der Gradientenextrographie wird die Probe auf eine modifizierte Diatomeenerde (Isolute HM-N) aufgezogen. Das Lösungsmittel wird im Rotationsverdampfer entfernt. Dabei lagern sich die polaren Substanzen zuerst an der Oberfläche der Diatomeenerde an. Je stärker sich die Menge des Lösungsmittels verringert, desto mehr lagern sich auch weniger polare Substanzen an die Oberfläche der Partikel an. Mit zunehmender Verdunstung des Lösungsmittels baut sich so Schicht für Schicht eine Ummantelung auf, bei der die unpolaren Moleküle außen liegen. Die Diatomeenerde wird in eine leere Kartusche gefüllt und mit Lösungsmitteln steigender Polarität eluiert. Dabei werden schichtweise, beginnend mit den unpolaren Molekülen, die Substanzen eluiert.

Tabelle 4: Allgemeine Probenkennzeichnung der Extrakte und Fraktionen

<i>Probenkennzeichnung</i>	<i>Elutionsmittel</i> <i>Gradientenextrographie</i>
Erste Extraktion mit MTBE/EtOH (80/20 %)	
BOCxxx yyy 1H	<i>n</i> -Hexan
BOCxxx yyy 1E	Ethylacetat
BOCxxx yyy 1A	Aceton
BOCxxx yyy 1M	Methanol
BOCxxx yyy 1AH	Aceton/HCl (0,5ml 2 N HCl auf 100ml Aceton)
BOCxxx yyy 3R	Rohextrakt

Zweite Extraktion mit MeOH	
BOCxxx yyy 2H	<i>n</i> -Hexan
BOCxxx yyy 2E	Ethylacetat
BOCxxx yyy 2A	Aceton
BOCxxx yyy 2M	Methanol
BOCxxx yyy 2AH	Aceton/HCl (0,5ml 2 N HCl auf 100ml Aceton)
BOCxxx yyy 4R	Rohextrakt

Die aus dem Aufarbeitungsschema resultierenden Probenbezeichnungen sind in Tabelle 4 aufgelistet (BOCxxx = Experimentnummer, yyy = Abkürzung für extrahierten Organismus).

Die so gewonnen Proben wurden im Zellproliferationsassay getestet. Weiterführende Fraktionierungen wirksamer Proben erfolgten mittels HPLC oder Säulenchromatographie.

HPLC

Der Rohextrakt aus dem Rhizom von *Cibotium-barometz* (LAW540) wurde mittels präparativer Hochdruckflüssigchromatographie mit einer RP18-Säule (YMC ODS-A 120, 5 µm, 20 x 150 mm) mit einem Acetonitril/Wasser Gradienten (2 %→100 %, 40 min, 10 ml/min) fraktioniert. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Vis-Detektor bei 210 nm. (Fraktionierungsschema siehe Anhang Teil F, Abb. 83). Die *Cibotium-barometz*-Fraktion LAW540 E ist mit einem Acetonitril/Wasser Gradienten von 5 %→60 % und einer Elutionszeit von 20 min fraktioniert worden (Fraktionierungsschema siehe Anhang Teil F, Abb. 85).

Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie der *Cibotium-barometz*-Fraktionen LAW540_E und LAW540_A wurde an Sephadex LH20 Material mit den Säulenabmessungen L = 50 cm und Ø = 10 cm und dem Elutionsmittel MeOH durchgeführt. Die Fraktionen wurden in 6 ml Volumina gesammelt und mittels Dünnschichtchromatographie (DC-Platten, Kieselgel 60 F254 und Sprühreagenz Vanillin-Schwefelsäure) untersucht. Gleiche Fraktionen wurden vereinigt und der Testung unterzogen (Fraktionierungsschema siehe Anhang Teil F, Abb. 84).

2.1.3 Pflanzen- und Pilzmaterial

Alle extrahierten Pflanzen und Pilze sind in Tabelle 5 bzw. in Tabelle 6 aufgelistet. Extrakte von Kooperationspartnern (Tab. 7) wurden durch Gradientenextrographie fraktioniert.

Tabelle 5: Extrahierte Pflanzen

<i>Art</i>	<i>Familie</i>	<i>Pflanzenteile</i>	<i>Probe</i>	<i>Quelle</i>
<i>Artemisia afra</i>	Compositae	Kraut	BOC377 ARA	Kenia, University of Nairobi
<i>Carthamus tinctorius</i>	Compositae	Blüten	BOC245 BOC249	Yong Quan GmbH
<i>Cibotium barometz</i>	Dicksoniaceae	Rhizom	BOC360 CBA	Holistikum.de Groß- und Einzelhandel für Naturrohstoffe
<i>Cibotium barometz</i>	Dicksoniaceae	Rhizom	BOC270 CBA	Pflanzenprobe, Exkursionsmaterial, Vietnam, Bestand IPB
<i>Cibotium regale</i>	Dicksoniaceae	Rhizom	BOC379 CIR	Botan. Garten Halle
<i>Cibotium schiedei</i>	Dicksoniaceae	Rhizom	BOC381 CIS	Botan. Garten Jena
<i>Cyrtomium falcatum</i>	Dryopteridaceae	Blätter	BOC269 CFA	Lebensammlung (IPB)
<i>Excoecaria bussei</i>	Euphorbiaceae	Rinde	BOC371 EXB BOC373 EXB	Kenia, University of Nairobi
<i>Heteropterys chrysophylla</i>	Malpighiaceae	Blätter	BOC267 HCH	Lebensammlung (IPB)
<i>Microglossa pyrifolia</i>	Compositae	Kraut	BOC375 MIP	Kenia, University of Nairobi
<i>Monanthes buchananii</i>	Annonaceae	Blätter	BOC375 MOB	Kenia, University of Nairobi
<i>Nephrolepis exaltata</i>	Oleandraceae	Blätter	BOC263 NEX	Lebensammlung (IPB)
<i>Ozoroa insignis</i>	Anacardiaceae	Blätter	BOC374 OZI	Kenia, University of Nairobi
<i>Polygonum multiflorum</i>	Polygonaceae	Wurzel	BOC268 PMU	Yong Quan GmbH
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Lamiaceae	Wurzel	BOC251 SMI	Yong Quan GmbH
<i>Suregada zanzibariensis</i>	Euphorbiaceae	Blätter	BOC374 SUZ	Kenia, University of Nairobi
<i>Teclea nobilis</i>	Rutaceae	Blätter	BOC377 TEN	Kenia, University of Nairobi

<i>Trichilia emetica</i>	Meliaceae	Blätter	BOC378 TRE	Kenia, University of Nairobi
<i>Trimeria grandifolia</i>	Flacourtiaceae	Blätter	BOC370 TRG	Kenia, University of Nairobi
<i>Turraea cornucopia</i>	Meliaceae	Blätter	BOC371 TUC BOC373 TUC	Kenia, University of Nairobi

Tabelle 6: Extrahierte Pilze

<i>Art</i>	<i>Familie</i>	<i>Extrahierte Teile</i>	<i>Probe</i>	<i>Quelle</i>
<i>Cortinarius brunneus</i>	Cortinariaceae	Fruchtkörper	BOC275 CBR	Bestand IPB
<i>Cortinarius speciosissimus</i>	Cortinariaceae	Fruchtkörper	BOC274 CSP	Bestand IPB

Tabelle 7: Extrakte von Kooperationspartnern

<i>Art</i>	<i>Familie</i>	<i>Pflanzenteile</i>	<i>Probe</i>	<i>Quelle</i>
<i>Aglia gigantea</i>	Meliaceae	Frucht	LAW539	Vietnam, Academy of Science and Technology
<i>Bumelia sartorum</i>	Sapotaceae	Rinde	BOC356, QBRxxx	Brasilien, Universidade Federal do Rio de Janeiro
<i>Cibotium barometz</i>	Dicksoniaceae	Rhizom	LAW540, BOC414	Vietnam, Academy of Science and Technology

2.2 Zellkultur

2.2.1 Verwendete Zelllinien

Die Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC-3 wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bezogen. Die MDA-kb2-Zellen und die VCaP-Zellen wurden von der American Type Culture Collection erworben.

LNCaP-Zellen

(DSMZ-Nr.: ACC 256)

LNCaP-Zellen wurden 1977 von der linken supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50 Jahre alten Mannes mit Prostatakarzinom etabliert¹⁰². Die Zellen wurden als androgensensitiv beschrieben¹⁰². Die Zellen exprimieren einen Androgenrezeptor mit einer Punktmutation in der Ligandenbindungsdomäne, geringe Mengen an Östrogenrezeptor β und keinen Östrogenrezeptor α ¹⁰³⁻¹⁰⁵. Kim *et al.* wiesen eine Expression des GR nach¹⁰⁶, während Yan *et al.* dies nicht bestätigen konnte¹⁰⁷.

PC-3-Zellen

(DSMZ-Nr.: ACC 465)

Die PC-3-Zellen wurden von einer Knochenmarksmetastase eines 62 Jahre alten weißen Mannes mit Prostatakrebs Stufe 4 post mortem isoliert und etabliert¹⁰⁸. Dieses schwach differenzierte Adenokarzinom (nach Androgenentzugstherapie) bildet Tumore in Nacktmäusen, wächst in Weichagar und ist unresponsiv gegenüber Androgenbehandlung¹⁰⁸. Die PC-3-Zellen exprimieren keinen Androgenrezeptor, aber Östrogenrezeptor α und β ^{104;105}.

MDA-kb2-Zellen

(ATCC-Nr.: CRL-2713™)

Die MDA-kb2-Zelllinie wurde von der Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 abgeleitet und enthält sowohl den Androgen- als auch den Glukokortikoidrezeptor. Sie exprimiert die Leuchtkäfer-Luziferase unter Kontrolle des MMTV Promoters, der sowohl für den AR als auch für den GR die jeweiligen Response-Elemente enthält. Damit eignet sich die Zelllinie sowohl zur Detektion von AR bzw. GR Agonisten und Antagonisten⁹⁹. In unserem Labor konnte nur ein maximal dreifaches Ansprechen der Zelllinie auf Androgene erreicht werden, was auf einen teilweisen Verlust des Plasmids zurückzuführen war.

VCaP-Zellen

(ATCC-Nr.: CRL-2876™)

Diese epithelialen Prostatakrebszellen wurden aus dem Gewebe einer vertebrealen Knochenmetastase eines 59 Jahre alten weißen Mannes mit hormonal nicht beeinflussbarem Prostatakrebs 1997 isoliert und als Prostatakrebsmodell etabliert. Die Zellen wurden als Xenotransplantate in Mäuse passagiert und dann *in vitro* kultiviert. Die Zellen sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* androgensensitiv¹⁰⁹. Setlur *et al.* konnten ein Vorkommen des Androgenrezeptors und des Östrogenrezeptors β , aber keinen Östrogenrezeptor α nachweisen¹⁰⁵.

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Zellkulturbedingungen

Die adherent wachsenden Zellen wurden mit Ausnahme der MDA-kb2-Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm², 75 cm² und 175 cm² inkubiert. Für jede Zelllinie wurden getrennte Flaschen Medium hergestellt, um Kreuzkontamination der Kulturen zu vermeiden. Die MDA-kb2-Zellen wurden bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Luftfeuchtigkeit ohne CO₂-Zufuhr inkubiert.

Mediumwechsel

Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und neues auf 37 °C temperiertes Medium entsprechend der Zelllinie (Tab. 8) hinzugegeben.

Tabelle 8: Zusammensetzung Zellkulturmedien

<i>Zelllinie</i>	<i>Medium</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Firma</i>
LNCaP PC-3	Zellkulturmedium	RPMI 1640 10 % fötales Kälberserum (FKS) 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin 16 mM N-[2-Hydroxyethyl]- piperazin-N'[2-ethansulfonsäure]	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) PAA Laboratories Biochrom AG (Berlin, BRD) HEPES-Puffer, pH 7,25 CCPro (Neustadt, BRD)
VCaP	Zellkulturmedium	DMEM (ohne Phenolrot, High Glucose, mit L-Glutamin und HEPES) 1 mM Natriumpyruvat 20 % fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen Biochrom AG (Berlin, BRD) Invitrogen
LNCaP PC-3 VCaP	ADFKS-Medium (Aktivkohle-Dextran behandeltes FKS)	Zusammensetzung wie Zellkul- turmedium nur 10 % bzw. 20 % ADFKS anstelle des FKS	ADFKS, SH30068.03, Hyclone, Perbioscience, Thermo Fisher Scientific (USA)
LNCaP PC-3 VCaP	Serumfreies Medium	Zusammensetzung wie Zellkul- turmedium nur ohne FKS	
MDA-kb2	Zellkulturmedium	Leibovitz-Medium L-15 ohne Phenolrot, mit L-Glutamin 10 % fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen Invitrogen

Passagieren von Zellen

Nachdem die Zellen in den Zellkulturflaschen konfluent gewachsen waren, spätestens aber nach 10 Tagen, wurden sie in eine größere Zellkulturflasche umgesetzt oder ein Teil der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt.

Dazu wurde das alte Medium abgegossen und die Zellen mit vorher auf 37 °C temperiertem PBS gewaschen. Es wurde ca. 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf eine 25 cm² Flasche gegeben und bei 37 °C im Inkubator für einige Minuten inkubiert. Das Fortschreiten des Ablöseprozesses der Zellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Nachdem ca. 80 % der Zellen abgelöst waren, wurde die Reaktion mit 9 ml auf 37 °C temperiertem serumhaltigem Medium abgestoppt.

Auszählen von Zellen

Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau-Lösung versetzt und von dieser Suspension 20 µl in die Pipette aufgenommen. Damit wurde die Neubauer-Zählkammer befüllt und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei tote Zellen dunkelblau erscheinen und lebende hellgelb.

Herstellen von Zellpellets

Die Zellen wurden wie oben beschrieben abgelöst und die Zellsuspension in Zentrifugationsröhrchen überführt. Nachdem sie durch einen Zentrifugationsschritt mit 430 g bei RT vom Medium getrennt wurden, sind sie mit RNase-freiem Wasser (Ampuwa) wieder aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt worden. Die Zellen wurden erneut mit RNase-freiem Wasser gewaschen und trocken bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Einfrieren von Zellen

Von den anfänglichen Passagen der Zellen wurden Proben eingefroren. Im Falle eines Verlustes der Zellen oder um mit ähnlichen Passagen Versuche durchzuführen, ist die Kryokonservierung sehr nützlich. Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196 °C für einige Jahre ihre Lebensfähigkeit erhalten. Die Zellen wurden bei dieser Prozedur wie oben beschrieben abgelöst, bei 4 °C und 430 g abzentrifugiert, in einer gekühlten Mischung aus 90 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. DMSO dient als Frostschutzmittel. Es verhindert die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen zerstören würden. Der Einfrierprozess sollte zudem nicht schneller als -1 °C/min erfolgen. Aus diesem Grund wurden die Kryoröhrchen in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox bei -80 °C über Nacht gelagert, um anschließend in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert zu werden.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde serumhaltiges Zellkulturmedium auf 37 °C temperiert und 10 ml davon in einem Zentrifugenröhrchen bereitgestellt. Zu den noch eingefrorenen Zellen wurde 1 ml von dem vorbereiteten Medium pipettiert. Das Medium im Kryoröhrchen wurde solange mit den gefrorenen Zellen gemischt, bis alle Zellen aufgetaut waren. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (430 g, RT), das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen (Entfernung des DMSO) und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml warmem Medium aufgenommen und in 6-Kavitäten-Zellkulturplatten kultiviert.

2.3 Zellproliferationsassay

Für die Zellproliferationsassays wurden LNCaP-Zellen und PC-3-Zellen der Passage 5 bis 31 verwendet.

2.3.1 Vorinkubation

Um eine bessere Ansprechbarkeit der LNCaP-Zellen gegenüber Androgenrezeptorliganden zu erhalten, wurden die Zellen 7 Tage serumfrei inkubiert. Es konnte nachweislich der Androgenrezeptor-mRNA-Gehalt im Vergleich zu normalen Kulturbedingungen erhöht werden (Abb. 22). Aufgrund der notwendigen Gleichbehandlung von PC-3-Zellen und LNCaP-Zellen im vergleichenden Proliferationsassay wurde diese Art der serumfreien Vorinkubation sowohl mit den LNCaP, als auch mit den PC-3-Zellen durchgeführt.

2.3.2 Durchführung der Assays

Die Zellen wurden nach der Vorinkubationszeit mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in Zellkulturmedium mit 10 % ADFKS-Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zelldichte betrug für LNCaP-Zellen 8×10^3 Zellen/100 μ l und für PC-3-Zellen $0,5 \times 10^3$ Zellen/100 μ l. Für jede 96-Kavitäten-Titerplatte wurde eine separate Suspension hergestellt, damit sich die Zellen beim Verteilen mit der Mehrkanalpipette nicht zwischenzeitlich absetzen können. Die Zellsuspension ist mit 100 μ l pro Kavität in der Platte verteilt worden. Zwei Kavitäten wurden nur mit Medium gefüllt, um einen Leerwert für die XTT-Messung zu erhalten. Aufgrund der langen Inkubationsdauer von 5 Tagen können Verdunstungseffekte die Ergebnisse verfälschen. Deshalb wurden die äußeren Kavitäten der Platte freigelassen, mit PBS aufgefüllt und die Platten zusätzlich in Tüten aus CO₂-durchlässigem Polypropylen verpackt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂, um den Anheftungsprozess der Zellen nicht zu stören. Die Verdünnungsreihen zur Herstellung

der Testsubstanzen wurden aus den DMSO-Stammlösungen und frischem warmem ADFKS-Medium hergestellt und in die Kavitäten der Platte verteilt. Es sind Vierfachbestimmungen pro Substanz und Konzentration durchgeführt worden. Die Inkubation der Platten mit den Substanzen erfolgte für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.3.3 Photometrische Detektion

Zur Bestimmung der Zellproliferation sind die Platten mit je 50 µl pro Kavität mit der nach Herstellerangaben aus dem Tetrazoliumsalz und dem Elektronenkupplungsreagenz frisch hergestellten XTT-Lösung versetzt worden. Das Tetrazoliumsalz wird durch die mitochondriale Dehydrogenase der lebenden Zellen reduziert und es bildet sich ein Formazan. Dieser Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum bei 490 nm. Nach vier Stunden Inkubationszeit im Brutschrank sind die Platten mit dem ELISA-Reader bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 600 nm detektiert worden.

2.4 Genexpressionsassay

Die LNCaP- bzw. VCaP-Zellen wurden für die Untersuchung der Genexpression in 175 cm² Zellkulturflaschen mit normalem Medium bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Von diesem Zellpool ausgehend wurden möglichst viele 25 cm² Zellkulturflaschen gleichmäßig mit der Zellsuspension befüllt und bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert. Dann wurden die Zellen für 24 h mit serumfreiem Medium kultiviert, um noch vorhandene Steroide und Wachstumsfaktoren auszuspülen. Die Verdünnungen der Testsubstanzen wurden frisch in ADFKS-Medium hergestellt, das serumfreie Medium verworfen und die Zellen mit bzw. ohne Testsubstanzen für 24 h in ADFKS-Medium inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden von den so behandelten Zellen Zellpellets hergestellt (siehe 2.2.2) und bis zur weiteren Verwendung (siehe 2.5) bei -80 °C gelagert.

2.5 Molekularbiologische Experimente

2.5.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen nach den Anleitungen des Herstellers. Von den zu untersuchenden Zellen wurden Zellpellets hergestellt, die mindestens 5×10^5 Zellen enthielten. Diese wurden durch Zugabe von 350 µl β-Mercaptoethanol/RLT-Puffer lysiert. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule gegeben und durch 2 min Zentrifugation bei 8000 g homogenisiert. 70 %iges Ethanol wurde dem homogenisierten Lysat hinzugefügt und nach Durchmischung auf eine

RNeasy-Mini-Säule gegeben. Nach dem Zentrifugationsschritt für 15 s bei 8000 g wurde der Durchfluss verworfen, anschließend die Säule mit 700 µl RW1-Puffer versetzt, zentrifugiert und in ein neues 2 ml Gefäß überführt. Die an die Säule gebundene RNA wurde zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule durch einen zweiminütigen Zentrifugationsschritt getrocknet. Danach wurde die RNeasy-Mini-Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit bis zu 30 bis 60 µl RNase freiem Wasser, je nach zu erwartender RNA-Menge, unter Zentrifugieren eluiert.

2.5.2 DNase-Verdau

Zur Durchführung des DNase-Verdau wurde das Deoxyribonuclease(DNase)-I-Amplification-Grade-Kit (Invitrogen) verwendet.

Der Reaktionsansatz für den DNase-Verdau setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

DNase I-Reaktionspuffer (10x)	1/10 des Gesamtvolumens
DNase I (1 U/µl)	1-1,5 µl
RNA	ad x µl

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei RT für 15 min. Die DNase I wurde durch Zugabe von 1/10 des Volumens des Gesamtansatzes an 25 mM EDTA und anschließendes zehnmütiges Erhitzen auf 65 °C deaktiviert. Die Qualität der RNA wurde mittels eines 1,5 %igen Agarose-Gels, versetzt mit Ethidiumbromid, untersucht. Es wurde für nachfolgende Arbeitsschritte nur RNA verwendet, deren Verhältnis von 28S-RNA- und 18S-RNA-Banden auf dem Agarose-Gel 2 : 1 betragen. Die so gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die durch DNase-Verdau gereinigten RNA-Proben wurden in der Verdünnung 1 : 75 mit RNase-freiem Wasser versetzt und die RNA-Konzentration mit dem BioPhotometer bestimmt. Die Konzentration der RNA wird vom BioPhotometer auf folgender Grundlage berechnet. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA.

2.5.4 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde mit dem RevertAid™-H-Minus-First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit von Fermentas durchgeführt.

Ansatz 1	RNA	2 µg
	Oligo(dT) ₁₈ -Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
	RNase freies Wasser	ad 12 µl
Ansatz 2	Reaktionspuffer (5x)	4 µl
	RiboLock™ Ribonuclease-Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
	RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl
	Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (10 mM)	2 µl

Der Ansatz 1 wurde 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 2 °C abgekühlt. Die Inkubation bei 70 °C führt zur Auflösung der Sekundärstruktur der RNA und die anschließende Abkühlung auf 2 °C ermöglicht die Hybridisierung der Oligo(dT)₁₈-Primer an die RNA. Im Anschluß wurde Ansatz 2 dazugegeben. Die reverse Transkription erfolgte in folgenden Schritten: 37 °C für 5 min, 42 °C für 1 h, 70 °C 10 min und Abkühlen auf 2 °C im T3 Thermocycler. Vor der Lagerung bei -20 °C wurde die cDNA 1 : 5 verdünnt.

2.5.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine Methode, die die gleichzeitige Bestimmung von Quantität und Qualität der PCR erlaubt. Dabei wird dem PCR-Ansatz zusätzlich ein Farbstoff (beispielsweise Sybr Green I) hinzugefügt, der durch Interkalation mit doppelsträngiger DNA Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm absorbiert und bei einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Nach jedem PCR-Zyklus werden die Fluoreszenzeigenschaften detektiert. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zur Konzentration der komplementären DNA (cDNA). Aufgrund dieser Tatsache kann man die Amplifikation in Echtzeit verfolgen. Die Qualität der PCR kann durch eine Analyse des Schmelzpunktes des doppelsträngigen PCR-Produktes am Ende der PCR überprüft werden, da jedes Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur besitzt, die von Produktlänge und GC-Gehalt abhängig ist. Zur Quantifizierung des AR-Gehaltes in den Zellen in Abhängigkeit von Passage und Serumzusatz wurde Platinum®-Sybr®-Green-qPCR-Super-Mix-UDG-Kit und das Rotor-Gene-2000-System verwendet. Die Auswertung wurde hier über die Bestimmung der Expression relativ zu einer Kontrolle vorgenommen. Zur Analyse des PSA-mRNA-Gehaltes und des AR-mRNA-Gehaltes in den LNCaP- und

VCaP-Zellen (siehe Kapitel 3.5) nach Behandlung mit den identifizierten Androgenrezeptorbindern wurde die Absolutzahl der während der PCR produzierten Anzahl der Kopien mit Hilfe von mitgeführten Standardkonzentrationen bestimmt. Dies hat den Vorteil, dass sich die absolute Expression zweier Gene gut vergleichen lässt.

In der folgenden Tabelle (Tab. 9) sind die verwendeten Primer aufgelistet. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sich damit alle Isoformen detektieren lassen ¹¹⁰.

Tabelle 9: Verwendete Primer

Gen	Ref.-Nr.	Primer (5' zu 3')	
		5'-Primer	3'-Primer
AR 1	NM_000044	AGGCACCTCTCTCAAGAGTTTG	CATGCAATGATACGATCGAGTT
AR 2	NM_001011645		
PSA 1	NM_001648	TCTGCGGCGGTGTTCTGGTG	GCGGGTGTGGGAAGCTGTGG
PSA 3	NM_001030047		
PSA 4	NM_001030048		
PSA 5	NM_001030049		
PSA 6	NM_001030050		
β-Actin	NM_001101		

Methode I: Relative Genexpression

Der Reaktionsansatz für die quantitative Real-Time-PCR ist folgendermaßen zusammengesetzt:

Platinum®-Sybr®-Green-qPCR-Super-Mix-UDG	10,0 µl
Wasser	8,5 µl
Vorwärtsprimer (100 pmol/µl)	0,25 µl
Rückwärtsprimer (100 pmol/µl)	0,25 µl
cDNA	1,0 µl

Die PCR wurde für den AR-Primer nach folgendem Programm durchgeführt:

Vorinkubation	2 min	50 °C
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C
Zyklus (40x)	15 s	95 °C
	45 s	60 °C
Schmelzpunktbestimmung		60 °C bis 99 °C

Jede Real-Time-PCR wurde dreimal durchgeführt. Die Auswertung der PCR erfolgte mittels des komparativen Quantifizierungsmodus der Rotor Gene Analysis Software V5.0.

Methode II: Absolute Genexpression

Die quantitative Real-Time-PCR wurde mit dem Platinum®-Sybr®-Green-qPCR-Super-Mix-UDG-Kit (Invitrogen) durchgeführt. Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurden 12,5 µl einer zweifach konzentrierten Platinum®-Sybr®-Green-qPCR-Supermix-Lösung, 2 µl der 1 : 10 verdünnten cDNA, 0,5 µM je Exon überspannendem Primer und 10 nM Fluoreszein verwendet. Die Amplifikation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Initiale Denaturierung	1 min	95 °C
Zyklus (40x)	30 s	95 °C
	15 s	63 °C (PSA,AR)
		58 °C (β-Aktin)
	15 s	72 °C

Um die Absolutzahl der PCR-Kopien zu ermitteln, wurden während der Real-Time-PCR Verdünnungsreihen von Plasmiden, welche die AR- bzw. PSA-Gene enthalten, in Konzentrationen zwischen $10 \cdot 10^7$ Kopien/PCR-Röhrchen mitgeführt. Die Plasmide wurden hergestellt, indem die mit der TaqPolymerase amplifizierte PCR-Produkte in den pCR2.1-TOPO-Klonierungsvektor kloniert wurden. Dazu wurden 6 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO-Vektor für 10 min bei Raumtemperatur versetzt, so dass die Ligation stattfinden konnte. Das pCR.21-TOPO Konstrukt wurde anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Selektion der transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte auf Ampicillin-haltigen (50 µg/ml) LB-Platten. Die Plasmidpräparation wurde mit dem NucleoBond-AX-Kit nach den Herstellerangaben durchgeführt und die Konzentrationen der Plasmid-DNA mit dem Biophotometer photometrisch bestimmt.

Die Anzahl der Kopien an Plasmiden pro µl (P) wurde mit folgender Formel berechnet, wobei $[P_{DNA}]$ die Konzentration der Plasmid-DNA und M_p das Molekulargewicht des Plasmids bedeuten.

Formel 1: Berechnung der Anzahl der Plasmid-Kopien/µl

$$P = \frac{6 \times 10^{23} \text{ Kopien/mol} \times [P_{DNA}]}{M_p}$$

2.6 Rezeptorbindungsassay

2.6.1 Funktionsweise der Fluoreszenzpolarisationsassays

Die Bindungsfähigkeit von Liganden an Rezeptoren kann mit Hilfe des Prinzips der Fluoreszenzpolarisierung gemessen werden (Abb. 17). Ein fluoreszierender Ligand (Fluoromon) wird in seinen Bindungseigenschaften an den Rezeptor charakterisiert und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d bestimmt. Dieser markierte Ligand bindet an den Rezeptor und aufgrund der Größe des Ligand-Rezeptor-Komplexes bewegt sich dieser nur sehr langsam in Lösung. Linear polarisiertes Licht wird eingestrahlt und trifft auf diesen Komplex. Das Fluorophor des markierten Liganden wird durch die Exzitationsstrahlung angeregt und die Emissionsstrahlung von linear polarisiertem Licht wird gemessen. Aufgrund der geringen Beweglichkeit des Komplexes ist die Polarisation und damit die Intensität der Emissionsstrahlung von linear polarisiertem Licht nur marginal gegenüber der Intensität der Exzitationsstrahlung verringert (paralleler Polarisationsfilter). Die Polarisationswerte sind in diesem Falle hoch. Trifft nun in einem Verdrängungsexperiment eine in ihren Bindungseigenschaften unbekannte Substanz auf diesen Komplex, kann sie den markierten Liganden von der Ligandenbindungsstelle des Rezeptors verdrängen. Der fluoreszierende Ligand liegt dann ungebunden in Lösung vor und kann sich aufgrund der geringeren Größe im Vergleich zum markierten Ligand-Rezeptor-Komplex schneller in Lösung bewegen. Das einfallende linear polarisierte Licht wird dadurch gedreht und die Polarisationswerte sinken. In der Zeitspanne zwischen Exzitation und Emission kann aus dem Verhältnis des Anteils von polarisiertem Licht und nichtpolarisiertem Licht die Lageveränderung von fluoreszierenden Molekülen und damit das Maß der Verdrängung bestimmt werden.

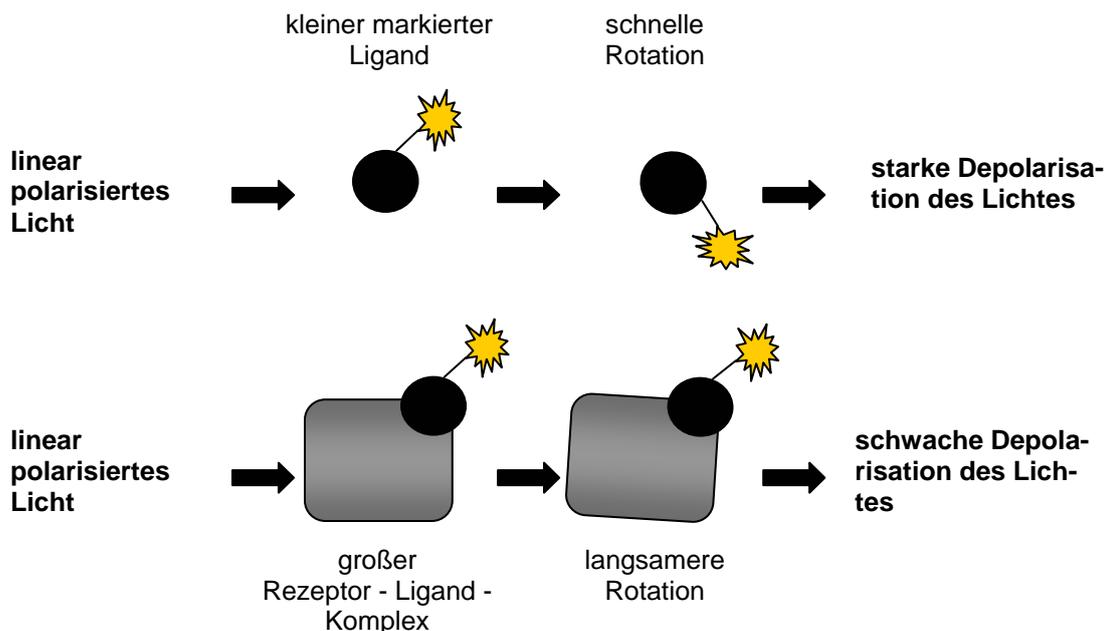


Abbildung 17: Prinzip der Fluoreszenzpolarisierung

2.6.2 Durchführung

Alle Assays wurden in schwarzen 96-Kavitäten-Halbvolumenplatten von Corning (3686) durchgeführt. Von allen Testsubstanzen wurden Stammlösungen in DMSO in 50 mM Konzentration hergestellt. Die Testsubstanzen wurden in dem jeweiligen Assaypuffer verdünnt und in die während des Bestückens gekühlten Platten mit 20 μ l vorgelegt. Alle Testsubstanzen wurden zuerst in zwei Konzentration, 100 μ M und 10 μ M, getestet. Der Rezeptor-Fluormone-Komplex wurde nach Herstellerangaben des Assays frisch hergestellt und zu den Testsubstanzen pipettiert. Das Endvolumen des Assays betrug 40 μ l. Als Negativkontrolle dienten die Lösungsmittelkontrolle (DMSO in Puffer 0,2 %) und als Positivkontrolle Dihydrotestosteron (**1**) (AR), β -Östradiol (**4**) (ER α , ER β), Dexamethason (**55**) (GR) und Progesteron (**5**) (PR). Das Reaktionsgemisch wurde mit der Mehrkanalpipette gemischt und für 5 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Fluoreszenzpolarisation wurde mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Tecan Genios Pro bei den Wellenlängen für den jeweiligen Assay (Tab. 10) vermessen.

Tabelle 10: Messwellenlängen der Fluoreszenzpolarisationsassays

<i>Fluoreszenzpolarisationsassay</i>	<i>Exzitationswellenlänge</i>	<i>Emissionswellenlänge</i>
PolarScreen Androgen Receptor Competitor Assay Kit, Green	485 nm	535 nm
PolarScreen Estrogen Receptor-alpha Competitor Assay Kit, Green	485 nm	530 nm
PolarScreen Estrogen Receptor-beta Competitor Assay Kit, Green	485 nm	530 nm
PolarScreen Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit, Red	535 nm	590 nm
PolarScreen Progesteron Receptor Competitor Assay Kit, Red	535 nm	590 nm

Wichtig ist die genaue Einhaltung der Messtemperatur von 27 °C, da die Polarisationswerte von der Temperatur abhängig sind. Zusätzlich wurde vor der Zugabe des Rezeptor-Fluormon-Komplexes die Eigenfluoreszenz der Substanzen gemessen. Unter Berücksichtigung der Totalintensität bei der Auswertung der Fluoreszenzpolarisation können falsch positive Substanzen ausgeschlossen werden.

Vor dem Vermessen von Proben wird der G-Faktor bestimmt. Dieser gerätespezifische Parameter stellt die Empfindlichkeit des Detektorsystems für parallele und orthogonale Strahlung dar und korrigiert instrumentelle Schwankungen des Gerätes.

Der G-Faktor fließt folgendermaßen in die Berechnung der Polarisation mit ein:

Formel 2: Berechnung der Polarisation unter Einbeziehung des G-Faktors

$$P = \frac{I_{vv} - (G \times I_{vh})}{I_{vv} + (G \times I_{vh})}$$

- P = Polarisation
 I_{vv} = Emissionsintensität des vertikal polarisierten Lichtes parallel zur Ebene des linear polarisierten Lichtes
 I_{vh} = Emissionsintensität des horizontal polarisierten Lichtes senkrecht zur Ebene des linear polarisierten Lichtes
 G = G-Faktor

Die Genauigkeit der Fluoreszenzpolarisationsmessungen wurde überprüft mit dem FP-Standardization-Reference-Kit.

2.6.3 Auswertung der Bindungsassays

Fluoreszenzpolarisation

Die Werte werden in Millipolarisationseinheiten (mP) angegeben. Berechnet wird die Fluoreszenzpolarisation durch die XFluor Software von Tecan nach Formel 2 (siehe 2.6.2).

Die Totalintensität der Fluoreszenzwerte wurde vor jeder Auswertung untersucht (Formel 3).

Formel 3: Berechnung der Totalintensität

$$I = G \times I_{vv} + 2I_{vh}$$

- I = Totalintensität
 G = G-Faktor
 I_{vv} = Emissionsintensität des vertikal polarisierten Lichtes parallel zur Ebene des linear polarisierten Lichtes
 I_{vh} = Emissionsintensität des horizontal polarisierten Lichtes senkrecht zur Ebene des linear polarisierten Lichtes

Zur Vermeidung von falsch positiven Aussagen müssen bei einer Abweichung der Totalintensität von mehr als 50 % von der Totalintensität der Positivkontrolle die Werte erneut überprüft werden. Bei Minderung der Totalintensität spricht dies für einen Quenchingeffekt bzw. bei Erhöhung für eine starke Eigenfluoreszenz der Substanz¹¹¹. In

diesen Fällen kann keine Aussage zum Bindungsstatus getroffen werden. Leider hat das zur Folge, dass bindende Substanzen, die mit der Fluoreszenzmessung interferieren als Rezeptorbinder unerkannt bleiben.

Die relative Bindungsaffinität (RBA) berechnet sich aus den Polarisationswerten der bei 100 μM gemessenen Testsubstanzen im Verhältnis zur Positivkontrolle in der Konzentration, bei der eine maximale Verdrängung erreicht wird. Substanzen, die eine größere relative Bindungsaffinität als 50 % aufweisen, werden als Binder eingestuft ¹¹¹.

Quantitative Auswertung der Bindungskurven

Für die Analyse der Daten stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Obwohl für das Verständnis von Bindungsparametern gut geeignet, sind traditionell angewandte Methoden, wie z. B. die Scatchard-Analyse oder die Hill-Analyse, die auf einer Linearisierung der Bindungsdaten beruhen, obsolet ¹¹². Sie führen zu einer schlechten Bewertung der Bindungsparameter ¹¹³. Heutzutage fast ausschließlich genutzt sind gewichtete Verfahren der nichtlinearen Regression, die in kommerziellen Software-Paketen standardmäßig zum Einsatz kommen. Die Daten wurden mit der Software Sigmaplot™ ausgewertet.

Bindende Liganden wurden in 12 Konzentrationen in drei Messungen untersucht und nach grafischer Darstellung durch nichtlineare Regression mit der 4-Parameter-Logistikkurve der IC_{50} -Wert berechnet.

Formel 4: IC_{50} -Berechnung mittels 4-Parameter-Logistikgleichung

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + (x / \text{IC}_{50})^{\text{Hillslope}}}$$

min = minimal erreichbarer Effekt (untere Asymptote der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung)

max = maximal erreichbarer Effekt (obere Asymptote der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung)

Hillslope = Steigungsparameter

IC_{50} = halbmaximale Inhibierungskonzentration

Die Spanne zwischen Positivkontrolle und Negativkontrolle sollte 100 mP betragen. Es wurde die 4-Parameter-Logistikkurve gewählt, da der variable Hillslope (auch Hillkoeffizient genannt) Aufschluß über die Qualität des erhaltenen IC_{50} -Wertes gibt. Die Hill-Analyse ist eine etablierte Methode, um bei Sättigungs- bzw. Verdrängungskurven festzustellen, ob eine kompetitive Bindung vorliegt. Wenn die Bindung kompetitiv und reversibel ist, so liegt der Hillslope bei 1,0. Bei Werten signifikant größer als 1,0 kann das auf eine positive Kooperativität hindeuten, während bei Werten signifikant kleiner als 1,0 entweder eine negative Kooperativität der Bindung oder heterogene Bindungs-

stellen vorliegen. Zusätzlich können Probleme, wie z. B. unzureichende Löslichkeit der Testverbindung, und Bildung von Assayartefakten für eine Abweichung des Hillslopes verantwortlich sein. Da für die Fluoreszenzpolarisationsassays der Kernrezeptoren nur die Ligandenbindungsdomäne verwendet wurde, kommt eine Heterogenität der Bindungsstellen und die Möglichkeit einer kooperativen Bindung nicht in Frage. Somit liefert in unserem Assaysystem der Hillslope einen wichtigen Parameter zur Beurteilung der Güte des erhaltenen IC_{50} -Wertes.

IC_{50} -Wert und K_i -Wert

Der K_i -Wert ist die Konzentration einer Substanz, bei der 50 % der Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors besetzt würde, wenn kein markierter Ligand zugegen wäre, der mit der Substanz um die Bindungsstelle konkurrierte. Die Inhibierungskonstante K_i ist ein Maß für die Bindungsaffinität eines Liganden, während der IC_{50} -Wert die Funktionalität des Liganden beschreibt, einen anderen Liganden kompetitiv zu verdrängen. Der IC_{50} -Wert kann je nach verwendetem markierten Liganden und dessen Konzentration von Assay zu Assay variieren. Der K_i -Wert ist jedoch für einen Liganden ein absoluter Wert, wodurch die Daten unterschiedlicher Quellen vergleichbar werden. Üblicherweise wird die Cheng-Prusoff-Gleichung für die Umrechnung von IC_{50} -Werten in K_i -Werte verwendet¹¹⁴.

Formel 5: K_i -Berechnung nach Cheng-Prusoff

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L_f]}{K_d}}$$

K_i = Inhibitionskonstante

IC_{50} = halbmaximale Inhibierungskonzentration

$[L_f]$ = Konzentration des freien markierten Liganden

K_d = Dissoziationskonstante des markierten Liganden

Laut Nikolovska-Coleska *et al.* ist aber die Cheng-Prusoff-Gleichung für die Umrechnung der IC_{50} -Werte bei fluoreszenzbasierten Assays nicht geeignet, da sie für die Umrechnung in klassischen Enzyminhibitionsstudien entwickelt worden ist¹¹⁵. In klassischen Enzyminhibitionsstudien wie auch bei anderen radioaktiven Messungen ist es möglich, dass die freie und totale Substratkonzentration bzw. die freie und totale Inhibitor-konzentration jeweils identisch sind. Bei Fluoreszenzpolarisationsmessungen ist dies allerdings nicht möglich, da das Messfenster sonst zu klein wäre. Verschiedentlich wurde in der Literatur versucht, dieses Problem der Anwendung der Cheng-Prusoff-Gleichung zu lösen¹¹⁵⁻¹¹⁹. Nikolovska-Coleska *et al.* haben zusätzlich zu ihrem validier-

ten mathematischen Lösungsvorschlag ein Web-basiertes Computerprogramm entwickelt, mit dessen Hilfe man K_i -Werte aus IC_{50} -Werten, die auf der Basis von Fluoreszenzpolarisationsassays bestimmt worden sind, berechnen kann¹²⁰. Die Kalkulation erfolgt nach folgender Formel:

Formel 6: K_i -Berechnung nach Nikolovska-Coleska

$$K_i = \frac{[I]_{50}}{([L]_{50} \div K_d + [P]_0 \div K_d + 1)}$$

K_d = Dissoziationskonstante des markierten-Ligand-Rezeptor-Komplexes

$[P]_0$ = Konzentration des Rezeptorproteins bei 0 % Inhibition

$[I]_{50}$ = Konzentration des freien Inhibitors bei 50 %iger Inhibition (IC_{50})

$[L]_{50}$ = Konzentration des freien markierten Liganden bei 50 %iger Inhibition

Beim Vergleich der Datenauswertung nach Nikolovska-Coleska mit den sonst üblichen Auswertungen nach Kenakin ergaben sich im Bereich der niedrigen nanomolaren Bindungsaffinität Unterschiede zwischen den K_i -Werten. Bei Bindungsaffinitäten im mikromolaren Bereich sind diese erhaltenen Unterschiede allerdings zu vernachlässigen. Vorteilhaft bei der Verwendung des K_i -Calculators nach Nikolovska-Coleska ist eine Plausibilitätsprüfung der gemessenen Daten. Aus Gründen der Einheitlichkeit und zum besseren Vergleich mit den Daten aus der Literatur wurde die Berechnung nach Kenakin gewählt (Formel 7).

Formel 7: K_i -Berechnung nach Kenakin

$$K_i = \frac{IC_{50} \times K_d \times 0,5B}{(L_T \times R_T) + 0,5B \times (-R_T - L_T + 0,5B - K_d)}$$

Mit Hilfe von L_T (Totalkonzentration des markierten Liganden), R_T (Totalkonzentration des Rezeptors), K_d (Dissoziationskonstante des Rezeptor-markierten-Ligand-Komplexes) und B (Menge des vorliegenden Rezeptor-markierten-Ligand-Komplexes) lässt sich die Beziehung zwischen IC_{50} und K_i beschreiben. Da bei der halbmaximalen Konzentration des unmarkierten Liganden B nur noch zur Hälfte vorliegt, muss B bei Verwendung des IC_{50} -Wertes mit 0,5 multipliziert werden. B lässt sich durch folgende Funktion beschreiben:

Formel 8: Berechnung der Konzentration des Komplexes aus markiertem Ligand und Rezeptor nach Kenakin

$$B = \frac{K_d + L_T + R_T - \sqrt{[(K_d + L_T + R_T)^2 - 4 \times R_T \times L_T]}}{2}$$

Die zur K_i -Wert-Berechnung benötigten Parameter und die Herkunft der Rezeptorproteine der jeweiligen Assays sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Assay-Rezeptorproteine, ihre eingesetzten Testkonzentrationen (R_T), Konzentrationen gelabelter Liganden (L_T) und ihre K_d -Werte

<i>Fluoreszenzpolarisationsassay</i>	<i>Rezeptorprotein</i>	<i>Ligand</i>	$[R_T]$	$[L_T]$	K_d
Androgenrezeptor	AR-LBD (His-GST), rekombinant, Ratte	Fluormone™ AL Green	25 nM	1 nM	20 nM
Östrogenrezeptor α	Östrogenrezeptor- α (ER α), rekombinant, human	Fluormone™ ES2	15 nM	1 nM	4 nM
Östrogenrezeptor β	Östrogenrezeptor- β (ER β), rekombinant, human	Fluormone™ ES2	10 nM	1 nM	4 nM
Glukokortikoidrezeptor	Glukokortikoidrezeptor, rekombinant, human	Fluormone™ GS Red	4 nM	1 nM	0,3 nM
Progesteronrezeptor	PR-LBD (GST), human	Fluormone™ PL Red	40 nM	2 nM	10 nM

2.7 Statistik

Die Daten wurden mittels SHAPIRO-WILK-Test ($\alpha = 1 \%$) auf Normalverteilung und auf Gleichheit der Varianzen mittels F-Test ($\alpha = 0,5 \%$) geprüft. Der SHAPIRO-WILK-Test wurde gewählt, da er bei Stichproben $n < 20$ eine bessere Trennschärfe als der Kolmogorov-Smirnov-Test aufweist. Bei Erfüllung der Voraussetzungen konnte zur Unterscheidung von signifikanten Unterschieden zwischen der Kontrollgruppe und der Testgruppe der zweiseitige Lord-Test ($\alpha = 1 \%$) angewandt werden. Bei den Daten des Proliferationsassays ist die zweiseitige Testform geeigneter, da mit diesem Assay bei Zugabe der Testsubstanz sowohl proliferationssteigernde als auch proliferationshemmende Effekte beobachtet werden können. Der Lord-Test ist für den Vergleich zweier unabhängiger normalverteilter kleiner Stichproben geeignet. Voraussetzungen sind, neben der Gleichheit der Varianzen und der annähernden Normalverteilung der Daten, die gleichen Stichprobenumfänge $n_1 = n_2 \leq 20$. In diesem Falle eignet sich der Lord-Test besser als der t-Test, da er nicht die Standardabweichung, die erst bei größeren Stichproben zuverlässig ist, als Fehlermaß verwendet, sondern die Spannweite, d. h. die Differenz zwischen Minimum und Maximum der jeweiligen Messreihe¹²¹.

Bei Nichtvorliegen dieser Voraussetzungen wurde ein nichtparametrischer Test, der U-Test (Mann-Whitney-Test), angewandt. Voraussetzungen für die Anwendung dieses Tests sind das Vorliegen gleicher Verteilungsformen der Daten und nicht zu unterschiedliche Probenumfänge¹²¹.

Die statistischen Tests wurden mit der STAtEasy Software durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 *In silico* Screening und Testsubstanzen

Das *in silico* Screening wurde von Frau Stephanie Tennstedt im Rahmen ihrer Promotion durchgeführt¹²².

In silico Screening

Ziel dieses *in silico* Screenings ist die Durchmusterung von Struktur-Datenbanken am Computer zur Auffindung von potentiellen Liganden des Androgenrezeptors. Die IPB-Substanz-Datenbank enthält ca. 5.000 synthetische und natürlich vorkommende Strukturen. Diese wurden in eine Konformationsdatenbank umgewandelt. Zusammen mit der MOE-Datenbank (enthält Verbindungen von 19 verschiedenen Anbietern) bildete sie die Grundlage für das virtuelle Screening. Insgesamt enthalten die Datenbanken mehr als 930.000 Strukturen, die mehr als 57 Millionen Konformationen entsprechen.

Pharmakophorsuche

Das virtuelle Screening erfolgte in zwei Schritten. Der erste Schritt stellt eine Pharmakophorsuche dar. Das Pharmakophormodell wurde auf der Basis der 3D-Struktur der Ligandenbindungstasche des Androgenrezeptors (PDB-Code: 1E3G) erzeugt. Mit Hilfe eines Simulated Annealings wurden die hydrophoben, aromatischen, Donor- und Akzeptorbereiche möglicher Liganden innerhalb der Ligandenbindungstasche identifiziert. Die Ergebnisse wurden mit bekannten Strukturaktivitätsbeziehungen zwischen dem Androgenrezeptor und verschiedenen steroidal und nicht steroidal Liganden abgeglichen. Es ergab sich ein Vier-Punkt-Pharmakophor, mit zwei Donor/Akzeptor-Bereichen, einem hydrophob/aromatischen Bereich und einem hydrophob/aromatischen-Akzeptor-Bereich. Mit diesem Pharmakophor konnte die 3D-Datenbank von insgesamt mehr als 57 Millionen Konformationen auf 39.000 Strukturen, die potentiell am Androgenrezeptor binden können, reduziert werden.

Docking und Scoring

Der zweite Schritt bestand in der Bewertung der Strukturen/Verbindungen hinsichtlich ihrer Affinität zur Ligandenbindungstasche des Androgenrezeptors. Dazu wurden die Strukturen in die Ligandenbindungstasche des Androgenrezeptors gedockt. Mit Hilfe des Dockings werden Ligand-Rezeptor-Komplexe erzeugt, die durch eine Scoringfunktion hinsichtlich ihrer Affinität bewertet werden. Nachdem PLANTS1.1 mit *chemclash* als geeignetes Docking/Scoring Programm identifiziert wurde, konnten im Anschluss an die Pharmakophorsuche die 39.000 Strukturen hinsichtlich ihrer Aktivität zum Androgenrezeptor bewertet werden. 390 Strukturen wurden zur Testung vorgeschlagen, wovon 147 Substanzen im Zellproliferationsassay getestet worden sind.

3.2 Testextrakte und Testfraktionen

3.2.1 Auswahl des Extraktionsverfahrens

Die Wahl des Extraktionsverfahrens richtete sich vordergründig danach, dass die Extraktion möglichst unter standardisierten Bedingungen, erschöpfend und zeitsparend durchgeführt werden sollte. Um standardisierte Extrakte zu erhalten, bietet sich die beschleunigte Flüssigextraktion mit dem automatischen Extraktor Dionex ASE 200® an. Hinsichtlich einer erschöpfenden, aber trotzdem zeitsparenden Extraktion wurden die Extraktionsparameter, wie in Kapitel 2.1.1 aufgeführt, optimiert. Da für eine Testung der Extrakte in einem hormonalen Zellassay die Gruppe der Phytosterole von besonderem Interesse ist, wurde bezüglich der Wahl des Lösungsmittels und der weiteren Fraktionierung die bestmögliche Konzentrierung dieser Stoffgruppe in einer Fraktion angestrebt.

Wahl des Lösungsmittels

Um eine Anreicherung von Phytosterolen und eine mögliche Trennung von der Gruppe der mittelpolaren Substanzen zu erreichen, wurde in einem Versuch 1,2 % Stigmasterol (**56**) während der Extraktion zu einem Probenpflanzenmaterial zugesetzt. Der anschließende nasschemische Nachweis von Stigmasterol (**56**) mittels Liebermann-Burchard-Reaktion im Extrakt zeigte, dass die Verwendung eines lipophilen Lösungsmittels als Extraktionsmittel eine sehr gute Anreicherung von Phytosterolen mit sich bringt (Tab. 12). Eine darauffolgende Extraktion mit einem zweiten hydrophileren Extraktionsmittel ermöglicht eine ausreichende Trennung der mittelpolaren Substanzen vom Hauptteil der Phytosterole. Um die Probenmenge und damit den Zeitaufwand für Extraktion, Fraktionierung und Testung so gering wie möglich zu halten, wurde die Extraktion in zwei und nicht in drei Schritten gewählt.

Tabelle 12: Anreicherung von Phytosterolen in Lösungsmittelkombinationen

<i>Extraktion</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Liebermann-Burchard-Reaktion auf Stigmasterol (56)</i>
1.	Tert-Butyl-Methylether	++++
	Methanol/Aceton (1 : 4)	+
	Methanol	negativ
2.	Methanol/Aceton (1 : 4)	+++
	Methanol	+

3.2.2 Auswahl des Fraktionierungsschrittes

Das Verfahren der Gradientenextrographie zeichnet sich durch eine schnelle, unkomplizierte und preiswerte Vorgehensweise aus. Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, kann so durch das Aufziehen der Extrakte auf eine modifizierte Diatomeenerde (Isolute HM-N) und Elution mit Lösungsmitteln steigender Polarität eine grobe Unterteilung in Gruppen unterschiedlicher Polarität erfolgen. Die Methode wurde hinsichtlich der ausreichenden Trennung der Phytosterole von den anderen Substanzen überprüft. Dazu wurde *Carthamus tinctorius* nach oben angegebenem Verfahren mit dem Dionex ASE 200® automatisch extrahiert und der lipophile MTBE/EtOH-Extrakt nach dem Aufziehen auf Diatomeenerde mit *n*-Hexan, Ethylacetat, Aceton, Methanol und Aceton/HCl eluiert. Im Dünnschichtchromatogramm in Abbildung 18 (DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254, LM: CHCl₃/Aceton 9 : 1, Detektion: Vanillin/H₂SO₄) ist zu erkennen, dass sich die Phytosterole in der Hexanfraktion angereichert haben.

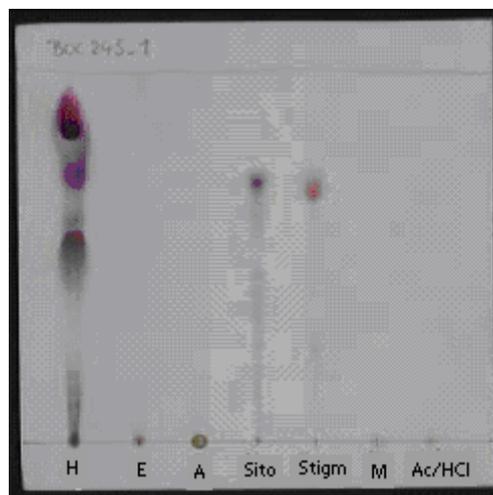


Abbildung 18: Dünnschichtchromatogramm der *n*-Hexan- (H), Ethylacetat- (E), Aceton- (A), Methanol- (M) und Aceton/HCl- (Ac/HCl) Fraktion des lipophilen *Carthamus tinctorius*-Extraktes im Vergleich zu β -Sitosterol (Sito) (57) und Stigmasterol (Stigm) (56)

3.2.3 Extraktionsschema

Daraus ergibt sich folgendes Extraktionsschema, welches für eine Extraktion unterschiedlichsten Pflanzen- bzw. Pilzmaterialies gleichermaßen geeignet ist (Abb. 19).

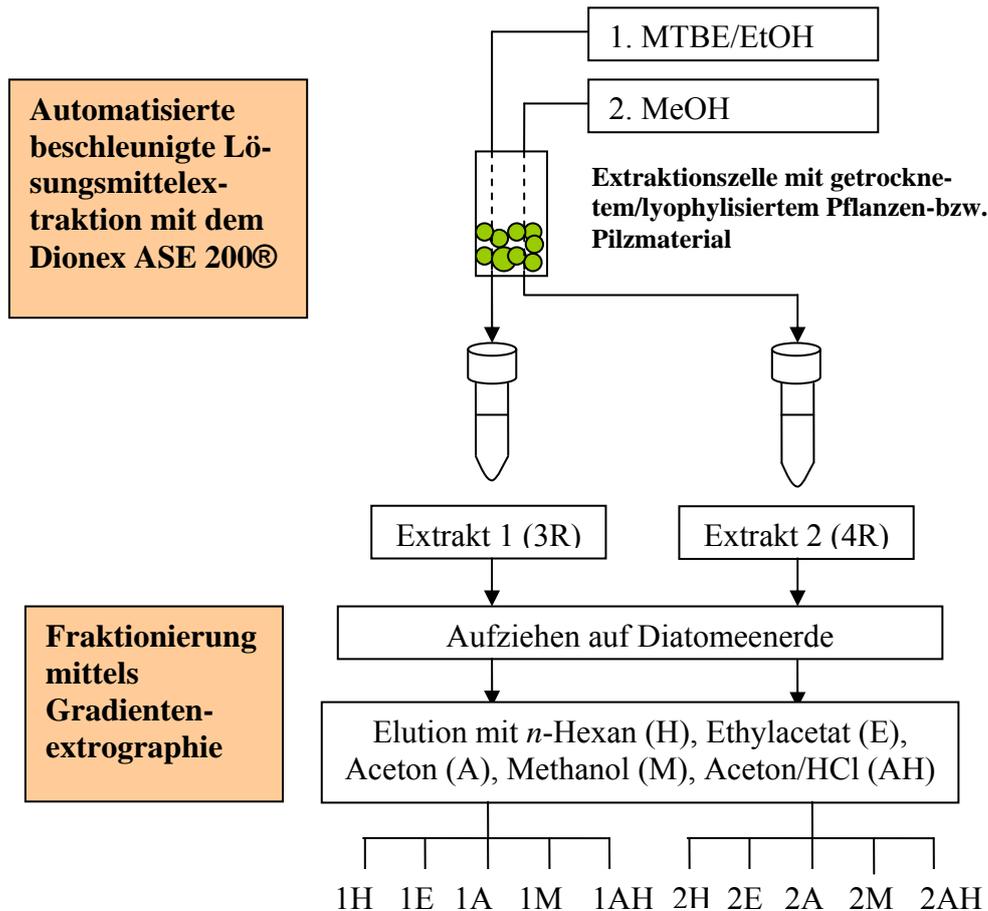


Abbildung 19: Extraktions- und Fraktionierungsrouten

3.2.4 Präparierte Extrakte und Fraktionen

Es wurden 19 Pflanzenarten (Tab. 13) und 2 Pilzarten (Tab. 14) wie oben beschrieben extrahiert. Extrakte von Kooperationspartnern (Tab. 7) wurden durch Gradientenextrographie fraktioniert.

Diese 175 Fraktionen und die 7 Fraktionen von Extrakten von Kooperationspartnern wurden der Testung am Zellproliferationsassay unterzogen.

Tabelle 13: Extrahierte Pflanzen und ihre Extraktausbeuten

<i>Art</i>	<i>Pflanzenteil</i>	<i>Probe</i>	<i>Ausbeute (%)*</i>
<i>Artemisia afra</i>	Kraut	BOC377 ARA	6,87
<i>Carthamus tinctorius</i>	Blüten	BOC245, BOC249	2,44
<i>Cibotium barometz</i>	Rhizom	BOC360 CBA	3,44
<i>Cibotium barometz</i>	Rhizom	BOC270 CBA	1,47
<i>Cibotium regale</i>	Rhizom	BOC379 CIR	3,57
<i>Cibotium schiedei</i>	Rhizom	BOC379 CIS	4,13
<i>Cyrtomium falcatum</i>	Blätter	BOC269 CFA	1,95
<i>Excoecaria bussei</i>	Rinde	BOC371 EXB BOC373 EXB	4,27
<i>Heteropterys chrysophylla</i>	Blätter	BOC267 HCH	3,48
<i>Microglossa pyrifolia</i>	Kraut	BOC375 MIP	4,35
<i>Monanthes buchananii</i>	Blätter	BOC375 MOB	4,36
<i>Nephrolepis exaltata</i>	Blätter	BOC263 NEX	5,05
<i>Ozoroa insignis</i>	Blätter	BOC374 OZI	7,68
<i>Polygonum multiflorum</i>	Wurzel	BOC268 PMU	0,87
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Wurzel	BOC251 SMI	2,44
<i>Suregada zanzibariensis</i>	Blätter	BOC374 SUZ	8,30
<i>Teclea nobilis</i>	Blätter	BOC377 TEN	6,02
<i>Trichilia emetica</i>	Blätter	BOC378 TRE	4,02
<i>Trimeria grandifolia</i>	Blätter	BOC370 TRG	6,09
<i>Turraea cornucopia</i>	Blätter	BOC371 TUC BOC373 TUC	5,70

*Trockenmasse beider nachfolgender Extraktionen bezogen auf das Gewicht des getrockneten Pflanzenmaterials

Tabelle 14: Extrahierte Pilze und ihre Extraktausbeuten

<i>Art</i>	<i>Extrahierter Teil</i>	<i>Probe</i>	<i>Ausbeute (%)*</i>
<i>Cortinarius brunneus</i>	Fruchtkörper	BOC275 CBR	3,33
<i>Cortinarius speciosissimus</i>	Fruchtkörper	BOC274 CSP	4,91

*Trockenmasse beider nachfolgender Extraktionen bezogen auf das Gewicht des lyophilisierten Pilzmaterials

3.3 Zellproliferationsassay

3.3.1 Etablierung und Validierung des Zellproliferationsassays

Die Einflüsse von hormonell wirksamen Substanzen auf das Wachstum von Prostatakrebszellen sind abhängig von den verwendeten Konzentrationen und den Kulturbedingungen. So gibt es große Variationen in den Proliferationsdaten, je nach verwendetem Medium, der Inkubationsdauer, der Konzentration der Androgene oder dem Alter der Zellkultur. Carruba *et al.* haben für R1881 (**9**) und DHT (**1**) LNCaP-Proliferationsdaten verschiedener Quellen und deren Inkubationsbedingungen verglichen¹²³. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Vergleich von Zellproliferationsdaten unterschiedlicher Quellen nur in den seltenen Fällen möglich ist, bei denen gleiche Kulturbedingungen Anwendung gefunden haben.

Die Assaybedingungen wurden hinsichtlich eines maximalen Ansprechens der LNCaP-Zellen auf Androgene bzw. der Suppression der durch Androgene vermittelten LNCaP-Zellproliferation von Antiandrogenen optimiert. Als normale Kulturbedingung wird ein Wachstum in Medium mit 10 % FKS bezeichnet. Um das prinzipiell langsame Wachstum der LNCaP-Zellen zu verbessern und die Clusterbildung von LNCaP-Zellen zu vermeiden, wurden die Versuche in CellBIND-Surface-Platten von Corning durchgeführt. Die spezielle CellBIND Oberfläche entsteht durch Behandlung mit einem durch Mikrowellenstrahlung erzeugten Plasmastrom. Dadurch wird mehr Sauerstoff in die Polymeroberfläche inkorporiert, so dass sich Zellen besser anheften können und das Wachstum verbessert wird¹²⁴.

3.3.1.1 Ernährungseffekte

Speziellmedien wie Aktivkohle-Dextran-behandeltes FKS, hitzeinaktiviertes FKS, Wachstumsfaktor-inaktiviertes FKS und dialysiertes hitzeinaktiviertes ADFKS lieferten bei Carruba *et al.* bei gleicher Substanzkonzentration und Inkubationsdauer verschiedene Zellproliferationsdaten¹²³. ADFKS ist kommerziell verfügbar und wird in letzter Zeit routinemäßig für Untersuchungen von Steroideinflüssen bzw. Einflüssen von Wachstumshormonen auf das Zellwachstum verwendet.

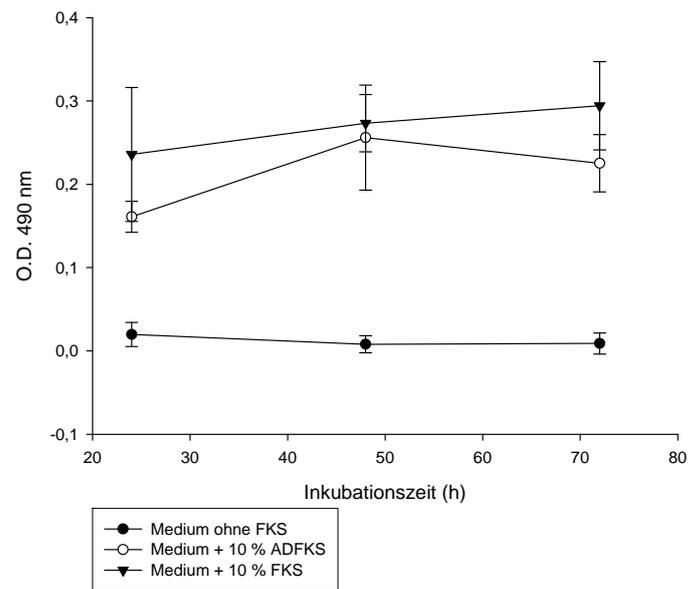


Abbildung 20: Einfluss des Mediums auf das Wachstum der LNCaP-Zellen (8×10^3 Zellen/100 μ l)

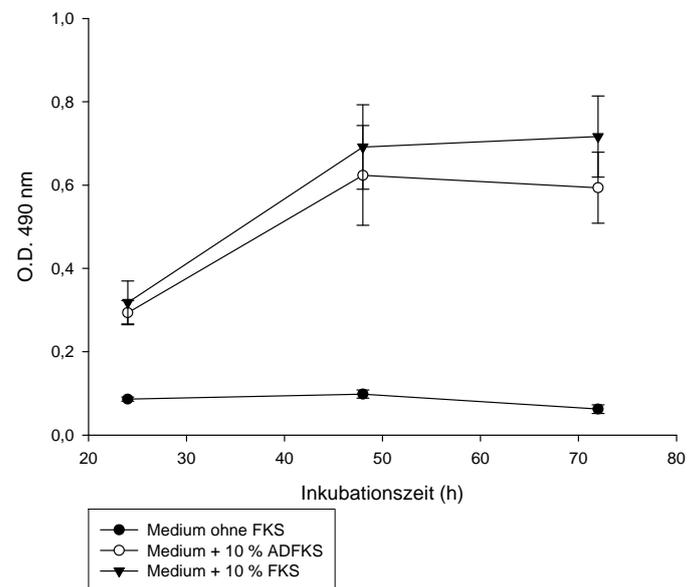


Abbildung 21: Einfluss des Mediums auf das Wachstum der PC-3-Zellen ($0,5 \times 10^3$ Zellen/100 μ l)

In Abbildung 20 ist sichtbar, dass sich LNCaP-Zellen nach 24 stündiger Vorinkubation in dem jeweiligen Medium in ihrem Wachstumsverhalten unterscheiden. Zellen, die serumfrei kultiviert werden, vermehren sich nicht in der Mikrotiterplatte. Ein entsprechendes Verhalten ist auch bei PC-3-Zellen in Abbildung 21 zu beobachten. Wie zu

erwarten ist, vermehren sich sowohl LNCaP- als auch PC-3-Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen in einem Medium mit 10 % FKS am besten, wobei der Wachstumsunterschied zu Zellen, die mit ADFKS-Medium kultiviert wurden nicht statistisch signifikant ist. Generell zeigen die PC-3-Zellen eine raschere Vermehrung als LNCaP-Zellen, was auch mit der unter normalen Kulturbedingungen veröffentlichten Verdopplungszeit von 60 h für LNCaP-Zellen und 50 h für PC-3-Zellen übereinstimmt¹²⁵.

Um durch die Kultivierung unter Normalbedingungen vorhandene Steroide und Wachstumsfaktoren auszuwaschen und die Ansprechbarkeit gegenüber hormonell wirksamen Substanzen zu erhöhen, kann man eine serumfreie Vorinkubation durchführen. Die Dauer einer Vorinkubation ist zwischen 24 h und 7 d möglich. Hier hat sich die beste Ansprechbarkeit bei einer serumfreien Vorinkubation von 7 d gezeigt. Bestätigt hat sich dieses Ergebnis durch die Untersuchung von drei aufeinanderfolgenden Passagen von LNCaP-Zellen, die entweder für 7 d serumfrei inkubiert oder unter Normalbedingungen kultiviert wurden (Abb. 22). In den jeweiligen Passagen wurde mittels Real-Time-PCR der Androgenrezeptor-mRNA-Gehalt quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung der relativen Genexpression, wobei die Expression der 19. Passage mit Serum gleich eins gesetzt wurde. Unter Normalbedingungen nimmt der Androgenrezeptor-mRNA-Gehalt ab, während er mit der serumfreien Vorinkubation konstant hoch bleibt. Offenbar kompensieren die Zellen die Auswirkungen von Hungerbedingungen durch eine Hochregulation des Androgenrezeptors. Unter normalen Kulturbedingungen, wobei auch Steroide und Wachstumsfaktoren vorkommen, zeigten die Zellen mikroskopisch eine intakte Zellstruktur und soweit für LNCaP-Zellen typisch, gleichmäßiges Wachstum (Abb. 23b)). Sie reagieren unter Ernährungsbedingungen im Überfluß mit einer Herunterregulation des Androgenrezeptors. Wie im Kapitel 3.5 näher erläutert, wird der AR androgenabhängig reguliert. Durch Agonisten des Androgenrezeptors erfolgt eine Herunterregulation des AR-mRNA-Gehaltes. Der Einfluss von Zellkulturbedingungen auf das Wachstum und den Gehalt an Androgenrezeptorprotein der LNCaP-Zellen wird auch von Langelier *et al.* beschrieben¹²⁶. Der Androgenrezeptorgehalt sinkt durch Kultivierung mit dem Androgen R1881 (**9**) bzw. mit dem Wachstumsfaktor EGF im Vergleich zum Normalmedium, wobei die Reduktion durch zusätzliche Gabe von EGF stärker ausfällt.

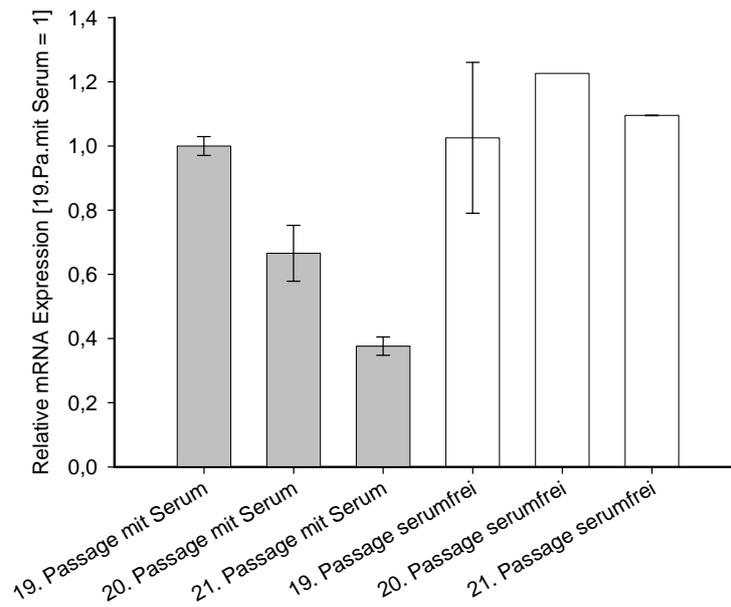


Abbildung 22: Einfluss der Ernährung auf Androgenrezeptor mRNA-Expression in LNCaP-Zellen

Einmal dem Stress der serumfreien Inkubation ausgesetzte Zellen, die nicht im jeweiligen Assay verbraucht wurden, wurden verworfen, da extreme Kulturbedingungen zu einem veränderten Verhalten von LNCaP-Zellen gegenüber Androgenen führen können. Dies ist auf eine veränderte Expression des Androgenrezeptors zurückzuführen. So wurden zum Beispiel die androgenunabhängige Subzelllinie LNCaP-r¹²⁷ und die hypersensitiven Subzelllinien LNCaP-ss¹²⁸ und LNCaP-abl¹²⁹ durch veränderte Kulturbedingungen gewonnen. Härkönen *et al.* entwickelte ein Zellmodell zur Untersuchung des progressiven Prostatakarzinoms, indem er LNCaP-Zellen über längeren Zeitraum bis zur Ablösung der Zellen in Normalmedium kultivierte, die er dann als Suspensionskultur fortführte¹³⁰. Die Zellen entwickelten sich unter diesen Bedingungen zu neuroendokrinen-ähnlichen Zellen, die später wiederum zu androgenunabhängig wachsenden, schnell proliferierenden und kleinen Zellen mit rundlicher Form transformierten. Diese Zellen verloren während des Transformationsprozesses ihre Fähigkeit detektierbare Mengen an AR und PSA zu produzieren¹³⁰.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden sowohl LNCaP- als auch PC-3-Zellen 7 d serumfrei vorinkubiert. Interessant ist die Veränderung der Morphologie der Zellen, was sich im mikroskopischen Bild widerspiegelt. Die Zellen zeigen unter serumfreien Bedingungen eine länglichere Zellform, wobei besonders bei den LNCaP-Zellen sehr gut sichtbar ist, dass die Zellenden lang und spitz auslaufen (Abb. 23a)24a)). Das Wachstum der LNCaP-Zellen kam unter serumfreien Bedingungen zum Erliegen (Abb. 23). Bei den PC-3-Zellen war im Gegensatz zum Wachstum in der Mikrotiterplatte in den Zellkulturflaschen keine Beeinträchtigung des Zellwachstums unter serumfreien Bedingungen zu beobachten. Bei Vorhandensein einer gewissen Zelldichte scheint für einen Zeitraum von 7 Tagen eine Hungersituation keinen Einfluss auf die Zellproliferation zu

haben (Abb. 24). Die serumfreie Vorinkubation wurde bei einer Konfluenz von 70 % begonnen. Die PC-3-Zellen wuchsen während der serumfreien Zeit in der Flasche bis zu einer Konfluenz von 90-100 % heran. Einige Zellen begannen sich dann abzulösen (Abb. 24a)).

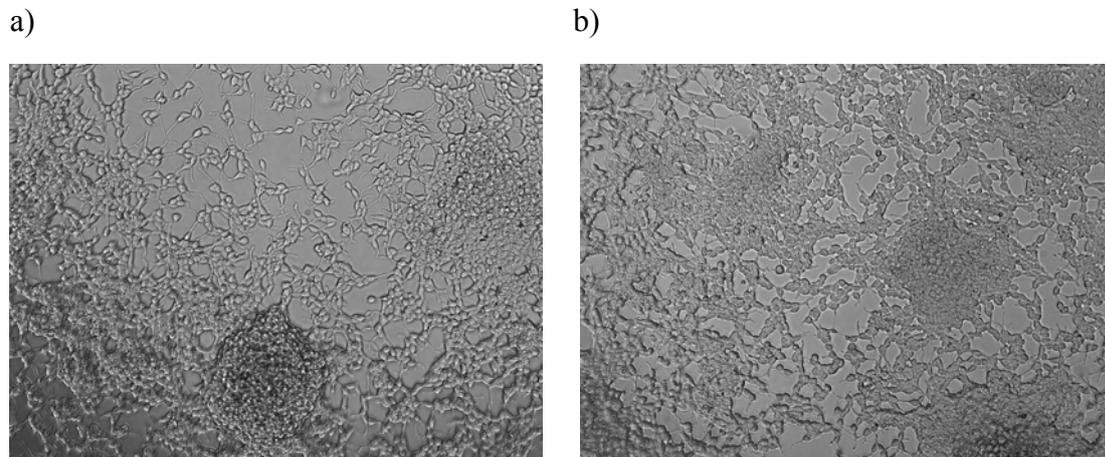


Abbildung 23: LNCaP-Zellen, 23. Passage, a) 7d serumfrei b) mit Serum

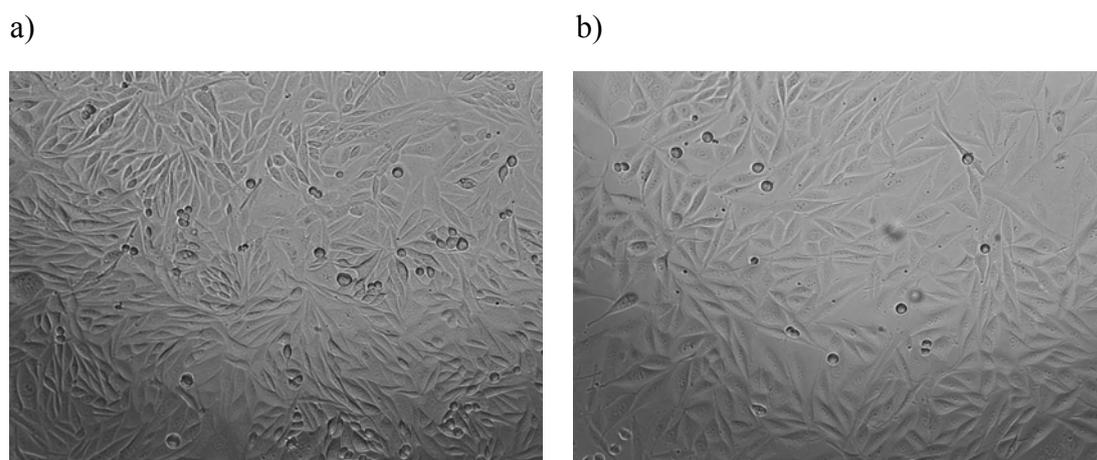


Abbildung 24: PC-3-Zellen, 21. Passage, a) 7d serumfrei b) mit Serum

Die Ansprechbarkeit der LNCaP-Zellen gegenüber hormonell wirksamen Substanzen konnte durch den Ernährungsstress mittels siebentägiger Vorinkubation verbessert und somit das Detektionsfenster des Proliferationsassays vergrößert werden. Die PC-3-Zellen zeigten unter der serumfreien Inkubation eine nur geringfügig veränderte Morphologie und kein verändertes Wachstumsverhalten während dieses Zeitraumes.

3.3.1.2 Wachstum in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Zellzahl

Da der Androgenrezeptor ein Transkriptionsfaktor ist, dessen Aktivierung die Regulation bestimmter Proteine und Wachstumsfaktoren beeinflusst, benötigt die Proliferation als Antwort auf seine Aktivierung Zeit. Eine Inkubation der LNCaP-Zellen mit DHT (1) über einen Zeitraum von drei Tagen erzielte keinen sichtbaren Effekt hinsichtlich eines

gesteigerten Wachstums (Abb. 25). Eine Ausweitung der Inkubationszeit auf 5 Tage und die Verlängerung der Vorinkubationszeit auf 7 Tage führten zu einem deutlichen Einfluss von DHT (**1**) auf das Wachstum der LNCaP-Zellen (Abb. 29; Kap. 3.3.1.3).

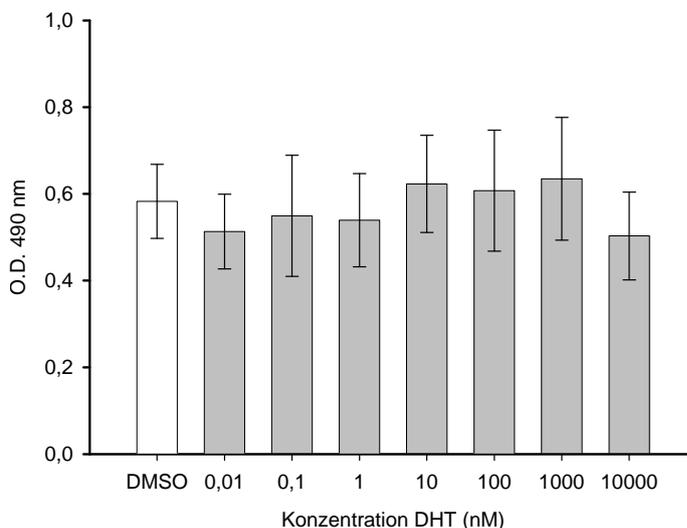


Abbildung 25: Einfluss von DHT (**1**) auf das LNCaP-Zellwachstum nach 3 Tagen Inkubationszeit

Die Detektion der Proliferation mit Bromdesoxyuridin hat den Vorteil, dass nur neu synthetisierte DNA in proliferierenden Zellen nachgewiesen wird. Die Zellproliferation konnte aber aufgrund der schlechten Wachstumseigenschaften und der Clusterbildung der LNCaP-Zellen nicht mit dem Bromdesoxyuridin-Assay nachgewiesen werden, da durch die verschiedenen Waschschrte ein unkontrollierbarer Verlust von LNCaP-Zellen stattfand. Die Verwendung von XTT (siehe Kapitel 2.3.3) ist schnell und unkompliziert durchzuführen, bedingt aber eine mikroskopische Analyse der so detektierten Zellen, da XTT von reduzierenden Substanzen ebenfalls reduziert werden kann und dadurch verfälschte Ergebnisse erhalten werden. Beachtet man diese Limitierung und interpretiert erhaltene Daten mit Sorgfalt, so ist XTT dennoch ein nützliches Detektionsmittel¹³¹. Die mit XTT photometrisch erhaltenen Daten dürfen allerdings die Absorptionswerte von 1,0 nicht überschreiten, da das Lambert-Beersche-Gesetz nur für verdünnte Lösungen seine Gültigkeit hat. Um die höchste Messgenauigkeit zu erreichen, sollte die Konzentration bzw. Schichtdicke so gewählt werden, dass die Messwerte für die Absorption zwischen 0,25 und 0,75 liegen¹³². Deshalb wurden für die gewählte Inkubationszeit von insgesamt 6 Tagen die für die photometrische Bestimmung optimale Zellzahl bestimmt (Abb. 26, Abb. 27). Dafür wurden pro Zelllinie drei Zelldichten ausgewählt, die aufgrund der vorherigen Beobachtungen bezüglich des Wachstumsverhaltens als günstig erschienen. Die Zellen wurden wie in einem Assay behandelt, d.h. 7 Tage serumfreie Vorinkubation in der Zellkulturflasche, Aussäen in ADFKS-Medium von 100 µl/Kavität, nach 24 h Zugabe von weiteren 100 µl ADFKS-Medium und Inkubation von 5 Tagen. Für die LNCaP-Zellen erwies sich die Konzentration von 8×10^3 Zellen/100 µl Medium als günstig (Abb. 26), da die durch proliferationssteigernde Sub-

stanzen bedingte Zunahme der Zellzahl mit berücksichtigt werden muss. Für die PC-3-Zellen wurde die Zelldichte von $0,5 \times 10^3$ Zellen/100 μl gewählt (Abb. 27).

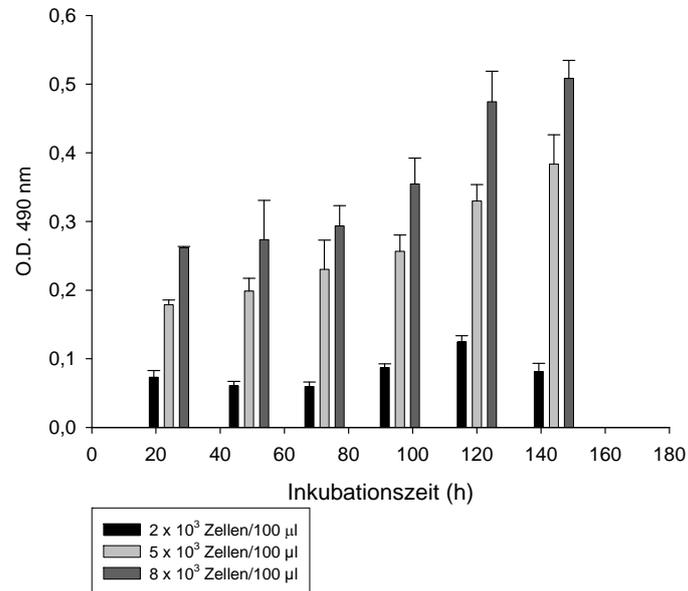


Abbildung 26: LNCaP-Wachstum in ADFKS-Medium in Abhängigkeit von Zellzahl und Inkubationszeit

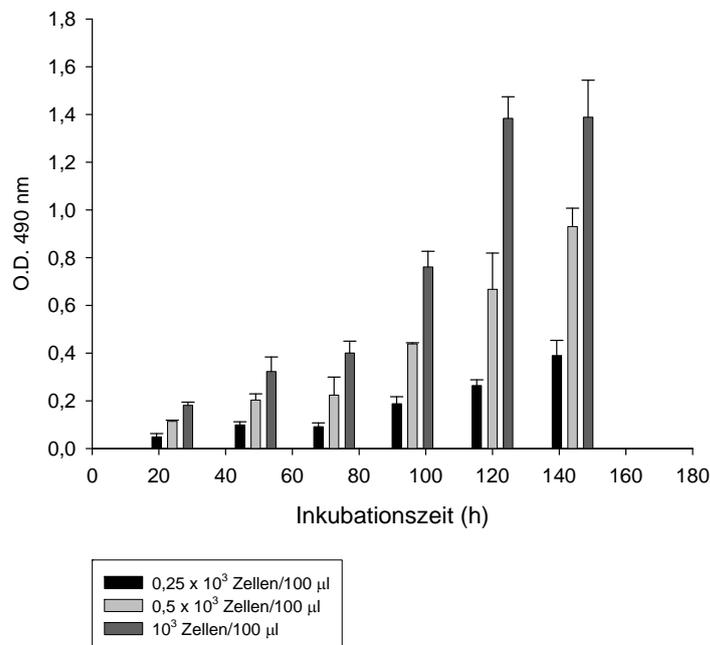


Abbildung 27: PC-3-Wachstum in ADFKS-Medium in Abhängigkeit von Zellzahl und Inkubationszeit

Ein zusätzlicher Aspekt ist der Einfluss der Zellzahl auf die Ansprechbarkeit der Zellen gegenüber Hormonen und auf das generelle Wachstum der Zellen. Kaighn *et al.* berichten über eine Veränderung der Wachstumsrate von PC-3-Zellen in Abhängigkeit von Zelldichte und Zellkulturmedium¹³³. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass PC-3-Zellen keine Hormone wie Insulin oder Steroidhormone zum Überleben und Wachsen benötigen, aber ein Ansprechen auf Hormone, insbesondere Insulin, in Abhängigkeit von Zelldichte und Zellkulturmedium zu beobachten ist. Aus diesem Grund sollten die Begriffe Hormonabhängigkeit und Ansprechen auf Hormonbehandlung separat behandelt werden, zumal jedes Konzept nur in dem Kontext von streng definierten Zellkulturparametern gültig ist.

3.3.1.3 Einfluss von Androgenen auf das Zellwachstum

Der Einfluss gängiger Androgene, wie Testosteron (**2**), Dihydrotestosteron (**1**) und R1881 (**9**) auf das Wachstum der LNCaP- und PC-3-Zellen unter Assaybedingungen wurde überprüft.

Dihydrotestosteron

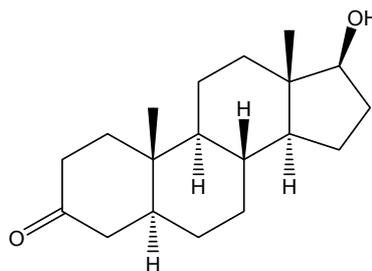


Abbildung 28: Dihydrotestosteron (**1**)

Für die LNCaP-Zellen wird ein biphasisches Verhalten gegenüber Androgenen in ADFKS-Medium beschrieben¹³⁴ und unter diesen Kulturbedingungen für DHT (**1**, Abb. 28) ein maximales Ansprechen im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-9} - 10^{-8} M nachgewiesen¹³⁵. Das ausgeprägte biphasische Verhalten mit einem Abflachen der Proliferation schon kurz nach dem Erreichen des Maximums, also für DHT (**1**) bei Konzentrationen zwischen 20 und 100 nM, konnte allerdings für keine agonistische Substanz bestätigt werden. Lediglich bei Konzentrationen ab 10 μ M konnte eine Verminderung der Zellzahl auf Kontrollniveau beobachtet werden. Die maximale Proliferation wurde für DHT (**1**) ab einer Konzentration von 10 nM erreicht (Abb. 29). Für DHT (**1**) ergab sich unter Assaybedingungen ein EC_{50} -Wert von 0,71 nM (Tab. 15). Das Fehlen des biphasischen Effektes von Androgenen auf das Wachstum von LNCaP-Zellen ist auf die veränderten Kulturbedingungen, wie Vorinkubation in serumfreien Medium und anschließende Kultivierung in ADFKS-Medium zurückzuführen. Langelier *et al.* haben einen reversiblen Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die Ansprechbarkeit von LNCaP-Zellen gegenüber Androgenen festgestellt¹²⁶. So konnte ein biphasisches Ver-

halten nur unter Normalbedingungen detektiert werden. Allerdings wurden ADFKS-Bedingungen nicht untersucht.

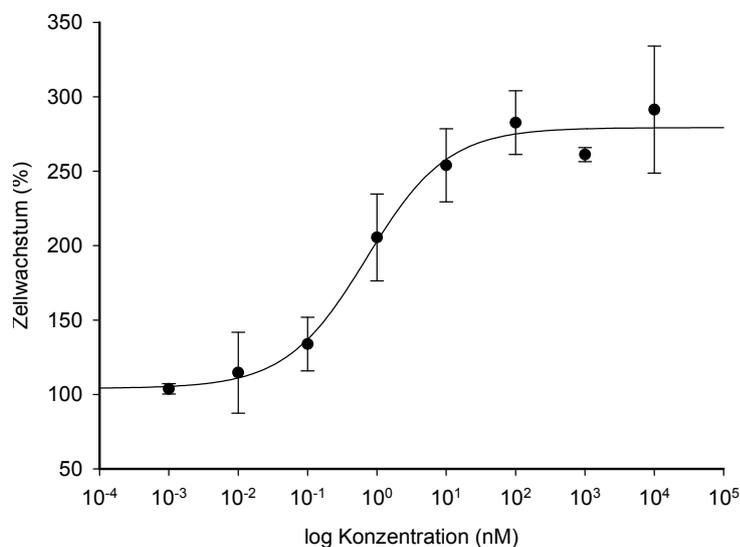


Abbildung 29: Dihydrotestosteron-Einfluss (1) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen

Testosteron

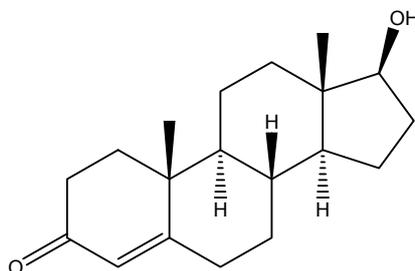


Abbildung 30: Testosteron (2)

Für Testosteron (2, Abb. 30) wurde unter Inkubationsbedingungen vergleichbar mit den Assaybedingungen eine geringe Metabolisierungsrate von 3 % beschrieben¹²⁷. Bei Belanger *et al.* wurde eine sehr starke acht- bis neunfache Proliferationssteigerung für die Androgene Testosteron (2) und DHT (1) beschrieben, die in unserem Labor in dem Ausmaß nicht reproduziert werden konnte, was eventuell auf die veränderten Kulturbedingungen zurückzuführen ist¹³⁴. Für Testosteron (2) wurde eine maximale 2,3fache Proliferationssteigerung ab einer Konzentration von 10 nM festgestellt (Abb. 31). Die halbmaximale Konzentration liegt bei 1,3 nM (Tab. 15).

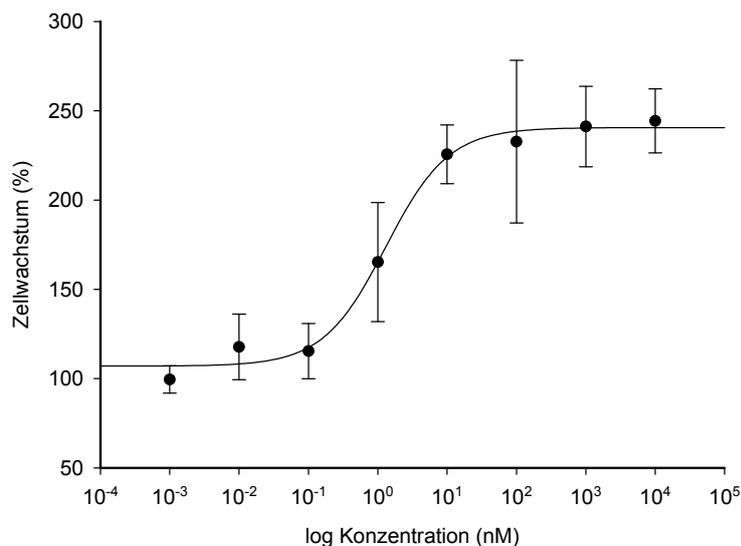


Abbildung 31: Testosteron-Einfluss auf das Wachstum der LNCaP-Zellen

Methyltrienolon

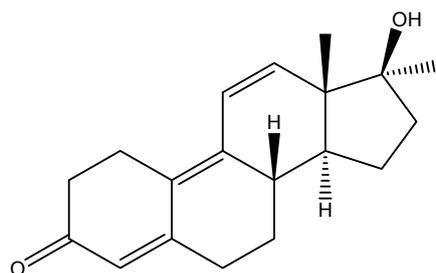


Abbildung 32: Methyltrienolon (R1881) (9)

Das synthetische Androgen Methyltrienolon (R1881) (9, Abb. 32) ist nicht aromatisierbar und wird deshalb üblicherweise in Zellassays zur Untersuchung androgenabhängiger Prozesse eingesetzt, konnte aber 2007 aufgrund von Beschaffungsproblemen (gelistet auf der Welt-Antidopingliste) nur in geringen Mengen erhalten und somit nicht für alle Messungen als Standard verwendet werden⁶⁹.

Die bei Schuurmans *et al.* beschriebene dreifache Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen durch R1881 (9) bei einer Inkubationszeit von 6 Tagen konnte reproduziert werden¹³⁶ (Abb. 33). Im Gegensatz zu der bei Schuurmans *et al.* publizierten Angabe einer maximalen Proliferationssteigerung bei einer Konzentration von 0,1 nM¹³⁷, wurden unter Assaybedingungen maximale Proliferationswerte ab einer Konzentration von 1 nM festgestellt. Der ermittelte EC₅₀-Wert beträgt 0,04 nM (Tab. 15).

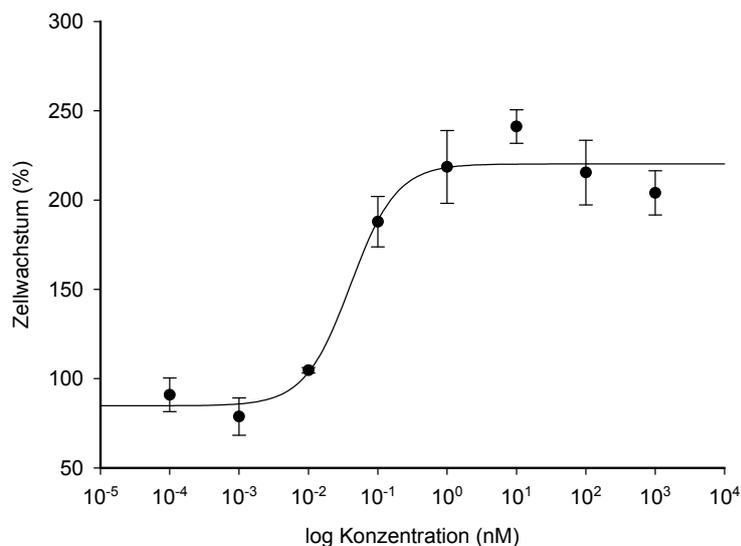


Abbildung 33: R1881-Einfluss (**9**) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen

3.3.1.4 Einfluss von antiandrogen wirksamen Substanzen auf die Zellproliferation

Bicalutamid

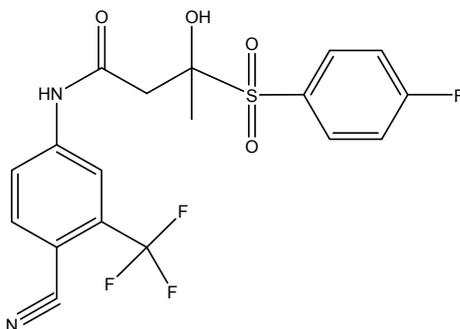


Abbildung 34: racemisches Bicalutamid (**30**)

In Studien wie bei Fujii *et al.* wurde bei einer Bicalutamid-Konzentration von 5 μM kein Effekt auf das Wachstum von LNCaP-Zellen festgestellt¹³⁸. Wichtig ist bei einem Vergleich der Literaturdaten, ob enantiomerenreines oder racemisches Bicalutamid (**30**, Abb. 34) verwendet wurde. Bicalutamid (**30**) liegt in Casodex® als Racemat vor, wobei die antiandrogene Wirksamkeit fast ausschließlich auf das R-Enantiomer zurückzuführen ist. Das S-Enantiomer wird zudem schneller ausgeschieden¹³⁹. Bicalutamid (**30**) wurde in dem Assay als Racemat verwendet. Unter Assaybedingungen konnte weder ein Einfluss auf das Wachstum der LNCaP- (Abb. 35), noch auf das Wachstum der PC-3-Zellen festgestellt werden.

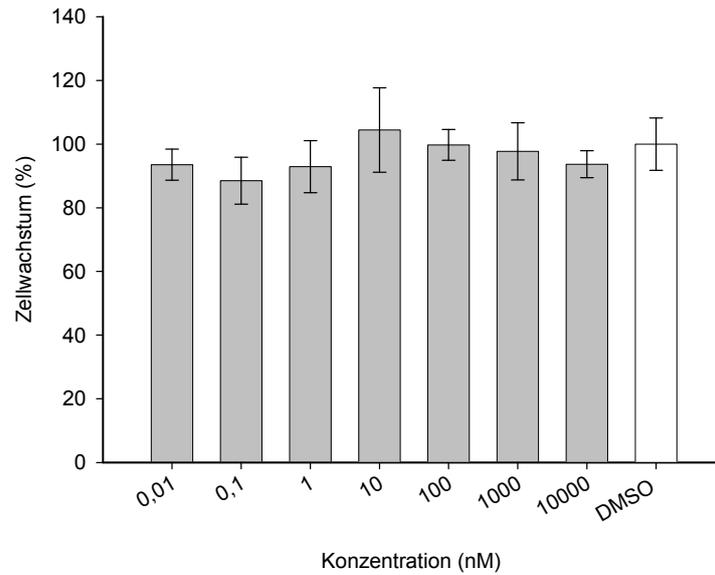
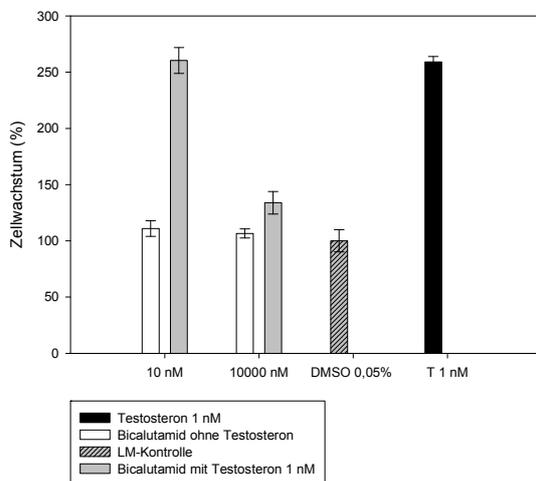


Abbildung 35: Bicalutamid-Einfluss (30) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen

Durch Testosteron (2) in ihrem Wachstum stimulierte LNCaP-Zellen konnten in ihrem Wachstum durch hohe Konzentrationen an Bicalutamid (30) gehemmt werden, wobei dieser Effekt bei den PC-3-Zellen wie erwartet nicht zu beobachten war (Abb. 36).

a)



b)

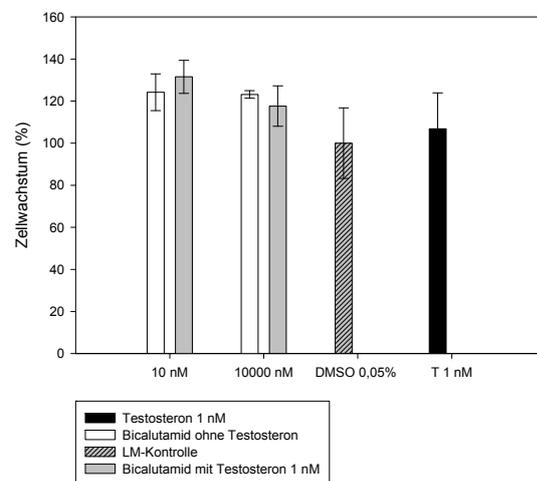


Abbildung 36: Einfluss von Bicalutamid (30) auf durch Testosteron (2) stimulierte a) LNCaP- und b) PC-3-Zellen

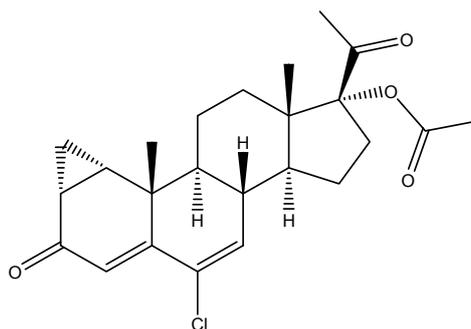
Cyproteronacetat

Abbildung 37: Cyproteronacetat (6)

Das Antiandrogen Cyproteronacetat (6, Abb. 37) stimuliert das Wachstum der LNCaP-Zellen in einem Ausmaß ähnlich der bei Applikation eines Androgens¹⁴⁰ erzielten Wirkung. Es konnte eine maximale zweifache Proliferationssteigerung festgestellt werden (Abb. 38). Der EC_{50} -Wert beträgt für Cyproteronacetat (6) 163 nM. Der von 1,0 abweichende Hillslope (Tab. 15) deutet eventuell auf das Vorhandensein von anderen Bindungsstellen für Cyproteronacetat (6) im Assaysystem oder auf die Möglichkeit einer negativen kooperativen Bindung hin. Eine negative kooperative Bindung kommt nur für Rezeptoren mit mehreren Bindungsstellen in Frage. Eine zweite Ligandenbindungsstelle (BF-3), die sich an der Oberfläche des AR befindet und allosterisch die Bindung von Coaktivatoren reguliert, wurde für den AR von Estébanez-Perpiná identifiziert¹⁴¹. Für Cyproteronacetat (6) wurde bei Wilkinson *et al.* eine starke agonistische Aktivität am Progesteronrezeptor mit einem EC_{50} -Wert von 0,22 nM festgestellt¹⁴². Eine antagonistische Wirkung am Androgenrezeptor ($IC_{50} = 37,2$ nM) und am Glukokortikoidrezeptor ($IC_{50} = 16,4$ nM) wurde ebenfalls beschrieben. Das Vorkommen eines Glukokortikoidrezeptors in LNCaP-Zellen wurde in keiner Publikation bestätigt, während die Aussagen über den Gehalt an Progesteronrezeptor in der Literatur variieren^{107;135;143-146}. Aufgrund dessen kann man keine eindeutige Aussage über die Ursache des abweichenden Hillslopes treffen. Die Bindung an einen eventuell vorhandenen Progesteronrezeptor ist aber wahrscheinlich.

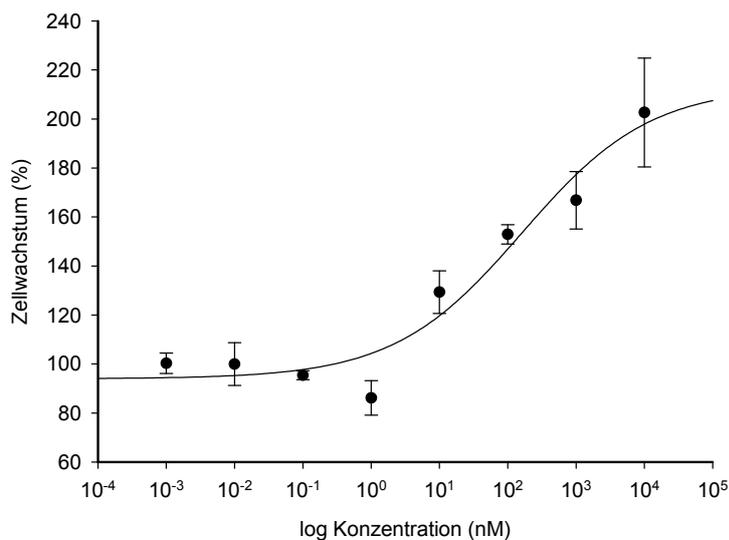


Abbildung 38: Cyproteronacetat (6)-Einfluss auf das Wachstum von LNCaP-Zellen

Finasterid

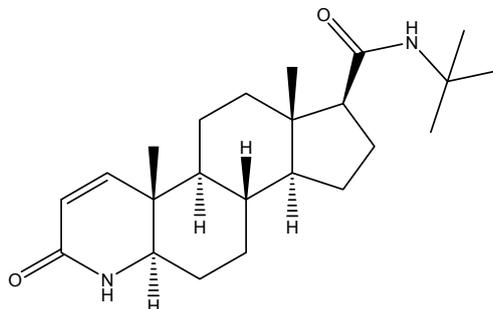


Abbildung 39: Finasterid (58)

Finasterid (58, Abb. 39) ist ein 5α -Reduktase-TypII-Inhibitor und für die Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (Proscar®) und der androgenetischen Alopezie (Propecia®) zugelassen. *In vitro* reduziert Finasterid (58) die Zellzahl der LNCaP-Zellen nur bei Inkubation in serumhaltigem Medium, während unter Inkubation mit ADFKS-Medium eine Erhöhung der Generationszeit festgestellt wurde bzw. eine Hemmung der Testosteron (2)/DHT (1) induzierten Proliferation¹⁴⁷. Finasterid (58) zeigt unter Assaybedingungen alleine weder einen Einfluss auf das Wachstum von LNCaP- (Abb. 40a) noch auf PC-3-Zellen. Eine statistisch signifikante Reduktion der durch Testosteron (2) induzierten Proliferation konnte nur bei der hohen Konzentration von 10 μ M festgestellt werden (Abb. 40b)).

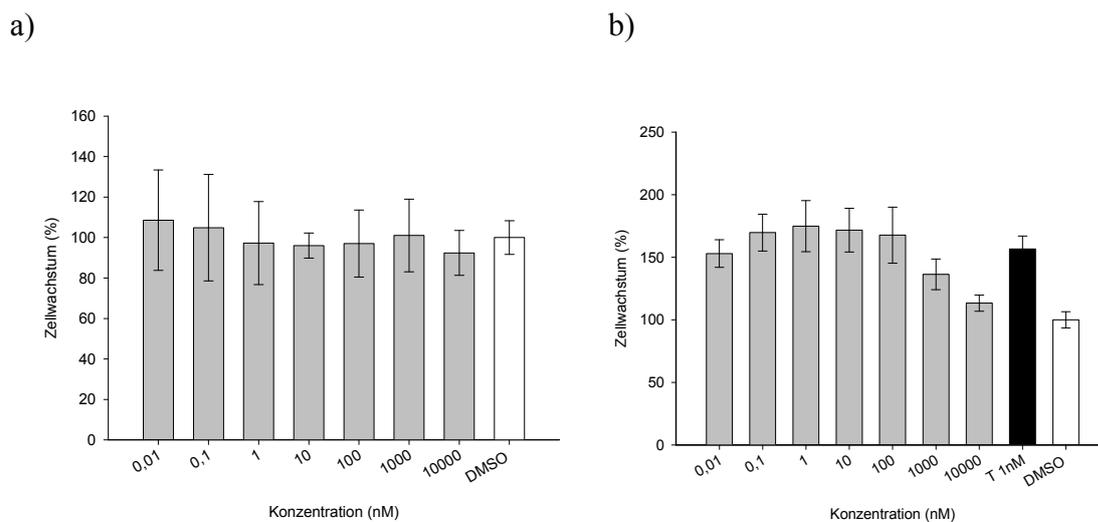


Abbildung 40: Einfluss auf das LNCaP-Zellwachstum a) Finasterid (**58**) b) Finasterid (**58**) + Testosteron (**2**) 1 nM

3.3.1.5 Einfluss von Östrogenen und Antiöstrogenen auf das Zellwachstum

17 α -Östradiol

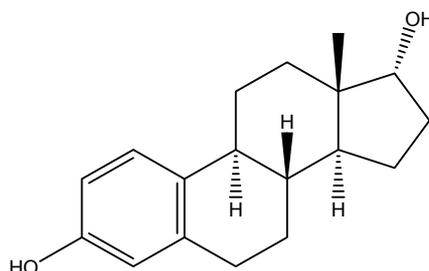


Abbildung 41: 17 α -Östradiol (**59**)

Das synthetische 17 α -Östradiol (Alfatradiol) (**59**, Abb. 41) wird topisch in Präparaten zur Therapie der androgenetischen Alopezie angewandt (Ell-Cranell alpha®, Pantostin®). Für 17 α -Östradiol (**59**) wurde eine Induzierung der Aromatase-Aktivität bestätigt¹⁴⁸, so dass Testosteron (**2**) vermehrt in 17 β -Östradiol (**4**) und Androstendion (**11**) umgewandelt wird und demzufolge weniger DHT (**1**) vorliegt. Im Proliferationsassay bewirkt 17 α -Östradiol (**59**) eine Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen bei Konzentrationen höher als 100 nM (Abb. 42). Auf das Wachstum der PC-3-Zellen hat die Substanz keinen Einfluss. 17 α -Östradiol (**59**) bindet laut Fang *et al.* an den Androgenrezeptor mit einem IC₅₀-Wert von 77 μ M und damit wesentlich schwächer als sein natürlich vorkommendes Enantiomer 17 β -Östradiol (**4**) mit einem IC₅₀-Wert von 405 nM⁵⁸. Das Vorkommen von Östrogenrezeptoren in LNCaP-Zellen wird in der Literatur widersprüchlich behandelt. In den älteren Publikationen von Schuurmans *et al.*, Mau-

cher *et al.*, Wilding *et al.* und Berns *et al.* kommen keine Östrogenrezeptoren vor^{135;145;146;149}. Bei Castagnetta *et al.*¹⁴³ wird das Vorkommen des Östrogenrezeptors allgemein beschrieben und in den neuesten Publikationen von Lau *et al.*, Bhattacharyya *et al.* und Setlur *et al.* konnten ebenfalls geringe Mengen des Östrogenrezeptors β nachgewiesen werden¹⁰³⁻¹⁰⁵. Die Bindung von 17α -Östradiol (**59**) an den ER α (RBA = 58 %) bzw. ER β (RBA = 11 %) ist viel schwächer verglichen mit 17β -Östradiol (**4**) (RBA = 100 %)¹⁵⁰. Die proliferationssteigernde Wirkung von 17α -Östradiol (**59**) ist aufgrund seiner mäßigen bis schwachen Bindungseigenschaften an den AR und ER β und dem Vorkommen von einem AR mit Mutation in der Ligandenbindungsdomäne und ER β in den LNCaP-Zellen demzufolge auf eine Bindung am mutierten AR und am ER β zurückzuführen.

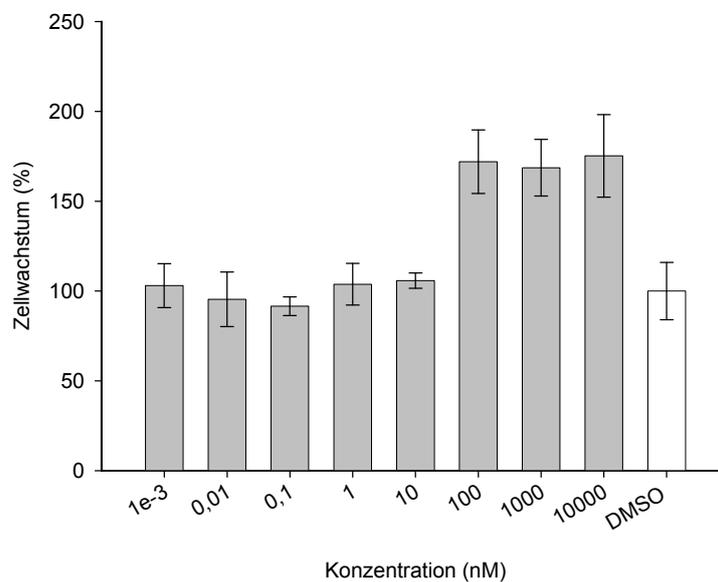


Abbildung 42: 17α -Östradiol-Einfluss (**59**) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen

17 β -Östradiol

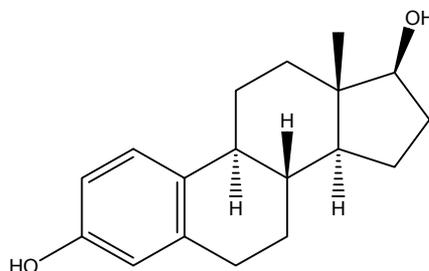


Abbildung 43: 17β -Östradiol (**4**)

Das natürliche Östrogen 17β -Östradiol (E2) (**4**, Abb. 43) besitzt wie oben beschrieben eine starke Bindungsaffinität sowohl zum ER α als auch zum ER β ¹⁵⁰ und eine mäßig

starke Bindungsaffinität zum AR ($IC_{50} = 405 \text{ nM}$)⁵⁸. Bei Wilkinson *et al.* wird für E2 (**4**) eine starke agonistische Aktivität im subnanomolaren Bereich für den ER α und den ER β berichtet, eine antagonistische Aktivität für den GR im niedrigen mikromolaren Bereich, für den MR im submikromolaren Bereich und eine partiell antagonistische Wirkung für den PR im niedrigen nanomolaren Bereich¹⁴². 17 β -Östradiol (**4**) stimuliert die Proliferation unter Assaybedingungen in einem stärkeren Ausmaß als DHT (**1**) oder Testosteron (**2**) (Tab. 15). Der Hillslope ist mit -1,1 annähernd optimal und spricht für eine einfache kompetitive Bindung. Ein sehr hoher Wert des Hillscopes würde auf eine positive Kooperativität der Bindung hindeuten. Dieser Effekt würde durch das gleichzeitige Vorkommen mehrerer möglicher Bindestellen (AR, ER β) aber im Hillslope nicht sichtbar sein, da sich mehrere Bindestellen in einem kleinen Betrag des Hillscopes ausdrücken. Insgesamt lässt sich wie bei 17 α -Östradiol eine konzertante Bindung an AR und ER vermuten, mit Sicherheit aber eine Bindung an den mutierten AR in den LNCaP-Zellen, was zu einer übermäßig hohen Stimulation des Zellwachstums führt (Abb. 44).

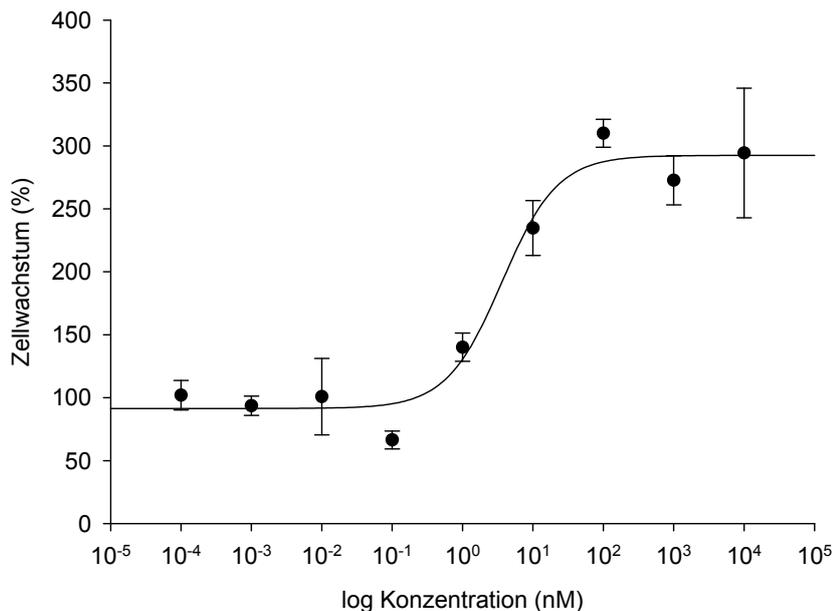
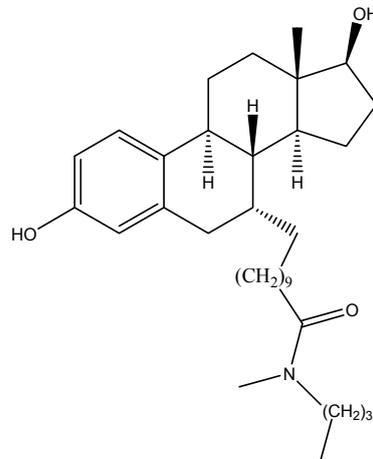


Abbildung 44: 17 β -Östradiol-Einfluss (**4**) auf das Wachstum von LNCaP-Zellen

FulvestrantAbbildung 45: Fulvestrant (**60**)

Das Antiöstrogen Fulvestrant (**60**, Abb. 45) stimuliert das Wachstum der LNCaP-Zellen nur in der Konzentration von 1 nM. In anderen Konzentrationen zeigt es keinen statistisch signifikanten Effekt auf das Wachstum der LNCaP-Zellen.

Tabelle 15: Standardsubstanzen und ihre EC_{50} -LNCaP-Zellproliferationswerte mit ihren Funktionsparametern

<i>Substanz</i>	<i>Min (%)</i>	<i>Max (%)</i>	<i>EC₅₀-Wert (nM)</i>	<i>Hillslope</i>
Dihydrotestosteron (1)	104 ± 13	279 ± 9	0,71 ± 0,33	-0,8 ± 0,2
Testosteron (2)	107 ± 7	241 ± 6	1,30 ± 0,41	-1,0 ± 0,3
R1881 (9)	85 ± 7	220 ± 5	0,04 ± 0,01	-1,3 ± 0,3
Cyproteronacetat (6)	94 ± 6	213 ± 24	162,86 ± 178,56	-0,5 ± 0,2
17β-Östradiol (4)	91 ± 8	293 ± 10	3,63 ± 1,21	-1,1 ± 0,3
17α-Östradiol (59)			n.b.	
Finasterid (58)			kein Effekt	
Bicalutamid (30)			kein Effekt	
Fulvestrant (60)			keine dosisabhängige Zellproliferation	

n.b. = nicht bestimmbar (Fehler der nichtlinearen Regression zu groß)

Einfluss auf das PC-3-Zellwachstum

Bei Dihydrotestosteron (**1**), Testosteron (**2**), R1881 (**9**), Cyproteronacetat (**6**), Bicalutamid (**30**) und Finasterid (**58**) ist kein Effekt auf die Proliferation der PC-3-Zellen nachweisbar. β -Östradiol (**4**) und α -Östradiol (**59**) zeigen bei 10 μ M eine hochsignifikante Verminderung der PC-3-Zellzahl, was in der Literatur bestätigt wird¹⁵¹. Bei Fulvestrant (**60**) gibt es einen zellzahlvermindernden Effekt der höheren Konzentrationen bei den PC-3-Zellen. Ein ähnlicher Effekt konnte für das Antiöstrogen Tamoxifen (**62**) beschrieben werden¹⁵².

3.3.1.6 Vergleich von Bicalutamid und Fulvestrant

Die therapeutisch eingesetzten Substanzen mit antiandrogener Wirkung wie Finasterid (**58**, diskutiert in 3.3.1.4, Abb. 40) und Bicalutamid (**30**, diskutiert in 3.3.1.4, Abb. 36) wurden auf ihren Einfluss auf LNCaP-Zellen, die gleichzeitig mit Androgenen wie Testosteron (**2**), Dihydrotestosteron (**1**) bzw. R1881 (**9**) behandelt wurden, untersucht. Der proliferationsmindernde Effekt von Bicalutamid (**30**) wurde auch hinsichtlich des Einflusses auf die gleichzeitige Stimulation durch β -Östradiol (**4**) tiefer gehend analysiert. Abschließend wurde der Effekt von Bicalutamid (**30**) mit der Wirkung von Fulvestrant (**60**) verglichen.

Vergleich von Bicalutamid und Fulvestrant auf Androgen-stimulierte LNCaP-Zellen

Sowohl Bicalutamid (**30**) als auch das Antiöstrogen Fulvestrant (**60**) inhibieren bei einer Konzentration von 1 μ M die durch R1881 (**9**) bei 0,1 nM gesteigerte LNCaP-Zellproliferation (Abb. 46). Auf die R1881 Konzentration von 1 nM haben beide Substanzen keinen Einfluss.

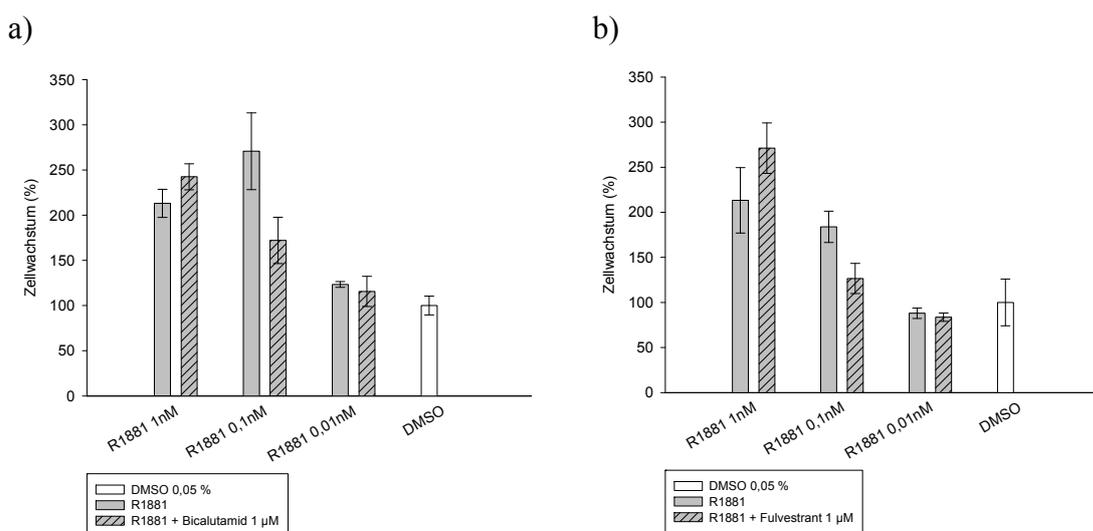


Abbildung 46: Wirkung von a) Bicalutamid (**30**) und b) Fulvestrant (**60**) auf R1881-stimulierte (**9**) LNCaP-Zellen

Auf die durch 1 nM Testosteron (**2**) stimulierte LNCaP-Zellproliferation hat Fulvestrant (**60**) bei einer Konzentration von 1 μ M und 10 μ M einen mindernden Einfluss (Abb. 47).

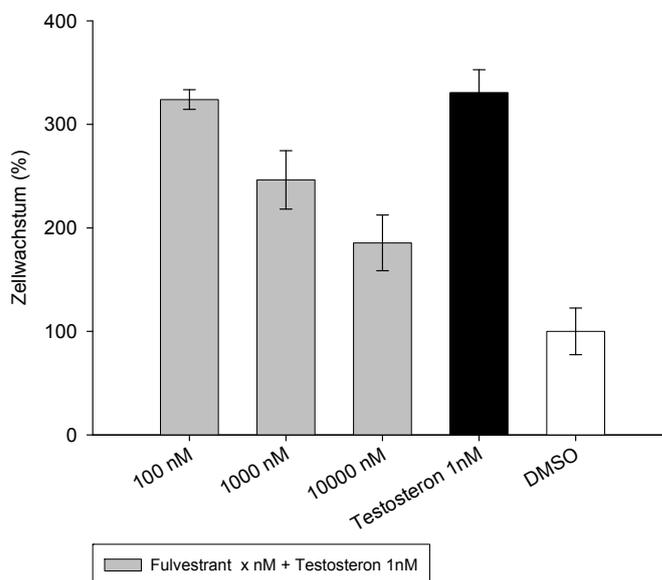


Abbildung 47: Wirkung von Fulvestrant (**60**) auf durch Testosteron (**2**) stimulierte LNCaP-Zellen

Der Einfluss von Antiöstrogenen auf die Zellproliferation von Prostatakrebszellen wurde schon in einigen Studien untersucht. In älteren Publikationen wurde diskutiert, dass erhöhte Konzentrationen von Östrogenen eine Hochregulation des Androgenrezeptors bewirken^{153;154} und Östrogenrezeptor-vermittelte Signalwege für ein Fortschreiten des Prostatakarzinoms mitverantwortlich gemacht werden können¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Daraufhin wurden auch Antiöstrogene hinsichtlich ihrer Wirkung auf Prostatakrebs untersucht. In experimentellen Ansätzen, in denen Antiöstrogene als Therapeutika für Prostatakrebs in Tiermodellen getestet wurden, konnte für das Antiöstrogen Toremifen (**61**, Abb. 50d) eine bessere Wirksamkeit als für Flutamid (**7**) nachgewiesen werden, jedoch kein Effekt auf den Androgenrezeptorspiegel¹⁵⁸. Koadministration von Finasterid (**58**) und Fulvestrant (**60**) ergab eine im Vergleich zu Finasterid (**58**) noch deutlichere Abnahme an Prostatagewicht der Ratte¹⁵⁹, was auf eine Hemmung des IGF-Systems zurückzuführen ist. Der Effekt von Fulvestrant (**60**) und anderen Antiöstrogenen wie Tamoxifen (**62**) und Toremifen (**61**) auf LNCaP-Zellen und mit dem wtAR transient transfizierte DU-145-Zellen wurde von Kawashima *et al.* untersucht¹⁵². Der antiproliferative Effekt von Fulvestrant (**60**) konnte nur in LNCaP-Zellen und nicht in den transfizierten DU-145-Zellen nachgewiesen werden, wobei hier die anderen Zellkulturbedingungen im Vergleich zu den hier durchgeführten Experimenten zu beachten sind. Bei Kawashima *et al.* wurde kein ADFKS-Medium, sondern nur dialysiertes Serum im Medium verwendet. Daher enthielten die verwendeten Medien auch Steroide. Das erklärt die Differenz zu dem hier ermittelten Befund, dass Fulvestrant (**60**) alleine keinen Effekt auf das LNCaP-

Wachstum zeigte, aber die durch Androgene vermittelte Zellproliferation ähnlich Bicalutamid (**30**) verringern konnte. Fulvestrant (**60**) könnte über den mutierten Androgenrezeptor antiproliferativ wirken, da der einzig bekannte Unterschied zwischen dem bei Kawashima *et al.* verwendeten DU-145-Zellsystem und den LNCaP-Zellen die Mutation in der Ligandenbindungsdomäne des AR ist. Eine Bindung von Fulvestrant an den wtAR wird durch die von Fang *et al.* publizierten Androgenrezeptorbindungsdaten ebenfalls nicht bestätigt, in denen ein IC₅₀-Wert von >42,8 µM angegeben wird⁵⁸. Bei Wilkinson *et al.* ist für Fulvestrant (**60**) keine Aktivität am AR detektiert worden¹⁴². Bhattacharyya *et al.* konnten aber auch keine Bindungsaffinität von Fulvestrant (**60**) an den mutierten Androgenrezeptor feststellen. Die Autoren bestätigten eine Herunterregulation von AR-mRNA-Expression und AR-Protein in LNCaP-Zellen als Ursache des verminderten Zellwachstums unter Fulvestrant (**60**)¹⁰³. Bhattacharyya *et al.* konnten nachweisen, dass die Herunterregulation des AR nicht auf posttranskriptionaler Ebene stattfindet, sondern Fulvestrant (**60**) direkt die Aktivität eines in die LNCaP-Zellen transfizierten AR-Promotor-Luziferase-Konstruktes supprimiert. Dies deutet auf eine direkte transkriptionale Repression des AR-Gens durch Fulvestrant (**60**) hin. Diese und auch die hier erhaltenen Ergebnisse stehen in Kontrast zu den Daten von Takahashi *et al.*¹⁶⁰. Sie beschreiben einen inhibierenden Effekt von Fulvestrant (**60**) nur für die E2 (**4**) stimulierte PSA-mRNA-Expression in LNCaP-Zellen, aber nicht für die R1881 (**9**) stimulierte PSA-mRNA-Expression. Dieser Widerspruch lässt sich nicht erklären.

Vergleich von Bicalutamid und Fulvestrant auf 17β-Östradiol-stimulierte LNCaP-Zellen

Sowohl das Antiandrogen Bicalutamid (**30**) als auch das Antiöstrogen Fulvestrant (**60**) konnten in dem Proliferationsassay deutlich die durch 17β-Östradiol (**4**) verursachte LNCaP-Zellproliferation auch bei einer höheren 17β-Östradiol (**4**) Konzentration von 100 nM inhibieren (Abb. 48). Interessant ist, dass Bicalutamid (**30**) sogar eine stärkere Inhibition verursacht als Fulvestrant (**60**).

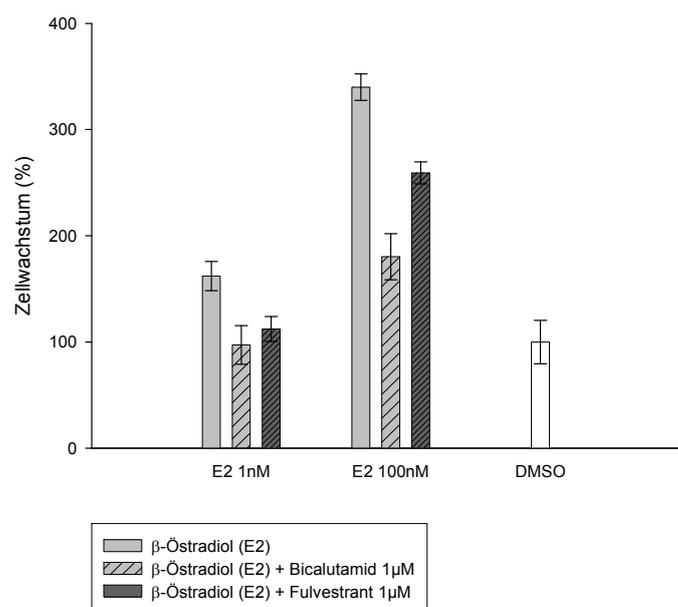


Abbildung 48: Einfluss von Bicalutamid (**30**) und Fulvestrant (**60**) auf das 17 β -Östradiol-stimulierte (**4**) LNCaP-Zellwachstum

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Signalwege, die über den Östrogenrezeptor β als auch solche, die über den Androgenrezeptor vermittelt werden und die die Zellproliferation verursachen, eng miteinander verbunden sind. Bislang wurde nur diese Art der Interaktion in unterschiedlichen Studien bestätigt, aber der vollständige Zusammenhang bleibt aufzuklären. Die hier erhaltenen Ergebnisse stehen in Kontrast zu den Ergebnissen von Castagnetta *et al.*, die ein durch E2 (**4**) induziertes Wachstum nur durch Fulvestrant (**60**) aber nicht durch Bicalutamid (**30**) inhibieren konnten¹⁴³. Auch bei Maggioni *et al.* wird beschrieben, dass sich die durch E2 (**4**) und DHT (**1**) transkriptionelle Aktivität nur durch Fulvestrant (**60**), nicht jedoch durch Bicalutamid (**30**) inhibieren lässt. Allerdings dienten hier mit dem ER-Reporterplasmid XETL, welches die für die Leuchtkäfer-Luziferase kodierende Sequenz unter der Kontrolle eines ERE stromaufwärts eines Thymidinkinase-Promotors enthält, transfizierte LNCaP-Zellen. Zusätzlich wurden die Zellen noch mit einem ER β -Plasmid transfiziert. Das könnte die Ursache der divergierenden Ergebnisse sein. Ein übermäßiges Vorkommen von ER β führt offenbar dazu, dass die E2- und auch DHT-vermittelten Effekte hauptsächlich über den ER β Signalweg verlaufen. Eine Inhibierung durch Bicalutamid (**30**) ist deshalb nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse unterstreichen den Einfluss von ER β auf Androgen-vermittelte Effekte. Die Autoren konnten auch eine Repression der durch E2 (**4**) und DHT (**1**) induzierten Wachstumseffekte durch einen ER β -Antisense-Expressionsvektor aufzeigen¹⁶¹. Dies spricht für die Notwendigkeit von ER β für die durch Androgene und Östrogene vermittelten Proliferationseffekte in LNCaP-Zellen. Ebenso wurde für das Phytoöstrogen Genistein (**63**, Abb. 49a)) eine verminderte AR-

und PSA-mRNA-Expression in LNCaP-Zellen festgestellt, wobei dieser Effekt durch das steroidale Antiöstrogen ICI 164 384 (**64**, Abb. 49b)) aufgehoben werden konnte¹⁶².

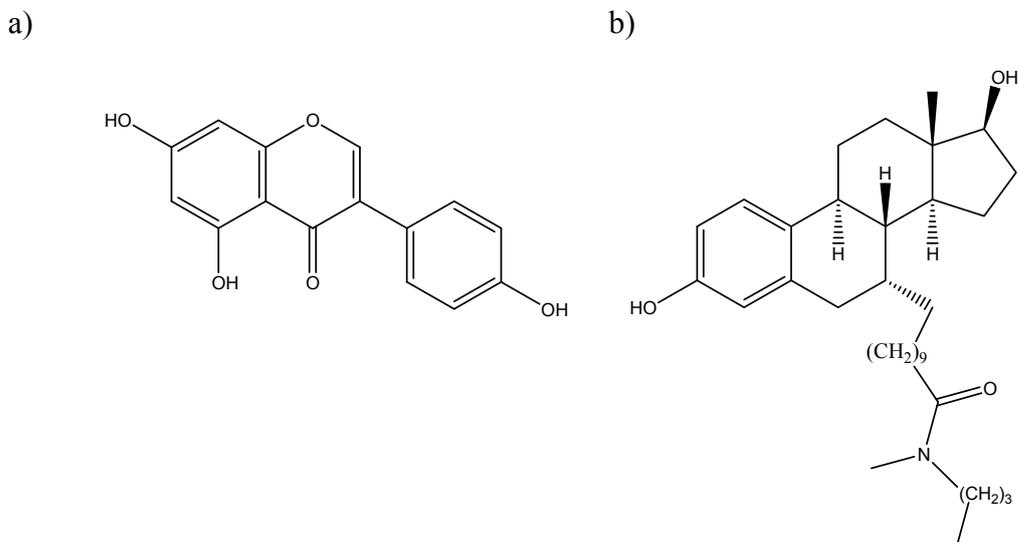
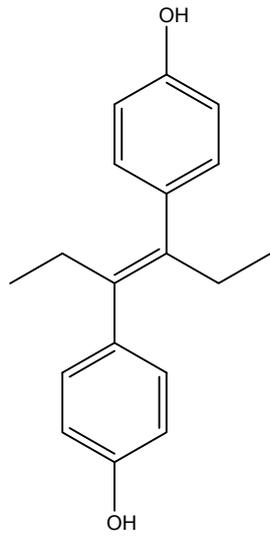


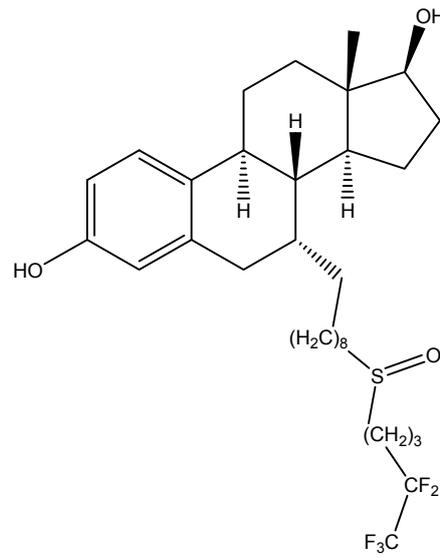
Abbildung 49: Strukturen von a) Genistein (**63**) und b) ICI 164 384 (**64**)

Allerdings konnte eine direkte Wirkung am wtAR nicht nachgewiesen werden. Taylor *et al.* untersuchten den Einfluss von E2 (**4**) auf ein Rattenprostata-Organsystem in Abhängigkeit von ER α und ER β ¹⁶³. Prinzipiell konnte ein apoptotischer Effekt von E2 (**4**) auf diese Prostataorgankulturen festgestellt werden. Durch die Verwendung von ER α bzw. ER β knockout Organkulturen konnte ein Zusammenhang zwischen E2-vermittelter Apoptose und Östrogenrezeptoren nicht nachgewiesen werden. Die Autoren konnten aber eine Herunterregulation der AR-Expression während Testosterongabe sowohl in wtOrgankultur, als auch in den Knockout-Modellen beobachten, so dass sie einen Mechanismus für die E2-Wirkung vorschlugen, der unabhängig von Östrogenrezeptoren und nichtgenomischen Effekten ist. Der Vergleich dieser Ergebnisse von Tiermodellen und Organkulturen mit den Ergebnissen von *in-vitro*-Zellexperimenten ist allerdings nicht ohne weiteres möglich, da sich der Hormonstatus von Knockout-Tieren erheblich verändert hat. Bei Kawashima *et al.* ist eine Inhibierung der Transaktivierungsaktivität des AR in transient transfizierten PC-3-Zellen für das Östrogen Diethylstilbestrol (**65**, Abb. 50a)) und die Antiöstrogene Tamoxifen (**62**, Abb. 50c)), Fulvestrant (**60**, Abb. 50b)) und Toremifen (**61**, Abb. 50d)) beschrieben worden¹⁵².

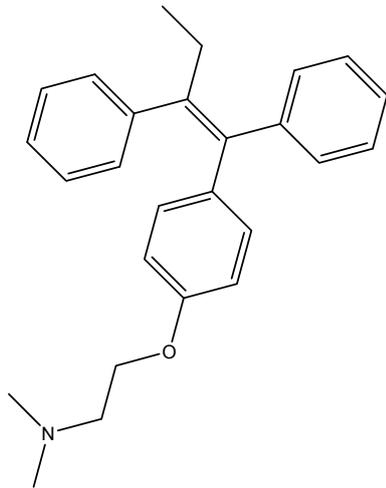
a)



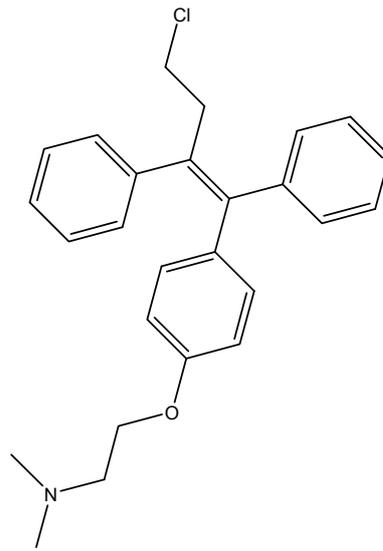
b)



c)



d)



e)

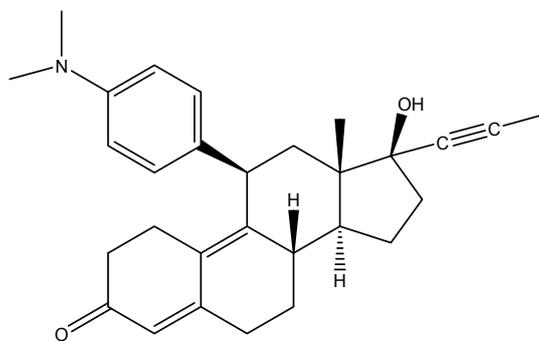


Abbildung 50: Strukturen des Östrogens a) Diethylstilbestrol (**65**), der Antiöstrogene b) Fulvestrant (**60**), c) Tamoxifen (**62**), d) Toremifen (**61**) und des Antiprogestins e) Mifepriston (RU-486) (**66**)

Dies bestätigt die Vermutung, dass Östrogene und Antiöstrogene zumindest teilweise in den AR-Signalweg eingreifen. Interessanterweise wird von Nawaz *et al.* eine antiprogestine Aktivität für Fulvestrant (**60**) beschrieben, die sogar vergleichbar mit der Wirkung des Antiprogestins Mifepriston (**66**, RU-486, Abb. 50e) ist ¹⁶⁴. Dies wurde durch die von Wilkinson *et al.* publizierten Daten für Fulvestrant (**60**) bestätigt, wobei eine partial agonistische Aktivität am ER α im subnanomolaren Bereich und MR im niedrigen mikromolaren Bereich und eine antagonistische Aktivität am ER β im subnanomolaren Bereich, am GR und PR im submikromolaren Bereich beschrieben wurde ¹⁴². Wahrscheinlich spielt die antagonistische Wirkung am GR und PR bei der Herunterregulation von AR- und PSA-mRNA durch das Antiöstrogen Fulvestrant ebenfalls eine Rolle. Bei dem Versuch die Rolle der Östrogene und des ER β in der Prostataphysiologie aufzuklären, fanden Takahashi *et al.* heraus, dass der proliferative Effekt von E2 (**4**) auf LNCaP-Zellen mit einer Induktion einiger androgenresponsiver Gene (ARG) korrelierte ¹⁶⁰. Interessanterweise sprachen aber nicht alle ARG auf die E2-Behandlung an. Der E2-vermittelte Effekt konnte durch ER β -siRNA inhibiert werden. Takahashi *et al.* postulieren für das durch E2 (**4**) stimulierte Wachstum einen ER β -abhängigen, AR-abhängigen und ERK-verwandten Signalweg. Interessanterweise konnten für das Phytoöstrogen Tectorigenin gegensätzliche Effekte beobachtet werden. Die Behandlung von LNCaP-Zellen führte bei Stettner *et al.* zu einer vermehrten Expression von ER β , was nachweislich mit einer Repression einiger ARG, wie z.B. PSA, korrelierte ¹⁶⁵. Diese unterschiedlichen Effekte von Liganden des ER können auf abweichende Kulturbedingungen zurückzuführen sein. So wurde bei Takahashi *et al.* vor und während des Assays ADFKS-Medium verwendet, bei Stettner *et al.* aber Medium mit 10 % FKS. Unabhängig davon wurde aber in beiden Arbeitsgruppen der ER β als bedeutendes Regulativ des AR-vermittelten Signalweges identifiziert. Phytoöstrogene verstärken den Tumorsuppressor-Effekt des ER β und besitzen eine antiandrogene Komponente.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass steroidale Östrogene ihre proliferative Wirkung an LNCaP-Zellen über einen komplizierten und noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus ausüben, der aber im Wesentlichen sowohl vom ER β als auch vom AR abhängt. In PC-3-Zellen wird ein apoptotischer Einfluss von E2 (**4**) beschrieben und PC-3-Zellen besitzen im Gegensatz zu LNCaP-Zellen einen ER α ¹⁶⁶ und einen GR ¹⁴⁴, aber keinen AR. Antiöstrogene wie Fulvestrant (**60**) reduzieren bei gleichzeitiger Gabe von Androgenen das Zellwachstum von LNCaP-Zellen. Sie reduzieren die AR-mRNA-Expression, den AR-Proteingehalt und die PSA-mRNA-Expression. Vermutlich wird durch die von Takahashi *et al.* publizierten Ergebnisse eine Wirkung von Fulvestrant (**60**) über den ER β und andere Signalwege, wie den AR-abhängigen und ERK-verwandten Signalweg erfolgen. Zu beachten ist aber noch die Wirkung von Fulvestrant (**60**) auf den GR und PR, die im Zusammenhang mit den E2-antagonisierenden Wachstumseffekten von Fulvestrant (**60**) noch nicht untersucht worden ist. Es gibt aber Hinweise, wie die von Wilkinson *et al.* publizierten Aktivitäten von Fulvestrant (**60**) und E2 (**4**) an dem GR und PR ¹⁴², die auf eine Beteiligung einer der beiden Rezeptoren an dem oben beschriebenen Effekt schließen lassen.

3.3.1.7 Zusammenfassung

Der Proliferationsassay wurde etabliert und dient der schnellen und kostengünstigen Testung sowohl von Reinsubstanzen, als auch von Pflanzen- und Pilzextrakten bzw. Fraktionen dieser Extrakte auf eine androgene oder antiandrogene Wirkung. Dazu wurden androgenabhängig wachsende LNCaP-Zellen und androgenunabhängig wachsende PC-3-Zellen verwendet. Gleichzeitig erfasst man allgemeine zytotoxische bzw. antiproliferative Effekte von Substanzen, Extrakten und Fraktionen. Durch die Mutation in der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors (T877A) in den LNCaP-Zellen ist es allerdings nicht möglich zwischen potentiell antiandrogen und potentiell androgen wirksamen Substanzen zu unterscheiden, sondern dies muss in nachfolgenden Experimenten bestimmt werden. Ebenfalls binden Liganden des Östrogenrezeptors und der anderen Steroidhormonrezeptoren an den mutierten AR. In höheren Konzentrationen haben aber Östrogene und Glukokortikoide eine zytotoxische Wirkung auf PC-3-Zellen, und können auf diesem Wege demaskiert werden. Unspezifische zytotoxische Effekte können durch den Vergleich von LNCaP- und PC-3-Zellen festgestellt werden. Diese möglichen Effekte, die während des Zellproliferationsassays beobachtet wurden, sind in Tab. 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Mögliche Effekte am Zellproliferationsassay

<i>LNCaP + T</i> (2) 1 nM	<i>LNCaP</i>	<i>PC-3</i>	<i>Effekt</i>
—	—	—	Kein Effekt
↑	↑	—	Effekt am mutierten AR
↑	↑	↑	Unspezifische Proliferationseffekte oder reduzierender Einfluss auf das XTT Reagenz
↓	—	—	antiandrogener Effekt mit potentieller Wirkung am AR
↓	↓	↓	allgemeiner zytotoxischer Effekt
↑	↑	↓	Effekt vermittelt durch östrogenartig bzw. glukokortikoidartig wirkende Substanzen
↓	↑	↑	antiandrogener Effekt, überlagert durch XTT Interaktion
—	kein statistisch signifikanter Effekt		
↑	Zellproliferationssteigerung		
↓	Zellproliferationsminderung		

Insgesamt sind die Ergebnisse des Zellproliferationsassays mit Vorsicht zu interpretieren. Sie liefern nur Aussagen, ob ein allgemeiner zytotoxischer Effekt oder eine Modulation der hormonellen Signalwege vorliegt. Es können aber auch andere regulatorische Einflüsse beteiligt sein. Deshalb müssen Substanzen und Extrakte bzw. Fraktionen, deren Wirkung auf einen Eingriff in das hormonelle System der Zellen schließen lassen, in

nachfolgenden Tests wie Rezeptorbindungsassays und Expressionsassays auf ihre Aktivität am Androgenrezeptor überprüft werden.

Vorteilhaft an diesem Zellsystem ist die Vielfalt an zusätzlichen Informationen, die man durch sorgfältige Interpretation der erhaltenen Daten gewinnen kann, denn das LNCaP-Zellmodell ist eines der meistuntersuchten Prostatakrebsmodelle. So bieten sich aus den erhaltenen Daten neue Möglichkeiten für weiterführende Forschungsansätze.

3.3.2 Potentielle androgene Effekte

Die zu testenden Reinsubstanzen wurden als Eingangstest in zwei Konzentrationen, 10 nM und 10 μ M gleichzeitig an LNCaP- und PC-3-Zellen getestet. In den nachfolgenden Wertetabellen ist die prozentuale Proliferation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit ihren Standardabweichungen dargestellt. Hellgrau hinterlegte Felder sind signifikante Proliferationsänderungen mit einem $\alpha = 5\%$ und dunkelgrau hinterlegte Felder sind hochsignifikante Proliferationsänderungen mit einem $\alpha = 1\%$. Weiße Felder zeigen nicht statistisch signifikante Änderungen. Die so für die Standardsubstanzen ermittelten Werte sind in Tab. 17 dargestellt.

Tabelle 17: Prozentuale Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen durch Standardsubstanzen

Substanz	LNCaP-Proliferation %		PC-3- Proliferation %	
	10 nM	10 μ M	10 nM	10 μ M
DHT (1)	142 \pm 27	273 \pm 43	15 \pm 16	15 \pm 15
Testosteron (2)	241 \pm 18	253 \pm 11	18 \pm 1	7 \pm 2
R1881 (9)	140 \pm 11	n.b.	17 \pm 8	n.b.
Cyproteronacetat (6)	28 \pm 7	101 \pm 16	10 \pm 5	13 \pm 2
17 α -Östradiol (59)	6 \pm 4	75 \pm 20	1 \pm 3	-12 \pm 4
17 β -Östradiol (4)	155 \pm 20	220 \pm 43	17 \pm 8	-10 \pm 7
Finasterid (58)	-4 \pm 6	8 \pm 11	19 \pm 12	10 \pm 12
Bicalutamid (30)	4 \pm 13	-6 \pm 4	7 \pm 4	5 \pm 6

3.3.2.1 Reinsubstanzen

Von den insgesamt 147 getesteten Substanzen wurden 35 Substanzen mit einer proliferationssteigernden Wirkung auf LNCaP-Zellen gefunden. Davon zeigten 17 Substanzen eine statistisch hochsignifikante ($\alpha = 1\%$) proliferationssteigernde Wirkung auf die LNCaP-Zellen, die in Tabelle 18 aufgelistet sind. In Tabelle 19 finden sich 14 Substanzen mit einer statistisch signifikanten ($\alpha = 5\%$) Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen, während die Tabelle 20 alle Substanzen enthält, die eine Proliferationssteigerung

der LNCaP- und PC-3-Zellen bewirken. Insbesondere die Strukturen der Substanzen MAD994 (**67**), MAD998 (**68**) und MAD925 (**69**) aus Tabelle 20 können aufgrund ihrer Hydrochinon-haltigen Struktur eine Reduzierung des XTT-Reagenzes bewirken. Die vier Substanzen aus Tabelle 20 zeigen aber eine ca. dreimal stärkere Proliferation der LNCaP-, als der PC-3-Zellen, so dass die Ursache hier eventuell zusätzlich zu der reduzierenden Wirkung auf das XTT Reagenz ein hormonaler Effekt sein könnte.

Von diesen potentiellen Androgenrezeptorbindern aus Tabelle 18 und 19 gibt es 11 Substanzen, die eine statistisch (hoch)signifikante Verminderung der Zellzahl der PC-3-Zellen bewirken. Das deutet auf eine Interaktion mit anderen Steroidhormonrezeptoren hin.

Alle Substanzen sind mit Namen bzw. der internen Substanzbezeichnung der IPB-Substanzdatenbank (3LC) und, soweit vorhanden, ihrer dazugehörigen Molekül-Identitätsnummer (MolID) angegeben. Die entsprechenden Strukturformeln befinden sich in Teil A des Anhangs.

Tabelle 18: Substanzen mit statistisch hochsignifikanter LNCaP-Zellproliferationssteigerung mit verminderter bzw. keiner signifikanten Proliferation der PC-3-Zellen

Substanz		LNCaP-Proliferation %		PC-3- Proliferation %	
Name bzw. 3LC	MolID	10 nM	10µM	10 nM	10µM
β-Sitosterol (57)	-	33 ± 34	58 ± 7	1 ± 12	- 31 ± 8
QDM255 (70)	2669	30 ± 7	170 ± 11	17 ± 6	8 ± 3
QDM276 (71)	2670	215 ± 31	281 ± 36	- 1 ± 11	4 ± 8
Stigmasterol (56)	-	23 ± 6	96 ± 12	12 ± 8	3 ± 6
24_Epicastasteron (72)	-	18 ± 2	- 8 ± 3	6 ± 4	6 ± 5
MAD919 (73)	2113	7 ± 3	39 ± 13	28 ± 7	- 75 ± 2
MAD968 (74)	1594	26 ± 4	2 ± 6	33 ± 13	8 ± 4
Trisepicastasteron-tetraacetat (75)	-	16 ± 10	58 ± 8	31 ± 14	- 76 ± 2
ZAC000 (76)	1266	18 ± 10	38 ± 5	- 7 ± 7	6 ± 8
QDM101 (77)	3114	- 2 ± 14	16 ± 3	- 14 ± 8	- 28 ± 6
QDM103 (78)	3115	- 3 ± 4	97 ± 9	17 ± 10	- 61 ± 9
QDM376 (79)	3118	11 ± 4	43 ± 9	20 ± 5	- 11 ± 22
QDM441 (80)	3122	- 10 ± 6	24 ± 6	- 5 ± 29	- 59 ± 7
DRT173 (81)	5084	- 8 ± 5	11 ± 9	- 17 ± 7	- 63 ± 2
ZAB000 (82)	496	- 15 ± 4	12 ± 3	39 ± 57	- 33 ± 55
ZAC000 (83)	1482	- 18 ± 7	33 ± 5	- 88 ± 2	- 88 ± 2
ZAC000 (84)	1286	- 12 ± 16	66 ± 8	- 29 ± 8	- 20 ± 9

Tabelle 19: Substanzen mit statistisch signifikanter LNCaP-Zellproliferationssteigerung mit verminderter bzw. keiner signifikanten Proliferation der PC-3-Zellen

Substanz		LNCaP-Proliferation %		PC-3- Proliferation %	
Name bzw. 3LC	MolID	10 nM	10µM	10 nM	10µM
QDM520 (85)	2671	71 ± 15	137 ± 51	15 ± 16	6 ± 20
QDM438 (86)	2673	28 ± 15	48 ± 9	7 ± 4	14 ± 4
24-Epibrassinolid (87)	-	9 ± 5	10 ± 3	6 ± 3	4 ± 11
24-Epiteasteron (88)	-	11 ± 1	-20 ± 6	10 ± 8	- 23 ± 9
MAD970 (89)	1592	14 ± 6	13 ± 7	36 ± 5	- 14 ± 5
MAD980 (90)	1587	20 ± 10	- 18 ± 7	38 ± 10	18 ± 13
DBC051 (91)	1569	- 15 ± 6	16 ± 3	34 ± 19	41 ± 20
QDM100 (92)	3113	- 7 ± 4	13 ± 5	- 1 ± 25	- 16 ± 13
QDM407 (93)	3119	- 4 ± 6	13 ± 4	4 ± 9	- 33 ± 15
QDM494 (94)	3125	6 ± 10	17 ± 9	24 ± 8	- 5 ± 8
XSA108 (95)	2400	3 ± 9	20 ± 5	1 ± 13	3 ± 13
DFK043 (96)	966	13 ± 20	35 ± 10	- 15 ± 4	6 ± 3
DBC032 (97)	1742	- 31 ± 31	51 ± 13	- 55 ± 11	- 53 ± 7
GUG333 (98)	3321	- 38 ± 25	40 ± 8	- 56 ± 9	- 59 ± 4

Tabelle 20: Substanzen mit hochsignifikanter Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen und gleichzeitiger Proliferationssteigerung der PC-3-Zellen

Substanz		LNCaP-Proliferation %		PC-3- Proliferation %	
Name bzw. 3LC	MolID	10 nM	10 µM	10 nM	10 µM
QDM458 (99)	2672	27 ± 7	34 ± 6	- 0,3 ± 5	14 ± 3
MAD994 (67)	1800	0,4 ± 5	141 ± 6	1 ± 4	29 ± 4
MAD998 (68)	1801	15 ± 4	86 ± 6	22 ± 7	33 ± 6
MAD925 (69)	1795	18 ± 3	110 ± 16	27 ± 9	30 ± 5

3.3.2.2 QDM276, QDM255 und β -Sitosterol

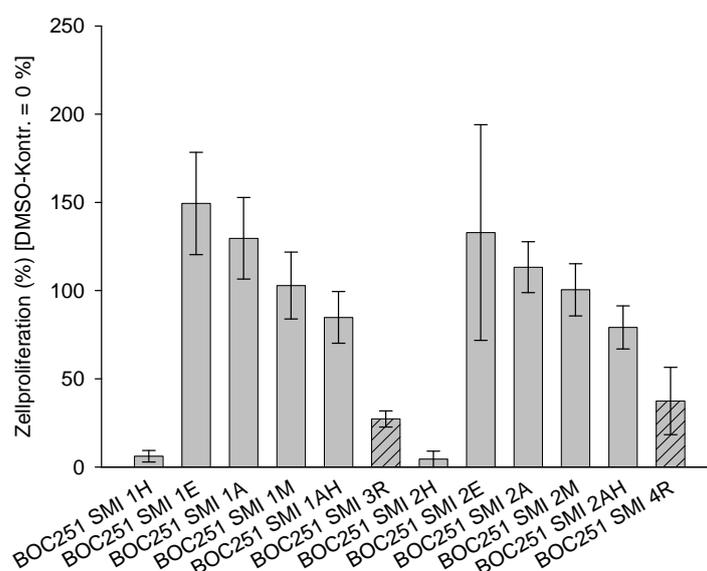
Von den 35 potentiellen Androgenrezeptorbindern aus den Tabellen 18, 19 und 20 sind 29 Substanzen im Androgenrezeptorbindungsassay (Kapitel 3.4.2) auf Bindung am Androgenrezeptor überprüft worden. Davon haben sich gute bis sehr gute Bindungseigenschaften für QDM276 (**71**), QDM255 (**70**) und β -Sitosterol (**57**) bestätigen lassen. Von diesen drei Bindern wurden die EC_{50} -Werte der LNCaP-Zellproliferation bestimmt.

Tabelle 21: EC_{50} -Werte und LNCaP-Zellproliferationsparameter für QDM276 (**71**), QDM255 (**70**) und β -Sitosterol (**57**)

Substanz	Min (%)	Max (%)	EC_{50} (nM)	Hillslope (nM)
QDM276 (71)	109 ± 12	380 ± 12	2,49 ± 0,84	-0,9 ± 0,2
QDM255 (70)	132 ± 5	275 ± 7	99,00 ± 19,35	-8,8 ± 9,4
β -Sitosterol (57)	109 ± 20	192 ± 27	35,02 ± 65,69	-1,0 ± 1,5

3.3.2.3 Extrakte und Fraktionen

Alle Extrakte und Fraktionen sind in einer Eingangskonzentration von 25 μ g/ml an LNCaP- und PC-3-Zellen getestet worden. Eine Reduktion des Testaufwandes durch Beschränkung der Testung auf Rohextrakte ist leider nicht möglich gewesen, wie sich an den Daten von *Salvia miltiorrhiza* verdeutlichen lässt (Abb. 54). Die Rohextrakte (der MTBE-EtOH-Extrakt BOC251 SMI 3R, der MeOH-Extrakt BOC251 SMI 4R) zeigen eine deutlich niedrigere LNCaP-Zellproliferation als einige Fraktionen dieser Extrakte. Dieser Effekt kommt durch die als zytotoxisch bekannten Hexanfraktionen BOC251 SMI 1H und 2H zustande. Sie enthalten die lipophilen Tanshinone, über deren zytotoxische Wirkung gegenüber humanen Krebszelllinien in der Literatur berichtet worden ist^{167;168}. Bei alleiniger Testung der Rohextrakte wäre z. B. der proliferationssteigernde Effekt der Fraktion BOC251 SMI 1E unentdeckt geblieben.

Abbildung 54: LNCaP-Zellproliferation unter Einfluss von *Salvia miltiorrhiza*-Fraktionen

Von den 23 präparierten Organismen zeigten die Fraktionen von 17 Organismen eine statistisch signifikante Proliferationssteigerung. Allerdings wiesen auffällig viele Fraktionen eine gleichzeitig verminderte Zellproliferation bei den PC-3-Zellen auf (Tab. 23). Das ist ein Indiz dafür, dass viele Fraktionen der pflanzlichen Extrakte Substanzen beinhalten, die mit anderen Steroidhormonrezeptoren wie z. B. dem Östrogenrezeptor oder dem Glukokortikoidrezeptor interagieren oder gleichzeitig zytotoxische Komponenten enthalten. Die Fraktionen mit der stärksten LNCaP-Proliferationssteigerung sind in Tabelle 22 und in Abbildung 55 dargestellt.

Tabelle 22: Fraktionen mit der stärksten LNCaP-Proliferationssteigerung

<i>Fraktionsbezeichnung</i>	<i>Pflanze</i>	<i>Fraktion</i>
BOC270 CBA 2A	<i>Cibotium barometz</i>	Acetonfraktion
BOC270 CBA 4R	<i>Cibotium barometz</i>	Rohextrakt (methanolisch)
BOC267 HCH 1H	<i>Heteropterys chrysophylla</i>	Hexanfraktion
BOC370 TRG H	<i>Trimeria grandifolia</i>	Hexanfraktion
BOC370 TRG E	<i>Trimeria grandifolia</i>	Ethylacetatfraktion
BOC370 TRG EtOH	<i>Trimeria grandifolia</i>	Rohextrakt (ethanolisch)
BOC378 TRE E	<i>Trichilia emetica</i>	Ethylacetatfraktion

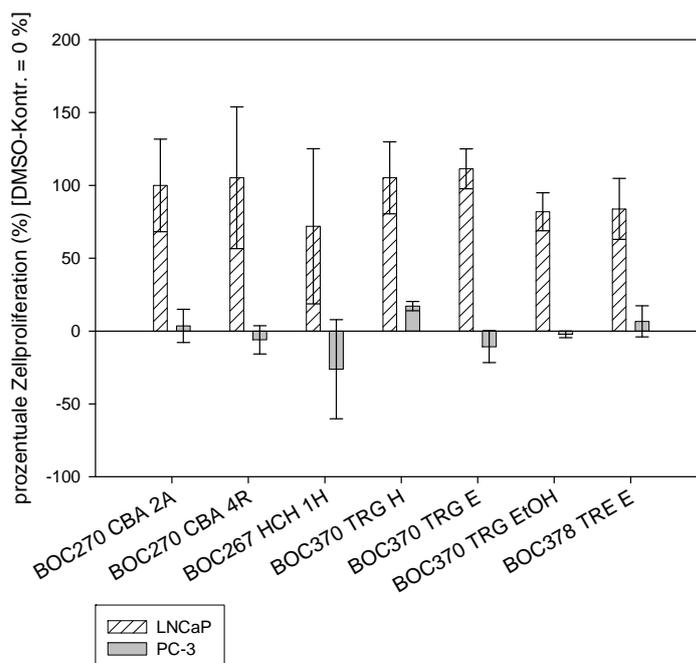


Abbildung 55: Fraktionen mit der stärksten LNCaP-Proliferationssteigerung

Die Fraktionen der kenianischen Pflanzen *Trimeria grandifolia* (Hexanfraktion BOC370 TRG H, Ethylacetatfraktion BOC370 TRG E) und *Trichilia emetica* (Ethylacetatfraktion BOC370 TRE E) weisen zwar hohe LNCaP-Proliferationswerte ohne große Schwankungen auf, aber leider war für die weitergehende Analyse nicht ausreichend Pflanzenmaterial vorhanden. Die Proliferationswerte von *Heteropterys chrysophylla* (Hexanfraktion BOC267 HCH 1H) waren sehr starken Schwankungen unterworfen. Mit zunehmender Anzahl von Versuchen, nahmen die Proliferationswerte ab. Eventuell fand hier mit der Zeit ein Zersetzungsprozess statt. Für die weitere Bearbeitung wurde *Cibotium barometz* ausgewählt, da die Werte für die zwei Fraktionen ausreichend stabile und konzentrationsabhängige Ergebnisse lieferten und ausreichendes Material für die fortführende Analytik zur Verfügung stand (Fraktionierungsschema siehe Anhang Teil F, Abb. 82).

Tabelle 23: Extrakte und Fraktionen mit statistisch signifikanter Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen und nicht signifikantem Effekt an PC-3-Zellen bzw. mit vermindertem Wachstum der PC-3-Zellen

Organismus	Fraktion	Proliferation %	
		LNCaP	PC-3
<i>Aglaiia gigantea</i>	LAW539 H	8 ± 1	- 80 ± 3
	LAW539 M	20 ± 7	- 17 ± 14
<i>Artemisia afra</i>	BOC377 ARA H	58 ± 40	- 99 ± 0,1
	BOC377 ARA A	125 ± 13	- 84 ± 1
	BOC377 ARA M	58 ± 11	- 2 ± 6
<i>Bumelia sartorum</i>	500 µg/ml	150 ± 3	- 53 ± 1
	100 µg/ml	18 ± 6	- 73 ± 2
<i>Carthamus tinctorius</i>	BOC245 1H	16 ± 18	1 ± 10
	BOC245 1E	18 ± 17	- 4 ± 12
	BOC245 1A	22 ± 12	- 12 ± 15
	BOC245 2A	19 ± 18	9 ± 8
<i>Cibotium barometz</i>	BOC270 CBA 1E	35 ± 17	- 13 ± 10
	BOC270 CBA 1A	38 ± 21	- 20 ± 21
	BOC270 CBA 1M	45 ± 28	- 25 ± 15
	BOC270 CBA 2H	16 ± 14	- 21 ± 26
	BOC270 CBA 2A	100 ± 32	4 ± 11
	BOC270 CBA 2M	44 ± 15	- 8 ± 9
	BOC270 CBA 3R	49 ± 21	- 18 ± 12
	BOC270 CBA 4R	105 ± 49	- 6 ± 10

<i>Cortinarius brunneus</i>	BOC275 CBR 1H	35 ± 24	9 ± 12
<i>Cyrtomium falcatum</i>	BOC269 CFA 1M	13 ± 3	- 62 ± 2
<i>Excoecaria bussei</i>	BOC371 EXB H	77 ± 36	n.b.
	BOC371 EXB A	47 ± 3	n.b.
	BOC373 EXB EtOH	118 ± 24	- 32 ± 33
<i>Heteropterys chrysophylla</i>	BOC267 HCH 1H	72 ± 53	- 26 ± 34
	BOC267 HCH 1E	10 ± 7	- 23 ± 13
	BOC267 HCH 1A	29 ± 10	- 21 ± 13
<i>Monanthes buchananii</i>	BOC375 MOB A	46 ± 17	- 10 ± 4
<i>Polygonum multiflorum</i>	BOC268 PMU 1E	40 ± 4	- 15 ± 12
	BOC268 PMU 1A	41 ± 6	- 32 ± 3
	BOC268 PMU 2A	26 ± 13	- 5 ± 10
	BOC268 PMU 3R	14 ± 5	- 62 ± 9
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	BOC251 SMI 1E	49 ± 29	- 84 ± 5
	BOC251 SMI 1A	30 ± 23	- 49 ± 12
	BOC251 SMI 2E	33 ± 61	- 76 ± 4
	BOC251 SMI 2A	13 ± 14	- 13 ± 17
<i>Suregada zanzibariensis</i>	BOC374 SUZ E	178 ± 19	- 81 ± 4
	BOC374 SUZ A	121 ± 36	- 58 ± 7
<i>Teclea nobilis</i>	BOC377 TEN E	16 ± 3	- 35 ± 3
	BOC377 TEN A	45 ± 11	- 12 ± 22
<i>Trichilia emetica</i>	BOC378 TRE E	84 ± 21	7 ± 11
<i>Trimeria grandifolia</i>	BOC370 TRG H	105 ± 25	17 ± 3
	BOC370 TRG E	111 ± 14	- 11 ± 11
	BOC370 TRG A	112 ± 18	- 9 ± 5
	BOC370 TRG EtOH	82 ± 13	- 2 ± 2
<i>Turraea cornucopia</i>	BOC371 TUC H	37 ± 17	- 99 ± 1
	BOC371 TUC A	24 ± 11	- 12 ± 3
	BOC371 TUC M	17 ± 5	- 9 ± 1

3.3.2.4 *Cibotium barometz*

Für die nachfolgende Analytik wurde ein methanolischer Rohextrakt von *Cibotium barometz* aus Vietnam verwendet. Der mittels Gradientenextrographie fraktionierte methanolische Extrakt (Fraktionierungsschema siehe Anhang Teil F, Abb. 84, mittlerer Teil) zeigte vergleichbare Proliferationswerte wie die Extrakte und Fraktionen der Originalpflanzenprobe. Alle Proben dieses Extraktes sind mit dem Probenamen LAW540 versehen worden. Der Ethylacetat- und Methanolextrakt der LAW540-Proben zeigte keine Proliferationsminderung bei den PC-3-Zellen.

Wie in Abbildung 56 sichtbar wird, lässt sich die proliferationssteigernde Wirkung des LAW540-Extraktes durch Bicalutamid (**30**) und durch Fulvestrant (**60**) inhibieren. Dies deutet auf eine Aktivierung des mutierten AR in LNCaP-Zellen hin. Eine östrogen- oder glukokortikoidartige Wirkung ist unwahrscheinlich, da keine statistisch signifikante Verringerung der PC-3-Zellzahl gemessen werden konnte. Bei gleichzeitiger Gabe von Testosteron (**2**) 1nM ist allerdings keine Verminderung der durch Testosteron (**2**) stimulierten Proliferation durch LAW540 zu beobachten. Eine antiandrogene Wirkung am mutierten AR in LNCaP-Zellen ist somit auszuschließen. Insgesamt deuten die LNCaP- und PC-3-Zellproliferationsdaten auf ein Eingreifen in die hormonellen Signalwege der LNCaP-Zellen hin. Eine eindeutige Aussage, ob die Inhaltsstoffe dieses Extraktes am Androgenrezeptor binden, ist nicht möglich. Durch weiterführende Untersuchungen, wie z. B. die Expression androgenabhängiger Gene können aussagekräftigere Ergebnisse erhalten werden (Kap. 3.5).

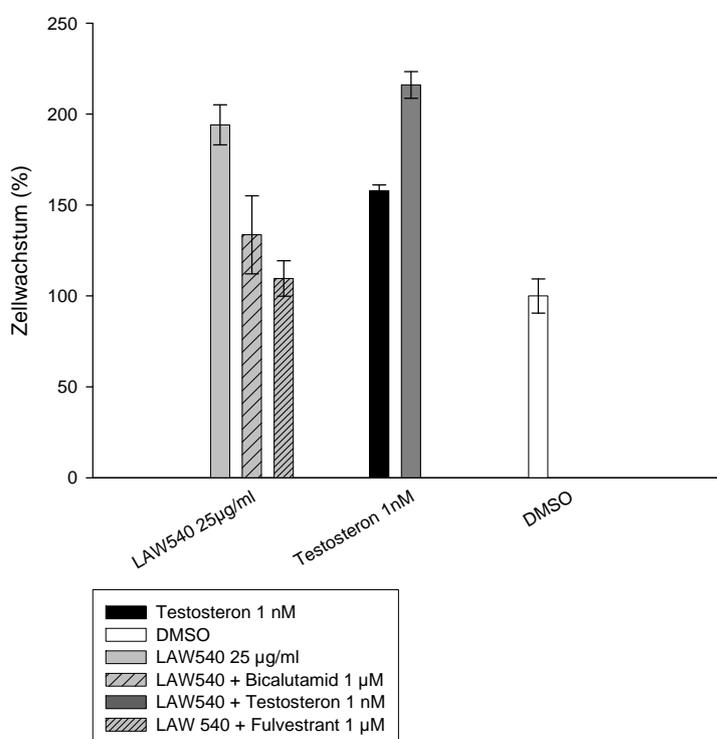


Abbildung 56: Wirkung von Bicalutamid (**30**), Fulvestrant (**60**) und Testosteron (**2**) auf die durch LAW540 vermittelte LNCaP-Zellproliferation

Um die proliferative Wirkung des Extraktes LAW540 stärker auf bestimmte Fraktionen eingrenzen zu können, wurde der methanolische Extrakt LAW540 mittels HPLC an einer RP18-Säule mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten präparativ getrennt, um zu sehen, in welchem Polaritätsbereich die proliferationssteigernden Fraktionen liegen (Abb. 57). Es wurden 17 Fraktionen LAW540-1 bis LAW540-17 gewonnen (Fraktionierungsschema siehe Anhang Teil F, Abb. 83). Die polareren Fraktionen LAW540-3 bis LAW540-6 zeigen eine sehr starke proliferationsfördernde Wirkung, die teilweise sogar über der von 1 nM Testosteron (**2**) liegt. Im unpolaren Bereich ist nach Fraktionen ohne Aktivität wieder ein proliferativer, aber schwächerer Effekt von fünf Fraktionen LAW540-11 bis LAW540-15 zu finden. Davon zeigen aber nur die Fraktionen LAW540-11, LAW540-14 und LAW540-15 eine statistische Signifikanz. Die Wirkung erstreckt sich über zwei Polaritätsbereiche. Das deutet auf eine Substanzklasse hin, die eventuell als Konjugat mit anderen niedermolekularen Substanzen, wie z. B. Zuckern, vorkommt. Die Aktivität zieht sich auch jeweils über mehrere aneinandergrenzende Fraktionen. Das bedeutet, dass es viele ähnliche Moleküle gibt, die sich so nicht ausreichend trennen lassen.

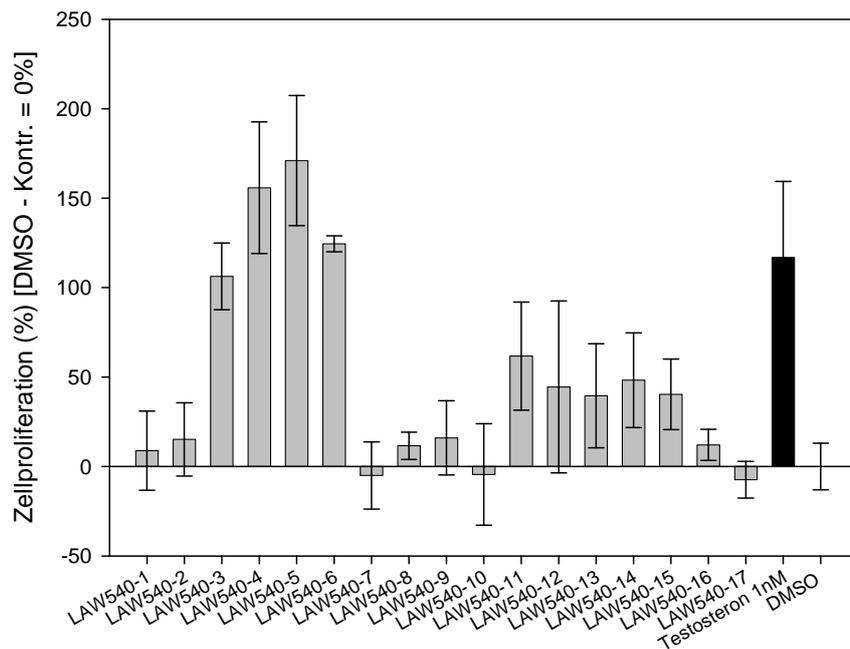


Abbildung 57: Einfluss der LAW540-HPLC-Fractionen auf das LNCaP-Wachstum

Die HPLC-Fraktion LAW540-5 des LAW540-Extraktes zeigt die stärkste proliferative Wirkung. Durch DC-Analytik wurde festgestellt, dass sich die Komponenten der acetonischen Fraktion LAW540_A und der Ethylacetatfraktion LAW540_E verglichen mit der HPLC-Fraktion LAW540-5 sehr ähneln. Diese wurden vereinigt und 1 Gramm dieser Probe der Säulenchromatographie mittels Sephadex LH20 unterzogen (Fraktionierungsschema siehe Anhang Teil F, Abb. 84).

Die so erhaltenen Fraktionen wurden am Proliferationsassay getestet. In Abbildung 58 ist ersichtlich, dass die Fraktionen BOC414_242_380, BOC414_381_480, BOC414_481_540 und BOC414_541_660 eine starke und signifikante proliferationssteigernde Wirkung an den LNCaP-Zellen haben. Von diesen vier Fraktionen weist nur BOC414_381_480 eine Reduktion der PC-3-Zellproliferation auf. Die proliferationssteigernde Wirkung nimmt mit abnehmender Molekülgröße zu, denn diese werden in dem vernetzten Dextrangel zuletzt von der Säule eluiert. Nur die letzte Fraktion zeigt eine Abnahme der proliferierenden, aber immer noch statistisch signifikanten Wirkung. Diese interessanten letzten vier Fraktionen zeigen mit abnehmender Molekülgröße der Fraktionsbestandteile eine zunehmende Verringerung des additiven proliferativen Effektes von durch Testosteron (**2**) stimulierten LNCaP-Zellen (Abb. 59). Nur die letzte Fraktion BOC414_541_660 zeigt eine statistisch signifikante Verringerung des Zellwachstums von durch Testosteron (**2**) stimulierten LNCaP-Zellen im Vergleich zur Testosteron-Kontrolle. Diese Fraktion ist hinsichtlich ihrer potentiellen antiandrogenen Wirkung interessant.

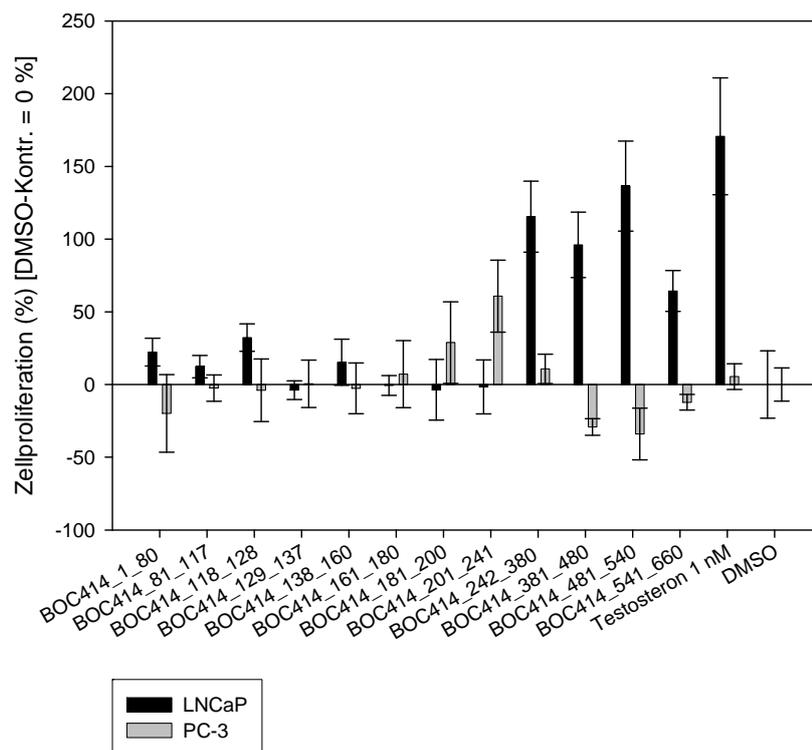


Abbildung 58: LNCaP- und PC-3-Zellproliferationswerte der LAW540-Fraktionen nach Säulenchromatographie

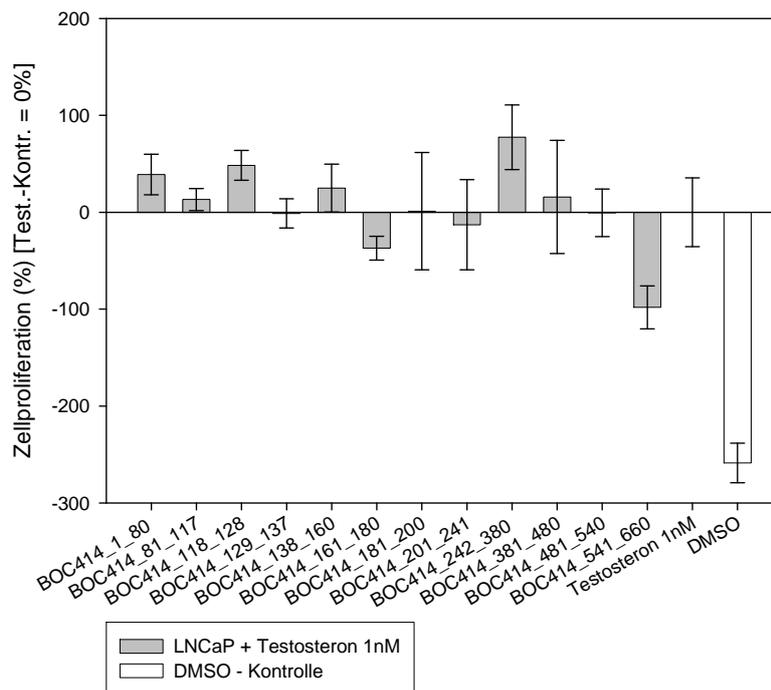


Abbildung 59: Einfluss der LAW540-Säulenchromatografiefraktionen auf durch Testosteron (2) stimulierte LNCaP-Zellen

Vergleich mit der Wirkung von *Cibotium regale*- und *Cibotium schiedei*-Extrakten

Cibotium barometz (chin.: Gou Ji; engl.: Scythian Lamb, golden chicken fern, wolly fern) ist in Südostasien beheimatet (Abb. 60). Das Rhizom dieses Baumfarnes wird in der traditionellen chinesischen Medizin zur Unterstützung bei der Heilung von Knochen und Gelenken, bei Beschwerden des Rückens und des Knies, gegen Inkontinenz und Scheidenausfluss eingesetzt¹⁶⁹.



Abbildung 60: Junger Baumfarn, *Cibotium barometz*

Um zu überprüfen, ob andere Baumfarne derselben Gattung eine ähnliche Wirkung an den LNCaP- und PC-3-Zellen aufweisen, wurden Extrakte von den Rhizomen der in Südamerika beheimateten Spezies *Cibotium regale* (Abb. 61a)) und *Cibotium schiedei* (Abb. 61b)) hergestellt, fraktioniert und im Zellproliferationsassay getestet.

a)



b)



Abbildung 61: Rhizome von a) *Cibotium regale* und b) *Cibotium schiedei*

Die Fraktionen dieser zwei *Cibotium*-Arten zeigen bis auf die methanolischen Fraktionen, verglichen mit den *Cibotium-barometz*-Fraktionen, ein ähnliches Verhalten (Abb. 62).

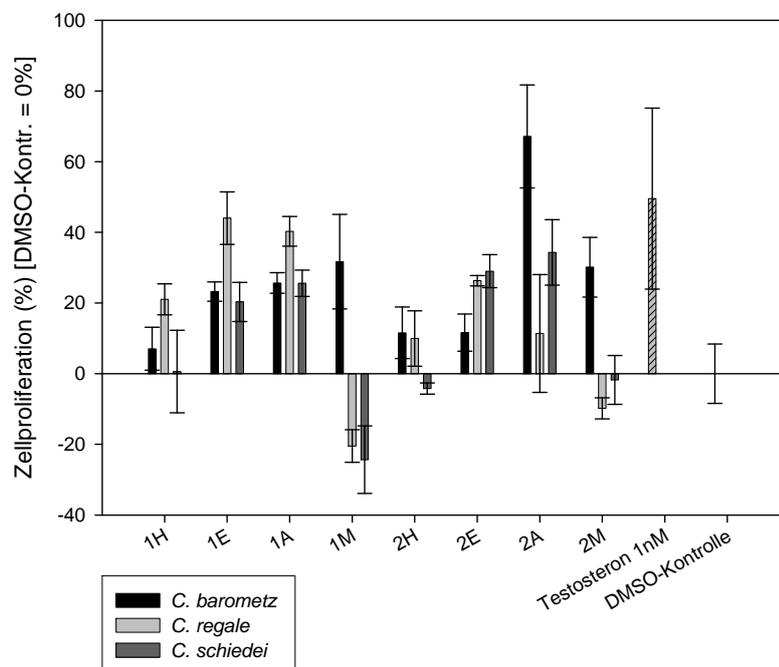


Abbildung 62: Vergleich der Wirkungen der *C. barometz*-, *C. regale*- und *C. schiedei*-Fraktionen auf die LNCaP-Zellproliferation

Die Hexan-, Ethylacetat- und Acetonfraktion des *C.-regale*-Extraktes stimulieren die LNCaP-Zellproliferation stärker als die entsprechenden Fraktionen des *C.-barometz*-Extraktes. Auffällig ist, dass die methanolischen Fraktionen sowohl des MTBE/EtOH-Extraktes (1M) als auch des MeOH-Extraktes (2M) von *C. barometz* eine proliferationssteigernde Wirkung aufweisen, während die entsprechenden Fraktionen von *C. regale* und *C. schiedei* eine mehr oder weniger deutliche Zellzahlverminderung bewirken. Ein Vorkommen zytotoxischer Komponenten ist in den *C.-regale*- und *C.-schiedei*-Fraktionen zu vermuten, da auch bei den PC-3-Zellen eine deutliche Verminderung der Zellzahl bei diesen Fraktionen eingetreten ist. Tatsächlich wird dies auch in einer Publikation von Creasey aus dem Jahre 1969 für *Cibotium schiedei* bestätigt¹⁷⁰. Die wässrige Fraktion des methanolischen Extraktes der Blätter von *Cibotium schiedei* inhibierte in einem *in-vivo*-Versuch das Wachstum von Tumoren in Mäusen. Leider ist eine strukturelle Aufklärung der dafür verantwortlichen Substanz nicht erfolgt. Für *Cibotium regale* und *Cibotium barometz* ist keine Antitumoraktivität in der Literatur dokumentiert. Extrakte der Blätter von *Cibotium barometz* weisen eine antioxidative und antibakterielle Wirkung auf¹⁷¹. Eine antioxidative Wirkung des Extraktes des Rhizomes von *Cibotium barometz* wird auch bei Ryu *et al.* beschrieben¹⁷². Zurückzuführen ist dies sicherlich auf das verstärkte Vorkommen von Polyphenolen in verholzten Pflanzenteilen, wie einem Rhizom. Ein Extrakt des Rhizoms von *Cibotium barometz* bewirkt laut Li *et al.* außerdem eine Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes bei Mäusen mit adjuvanter Arthritis¹⁷³. Über eine genaue Aufklärung des Mechanismus, die Art der Applikation oder die verantwortliche chemische Substanz wird allerdings nicht berichtet. Über Wirkungen von *Cibotium*-Extrakten an Prostatakrebszellen ist in der Literatur nichts dokumentiert. Von Murakami *et al.* wurden die Pterosinderivate Onitin (**100**), die Glykoside Onitin-2'-O- β -D-glukosid (**101**) und Onitin-2'-O- β -D-allosid (**102**), sowie Pterosin R (**103**) aus den oberen Pflanzenteilen von *Cibotium barometz* isoliert und charakterisiert¹⁷⁴. Aus den Wurzeln von *Cibotium barometz* wurden von Kim *et al.* ebenfalls das Pterosinderivat Onitin (**100**), das β -Sitosterolglucosid Daucosterol (**104**) und Shinbarometin (**105**, Abb. 63) als Inhaltsstoffe isoliert¹⁷⁵. Shinbarometin (**105**) fördert die neuronale Regeneration an mit Nogo-A induzierten Neuroblastomazellen.

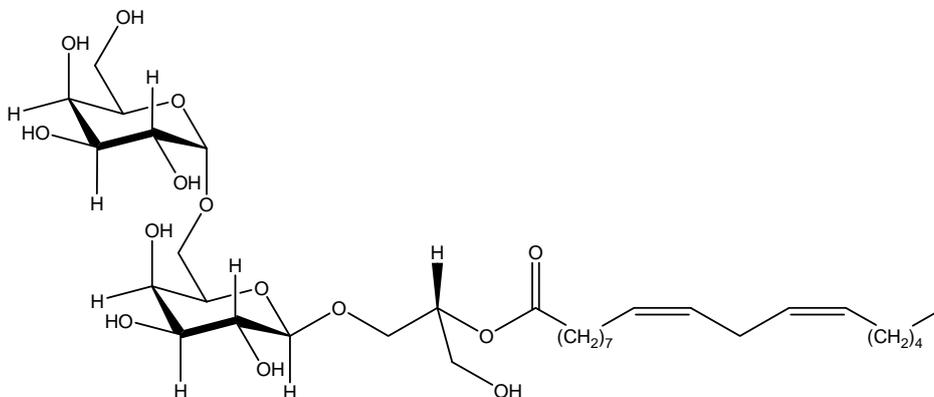


Abbildung 63: Shinbarometin (**105**)

Es wurden außerdem die Protocatechusäure (**106**), 5-Hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyd (**107**), β -Sitosterol (**57**), Stearinsäure (**40**) und Kaffeesäure (**108**) als Inhaltsstoffe des *Cibotium-barometz*-Rhizomes identifiziert^{176;177}.

Die Ethylacetatfraktion LAW540_E wurde mittels präparativer Umkehrphasenchromatographie fraktioniert (ACN/H₂O, 5 %→60 %, 20 min). Als Hauptinhaltsstoff von LAW540_E konnte aus der Fraktion LAW540_E11 die Verbindung Onitin (**100**, Abb. 64) isoliert werden (Fraktionierungsschema siehe Anhang Teil F, Abb. 85).

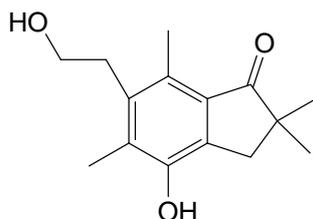


Abbildung 64: Onitin (**100**)

Zur Identifizierung der Substanz wurden die ¹H-NMR-Spektroskopie und die hochauflösende Massenspektrometrie herangezogen (siehe Anhang Teil E). Onitin (**100**) wurde im Androgenrezeptor-Fluoreszenzpolarisationsbindungsassay getestet. Leider wurde die Totalintensität während des Assays durch Onitin (**100**) verändert, so dass eine Aussage über die Bindungsfähigkeit von Onitin (**100**) an den Androgenrezeptor nicht getroffen werden kann.

3.3.3 Potentielle antiandrogene Effekte

Potentielle antiandrogene Effekte lassen sich durch eine verminderte Zellproliferation der durch Testosteron (**2**) stimulierten LNCaP-Zellen feststellen. Die PC-3-Zellproliferation sollte dabei unbeeinflusst bleiben. Dieser antiandrogene Effekt kann sowohl auf eine kompetitive Inhibierung der Ligandenbindungsdomäne des mutierten AR, eine Hemmung von Enzymen, die im Steroidmetabolismus eine Rolle spielen, der Herunterregulation von AR-mRNA oder einer gehemmten Translokation des Ligand-AR-Komplexes zurückzuführen sein. Eine Beteiligung der AR-Bindung als Ursache dieser Wirkung kann nachfolgend durch den AR-Bindungsassay festgestellt werden.

3.3.3.1 Reinsubstanzen

In Tabelle 24 sind alle 21 Substanzen, die einen statistisch hochsignifikanten potentiell antiandrogenen Effekt an den LNCaP-Zellen zeigen, aufgelistet. Sie enthält die Proliferationswerte der Substanzen bei einer Konzentration von 10 μ M.

Tabelle 24: Substanzen mit verminderter LNCaP-Zellproliferation während Testosteronzugabe 1nM

Substanz		Proliferation (%)		AR Aktivität
Name bzw. 3LC	MolID	LNCaP	PC-3	
MAD969 (109)	1593	- 30 ± 18	17 ± 4	k.A.
MAD955 (110)	1790	- 25 ± 4	8 ± 8	78 ± 4 %
MAD952 (111)	1789	- 83 ± 4	69 ± 7	22 ± 11 µM
MAD958 (112)	1786	- 97 ± 7	103 ± 4	s.A.
MAD961 (113)	1781	- 22 ± 9	-9 ± 2	k.A.
MAD968 (74)	1594	- 146 ± 5	8 ± 4	s.A.
MAD980 (90)	1587	- 58 ± 9	18 ± 13	66 ± 21 %
QDM237 (114)	2668	- 56 ± 14	26 ± 8	s.A.
TPT094 (115)	1988	- 18 ± 5	25 ± 6	k.A.
TPT095 (116)	1990	- 92 ± 14	25 ± 8	s.A.
TPT097 (117)	1992	- 17 ± 12	4 ± 9	s.A.
TPT100 (118)	1995	- 41 ± 13	20 ± 5	s.A.
TPT101 (119)	1996	- 44 ± 5	19 ± 5	s.A.
XSA006 (120)	1885	- 19 ± 10	10 ± 6	k.A.
NHV015 (121)	1124	- 49 ± 1	2 ± 10	Eigenfluoreszenz
QDM507 (122)	3126	- 11 ± 8	14 ± 16	s.A.
QDM501 (123)	3111	- 35 ± 5	-6 ± 5	k.A.
ZAB000 (124)	535	- 2 ± 3	100 ± 24	66 ± 6 %
ZAB000 (82)	496	- 16 ± 3	-33 ± 55	s.A.
XSA164 (125)	2415	- 20 ± 3	1 ± 13	18 ± 4 µM
XSA134 (126)	2573	- 79 ± 15	- 90 ± 2	4 ± 0,5 µM
<hr/>				
Finasterid (58)		- 48 ± 3	10 ± 12	n.b.
Bicalutamid (30)		- 125 ± 10	5 ± 6	97 ± 2 %

n.b. = nicht bestimmt

k.A. = keine Aktivität (relative prozentuale Bindungsaffinität bei 100 µM < 10 %)

s.A. = schwache Aktivität (relative prozentuale Bindungsaffinität bei 100 µM < 50 %)

angegeben sind bei AR Aktivität die relativen Bindungswerte bei 100 µM Substanzkonzentration im Verhältnis zur maximalen Verdrängung der DHT-Positivkontrolle in % oder der IC₅₀-Wert in µM

Aufgenommen wurden auch solche Substanzen, die eine Proliferationssteigerung der PC-3-Zellen bewirkten, da das auf eine mögliche Interaktion mit dem XTT-Reagenz zurückzuführen sein könnte. Diese Vermutung hat sich durch die nachfolgende Analyse mittels AR-Bindungsassay bestätigt. Von den 21 Substanzen konnten 6 als Binder am Androgenrezeptor bestätigt werden (**110**, **111**, **90**, **124**, **125**, **126**). Von diesen 6 Substanzen wiesen drei eine statistisch signifikante Proliferationssteigerung der PC-3-Zellen auf (**111**, **90**, **124**). XSA134 (**126**) wurde im AR-Bindungsassay getestet, obwohl sie eine Verminderung der PC-3-Zellzahl verursachte. Für XSA134 (**126**) war von den 6 identifizierten AR-Bindern der beste IC₅₀-Wert nachweisbar. Bei weiterer Untersuchung der Bindungsaktivität von XSA134 (**126**) konnte eine Kreuzreaktivität zum ER α und GR im submikromolaren und nanomolaren Bereich festgestellt werden (siehe Kapitel 3.4.4). Das bestätigt die Vermutung, dass Substanzen, die gleichzeitig die durch Testo-

steron (2) stimulierte LNCaP-Zellproliferation und die PC-3-Zellproliferation inhibieren, sowohl mit dem Androgenrezeptor als auch mit dem Östrogen- bzw. Glukokortikoidrezeptor interagieren.

3.3.3.2 Extrakte und Fraktionen

Für 11 Fraktionen von 6 Organismen konnte eine Verminderung der durch Testosteron (2) stimulierten LNCaP-Zellproliferation festgestellt werden (Tab. 25). Dabei wurden nur die Fraktionen ausgewählt, die keine statistisch signifikante Verminderung der PC-3-Zellproliferation zeigten, da in Pflanzenextrakten häufig Stoffe vorkommen, die mit dem Östrogenrezeptor interagieren können.

Tabelle 25: Extrakte und Fraktionen mit verminderter LNCaP-Zellproliferation während Testosteronzugabe 1 nM

Organismus	Fraktion	Konzentration	Proliferation %	
			LNCaP	PC-3
<i>Bumelia sartorum</i>	Wässriger Rohextrakt	1 µg/ml	-25 ± 11	6 ± 5
	BOC356_2E	25 µg/ml	-103 ± 26	30 ± 17
	QBR007	25 µg/ml	-56 ± 14	8 ± 8
<i>Cibotium barometz</i>	LAW540 3M	25 µg/ml	-35 ± 2	-7 ± 9
	BOC414_541_660	25 µg/ml	-98 ± 22	-12 ± 5
<i>Cortinarius speciosissimus</i>	BOC274 CSP 3R	25 µg/ml	-32 ± 7	-11 ± 11
<i>Cyrtomium falcatum</i>	BOC269 CFA 2E	25 µg/ml	-17 ± 4	7 ± 12
<i>Nephrolepis exaltata</i>	BOC263 NEX 2A	25 µg/ml	-86 ± 19	-27 ± 19
	BOC263 NEX 2M	25 µg/ml	-71 ± 30	-43 ± 16
	BOC371 TUC 4R	25 µg/ml	17 ± 5	29 ± 12
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	BOC251 SMI 2AH	25 µg/ml	-51 ± 34	-2 ± 31

Der wässrige Rohextrakt von *Bumelia sartorum* zeigte schon bei einer Konzentration von 1 µg/ml eine statistisch signifikante Verminderung der durch Testosteron (2) induzierten Zellproliferation und wurde deshalb näher untersucht.

3.3.3.3 *Bumelia sartorum*

Bumelia sartorum, in Brasilien auch als Qixabeira bezeichnet, wird in der traditionellen brasilianischen Medizin äußerlich als wässriger Extrakt der Rinde gegen Mykosen eingesetzt. Eine solche antifungische Aktivität konnte für *Bumelia sartorum* aber nicht nachgewiesen werden¹⁷⁸. Allerdings wurde eine hypoglykämische Aktivität¹⁷⁹ und eine antientzündliche Aktivität¹⁸⁰ für den ethanolischen Extrakt der Rinde von *Bumelia sartorum* bestätigt. Für polyphenolische Verbindungen, Sterole, Tocopherole und Saponine des nativen Arganöls des Arganbaums *Argania spinosa*, der ebenfalls wie *Bumelia sartorum* zur Familie der Sapotaceae gehört, ist eine antiproliferative Wirkung an den Prostatakrebszellen DU145, LNCaP und PC-3 nachgewiesen worden^{181;182}.

Tabelle 26: Zellproliferationsdaten des wässrigen Extraktes von *Bumelia sartorum*

Konzentration <i>Bumelia sartorum</i>	LNCaP		PC-3
	Zellproliferation (%)	Inhibierung der Testosteron (2) vermittelten Zellproliferation (%)	Zellproliferation (%)
100 µg/ml	3 ± 4	- 102 ± 7	- 46 ± 0,6
50 µg/ml	- 12 ± 6	- 126 ± 4	- 31 ± 2
1 µg/ml	6 ± 5	- 25 ± 11	- 3 ± 6
100 ng/ml	- 19 ± 3	- 23 ± 11	- 13 ± 7

Die Testung und anschließende statistische Prüfung ergab eine Inhibierung der Testosteron (**2**) vermittelten Proliferation der LNCaP-Zellen (Testosteronzugabe 1 nM) (Tab. 26). Besonders deutlich wird das bei der Testkonzentration von 1 µg/ml. In höheren Konzentrationen wird auch das Wachstum von PC-3-Zellen gehemmt. Da hier ein Rohextrakt vorliegt, könnten eventuell ebenfalls vorhandene zytotoxische Substanzen oder eine Interaktion von Substanzen mit den anderen Steroidhormonrezeptoren dafür verantwortlich sein. Die Inhibierung der durch Androgene vermittelten LNCaP-Zellproliferation fällt insgesamt viel stärker aus, als die Proliferationshemmung bei den PC-3-Zellen.

Um die wirksamen Fraktionen in ihrem Polaritätsbereich stärker einschränken zu können, wurden mittels präparativer HPLC die Fraktionen BOC 356_2 A bis BOC 356_2 J gewonnen (RP18, MeOH 5 % → H₂O 80 %, 40 min). Das Fraktionierungsschema und die Elutionszeiten der einzelnen Fraktionen sind im Anhang Teil F zu finden (Abb. 81). Diese Fraktionen wurden dann der Testung am Zellproliferationsassay unterzogen (Tab. 27).

Tabelle 27: Zellproliferationsdaten der HPLC-Fractionen von *Bumelia sartorum*

BOC356_2 ...	LNCaP		PC-3
	Zellproliferation (%)	Inhibierung der Testosteron (2) vermittelten Zellproliferation (%)	Zellproliferation (%)
A	28 ± 9	39 ± 22	- 2 ± 6
B	32 ± 12	26 ± 28	13 ± 4
C	83 ± 16	20 ± 36	- 8 ± 10
D	7 ± 7	9 ± 11	- 2 ± 9
E	- 22 ± 17	- 103 ± 26	30 ± 17
F	- 34 ± 27	32 ± 25	- 67 ± 16
G	- 11 ± 13	34 ± 19	- 22 ± 21
H	16 ± 20	13 ± 18	- 3 ± 17
I	- 26 ± 10	5 ± 11	- 7 ± 27
J	- 69 ± 13	- 36 ± 16	26 ± 47

Die Fraktion BOC356_2_E zeigt eine proliferationshemmende Wirkung bei gleichzeitiger Zugabe von Testosteron (2) 1 nM. Dies deutet auf eine antiandrogene Wirkung der Fraktion hin, besonders da sie das Zellwachstum der PC-3-Zellen nicht statistisch signifikant beeinflusst. Eine allgemeine zytotoxische Wirkung und Effekte auf andere Steroidhormonrezeptoren sind hier auszuschließen.

Eine Steigerung der Anzahl der LNCaP-Zellen ist für die Fraktion BOC356_2_C nachweisbar. Damit enthält diese Fraktion potentiell am Androgenrezeptor wirksame Substanzen, denn eine proliferationssteigernde Wirkung ist sowohl für Androgene typisch, aufgrund der Punktmutation in der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors in den LNCaP-Zellen aber auch für manche Antiandrogene. In diesem Assay lässt sich für eine androgene bzw. antiandrogene Wirkweise dieser Fraktion keine eindeutige Aussage treffen.

Die HPLC-Fraktion BOC356_2_J schließt sich direkt an die Fraktion BOC356_2_E an. Vermutlich stammt ein Teil der Substanzen, der in der HPLC-Fraktion BOC356_2_J für die proliferationshemmende Wirkung verantwortlich ist, aus der HPLC-Fraktion BOC356_2_E. Eine schwache proliferationshemmende Wirkung der Fraktion BOC356_2_J ist auch unter Testosteroneinfluss zu beobachten, die allerdings nicht statistisch signifikant ist. Da sich diese Wirkung wieder nur auf die LNCaP- und nicht auf die PC-3-Zellen erstreckt, ist eine allgemeine Zytotoxizität auszuschließen.

Durch weiterführende analytische Untersuchungen haben sich Hinweise auf das Vorhandensein von Catechinen ergeben. Da aber Proanthocyanidine und andere polyphenolische Verbindungen aufgrund ihrer Struktur eine prinzipielle Affinität zu proteinartigen Verbindungen haben, sind sie für eine genauere weiterführende Analytik hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität kritisch zu sehen.

Um zu überprüfen, ob sich die Aktivität nur auf den wässrigen Extrakt der Rinde beschränkt, sind weitere Extrakte und Fraktionen von unserem Kooperationspartner Professor Kuster aus Brasilien von *Bumelia sartorum* im Zellproliferationsassay getestet worden (Tab. 28).

Tabelle 28: Testung weiterer *Bumelia sartorum* Extrakte und Fraktionen

Bezeichnung	Extrakt/Fraktion	LNCaP		PC-3
		Zellproliferation (%)	Inhibierung der Testosteron (2) vermittelten Proliferation (%)	Zellproliferation (%)
QBR004	Methanol-Extrakt	19 ± 12	16 ± 39	- 9 ± 5
QBR005	Hexan-Extrakt	7 ± 7	- 24 ± 18	- 11 ± 11
QBR006	Dichlormethan-Extrakt	22 ± 20	- 17 ± 27	- 7 ± 5
QBR007	Ethylacetat-Extrakt	35 ± 17	- 56 ± 13	- 8 ± 8
QBR008	Butanol-Extrakt	17 ± 24	23 ± 25	- 1 ± 4
QBR009	Polymere Tannine (PPT 1)	- 11 ± 9	- 25 ± 15	- 29 ± 4
QBR011	methanolunlösliche Saponine	- 5 ± 25	- 23 ± 48	- 6 ± 4
QBR012	methanollösliche Saponine	2 ± 23	21 ± 23	- 13 ± 2
Testosteron (2)		100 ± 31		- 1 ± 2

Eine zytotoxische Wirkung ist für die Fraktionen QBR009 und QBR012 (methanollösliche Saponine) nachgewiesen worden. QBR009 zeigt auch bei den LNCaP-Zellen eine Verminderung der Zellzahl, die aber statistisch nicht signifikant ist. Die Fraktion der methanollöslichen Saponine QBR012 zeigt ausschließlich bei den PC-3-Zellen eine Verminderung der Zellzahl.

Sehr interessant ist der Ethylacetatextrakt von *Bumelia sartorum* QBR007, da er eine deutliche Verminderung der durch Testosteron (2) vermittelten Proliferation zeigt. Da er das PC-3-Zellwachstum nicht signifikant beeinflusst spricht dies gegen eine allgemeine zytotoxische Komponente oder eine Beteiligung anderer Steroidhormonrezeptoren. Eine weiterführende Analyse des Ethylacetatextraktes bietet sich demzufolge an.

3.3.4 Zytotoxische Effekte

Als zytotoxisch wurden Substanzen bewertet, die alleine ohne Koinkubation mit Testosteron (2) sowohl bei LNCaP- als auch bei PC-3-Zellen eine statistisch signifikante Verminderung der Zellzahl gezeigt haben.

3.3.4.1 Reinsubstanzen

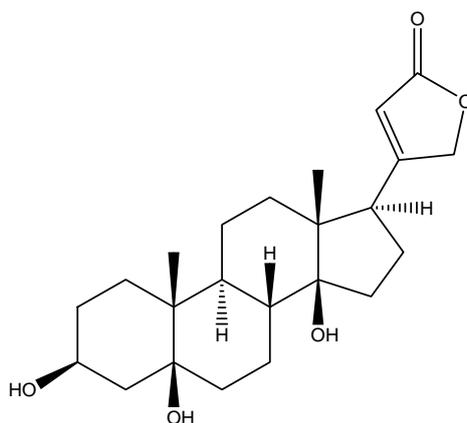
Eine statistisch hochsignifikante Zellzahlverminderung hat sich in diesem Kontext nur für vier Substanzen bestätigt (Tab. 29). Als Positivkontrollen dienten der Mitosehemmstoff Vincristinsulfat (**127**) und der Topoisomerase-II-Hemmer Etoposid (**128**). Sowohl Vincristinsulfat (**127**) als auch Etoposid (**128**) zeigten unter Assaybedingungen eine bedeutend stärkere Verminderung der PC-3-Zellzahl als der LNCaP-Zellzahl. Das ist auf die prinzipiell langsamere Zellteilung der LNCaP-Zellen unter Assaybedingungen zurückzuführen.

Tabelle 29: Zytotoxisch wirkende Substanzen

Substanz (10 μ M)		Zellproliferation %	
Name bzw. 3LC	MolID	PC-3	LNCaP
24-Epiteasteron (88)	-	-23 \pm 9	-20 \pm 6
ZHM118-10 (129)	1678	-69 \pm 9	-37 \pm 24
MMK009 (130)	1913	-92 \pm 0,6	-75 \pm 3
ZAB000 (131)	363	-67 \pm 15	-12 \pm 4
Vincristinsulfat (127)		-90 \pm 1	-27 \pm 3
Etoposid (128)		-74 \pm 5	-27 \pm 8

Besonders aktiv ist die Verbindung 17 α -H-Periplogenin (MMK009) (**130**, Abb. 65). Sie ist von Myint Myint Khine aus der Pflanze *Streptocaulon tomentosum* isoliert worden

183

Abbildung 65: MMK009 (**130**)

Die Verbindung gehört zur Gruppe der Cardenolide und ist ein 5-Hydroxyderivat des Digitoxigenins. Die tumorspezifische Zytotoxizität von Cardenoliden im Allgemeinen

und von 17 α -H-Periplogenin im Speziellen wurde gegenüber anderen Zelllinien bestätigt^{183;184}.

3.3.4.2 Extrakte und Fraktionen

In Tabelle 30 sind 14 Fraktionen aus 7 Organismen aufgelistet, die als zytotoxisch einzustufen sind.

Tabelle 30: Zytotoxisch wirkende Extrakte bzw. Fraktionen

Organismus	Fraktion (25 μ g/ml)	Proliferation %	
		PC-3	LNCaP
<i>Aglaia gigantea</i>	LAW539 E	-101 \pm 0,1	-103 \pm 1
<i>Carthamus tinctorius</i>	BOC245 2 AH	-12 \pm 11	-15 \pm 13
<i>Cortinarius brunneus</i>	BOC275 CBR 2M	-39 \pm 13	-21 \pm 9
<i>Cortinarius speciosissimus</i>	BOC274 CSP 2M	-25 \pm 6	-18 \pm 6
<i>Nephrolepis exaltata</i>	BOC263 NEX 1E	-51 \pm 8	-18 \pm 3
	BOC263 NEX 1M	-59 \pm 8	-21 \pm 10
	BOC263 NEX 1AH	-147 \pm 15	-50 \pm 23
	BOC263 NEX 2H	-44 \pm 8	-20 \pm 4
	BOC263 NEX 2E	-60 \pm 8	-16 \pm 1
<i>Ozoroa insignis</i>	BOC374 OZI M	-55 \pm 4	-37 \pm 5
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	BOC251 SMI 1H	-98 \pm 2	-94 \pm 3
	BOC251 SMI 3R	-89 \pm 3	-73 \pm 5
	BOC251 SMI 2H	-97 \pm 2	-96 \pm 5
	BOC251 SMI 4R	-86 \pm 3	-63 \pm 19

Die stärkste Zytotoxizität findet sich in den Hexanfraktionen von *Salvia miltiorrhiza* und in der Ethylacetatfraktion von *Aglaia gigantea*. Wie in Kapitel 3.3.2.3 verdeutlicht, ist die zytotoxische Wirkung der lipophilen Hexanfraktionen von *Salvia miltiorrhiza* auf die Wirkung der Tanshinone zurückzuführen. *Aglaia gigantea* wurde auf seine insektizide Wirkung in der Dissertation von Duong untersucht und zeigt eine 60 %ige Mortalität gegenüber Larven von *Spodoptera littoralis*. Isoliert wurden die Putrescin-Bisamid-Derivate Dasyclamid (**132**), Grandiamid D (**133**), Gigantamid A (**134**) und das Damma-

ran-Triterpen Foveolin B (**135**)¹⁸⁵. Eine zytotoxische Wirkung gegenüber humanen Zelllinien wird in der Literatur nicht beschrieben. Für die Verbindung Zhu-xiang aus einer Formulierung, die Ginseng und *Carthamus tinctorius* enthält, wird eine antiproliferative und apoptotische Wirkung gegenüber der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 beschrieben¹⁸⁶. Allerdings geht aus dieser Publikation nicht hervor, ob diese Verbindung aus Ginseng oder *Carthamus tinctorius* stammt. Bei Rea *et al.* wurde eine zytotoxische Aktivität für den Rohextrakt aus der Rinde von *Ozoroa insignis* gegenüber Hep-G2-Zellen, MDA-MB-231-Zellen und die humane Blasenkarzinomzelllinie 5637 beschrieben¹⁸⁷. Die zytotoxische Aktivität konnte dabei den Verbindungen Anacardsäure (**136**) und Ginkgolsäure (**137**) zugeordnet werden. Für *Nephrolepis exaltata* wurde keine zytotoxische Aktivität gegenüber humanen Zelllinien in der Literatur beschrieben. Ebenso wenig sind für *Cortinarius brunneus* zytotoxische Aktivitäten dokumentiert. Die von Teichert *et al.* isolierte Verbindung Brunnein A (**138**) wurde in dem hier durchgeführten Assay getestet und zeigte keine statistisch signifikante Zytotoxizität¹⁸⁸. Die zytotoxische Wirkung muss demnach auf andere Inhaltsstoffe zurückzuführen sein. *Cortinarius speciosissimus* zeigt nur eine mäßig zytotoxische Wirkung. Das steht im Gegensatz zu der bekannten Giftwirkung dieses Pilzes, wofür der Inhaltsstoff Orellanin (**139**) verantwortlich ist. Orellanin (**139**) hemmt kompetitiv die alkalische Phosphatase und die RNA- und DNA-Synthese¹⁸⁹. Allerdings ist die Giftwirkung auf die Niere beschränkt. Da in Prostatazellen keine alkalische Phosphatase, sondern die saure Phosphatase vorkommt, wäre das eine mögliche Erklärung für die nur mäßig starke im Zellproliferationsassay gemessene Toxizität.

Weiterführende Untersuchungen der zytotoxischen Wirkung, wie z. B. ein Eingreifen in den Zellzyklus oder Messung von apoptotischer Aktivität wäre unter Berücksichtigung der Daten aus der Literatur für *Aglaia gigantea*, *Nephrolepis exaltata* und *Cortinarius brunneus* von besonderem Interesse.

3.4 Rezeptorbindungsassay

Die durch den Zellproliferationsassay als potentiell am AR wirksam eingestuft Substanzen wurden auf ihre Bindungsaffinität an die AR-LBD mittels eines auf Fluoreszenzpolarisation basierenden Rezeptorbindungsassays untersucht. Binder des AR wurden anschließend hinsichtlich einer Kreuzreaktivität mit anderen Steroidhormonrezeptoren wie dem GR, PR, ER α und ER β analysiert.

3.4.1 Validierung der Fluoreszenzpolarisations-Rezeptorbindungsassays

Die Bezeichnungen der verwendeten Rezeptorbindungsassays sind im Anhang Teil B aufgelistet (Tab. 38). Die Rezeptorbindungsassays wurden von Invitrogen hinsichtlich des Verhältnisses von Rezeptor und markiertem Ligand so optimiert, dass ein Messfenster von 100 mP zu erreichen war. Für jeden Rezeptorbindungsassay wurde überprüft, ob der erhaltene IC₅₀-Wert der Positivkontrolle mit dem theoretischen Wert des Invitrogen-Assay-Protokolls übereinstimmte (Tab. 31).

Tabelle 31: Bestimmung der IC₅₀-Werte für die Positivkontrollen

<i>Assay</i>	<i>Positivkontrolle</i>	<i>Soll- IC₅₀-Wert</i>	<i>Ist-IC₅₀-Wert</i>
AR-Bindungsassay	Dihydrotestosteron (1)	20 nM	26,4 ± 3,4 nM
ER α -Bindungsassay	17 β -Östradiol (4)	5,7 nM	11,6 ± 4 nM
ER β -Bindungsassay	17 β -Östradiol (4)	5,6 nM	4,4 ± 1,6 nM
GR-Bindungsassay	Dexamethason (55)	4,3 nM	5,6 ± 1,9 nM
PR-Bindungsassay	Progesteron (5)	33 nM	95,6 ± 2,6 nM

3.4.2 Testung der potentiellen Androgenrezeptorbinder

Tabelle 32 enthält für 29 der 35 Substanzen, die im Zellproliferationsassay eine Steigerung der LNCaP-Zellzahl hervorgerufen haben, ihre relativen Bindungsaffinitäten (RBA) und die Standardabweichung (SD). Für 11 dieser Verbindungen konnte eine relative AR-Bindungsaffinität von über 50 % bestätigt werden (grau unterlegt). Sie sind somit als Androgenrezeptorbinder einzustufen. Allerdings erwies sich die Bestimmung der IC₅₀-Werte nur für Verbindungen mit einer RBA > 80 % als lohnenswert. Für drei Verbindungen, β -Sitosterol (**57**), QDM255 (**70**) und QDM276 (**71**) wurden IC₅₀-Werte ermittelt, die in Tabelle 34 aufgelistet sind. Für sieben der Verbindungen konnten keine

Werte bestimmt werden, da sie mit der Messung der Fluoreszenzpolarisation interferieren.

Tabelle 32: Relative AR-Bindungsaffinitäten der LNCaP-zellproliferationssteigernden Substanzen

Substanz		100 μ M		10 μ M	
Name bzw. 3LC	MolID	RBA %	SD %	RBA %	SD %
β -Sitosterol (57)	-	107,9	3,7	62,4	15,3
QDM255 (70)	2669	99,6	3,7	52,1	11,0
QDM276 (71)	2670	104,0	4,2	94,0	4,9
Stigmasterol (56)	-	71,2	6,5	-0,3	7,5
24_Epicasteron (72)	-	67,3	25,6	7,9	28,7
MAD919 (73)	2113	erhöhte Totalintensität		erhöhte Totalintensität	
MAD968 (74)	1594	29,1	4,1	20,9	1,4
Trisepicasterontetraacetat (75)	-	39,2	10,9	0,6	2,3
ZAC000 (76)	1266	n.b.	-	n.b.	-
QDM101 (77)	3114	21,0	9,9	24,6	14,0
QDM103 (78)	3115	erhöhte Totalintensität		erhöhte Totalintensität	
QDM376 (79)	3118	erhöhte Totalintensität		erhöhte Totalintensität	
QDM441 (80)	3122	n.b.	-	n.b.	-
DRT173 (81)	5084	n.b.	-	n.b.	-
ZAB000 (82)	496	36,7	3,2	6,9	5,2
ZAC000 (83)	1482	72,9	7,1	15,2	4,4
ZAC000 (84)	1286	erhöhte Totalintensität		erhöhte Totalintensität	
QDM520 (85)	2671	erhöhte Totalintensität		erhöhte Totalintensität	
QDM438 (86)	2673	71,9	3,2	31,4	5,6
24-Epibrassinolid (87)	-	40,6	11,4	-1,8	12,0
24-Epiteasteron (88)	-	4,7	28,4	4,4	19,8
MAD970 (89)	1592	40,6	1,6	20,7	2,5
MAD980 (90)	1587	66,1	21,3	17,1	10,5
DBC051 (91)	1569	38,9	2,7	11,6	7,9
QDM100 (92)	3113	n.b.	-	n.b.	-
QDM407 (93)	3119	n.b.	-	n.b.	-
QDM494 (94)	3125	21,0	10,3	13,7	6,2
XSA108 (95)	2400	n.b.	-	n.b.	-
DFK043 (96)	966	erhöhte Totalintensität		erhöhte Totalintensität	
DBC032 (97)	1742	47,4	15,6	10,9	5,7
GUG333 (98)	3321	27,5	3,0	-5,5	3,6
QDM458 (99)	2672	erhöhte Totalintensität		erhöhte Totalintensität	
MAD994 (67)	1800	78,2	22,8	24,7	2,4
MAD998 (68)	1801	52,0	2,6	21,3	9,6
MAD925 (69)	1795	65,0	0,8	28,0	2,8

n.b. = nicht bestimmt

Für alle 21 Verbindungen, die eine Verminderung der durch Testosteron (**2**) stimulierten LNCaP-Zellproliferation bewirkt hatten, wurden die relativen Bindungsaffinitäten an die AR-LBD ebenfalls mittels Fluoreszenzpolarisationsassay bestimmt (Tab. 33).

Tabelle 33: Relative AR-Bindungsaffinitäten der potentiell antiandrogen wirkenden Substanzen

Substanz		100 μ M		10 μ M	
Name bzw. 3LC	MolID	RBA %	SD %	RBA %	SD %
MAD969 (109)	1593	8,8	7,3	7,3	5,9
MAD955 (110)	1790	77,7	3,8	15,2	0,7
MAD952 (111)	1789	98,5	7,0	43,4	8,0
MAD958 (112)	1786	21,7	1,6	12,9	2,4
MAD961 (113)	1781	9,6	2,0	-3,4	2,3
MAD968 (74)	1594	29,1	4,1	20,9	1,7
MAD980 (90)	1587	66,1	21,3	17,1	10,5
QDM237 (114)	2668	20,3	7,1	3,3	6,1
TPT094 (115)	1988	1,6	0,9	-2,7	1,9
TPT095 (116)	1990	32,8	4,9	-1,1	1,0
TPT097 (117)	1992	24,7	4,5	14,7	3,2
TPT100 (118)	1995	46,5	4,3	3,2	3,5
TPT101 (119)	1996	49,2	7,5	6,5	2,3
XSA006 (120)	1885	2,9	3,6	-8,3	2,3
NHV015 (121)	1124	erhöhte Totalintensität		erhöhte Totalintensität	
QDM507 (122)	3126	33,1	1,1	4,6	0,9
QDM501 (123)	3111	5,5	3,6	-2,2	5,0
ZAB000 (124)	535	65,8	6,0	33,9	7,0
ZAB000 (82)	496	36,7	3,2	6,9	5,2
XSA164 (125)	2415	72,6	7,8	25,3	4,2
XSA134 (126)	2573	57,5	1,5	77,0	6,3

Dabei zeigten die sechs Verbindungen MAD955 (**110**), MAD952 (**111**), MAD980 (**90**), ZAB000 (MolID 535, **124**), XSA164 (**125**) und XSA134 (**126**) eine relative Bindungsaffinität von über 50 % und konnten als Binder des Androgenrezeptors eingestuft werden (grau unterlegt). Von diesen sechs Verbindungen wurden für MAD952 (**111**), XSA164 (**125**) und XSA134 (**126**) die jeweiligen IC_{50} -Werte gemessen (Tab. 34). Für die Verbindung NHV015 (**121**) konnten keine Werte ermittelt werden, da die Totalintensität durch die Substanz erhöht worden ist.

In den Abbildungen 66 und 67 sind die Ergebnisse des Proliferationsassays und des nachfolgenden Androgenrezeptorbindungsassays zusammenfassend dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen der Gruppe der Substanzen mit einer hochsignifikanten Proliferationsänderung ($\alpha = 1$ %) und der Gruppe der Substanzen mit einer signifikanten Änderung ($\alpha = 5$ %) gibt.

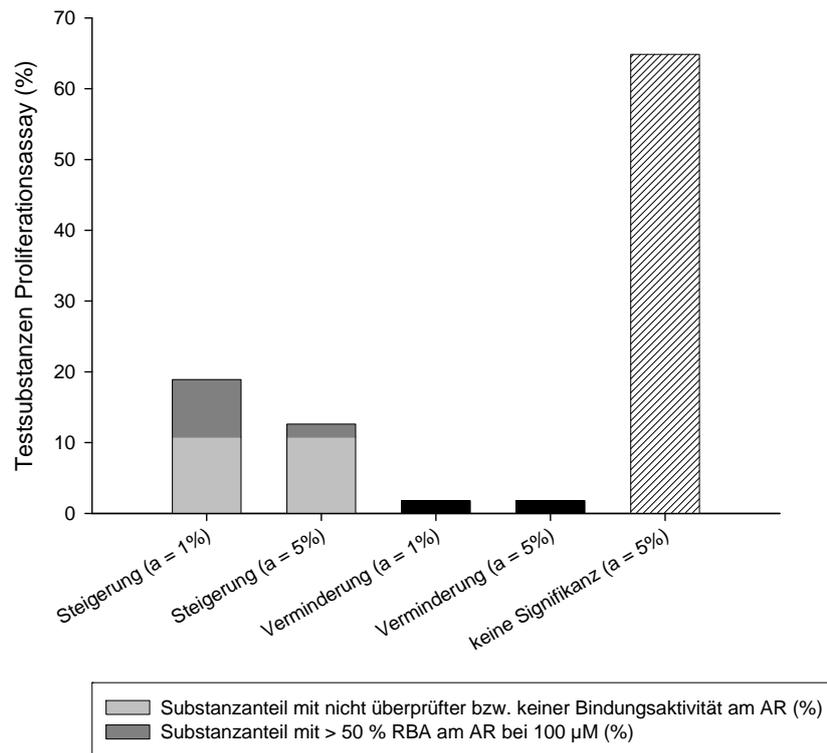


Abbildung 66: Übersicht LNCaP-Proliferationsdaten aller Testsubstanzen

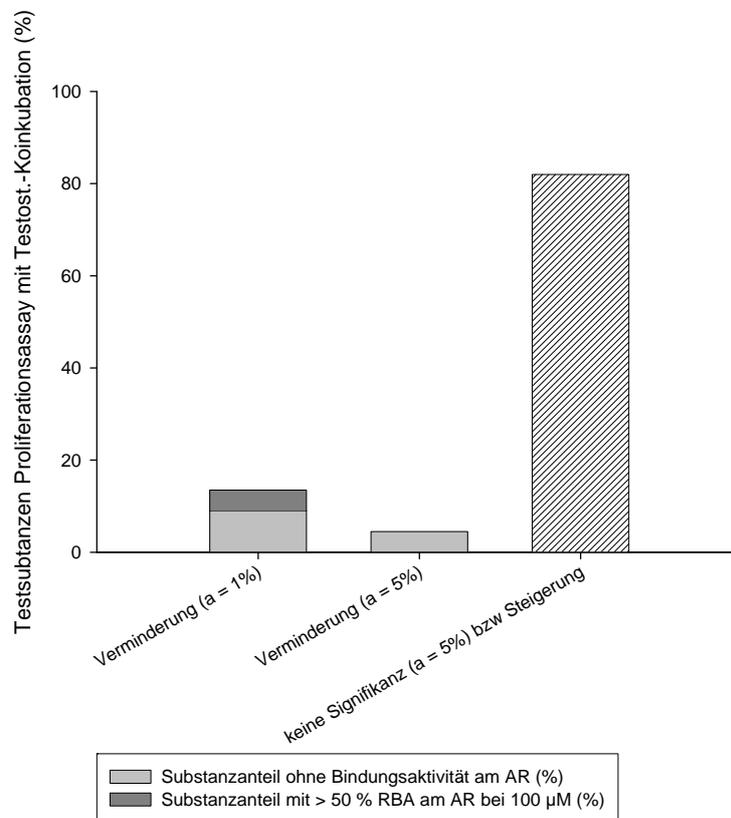


Abbildung 67: Übersicht LNCaP-Proliferationsdaten aller Testsubstanzen mit Testosteron-Koinkubation

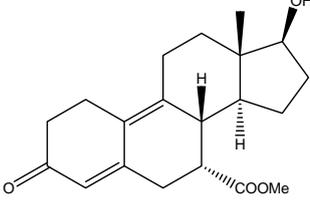
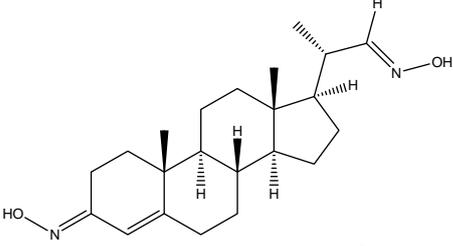
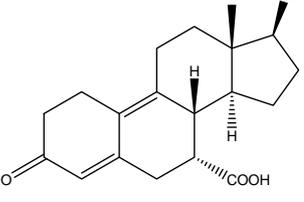
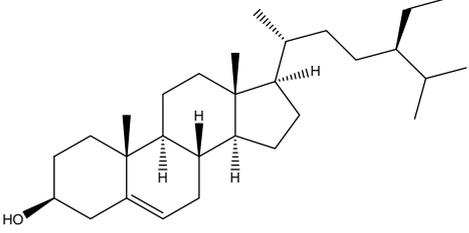
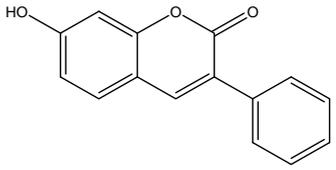
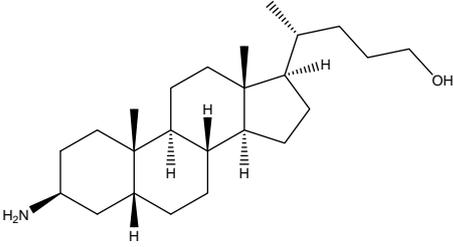
Die Gruppe der Substanzen, die eine hochsignifikante Proliferationssteigerung der LNCaP-Zellen verursacht hat, hat einen höheren Anteil von 8 % der gesamten Testsubstanzen mit einer Bindung an den AR, während die Gruppe der signifikanten Proliferationssteigerer nur einen Anteil von 1,8 % an AR-Bindern beinhaltet. Dieser Unterschied ist in noch stärkerem Maße bei den LNCaP-Zellproliferationsdaten mit Testosteron-Koinkubation (**2**) zu beobachten (Abb. 67). Androgenrezeptorbinder sind hier mit einem Anteil von 4,5 % aller Testsubstanzen nur in der Gruppe der Substanzen, die eine hochsignifikante Verminderung der LNCaP-Zellzahl unter Testosteron-Koinkubation (**2**) verursacht hatten, zu finden. Die Mehrheit der Substanzen, die im Proliferationsassay eine Steigerung der LNCaP-Zellzahl bzw. eine Verminderung der durch Testosteron (**2**) stimulierten LNCaP-Zellzahl hervorgerufen hat, wirkt allerdings nicht über eine Ligandenbindung an den AR, sondern über alternative Regulationsmechanismen, wie zum Beispiel die Cofaktor-Regulation, Bindung an den zwar gering, aber doch vorhandenen Östrogenrezeptor β oder Beeinflussung des Steroidmetabolismus.

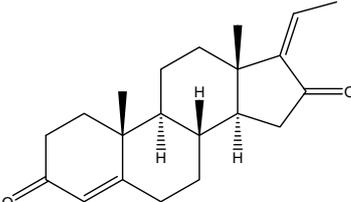
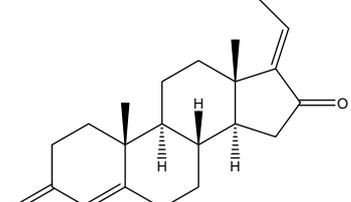
Insgesamt stellt der Proliferationsassay ein schnelles Vorscreeningsystem dar, um potentielle Binder des Androgenrezeptors zu identifizieren. Zusätzlich werden Informationen über Substanzen wie Zytotoxizität oder antiandrogene Wirkungen, die über alternative Regulationsmechanismen ablaufen, aufgedeckt. Die nachgeschaltete Überprüfung der AR-Bindungsaffinität erlaubt eine konkrete Einstufung der Substanzen in Androgenrezeptorbinder, die den im Zellproliferationsassay gemessenen Effekt über eine ligandenabhängige Reaktion des AR verursachen bzw. in Substanzen, die über alternative Mechanismen in die Hormonregulation der Zelle eingreifen.

3.4.3 Bestimmung der IC_{50} - und K_i -Werte

Die IC_{50} -Werte und die entsprechenden K_i -Werte der in der Arbeit identifizierten Androgenrezeptorbinder sind in der Reihenfolge ihrer Bindungsaffinität zusammen mit dem Hillslope in Tabelle 34 aufgeführt. Zum Vergleich enthält die Tabelle im unteren Teil die Androgenrezeptorbinder Guggulsteron Z (**140**) und Guggulsteron E (**141**), die im Rahmen einer Staatsexamensarbeit von Kristin Palberg mit denselben Methoden ermittelt worden sind¹⁹⁰. Die Substanz mit der höchsten Bindungsaffinität zur Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors, vergleichbar mit der von DHT (**1**), ist die Verbindung QDM276 (**71**). Interessanterweise bewirkt die geringe strukturelle Abwandlung durch Austausch der Methylestergruppe durch eine Carboxygruppe am C7 in QDM255 (**70**) einen starken Abfall der Bindungsaffinität. QDM255 (**70**) bindet nur noch im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Verbindungen XSA134 (**126**), QDM255 (**70**) und β -Sitosterol (**57**) weisen mäßig starke Bindungsaffinitäten im niedrigen mikromolaren Bereich auf.

Tabelle 34: Am Androgenrezeptor bindende Substanzen mit ihren Bindungsparametern

<i>Substanz</i>	<i>Struktur</i>	<i>Hillslope</i>	<i>IC₅₀-Wert (nM)</i>	<i>K_i (nM)</i>
QDM276 (71)		0,9 ± 0,2	24 ± 6	10,8
XSA134 (126)		0,9 ± 0,1	3759 ± 463	1664
QDM255 (70)		1,0 ± 0,2	4109 ± 1182	1819
β-Sitosterol (57)		1,4 ± 0,3	7048 ± 1000	3120
MAD952 (111)		0,9 ± 0,2	18278 ± 6098	8090
XSA164 (125)		0,6 ± 0,1	20742 ± 3458	9181

Guggulsteron Z (140)		$1,0 \pm 0,1$	7608 ± 1362	3368
Guggulsteron E (141)		$1,1 \pm 0,2$	9798 ± 1772	4337

Der Hillslope ist bei den meisten Substanzen annähernd 1,0 und weist damit auf eine kompetitive und reversible Bindung hin. Größere Abweichungen liegen bei β -Sitosterol (**57**) (1,43) und bei XSA164 (**125**) (0,60) vor. Diese Abweichungen liegen aber noch im normalen Bereich. Hat eine Hillslope einen viel größeren Wert als 1,0, d.h. ab 3,0, so sollten die Werte kritisch betrachtet werden¹⁹¹. Wie in Kapitel 2.6.3 erläutert können die Ursachen dafür bei einer unzureichenden Löslichkeit der Testsubstanz oder das Vorkommen von Assayartefakten sein. Diese Substanzen folgen in ihrer initialen Bindung dann nicht dem Massenwirkungsgesetz¹⁹².

3.4.4 Rezeptorbindungsassays an weiteren Steroidhormonrezeptoren

Um die Androgenrezeptorbinder auf Kreuzreaktivität mit anderen Steroidhormonrezeptoren zu überprüfen, wurde ihre Bindungsaffinität zu den jeweiligen Rezeptoren (ER α , ER β , GR und PR) mittels Fluoreszenzpolarisationsassays bestimmt. Keiner der Androgenrezeptorbinder weist eine spezifische Bindung an den AR auf. QDM276 (**71**) und QDM255 (**70**) haben aber zum Androgenrezeptor im Vergleich zu den anderen Rezeptoren die stärkste Affinität. β -Sitosterol (**57**) weist die höchste Bindungsaffinität zum GR auf ($K_i = 1,3 \mu\text{M}$). XSA134 (**126**) bindet im nanomolaren Bereich an den GR und ER α und weist damit zu diesen beiden Rezeptoren eine stärkere Affinität als zum AR auf. XSA164 (**125**) bindet an den PR mit höherer Bindungsaffinität als an den AR und ist auch ein Ligand des ER β . Interessant ist die Tatsache, dass die im LNCaP-Zellproliferationsassay antiandrogen wirkenden Substanzen XSA134 und XSA164 im Vergleich zum AR mit stärkerer Affinität an andere Steroidhormonrezeptoren binden. Eventuell ist die Interaktion mit anderen Steroidhormonrezeptoren, insbesondere mit dem GR und dem ER β , für die proliferationsmindernde Wirkung mitverantwortlich.

Rezeptorspezifische Bindungen sind hinsichtlich einer potentiellen klinischen Applikation zwar wünschenswert, um mögliche Nebenwirkungen auszuschließen, aber für steroidale Substanzen sehr unwahrscheinlich. Trotzdem können nichtspezifische Rezeptor-

binder erfolgreich in der klinischen Anwendung sein. Dies beweist das Beispiel von Cyproteronacetat (**6**), welches neben der antiandrogenen auch über eine gestagene Komponente verfügt und durch den hormonellen Rückkopplungsmechanismus den Testosteronspiegel senkt ⁷⁸. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch das neue synthetische Steroid und potentielle SARM S42 (**142**; TZP-3157; TZCL050709), das *in vivo* gewebespezifisch antiandrogene Eigenschaften besitzt und sowohl an den AR als auch den PR bindet ¹⁹³.

Tabelle 35: Identifizierte Androgenrezeptorbinder und ihre Bindungsparameter an anderen Steroidhormonrezeptoren

Substanz		AR	ER α	ER β	GR	PR
QDM276 (71)	IC ₅₀	24 ± 6 nM	14,4 ± 6,2 μ M	46,2 ± 10,4 μ M	1,6 ± 0,1 μ M	0,3 ± 0,1 μ M
	K _i	10,8 nM	3,1 μ M	13,2 μ M	123,6 nM	66,1 nM
XSA134 (126)	IC ₅₀	3,8 ± 0,5 μ M	1,0 ± 0,2 μ M	2,0 ± 0,6 μ M	0,4 ± 0,1 μ M	4,1 ± 0,5 μ M
	K _i	1,7 μ M	201,6 nM	566,1 nM	30,6 nM	827,4 nM
QDM255 (70)	IC ₅₀ /RBA (%)	4,1 ± 1,1 μ M	9,6 ± 1,6 μ M	10,1 ± 5,7 μ M	83,7 ± 33,8 %	58,0 ± 2,9 %
	K _i	1,8 μ M	2,0 μ M	2,9 μ M	-	-
β -Sito- sterol (57)	IC ₅₀ /RBA (%)	7,0 ± 1,0 μ M	27,4 ± 3,9 %	47,3 ± 12,6 %	17,5 ± 2,8 μ M	30,2 ± 9,9 μ M
	K _i	3,1 μ M	-	-	1,3 μ M	6,1 μ M
MAD952 (111)	IC ₅₀	18,3 ± 6,1 μ M	Quenching	Quenching	n.b.	n.b.
	K _i	8,1 μ M	-	-	-	-
XSA164 (125)	IC ₅₀ /RBA (%)	20,7 ± 3,5 μ M	45,9 ± 20,7 %	24,7 ± 0,8 μ M	52,4 ± 2,7 %	14,0 ± 1,1 μ M
	K _i	9,2 μ M	-	7,1 μ M	-	2,8 μ M
Guggul- steron Z (140)	IC ₅₀ /RBA (%)	7,6 ± 1,4 μ M	5,3 ± 9,3 %	2,1 ± 2,9 %	34,6 ± 21,5 %	14,7 ± 1,5 μ M
	K _i	3,4 μ M	-	-	-	3,0 μ M
Guggul- steron E (141)	IC ₅₀ /RBA (%)	9,8 ± 1,8 μ M	-0,7 ± 4,2 %	23,6 ± 7,2 %	0,2 ± 0,002 μ M	3,2 ± 0,4 μ M
	K _i	4,3 μ M	-	-	17,3 nM	652,1 nM

RBA = wenn kein IC₅₀-Wert bestimmt werden konnte, sind für die Testkonzentration von 100 μ M im Bezug zur max. Verdrängung durch die Positivkontrolle die relativen Bindungsaffinitäten in % angegeben

3.5 Genexpressionsassay

Die Expression androgenabhängig regulierter Gene wurde zur funktionellen Analyse der Androgenrezeptorbinder herangezogen. Dieser Assay wurde anstelle eines Reporter-genassays mit der stabil transfizierten Zelllinie MDA-kb2 (siehe 2.2.1) etabliert. In unserem Labor konnte mit dem Androgen Dihydrotestosteron (**1**) nur ein maximal dreifaches Ansprechen der MDA-kb2-Zellen beobachtet werden, was auf einen teilweisen Verlust des Plasmids zurückzuführen war.

Zur Untersuchung der Wirkung der drei identifizierten Androgenrezeptorbinder QDM255 (**70**), QDM276 (**71**) und β -Sitosterol (**57**) auf die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors wurde die PSA-mRNA-Expression in LNCaP-Zellen und die PSA- und AR-mRNA-Expression in VCaP-Zellen mittels Real-Time-PCR analysiert. Ebenso wurde der *Cibotium-barometz*-Extrakt LAW540 im Genexpressionsassay untersucht.

3.5.1 Bestimmung der PSA-mRNA-Expression in LNCaP-Zellen

Die PSA-mRNA-Regulation in den LNCaP-Zellen funktioniert über den Androgenrezeptor. Es konnte eine PSA-Hochregulation durch Androgene wie DHT (**1**), aber nicht durch synthetische Glukokortikoide wie Dexamethason (**55**) oder das synthetische Östrogen Diethylstilbestrol (**65**) induziert werden¹⁹⁴. Dies entspricht auch der mangelnden Bindungsaffinität dieser Verbindungen an den mutierten AR der LNCaP-Zellen¹⁹⁵.

Die Inkubation der LNCaP-Zellen mit Dihydrotestosteron (**1**) (1 nM) ergab eine dreifache Steigerung der PSA-mRNA-Expression (Abb. 68).

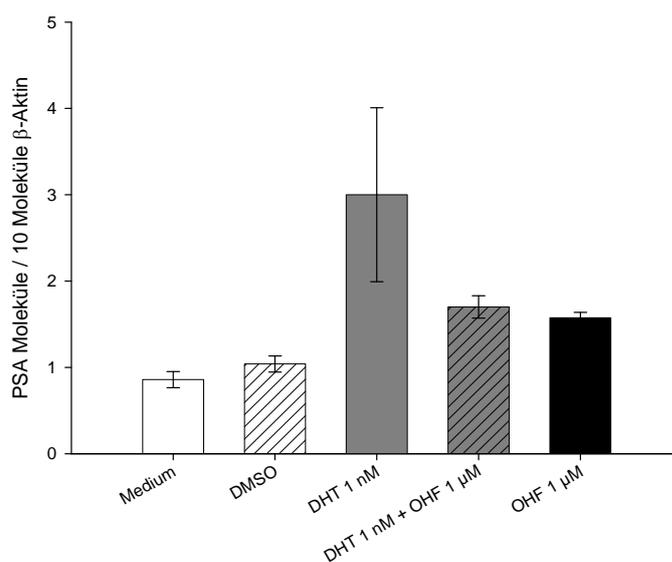


Abbildung 68: Einfluss des Androgens DHT (**1**) und des Antiandrogens OHF (**8**) auf die PSA-mRNA-Expression in LNCaP-Zellen

Diese Steigerung konnte durch Koinkubation mit dem nichtsteroidalen Antiandrogen Hydroxyflutamid (**8**) (1 μM) wieder aufgehoben werden. Trotz der relativ hohen Messchwankungen bei der PSA-mRNA-Bestimmung nach DHT-Inkubation ist dieser antagonistische Effekt statistisch signifikant. Hydroxyflutamid (**8**) selbst weist in der Konzentration von 1 μM einen schwachen, aber signifikanten PSA-mRNA-expressionssteigernden Effekt auf, was auf die Mutation in der LBD des AR in den LNCaP-Zellen zurückzuführen ist.

Die drei Androgenrezeptorbinder QDM276 (**71**), QDM255 (**70**) und β -Sitosterol (**57**) bewirken alleine eine Steigerung der PSA-mRNA-Expression, wobei diese bei QDM255 (**70**) nicht statistisch hochsignifikant ist (Abb. 69). Bei gleichzeitiger Inkubation mit DHT (**1**) in der Konzentration von 1 nM trat ein sich gegenseitig verstärkender Effekt der Testsubstanzen und DHT (**1**) ein. Eine Koinkubation mit Hydroxyflutamid (**8**) in 1 mikromolarer Konzentration bewirkte bei QDM276 (**71**) und QDM255 (**70**) keine signifikante Änderung der PSA-Expression. Interessanterweise konnte aber bei β -Sitosterol (**57**) eine Reduktion der PSA-mRNA-Expression unter OHF-Einfluss beobachtet werden. Hinsichtlich der PSA-mRNA-Expression in den LNCaP-Zellen wirken alle drei Substanzen agonistisch. Eine antagonistische Komponente ist nicht zu belegen. Ob dies aber durch die Punktmutation in der LBD des AR in den LNCaP-Zellen zurückzuführen ist, lässt sich nur durch einen Vergleich mit Zellen mit wtAR feststellen.

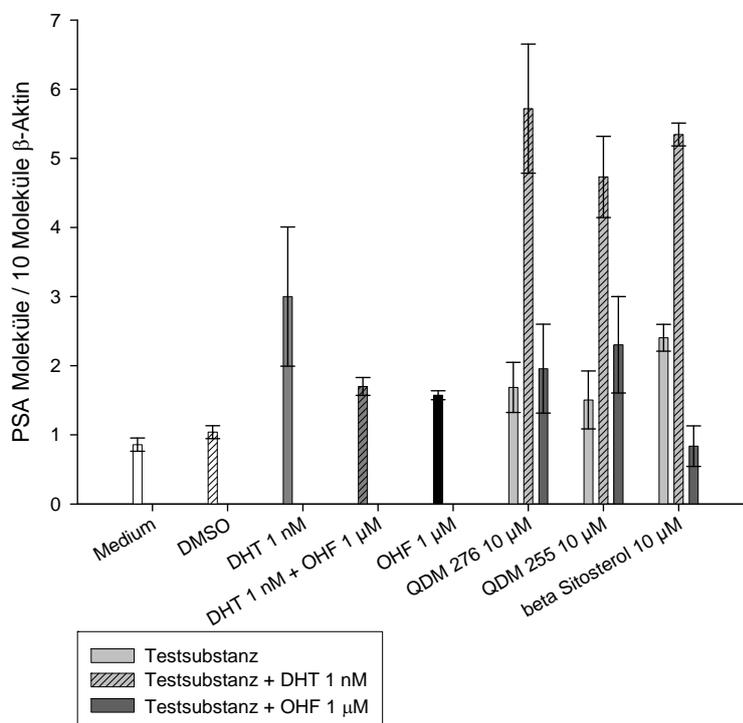


Abbildung 69: Wirkung der Androgenrezeptorbinder QDM276 (**71**), QDM255 (**70**) und β -Sitosterol (**57**) auf die PSA-Expression in LNCaP-Zellen

In Abbildung 70 sind die Einflüsse der Fraktionen des Extraktes LAW540 auf die PSA-mRNA-Expression in LNCaP-Zellen dargestellt. Die methanolische Fraktion LAW540-M und der Rohextrakt LAW540 bewirken eine Steigerung der PSA-mRNA-Expression, während die anderen Fraktionen diese alleine nicht beeinflussen. Interessanterweise ist auch die methanolische Fraktion in der Inhibierung der durch DHT (**1**) ausgelösten Steigerung der PSA-mRNA-Expression am effektivsten. Die Ethylacetatfraktion LAW540 E, die acetonische Fraktion LAW540 A und der Rohextrakt LAW540 vermindern ebenso die durch DHT (**1**) ausgelöste PSA-Hochregulation. Ein Einfluss von OHF (**8**) konnte nicht beobachtet werden. Insgesamt zeigen in den LNCaP-Zellen der methanolische Extrakt LAW540 M und der Rohextrakt LAW540 einen partiell agonistischen und partiell antagonistischen Effekt. Die Ethylacetatfraktion LAW540 E und die acetonische Fraktion LAW540 A wirken in diesem System rein antagonistisch. Die Hexanfraktion LAW540 H hat weder selbst einen Einfluss noch während der Koinkubation mit DHT (**1**).

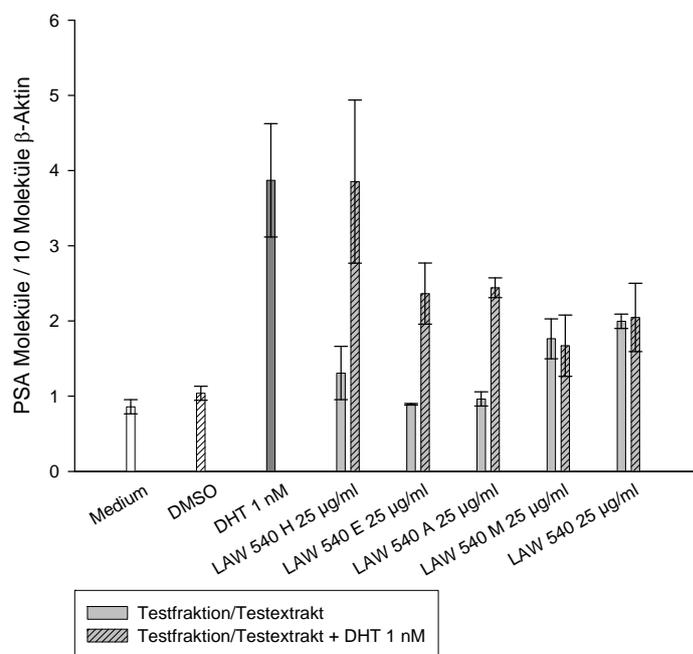


Abbildung 70: *Cibotium-barometz*-(LAW540)-Fraktionen und ihre Wirkung auf die PSA-Expression in LNCaP-Zellen (Extraktionsschema siehe Anhang Teil F)

3.5.2 Bestimmung der PSA-mRNA- und AR-mRNA-Expression in VCaP-Zellen

Die epitheliale Prostatakrebszelllinie VCaP besitzt einen wtAndrogenrezeptor^{105;109;196}, keinen Östrogenrezeptor α und nur geringe Mengen an Östrogenrezeptor β ¹⁰⁵. Das Vorkommen eines Glukokortikoidrezeptors und Progesteronrezeptors wird in der Literatur nicht erwähnt. Wie in Abbildung 71 ersichtlich sind VCaP-Zellen breit auslaufende Zellen, die bei hoher Konfluenz Zellcluster bilden. Sie exprimieren das PSA und sind deshalb zur Untersuchung der androgenabhängigen Regulation geeignet.

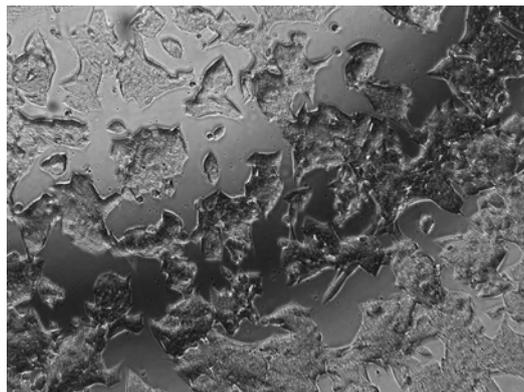
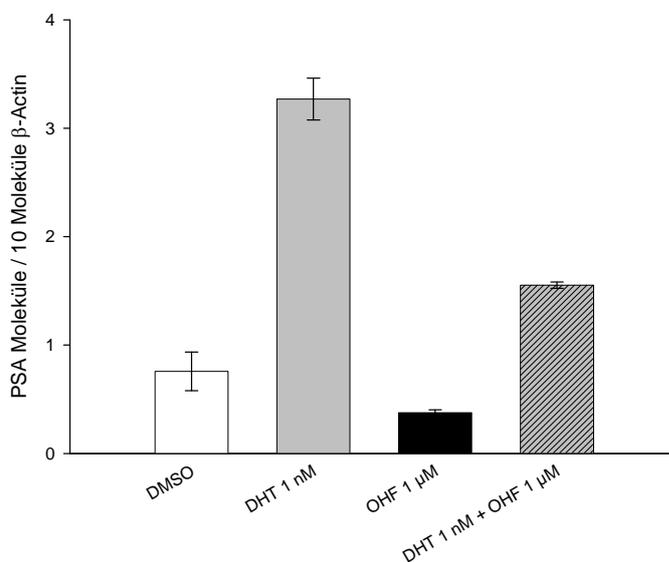


Abbildung 71: VCaP-Zellen, 3.Passage

Durch Darstellung der Daten in Abbildung 72 ist ersichtlich, dass die PSA-mRNA-Expression durch Inkubation der VCaP-Zellen mit DHT (**1**) in 1 nanomolarer Konzentration um das 4,3-fache erhöht ist. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von Hydroxyflutamid (**8**) in der Konzentration von 1 μM inhibiert, so dass dort die PSA-Regulation nur noch um das zweifache erhöht ist. Hydroxyflutamid (**8**) selbst zeigt im Gegensatz zu den LNCaP-Zellen in den VCaP-Zellen eine Erniedrigung der PSA-mRNA-Regulation um die Hälfte. In den VCaP-Zellen wirkt Hydroxyflutamid (**8**) somit als reiner Antagonist. Vermutlich sind trotz der 24stündigen serumfreien Vorinkubation nicht alle Liganden des AR aus den Zellen entfernt worden, so dass ein antagonistischer Effekt durch alleinige Hydroxyflutamid-Inkubation beobachtet werden konnte.

Abbildung 72: Suppression der PSA-Expression in VCaP-Zellen durch OHF (**8**) nach Stimulation mit DHT (**1**)

Mögliche Interaktionen mit anderen Signalwegen

Die PSA-Regulation hängt nicht nur von der ligandenabhängigen transkriptionellen genotropen Reaktion des AR ab, sondern wird auch über den nichtgenotropen Androgenrezeptorsignalweg der Kinasen beeinflusst^{23;197;198}. Es wurde auch der Einfluß des Orphan-Rezeptors ERR α auf Steroidhormonrezeptorsignalwege beschrieben¹⁹⁹. Der ERR α aktiviert Promotoren, die Androgen-Response-Elemente enthalten, so z. B. auch den des prostataspezifischen Antigens. Deshalb liefern die Ergebnisse aus dem VCaP-PSA-Regulationsexperiment keine Aussage über die Bindungsfähigkeit von Substanzen am wtAR. Die Untersuchung der androgenabhängigen Gene beschreibt die Funktionalität der Substanzen bzw. Extrakte hinsichtlich der Beeinflussung der Androgenrezeptorsignalwege. Da hier nachweislich Substanzen getestet wurden, die hauptsächlich am AR binden, kann man für die Reinsubstanzen von einer vorrangigen Einflussnahme auf den Androgenrezeptorsignalweg ausgehen. Für den Extrakt LAW540 ist dies allerdings nicht zutreffend und es kann nur eine Aussage über die Funktionalität getroffen werden.

Es wurde der Einfluss der drei identifizierten Androgenrezeptorbinder QDM276 (**71**), QDM255 (**70**) und β -Sitosterol (**57**) auf die PSA- und AR-mRNA-Regulation in den VCaP-Zellen untersucht. Da dieser Assay nicht im Mikrotiterplattenformat durchgeführt werden kann, sind größere Substanzmengen erforderlich und es können aufgrund der Wachstumseigenschaften der Zellen nur wenige Parallelproben gemessen werden. Deshalb wurde der Assay zur näheren Charakterisierung des Extraktes LAW540 mit dem Rohextrakt durchgeführt. Der Versuch wurde zusätzlich zu den in den LNCaP-Zellen getesteten Substanzen noch auf die von Kristin Palberg in ihrer Staatsexamensarbeit durch den Zellproliferationsassay und die Rezeptorbindungsassays charakterisierten Substanzen Guggulsteron E (**141**) und Guggulsteron Z (**140**) ausgeweitet¹⁹⁰. Sie weisen laut Burris *et al.* eine Stimulation der PSA-Expression in LNCaP-Zellen auf, welche durch Bicalutamid (**30**) antagonisierbar ist²⁰⁰. Eine Aussage über eine agonistische bzw. antagonistische Wirkung ist aufgrund des mutierten AR in den LNCaP-Zellen allerdings nicht möglich. Zusätzlich wurden bei Burris *et al.* die Guggulsterone in mit einem GAL4-AR-chimären Rezeptor transfizierten HEK293-Zellen und in C2C12-Zellen, die mit einem wtAR transfiziert wurden, getestet. Burris *et al.* beschreiben eine antagonistische Wirkung der Guggulsterone E (**141**) und Z (**140**) auf die durch R1881 (**9**) stimulierte PSA-Expression in diesen Zellsystemen. Aufgrund dessen wurden die Guggulsterone als Antagonisten eingestuft. Die Verwendung dieser Zelllinien als Basis zur Überprüfung der transkriptionellen Aktivität erscheint allerdings nicht gut geeignet zu sein. Da HEK-293-Zellen per se schon mit Fremd-DNA transfiziert wurden, ist ihr Verhalten mit dem normaler Zellen nicht vergleichbar. Sie verfügen zudem nicht über einen endogen exprimierten AR, so dass die Expression von nötigen Cofaktoren eventuell nicht gegeben ist. Bei der C2C12-Zelllinie sind ihre Herkunft aus einer anderen Spezies und ebenfalls die eventuell fehlende Expression von Cofaktoren von Nachteil. Der Vergleich der Daten aus dem VCaP-Zell-Experiment mit den von Burris *et al.* erhaltenen Daten ist somit von besonderem Interesse.

PSA-mRNA-Expression

Die Substanzen QDM276 (**71**), QDM255 (**70**), β -Sitosterol (**57**) und Guggulsteron E (**141**) steigern die PSA-mRNA-Expression und besitzen demzufolge eine agonistische Komponente (Abb. 73). Davon werden allerdings nur die Wirkungen von QDM255 (**70**) und Guggulsteron E (**141**) statistisch signifikant durch Hydroxyflutamid (**8**) antagonisiert. Die agonistische Wirkung von β -Sitosterol (**57**) wird zwar durch OHF (**8**) vermindert, aber ist statistisch nicht signifikant. Eine mögliche Ursache für die fehlende Antagonisierbarkeit von QDM276 (**71**) durch Hydroxyflutamid (**8**) wäre eine eventuelle Interaktion von **71** mit dem Glukokortikoidrezeptor. Laut Cleutjens *et al.* wird PSA zelltypspezifisch und nicht nur über den AR, sondern auch über den GR reguliert²⁰¹. **71** bindet im niedrigen mikromolaren Bereich an den GR (Tab. 35). Im Gegensatz dazu haben sowohl QDM255 (**70**), als auch β -Sitosterol (**57**) und Guggulsteron Z (**140**) eine viel schwächere Bindungsaffinität an den GR. Da aber Guggulsteron E (**141**) mit noch stärkerer Affinität als QDM276 (**71**) an den GR bindet und dort eine fehlende Antagonisierbarkeit durch OHF (**8**) nicht zu beobachten ist, deutet dies auf einen konzentrationsbedingten Einfluss der Testsubstanz **71** hin. Da QDM276 (**71**) mit einem IC₅₀-Wert ähnlich dem von DHT (**1**) an den AR bindet und die Testkonzentration in dem Genexpressionsassay 10 μ M beträgt, scheint OHF (**8**) die starke agonistische Wirkung von **71** unter diesen Bedingungen nicht mehr antagonisieren zu können.

Eine antagonistische Komponente durch Inhibierung der durch DHT (**1**) induzierten PSA-Hochregulation wird bei β -Sitosterol (**57**), LAW540, Guggulsteron E (**141**) und Guggulsteron Z (**140**) beobachtet.

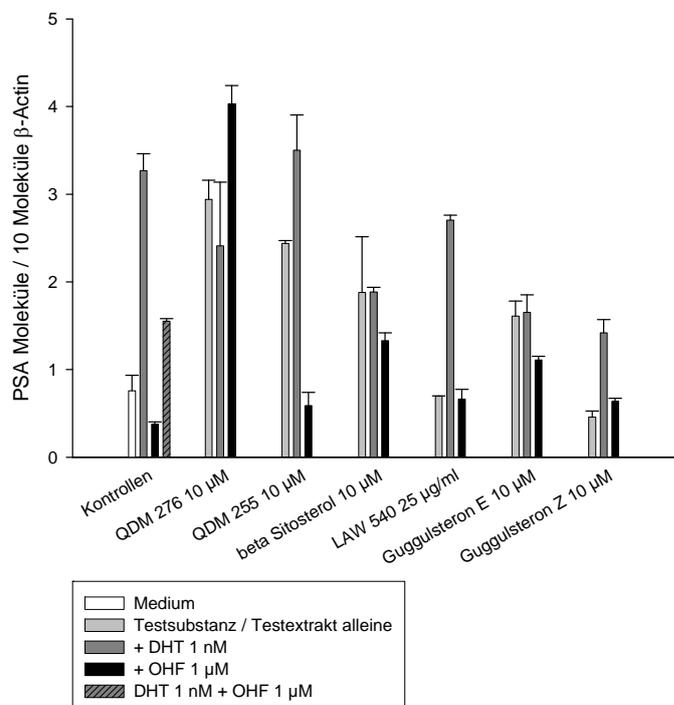


Abbildung 73: PSA-mRNA-Expression in VCaP-Zellen nach Behandlung mit QDM276 (**71**), QDM255 (**70**), β -Sitosterol (**57**), LAW540, Guggulsteron E (**141**) bzw. Z (**140**)

AR-mRNA-Expression

Die Expression des Androgenrezeptorproteins wird durch Androgene selbst reguliert. Sie inhibieren die AR-mRNA-Expression (Abb. 74). Verglichen mit den DHT-behandelten VCaP-Zellen exprimieren die Kontrollzellen 6,8-fach mehr AR-mRNA. Hydroxyflutamid (**8**) hat keinen Einfluss auf die AR-mRNA-Regulation. Die gleichzeitige Applikation von DHT (**1**) (1 nM) und OHF (**8**) (1 μ M) kann zwar die durch DHT (**1**) vermittelte AR-Expressionsminderung nicht komplett aufheben, aber die so behandelten Zellen zeigen im Vergleich zu den mit DHT (**1**) behandelten Zellen eine 4,6-fach erhöhte AR-mRNA-Expression. Hydroxyflutamid (**8**) wirkt auch hier als reiner Androgenrezeptorantagonist.

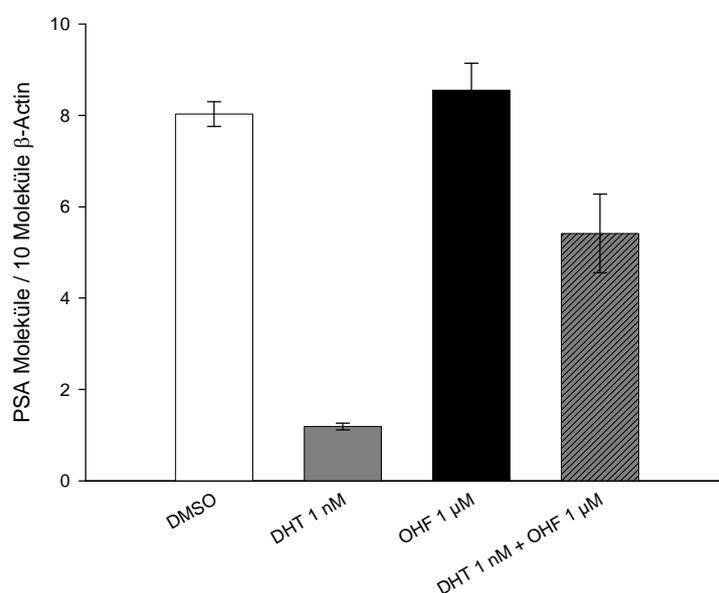


Abbildung 74: Suppression der AR-mRNA-Expression in VCaP-Zellen durch Dihydrotestosteron (**1**) und Antagonisierung durch Hydroxyflutamid (**8**)

Alle Testsubstanzen bzw. der Testextrakt bewirken eine verminderte AR-mRNA-Expression in folgender Reihenfolge β -Sitosterol (**57**) > QDM276 (**71**) > QDM255 (**70**) > Guggulsteron E (**141**) > Guggulsteron Z (**140**) > LAW540 (Abb. 75).

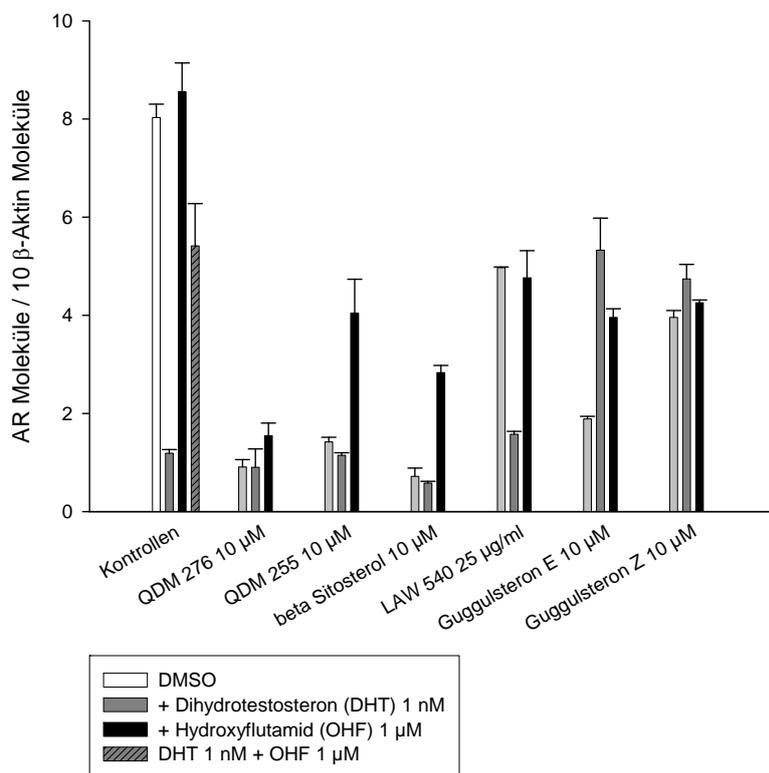


Abbildung 75: AR-mRNA-Expression in VCaP-Zellen nach Behandlung mit QDM276 (**71**), QDM255 (**70**), β -Sitosterol (**57**), LAW540, Guggulsteron E (**141**) bzw. Z (**140**)

Durch Hydroxyflutamid (**8**) antagonisierbar ist dieser Effekt bei QDM255 (**70**), β -Sitosterol (**57**), Guggulsteron E (**141**) und in schwachem Ausmaß auch bei QDM276 (**71**). Diese Substanzen besitzen eine zumindest partielle agonistische Wirkkomponente. Bei Guggulsteron Z (**140**) und bei LAW540 lässt sich diese Wirkung allerdings nicht durch die Gabe von Hydroxyflutamid (**8**) antagonisieren. Demzufolge scheint hier ein anderer Wirkmechanismus für die Herunterregulation des AR verantwortlich zu sein. Sie sind deshalb nicht als Agonisten des AR einzustufen. Eine AR antagonistische Wirkung zeigen LAW540, Guggulsteron E (**141**) und Guggulsteron Z (**140**). Sie heben die durch DHT (**1**) verminderte AR-mRNA-Expression teilweise wieder auf. Bei LAW540 ist dieser Effekt zwar nur schwach ausgeprägt, aber statistisch signifikant. Diese Ergebnisse stimmen nur teilweise mit den Messungen der PSA-mRNA-Expression überein und sind deshalb in der Tabelle 36 den PSA-mRNA-Daten gegenübergestellt.

Zusammenfassend lassen sich die getesteten Substanzen folgendermaßen in Agonisten bzw. Antagonisten des Androgenrezeptors einteilen (Tab. 36). Übereinstimmung zwischen den gemessenen PSA-mRNA-Daten und den AR-mRNA-Daten findet sich bei QDM276 (**71**), QDM255 (**70**), Guggulsteron E (**141**), Guggulsteron Z (**140**) und LAW540. Als Agonisten fungieren QDM276 (**71**) und QDM255 (**70**), Guggulsteron E (**141**) als partieller Agonist bzw. Antagonist, Guggulsteron Z (**140**) und LAW540 als Antagonisten. LAW540 scheint jedoch nicht nur über den Androgenrezeptor zu wirken,

da die Expression der AR-mRNA erniedrigt ist, sich aber nicht durch Hydroxyflutamid (**8**) antagonisieren lässt. Die Regulation des AR wird ebenso wie die PSA-Regulation über verschiedene andere Wege beeinflusst. So wird die AR-mRNA-Expression durch β -Catenin induzierte Wnt-Signalaktivierung stimuliert²⁰². Der Transkriptionsfaktor p53, der für die normale Zellfunktion wichtige Prozesse wie Arrest des Zellwachstums, Apoptose oder Seneszenz reguliert, inhibiert die Expression des AR²⁰³. Glukokortikoide beeinflussen die Expression der AR-mRNA in einem negativen Weg²⁰⁴. Dies könnten auch Ursachen für die abweichenden Ergebnisse beim Vergleich der PSA-mRNA- und der AR-mRNA-Daten für β -Sitosterol (**57**) sein. β -Sitosterol (**57**) antagonisiert zwar die durch DHT (**1**) induzierte PSA-mRNA-Hochregulation aber nicht die durch DHT (**1**) induzierte AR-mRNA-Herunterregulation. Vermutlich beeinflusst β -Sitosterol (**57**) die AR-mRNA-Expression über einen zusätzlichen AR-unabhängigen Mechanismus.

Tabelle 36: Einstufung der AR-Binder in Agonisten bzw. Antagonisten

<i>Substanz/Extrakt</i>	<i>PSA-mRNA-Expression</i>	<i>AR-mRNA-Expression</i>
QDM276 (71)	Agonist	Agonist
QDM255 (70)	Agonist	Agonist
β -Sitosterol (57)	Partieller Agonist/Antagonist	Agonist
<i>Cibotium barometz</i> (LAW540)	Antagonist	Antagonist
Guggulsteron E (141)	Partieller Agonist/Antagonist	Partieller Agonist/Antagonist
Guggulsteron Z (140)	Antagonist	Antagonist

Im Vergleich zu den von Burris *et al.* erhaltenen Daten ergibt sich für die Einstufung der Guggulsterone ein differenzierteres Bild. Guggulsteron E (**141**) ist im Gegensatz zu Guggulsteron Z (**140**) in dem hier durchgeführten Assay ein partieller Agonist/Antagonist und kein reiner Antagonist.

3.6 Zusammenfassende Diskussion

3.6.1 QDM276 und QDM255

Das erstmalig von Sünemann *et al.* mittels einer Stille-Heck-Kopplungssequenz und nachfolgender thermischer 6π -Elektrozyklisierung synthetisierte 3-Oxo-7-carboxy-steroidanalogon QDM255 (**70**) und sein Methylester QDM276 (**71**) weisen strukturelle Ähnlichkeit mit dem 7α -Methyl-19-Nortestosteron (MENT (**143**); Abb. 76) auf²⁰⁵.

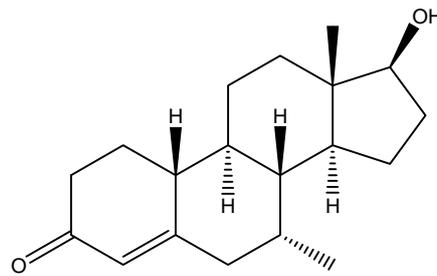


Abbildung 76: MENT (7 α -Methyl-19-nortestosteron) (**143**)

7 α -Methyl-19-Nortestosteron (MENT))

MENT (**143**) wurde hinsichtlich einer Anwendung als hormonelles Kontrazeptivum für Männer untersucht. Noe *et al.* bestätigten eine Suppression von Gonadotropin und Androgenen nach subdormaler Insertion von MENT-azetat in gesunden Männern²⁰⁶. Eine sehr hohe Effizienz (100 % Unfruchtbarkeitsrate) von MENT (**143**) als hormonelles Kontrazeptivum wurde allein oder in Kombination von Östradiol (**4**) in ausgewachsenen indischen Hutaffen beobachtet²⁰⁷. Die Reversibilität von MENT (**143**) als hormonelles Kontrazeptivum des Mannes und sein möglicher Einsatz im Einzelregime ist in der frühen Phase klinischer Studien belegt²⁰⁸. Pharmakologische Studien in Affen zeigten, dass die Applikation der minimalen Dosis von MENT (**143**), die notwendig ist, um die Produktion von LH zu unterdrücken, nicht zu einer Vergrößerung der Prostata führt²⁰⁹. Aufgrund dieser vielversprechenden Studien wurde 2007 von Walton *et al.* untersucht, wie sich MENT (**143**) in Kombination mit Etonogestrel (**144**) als hormonelles Kontrazeptivum im Vergleich zu Testosteron/Etonogestrel verhält²¹⁰. Leider gab es ein Abfallen der MENT-Freisetzung aus den Implantaten, so dass die Daten vorsichtig zu interpretieren sind. In beiden Gruppen wurden ein Abfall von HDL und ein Anstieg der Hämoglobinkonzentration beobachtet. Ein Vorteil der MENT/Etonogestrel-Kombination gegenüber der Testosteron/Etonogestrel-Kombination konnte in den getesteten Konzentrationen nicht gezeigt werden. Für MENT (**143**) wurde von Anderson *et al.* Gewebespezifität nachgewiesen²¹¹. Verabreicht in Dosen, die eine Erhaltung aller androgenabhängigen Funktionen bewirken, wurde ein selektives Aussparen des Prostatagewebes dokumentiert. Dies untermauert einerseits die Vermutung, dass unerwünschte Nebenwirkungen, wie das Wachstum der Prostata, konzentrationsabhängig sind, und unterstützt andererseits die Hypothese, dass MENT (**143**) im Vergleich zu Testosteron (**2**) ein geeigneteres hormonelles Kontrazeptivum ist. Distribution, Metabolismus und Exkretion wurde 2009 in einer Studie an Sprague-Dawley Ratten mit ³H-MENT untersucht²¹². Dabei wurde gezeigt, dass MENT (**143**) und seine Metaboliten zu gleichen Teilen in Fäzes und Urin innerhalb von 30 h ausgeschieden werden. Folgende Metaboliten wurden erhalten, 3-Hydroxyl-MENT in Ratten und humanem Leberzytosol, 16 α -Hydroxyl-MENT in Ratten und humanen Lebermikrosomen und 7 α -Methyl-19-norandrostendion in humanen Lebermikrosomen. Die für die Metabolisierung von MENT (**143**) verantwortlichen spezifischen Enzyme sind in der Ratte CYP 2C11 und

3-HSD, während beim Menschen die Metabolisierung durch CYP 3A4, 17 β -HSD und die 3-HSD erfolgt²¹². Das Enzym CYP 3A4 weist eine hohe interindividuelle Varianz auf und wird zudem noch von vielen Medikamenten oder Xenobiotika beeinflusst, was bei einer eventuellen Applikation von MENT (**143**) als hormonelles Kontrazeptivum berücksichtigt werden müsste. Bei der Untersuchung der Distribution ergab die Studie, dass nach 30 min die höchste Konzentration im Duodenum festgestellt wurde, und nach 6 h eine spezifische Aufnahme in die Zielgewebe wie die ventrale Prostata und der Samenbläschen. Eine Anreicherung in anderen Geweben konnte nicht beobachtet werden. MENT (**143**) wird durch die Aromatase umgesetzt^{213;214}, allerdings sehr langsam wie bei Attardi *et al.* dokumentiert²¹⁵. Eine Umsetzung durch die 5 α -Reduktase^{216;217} erfolgt nicht. Somit hat MENT (**143**) einen geringeren Einfluss auf das Prostatagewebe als Testosteron (**2**), welches im Prostatagewebe durch die Umwandlung zu DHT (**1**) eine Potenzierung erreicht. In einem transgenen Mausmodell konnte eine Dosisabhängigkeit hinsichtlich des Wachstums der Prostata, der Samenbläschen oder des Musculus levator ani im Vergleich zu Testosteron (**2**) festgestellt werden. Bei niedriger Dosierung wird bei MENT (**143**) im Vergleich zu Testosteron (**2**) eine geringere Steigerung an DNA/mg Prostatagewebe festgestellt²¹⁸. Der Einfluss von MENT (**143**) auf Primärzellen des Prostatakarzinoms und der benignen Prostatahyperplasie zeigte einen geringeren proliferationssteigernden Effekt als DHT (**1**), aber größer als Testosteron (**2**)²¹⁹.

Vergleich von MENT mit QDM276 und QDM255

In der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Mendoza *et al.* wurde der Einfluss von MENT (**143**) auf das Proliferationsverhalten von primären Zellen der benignen Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms beschrieben²¹⁹. Dabei wurde in höheren Dosen (ab 100 nM) eine stärkere proliferationssteigernde Wirkung von MENT (**143**) im Vergleich zu Testosteron (**2**) festgestellt. Die therapeutischen Dosen betragen für MENT (**143**) jedoch nur 1,4 nM. In dem hier verwendeten Zellproliferationsassay ist die proliferationssteigernde Wirkung von QDM276 (**71**) im Vergleich zu Testosteron (**2**) signifikant erhöht. Der EC₅₀-Wert ist jedoch vergleichbar mit dem von Testosteron (**2**), aber schwächer als der von DHT (**1**). QDM255 (**70**) weist hinsichtlich der maximalen Proliferation einen mit Testosteron (**2**) und DHT (**1**) vergleichbaren Wert auf. Der EC₅₀-Wert ist aber deutlich schwächer als der entsprechende Wert von Testosteron (**2**) bzw. DHT (**1**). Die fehlende Umsetzung von MENT (**143**) durch die 5 α -Reduktase ist auf die Substitution am C7-Atom zurückzuführen. Vermutlich werden also auch die Substanzen QDM276 (**71**) und QDM255 (**70**) nicht an C5 reduziert. Bei einer fehlenden C19-Methylgruppe erfolgt laut Attardi *et al.* eine Aromatisierung des A-Ringes entweder nur sehr langsam oder gar nicht²¹⁵, so dass QDM276 (**71**) und QDM255 (**70**) mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenso wie MENT (**143**), wenn überhaupt, nur sehr langsam aromatisiert werden. Interessant sind die schwächere Bindungsaffinität und die schwächere proliferationssteigernde Aktivität von QDM255 (**70**) im Vergleich zu QDM276 (**71**). Der Methylester (**71**) besitzt eine im Vergleich zur Säure (**70**) verbesserte Zellgängigkeit, was die stärkere proliferationssteigernde Wirkung der Verbindung QDM276

(71) erklären würde. Die unterschiedliche Bindungsaffinität der beiden Verbindungen kann ebenfalls nur auf das Vorhandensein der Säurefunktion an C7 bei QDM255 (70) im Vergleich zur Methoxygruppe bei QDM276 (71) zurückzuführen sein. In den Abbildungen 77a) und 77b) sind die Verbindungen QDM276 (71) und QDM255 (70) in die Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors gedockt worden.

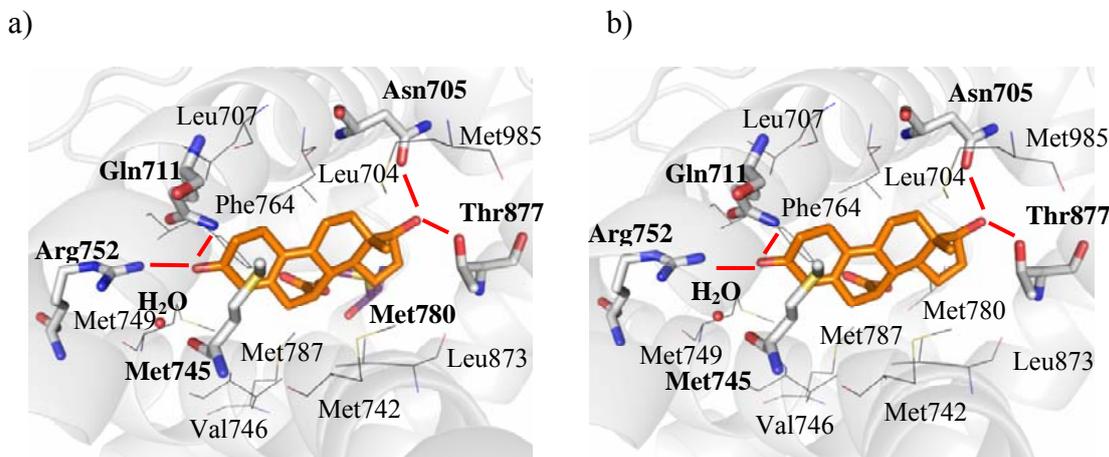


Abbildung 77: Docking von a) QDM276 (71) und b) QDM255 (70) in AR-Ligandenbindungstasche

Eine Erklärung für die stärkere Bindungsaffinität des 7α -Methoxy-Derivates QDM276 (71) im Vergleich zum 7α -Carbonsäure-Derivate QDM255 (70) ist die bessere Interaktion der Methoxy-Gruppe über Van-der-Waals-Kräfte mit der Aminosäure Methionin 780 (Abb. 78). Eine ausführliche Analyse der Dockingergebnisse findet sich in der Arbeit von Stephanie Tennstedt¹²².

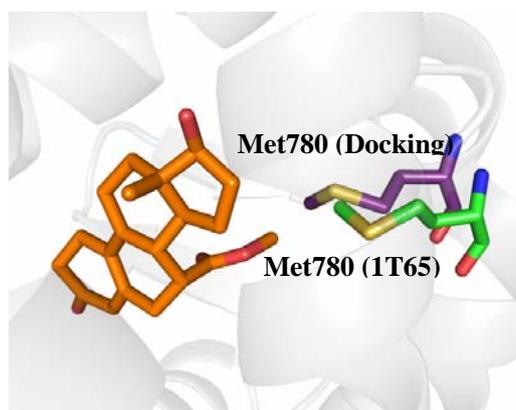


Abbildung 78: Interaktion der 7α -Methoxygruppe von QDM276 (71) mit dem Methionin 780 der AR-Ligandenbindungstasche

Für MENT (143) wurde durch radioaktive Verdrängungsexperimente in Rattenuterusgewebe eine 3500mal schwächere Bindung an den ER im Vergleich zu E2 (4) nachgewiesen, während eine mit Progesteron (5) vergleichbare Bindungsaffinität zum PR festgestellt werden konnte²²⁰. Dieser progestagene Effekt von MENT (143) wurde ebenso in einem zellbasierten Assay von Markiewicz *et al.* dokumentiert²²¹. In beiden Assay-

systemen ist die Anwesenheit von mehreren Steroidhormonrezeptoren nicht auszuschließen, weshalb die Ergebnisse kritisch zu bewerten sind. Neuere Bindungsdaten von MENT (**143**) an Steroidhormonrezeptoren sind leider nicht publiziert, weshalb diesbezüglich ein Vergleich mit QDM276 (**71**) und QDM255 (**70**) nicht möglich ist. Sowohl QDM276 (**71**) als auch QDM255 (**70**) wirken nicht spezifisch am Androgenrezeptor. QDM276 (**71**) zeigt eine relativ starke Bindungsaffinität zum Progesteronrezeptor mit einem K_i -Wert von 66 nM und eine mäßig starke Bindungsaffinität zum Glukokortikoidrezeptor mit einem K_i -Wert von 124 nM. QDM255 (**70**) zeigt gegenüber diesen beiden Rezeptoren keine (PR) bis eine sehr schwache (GR) Bindungsaffinität. QDM255 (**70**) weist eine höhere, aber trotzdem nur mäßig starke Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor α ($K_i = 2 \mu\text{M}$) und β ($K_i = 3 \mu\text{M}$) im Vergleich zu QDM276 (**71**) auf. Diese Unterschiede in der Bindung zu anderen Steroidhormonrezeptoren sind durch die Dockingstudien, die in der Arbeit von Stephanie Tennstedt näher analysiert werden, nicht eindeutig zu erklären¹²².

3.6.2 β -Sitosterol

β -Sitosterol (BSS) (**57**) gehört neben Campesterol (**145**) und Stigmasterol (**56**) zu den hauptsächlich vorkommenden Pflanzensterolen, die vorwiegend in fettreichen Pflanzenteilen, wie Nüssen, Früchten und Samen akkumuliert werden. Der Anteil von β -Sitosterol (**57**) an der in der Nahrung konsumierten Menge an Phytosterolen beträgt ca. 65 %, gefolgt von Campesterol (**145**) mit einem Anteil von 30 %. Phytosterole werden effektiv zur Reduktion des Plasmacholesterolspiegels eingesetzt. Außerdem werden sie hinsichtlich ihrer antikanzerogenen Wirkung und ihrer möglichen Eigenschaft als endokriner Disruptor untersucht. Hinsichtlich ihrer potentiellen Toxizität gibt es in der Literatur keine Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen, mit Ausnahme bei den Menschen, die an der seltenen genetisch bedingten Erkrankung der Phytosterolämie leiden.

BSS (**57**) stimuliert das Wachstum der Brustkrebszelllinie MCF-7, schützt aber vor E2-stimuliertem MCF-7-Tumorwachstum in Mäusen und reduziert den E2-Plasmaspiegel²²². Gegensätzliche Aussagen finden sich bei Awad *et al.*²²³. Die Autoren beschreiben eine Inhibierung der Zellzahl der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und eine Stimulation der Apoptose durch BSS-Behandlung. Allerdings findet die Inkubation bei Awad *et al.* in normalem Medium statt und BSS (**57**) wird als Cyclodextrin-Komplex appliziert, während bei den MCF-7-Daten explizit auf eine östradiolfreie Inkubationsumgebung geachtet wird. Interessanterweise wird der Konsum von Phytosterolen wie BSS (**57**) mit einem vermehrten Auftreten der aggressiveren Form des Brustkrebses, der ER-negativen Form beobachtet²²⁴. Von den Autoren wird ein möglicher Weg der ER-Regulation diskutiert, da Phytosterole die Fluidität von cholesterolreichen Zellmembranen ohne Störung ihrer Integrität beeinflussen können. Sie könnten so durch eine Inhibierung von membrangebundenen Molekülen indirekt zelluläre Prozesse wie Östrogenmetabolismus, ER-Funktion und ER-Expression modifizieren. Diese Annahme wird gestützt durch die

Untersuchungen von Awad *et al.*, die einen Einfluss von BSS (**57**) auf die Phospholipase D Aktivität ergeben haben²²⁵. Da die Phospholipase D ein membrangebundenes Enzym ist, vermuten die Autoren einen Zusammenhang zwischen der Inkorporation von BSS (**57**) in die Zellmembran, Veränderung der Fluidität und damit der Beeinflussung der Aktivität membrangebundener Proteine. Zusätzlich liefern die Autoren in ihrer Publikation aber Daten, die einen anderen Wirkmechanismus für die antiproliferative Wirkung von BSS (**57**) beschreiben. BSS (**57**) stimuliert demnach die Ceramid-Produktion, welches wiederum die Protein-Phosphatase-2A aktiviert und die Phospholipase D-Aktivität vermindert, was sich in einer Inhibierung des Zellwachstums äußert. Widersprüchliche Aussagen zur Wirkung von BSS (**57**) in LNCaP-Zellen entstehen durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen. So dokumentieren Holtz *et al.* eine Reduzierung der LNCaP-Zellzahl nach BSS-Applikation und keinen Einfluss von BSS (**57**) auf die PSA-Sekretion²²⁶. Allerdings findet die Inkubation in normalem und nicht in ADFKS-Medium statt, so dass Androgene und andere Steroide gleichzeitig vorhanden sind. BSS (**57**) wurde außerdem in einem Cyclodextrin-Komplex appliziert und das Medium jeden Tag erneuert. Eventuell ist eine Metabolisierung von BSS (**57**) ebenfalls eine mögliche Ursache für die von unseren Daten abweichenden Ergebnisse. Interessanterweise wird bei Malíková *et al.* nur eine sehr schwache zytotoxische Aktivität von BSS (**57**) gegenüber der T-Lymphoblastenzelllinie CEM ($IC_{50} = >50 \mu M$), der multiplen Myelomzelllinie RPMI 8226 ($IC_{50} = 32 \mu M$), der malignen Melanomzelllinie G31 ($IC_{50} = >50 \mu M$) und der normalen BJ-Fibroblastenzelllinie BJ h-TERT ($IC_{50} = >50 \mu M$) beschrieben²²⁷. Gegenüber der chronisch myeloischen Leukämiezelllinie K562, der Lungenkrebszelllinie A-549, der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und der Osteosarkomzelllinie HOS konnte keine zytotoxische Aktivität festgestellt werden. Ebenso wird für BSS (**57**) ein Mangel an Zytotoxizität gegenüber der humanen epithelialen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie Caco-2 von Fahy *et al.* bestätigt²²⁸. BSS (**57**) entfaltet also keine prinzipielle Zytotoxizität gegenüber normalen Zellen oder verschiedenen Krebszelllinien, sondern wirkt anscheinend nur bei Prostata- oder Brustkrebszelllinien und auch dort nur unter bestimmten Kulturbedingungen zytotoxisch. Dies legt eine Beeinflussung der Steroidhormonrezeptorsignalwege oder des Steroidhormonmetabolismus nahe. So konnte eine Phytosterolmischung aus 56 % BSS (**57**), 28 % Campesterol (**145**), 10 % Stigmasterol (**56**) und 6 % Dihydrobrassicasterol (**146**) einen veränderten Testosteronmetabolismus in Rattengewebe bewirken²²⁹. Nachgewiesen wurde dieser Sachverhalt durch eine verminderte Serumkonzentration von Testosteron (**2**), eine reduzierte 5α -Reduktase-Aktivität in der Leber und in der Prostata und eine reduzierte Aromataseaktivität in der Prostata. Zusätzlich erhöht BSS (**57**) in BPH-Zellen die Expression und Sekretion des Wachstumsfaktors TGF- β 1²³⁰. Dies spricht ebenso für eine Beeinflussung des Androgenrezeptorsignalwegs durch BSS (**57**), da von Qi *et al.* die TGF- β 1-Regulation durch den Androgenrezeptor beschrieben wurde²³¹. Der TGF- β 1-Promoter enthält drei entfernte und drei nahe ARE, die nachweislich mit der DBD des AR interagieren. Interessanterweise waren sowohl negative als auch positive ARE funktionell in der Androgenregulierten Transkription des TGF- β 1-Promoters aktiv. Das bedeutet, dass je nach Ein-

fluss von zusätzlichen Signalen oder milieubedingt entweder eine negative oder eine positive Regulation von TGF- β 1 durch den AR erfolgen kann. Diese neuen Erkenntnisse untermauern die Wirkung von BSS (**57**) auf den Androgenrezeptorsignalweg und erklären die milieubedingten Unterschiede unserer Ergebnisse im Vergleich zu denen aus der Literatur.

Für das Phytosterol β -Sitosterol (BSS) (**57**) wurde ein maximaler proliferationssteigernder Effekt von 191 % mit einem EC_{50} -Wert von 35 nM auf die LNCaP-Zellen gemessen. Durch die besonderen, auf eine Hormondetektion abgestimmten Kulturbedingungen können die von der Literatur abweichenden proliferationssteigernden Ergebnisse der Arbeit erklärt werden. Für β -Sitosterol (**57**) konnte ein statistisch signifikanter zellzahlvermindernder Effekt auf das Wachstum der PC-3-Zellen von -31 % festgestellt werden. Eventuell ist dies auf die oben in der Literatur dokumentierte Beeinflussung der Ceramid-Produktion durch BSS (**57**) zurückzuführen. Die Zellzahlverminderung der PC-3-Zellen durch BSS-Behandlung kann aber auch mit einer agonistischen Bindung von BSS (**57**) an den Glukokortikoidrezeptor ($K_i = 1,3 \mu\text{M}$) erklärt werden. Interessant ist, warum dagegen die stark an den GR ($K_i = 124 \text{ nM}$) bindende Substanz QDM276 (**71**) keine Zellzahlverminderung der PC-3-Zellen verursacht. Eventuell ist das ein Indiz für eine mögliche agonistische Wirkung von BSS (**57**) und eine antagonistische Wirkung von QDM276 (**71**) am GR, was mittels funktionaler GR-Assays überprüft werden müsste. BSS (**57**) bindet im Vergleich zu den anderen Steroidhormonrezeptoren mit der höchsten Affinität an den GR ($K_i = 1,3 \mu\text{M}$), gefolgt von der Affinität zum AR ($K_i = 3,1 \mu\text{M}$) und zum PR ($K_i = 6,1 \mu\text{M}$). In der Literatur ist für den AR bei Fang *et al.* ein schwächerer IC_{50} -Wert von nur $42 \mu\text{M}$ beschrieben⁵⁸. Allerdings wurde dort als Assay-system ein radioaktiver Verdrängungsassay verwendet. Radioaktive Assays sind aber in der Differenzierung schwächerer Liganden nicht so effektiv wie Fluoreszenzpolarisationsassays. Dies könnte eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Werte sein. Die von Kristin Palberg untersuchten Phytosterole Fucosterol (**147**), Stigmastanol (**148**), β -Sitosteron (**149**) und Campesterol (**145**) zeigten in dem Proliferationsassay Wachstumssteigerungen von 12 bis 47 %, konnten aber nicht als Liganden des AR identifiziert werden¹⁹⁰. Die relativen Bindungsaffinitäten dieser Phytosterole an den ER α , ER β , GR und PR sind sehr schwach (< 48 %) bzw. es konnte keine Bindungsaffinität detektiert werden. In Abbildung 79 ist β -Sitosterol (**57**) in der Ligandenbindungstasche des Androgenrezeptors zu sehen. Die Hydroxygruppe an Position drei bildet Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Glutamin 711 und Arginin 752 aus. Die große Seitenkette von β -Sitosterol (**57**) produziert eine Kollision mit der Aminosäure Phenylalanin 876. Die stärkere Bindungsaffinität von β -Sitosterol (**57**) mit dem AR im Vergleich zu den anderen von Kristin Palberg getesteten Phytosterolen lässt sich nicht mit den Ergebnissen aus dem Docking erklären. Dies wäre nur durch Berechnung der freien Energie der Ligand-Rezeptor-Komplexe mittels Moleküldynamik-Simulationen und Vergleich der freien Energie möglich.

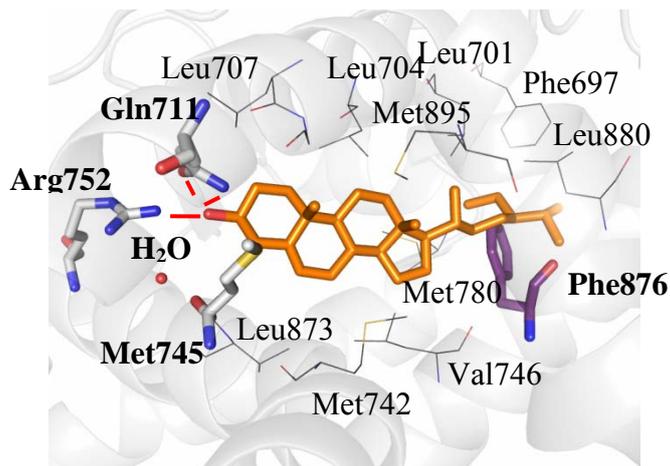


Abbildung 79: Docking von β -Sitosterol (**57**) in AR-Ligandenbindungstasche

β -Sitosterol (**57**) ist aufgrund der PSA-mRNA-Expressionsdaten in den VCaP-Zellen als partieller Agonist bzw. partieller Antagonist des Androgenrezeptors einzustufen. Da BSS (**57**) aber die durch DHT (**1**) induzierte AR-mRNA-Herunterregulation in den VCaP-Zellen nicht antagonisiert aber selbst die AR-mRNA-Expression herunterreguliert, was durch OHF (**8**) wiederum antagonisiert wird, spricht das für eine Kopplung verschiedener Mechanismen. Einerseits wirkt β -Sitosterol (**57**) nachweislich über den Androgenrezeptor, scheint aber auch über einen alternativen Weg die AR-mRNA-Expression zu beeinflussen.

4 Schlussfolgerung

Identifizierte Androgenrezeptorbinder

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen treffen: Das 19-Nortestosteronderivat QDM255 (**70**) und dessen Methylester QDM276 (**71**) besitzen eine Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor, wobei der Methylester QDM276 (**71**) eine ca. 160fach stärkere Bindungsaffinität aufweist als die Säure QDM255 (**70**). Die Bindung zum Androgenrezeptor ist allerdings nicht spezifisch. Im Vergleich zu den anderen Steroidhormonrezeptoren ist für beide Substanzen die Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor zwar am größten, QDM276 (**71**) weist aber auch zum Progesteron- und Glukokortikoidrezeptor eine starke Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich und zu den Östrogenrezeptoren im niedrigen mikromolaren Bereich auf. Die Verbindung QDM255 (**70**) zeigt nur marginale Unterschiede in der Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor und den Östrogenrezeptoren. In den VCaP-Zellen konnte für diese Substanzen eine androgene Aktivität nachgewiesen werden. Demzufolge ist eine potentielle Anwendung ähnlich MENT (**143**) als hormonelles Kontrazeptivum des Mannes denkbar, ebenso ein Einsatz zur Substitutionstherapie oder bei Infertilität infolge Oligospermie.

Die Verbindungen XSA134 (**126**) und XSA164 (**125**) wirken im Zellproliferationsassay antiandrogen. Die Verbindung XSA134 (**126**) zeigt eine nichtspezifische sehr starke Bindung an den Glukokortikoidrezeptor ($K_i = 30,6 \text{ nM}$). An die Östrogenrezeptoren und den Progesteronrezeptor bindet XSA134 (**126**) mit einer mäßig starken Bindungsaffinität mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich. Die schwächste Bindungsaffinität zeigt XSA134 (**126**) zum Androgenrezeptor ($K_i = 1,7 \text{ }\mu\text{M}$). XSA164 (**125**) bindet am stärksten an den Progesteronrezeptor ($K_i = 2,8 \text{ }\mu\text{M}$). Die Unterschiede in der Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor β ($K_i = 7,1 \text{ }\mu\text{M}$) und Androgenrezeptor ($K_i = 9,2 \text{ }\mu\text{M}$) sind allerdings marginal. Aufgrund der Mutation in der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors in den LNCaP-Zellen müsste die androgenrezeptorantagonistische Wirkung in einem anderen Assay-System überprüft werden. Dafür würde sich eine Untersuchung der PSA-mRNA-Regulation in den VCaP-Zellen anbieten. Aufgrund der starken Bindungsaffinitäten der Verbindung XSA134 (**126**) am GR bzw. der Verbindung XSA164 (**125**) am PR sind weiter führende Untersuchungen hinsichtlich einer agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung an diesen Rezeptoren zu empfehlen. Dafür wären die Coaktivator-Systeme von Invitrogen geeignet. Eventuell bietet sich für XSA134 (**126**) eine Anwendung ähnlich der Substanz RU-486 (**66**) an, die sowohl durch seine antigestagene Wirkung als Abortivum eingesetzt wird, aber auch als GR-Antagonist wirkt. Aufgrund der antiproliferativen Wirkung bei den LNCaP- und PC-3-Zellen, was auf die hauptsächliche Bindung an den GR zurückgeführt werden kann, ist ein Einsatz als Antitumortherapeutikum denkbar. XSA164 (**125**) könnte bei nachgewiesener agonistischer Wirkung am Progesteronrezeptor bzw. den Östrogenrezeptoren als hormonales Kontrazeptivum für die Frau mit zusätzlicher antiandrogener Komponente

eingesetzt werden. Die antiandrogene Komponente ermöglicht es, neben der kontrazeptiven Wirkung, Akne und Haarausfall (androgenetische Alopezie) zu therapieren. Als Gestagen kann die Substanz auch bei Endometriose und fortgeschrittenem Uterus- und Mammakarzinom eingesetzt werden.

Für das Phytosterol β -Sitosterol (**57**) ist ein Einfluss auf hormonelle Signalwege nachgewiesen worden. Im Vergleich zu anderen Phytosterolen, die mit denselben Methoden auf ihre Bindungsaffinität an den Steroidhormonrezeptoren überprüft worden sind, zeigt β -Sitosterol (**57**) die stärkste Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor ($K_i = 3,1 \mu\text{M}$). Allerdings ist diese nicht spezifisch. β -Sitosterol (**57**) bindet mit etwas stärkerer Affinität an den Glukokortikoidrezeptor ($K_i = 1,3 \mu\text{M}$). Hinsichtlich einer potentiellen Anwendung von β -Sitosterol (**57**) empfehlen sich *in vitro*-Versuche mit Zielzellen von Interesse. Dabei sollte auf möglichst physiologische Bedingungen geachtet werden.

Extrakte und Fraktionen

Da für den Ethylacetat-Extrakt QBR007 aus der Rinde von *Bumelia sartorum* im Zellproliferationsassay eine antiandrogene Wirkung nachweisbar war, ist eine tiefer gehende Analyse zu empfehlen. Für den Extrakt oder daraus isolierte Substanzen bietet sich hier ebenso die Messung der PSA-mRNA-Regulation in den VCaP-Zellen an. Für isolierte Substanzen ist zusätzlich ein Nachweis der Bindungsaffinitäten an den verschiedenen Steroidhormonrezeptoren von Interesse.

Für den Rohextrakt des Rhizoms von *Cibotium barometz* wurde eine leichte antiandrogene Aktivität nachgewiesen. Weiter führende analytische Untersuchungen nach Abschluss der Experimente für diese Arbeit führten zur Aufklärung der hauptsächlich für diese Wirkung verantwortlichen Strukturen. Diese neue Substanzklasse wurde kürzlich in einer Publikation von Nguyen *et al.* mit einer Inhibierung der Osteoklasten-Bildung in Verbindung gebracht²³². Da die Osteoklasten-Aktivität sowohl von Östrogenen als auch von Androgenen gehemmt wird, sind auch hier weitere Untersuchungen hinsichtlich der Ablärung einer spezifischen Wirkung am Androgenrezeptor bzw. Östrogenrezeptor nötig. Geeignet wäre eine Überprüfung der Bindungsaffinität am Androgen- bzw. Östrogenrezeptor für die isolierten Substanzen oder Versuche hinsichtlich einer potentiellen Anwendung an Zielzellen von Interesse, wie z. B. Prostatakrebszelllinien, Brustkrebszelllinien oder Keratinozyten der Haarzwiebel.

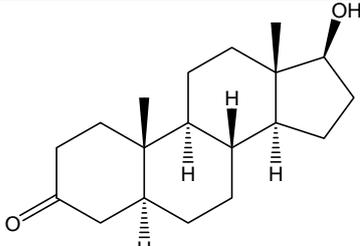
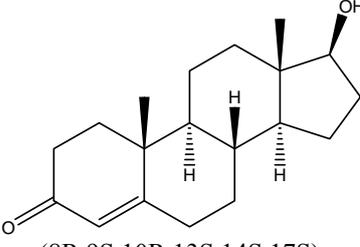
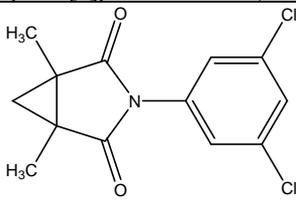
Eine zytotoxische Wirkung war für die Fraktionen der Organismen *Aglaia gigantea*, *Nephrolepis exaltata* und *Cortinarius brunneus* sowohl an LNCaP- als auch an PC-3-Zellen nachweisbar. Eine mögliche Strukturaufklärung der dafür verantwortlichen Substanzen ist bei diesen Organismen besonders interessant. Außerdem ist eine nähere Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung durch Messung der apoptotischen Aktivität und des Eingriffs in den Zellzyklus zu empfehlen. Eventuell ergeben sich hieraus neue Ansätze für Antikrebstherapeutika.

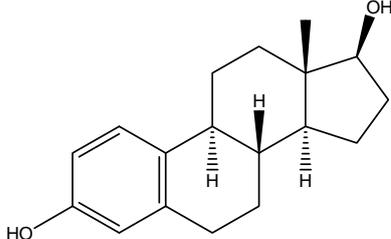
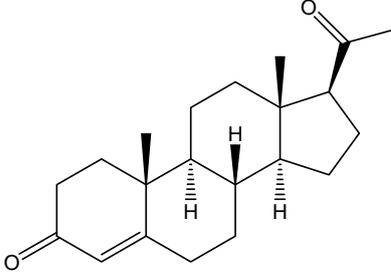
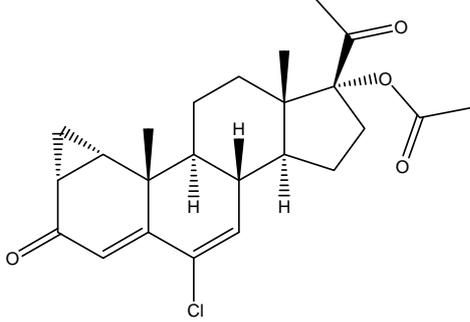
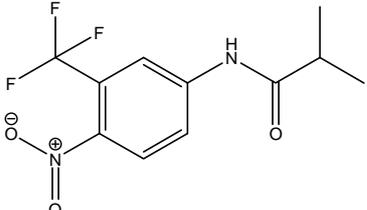
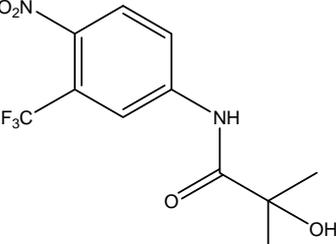
5 Anhang

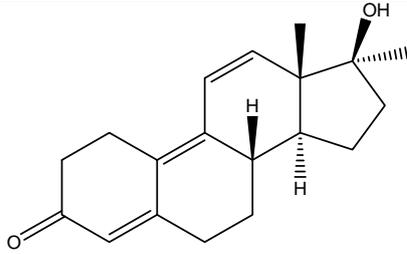
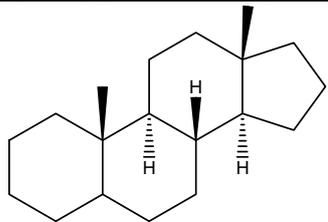
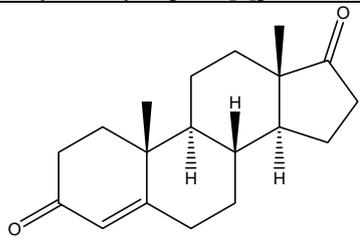
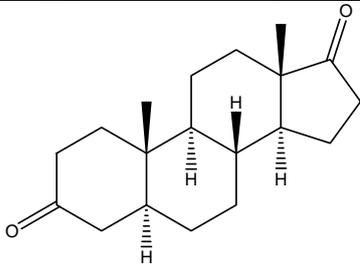
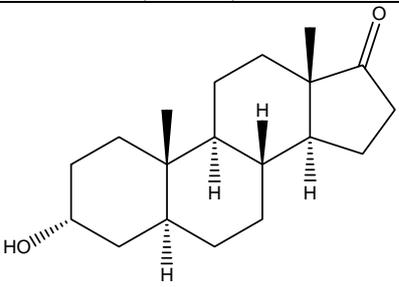
A Strukturformelverzeichnis

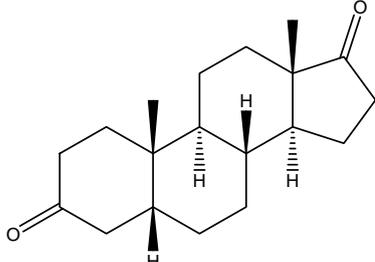
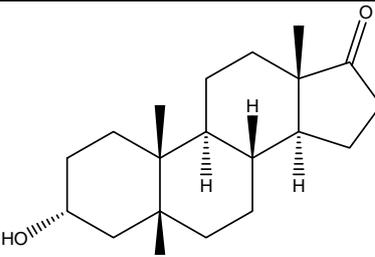
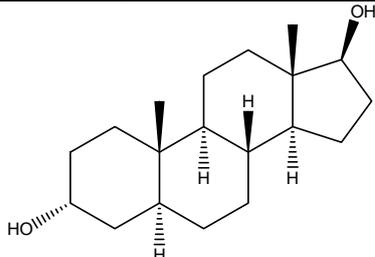
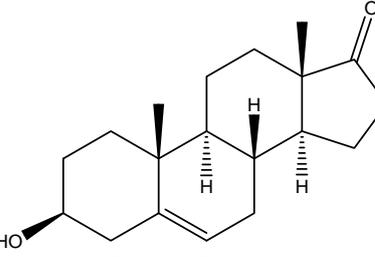
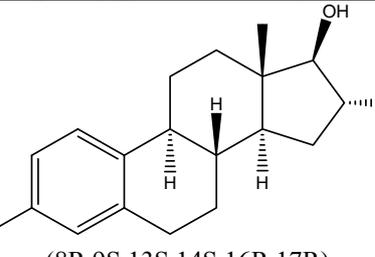
In der nachfolgenden Tabelle sind die Formelnummern, die Strukturformeln mit der in der IPB-Substanzdatenbank angegebenen Stereochemie und der IPB-internen Substanzbezeichnung (MolID, 3LC) oder mit dem Trivialnamen und dem IUPAC-Namen aller in der Arbeit erwähnten Verbindungen angegeben. Der IUPAC-Name wurde mit ChemDraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA) generiert. Die mit * markierten IUPAC-Namen wurden mit Marvin Sketch (ChemAxon, Ungarn) benannt.

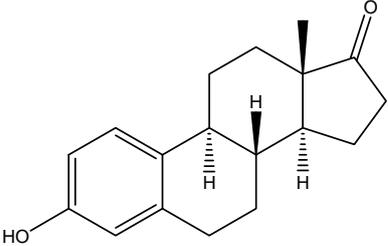
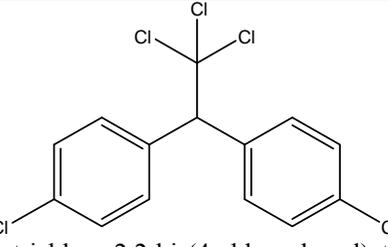
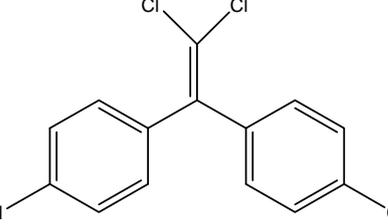
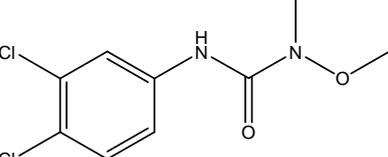
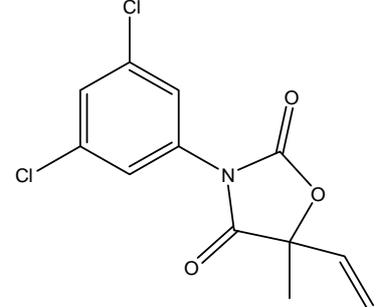
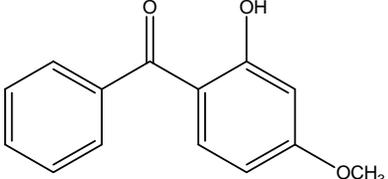
Tabelle 37: Strukturformelverzeichnis

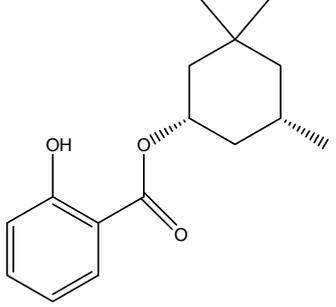
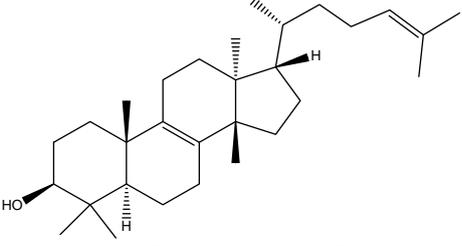
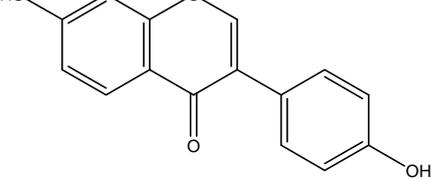
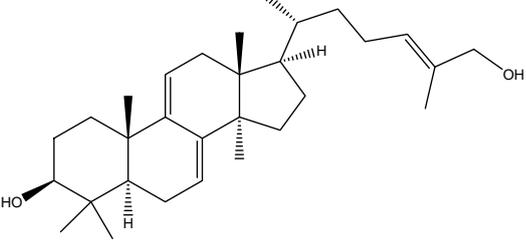
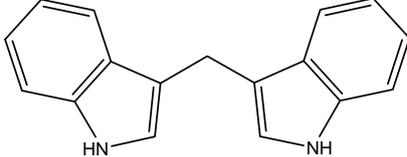
<i>Nr.</i>	<i>Struktur</i>	<i>Trivialname</i>	<i>MolID</i>	<i>3LC</i>
1	 <p>(5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-tetradecahydro-17-hydroxy-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-3(4H)-one</p>	Dihydrotestosteron	-	-
2	 <p>(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-1,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-17-hydroxy-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-3(6H)-one</p>	Testosteron	-	-
3	 <p>3-(3,5-dichlorophenyl)-1,5-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-2,4-dione</p>	Procymidon	-	-

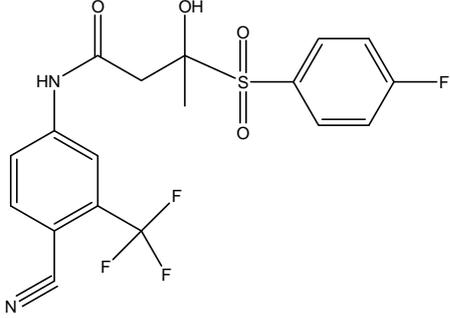
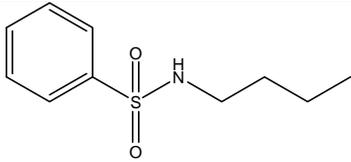
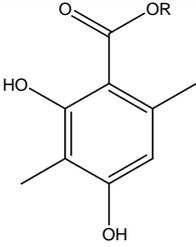
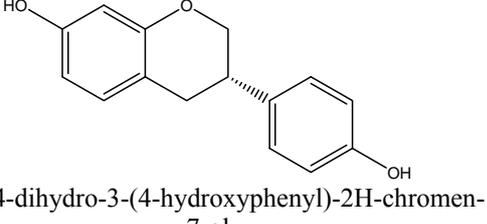
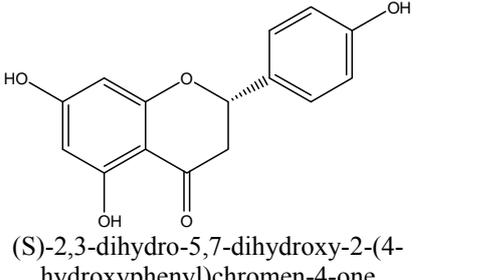
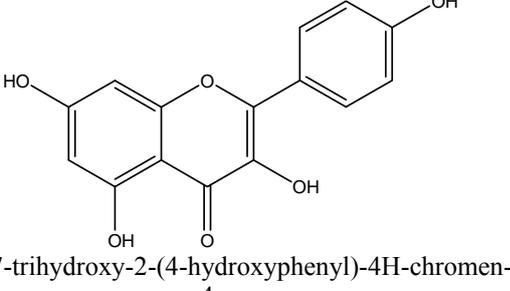
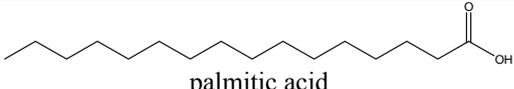
4	 <p>(8R,9S,13S,14S,17S)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-13-methyl-6H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,17-diol</p>	17β-Östradiol	-	-
5	 <p>(8S,9S,10R,13S,14S,17S)-17-acetyl-1,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-3(6H)-one</p>	Progesteron	-	-
6	 <p>(1S,2S,3S,5R,11R,12S,15R,16S)-15-acetyl-9-chloro-2,16-dimethyl-6-oxopentacyclo[9.7.0.0^{2,8}.0^{3,5}.0^{12,16}]octadeca-7,9-dien-15-yl acetate*</p>	Cyproteronacetat	-	-
7	 <p>N-(3-(trifluoromethyl)-4-nitrophenyl)isobutyramide</p>	Flutamid	-	-
8	 <p>N-(3-(trifluoromethyl)-4-nitrophenyl)-2-hydroxy-2-methylpropanamide</p>	Hydroxyflutamid	-	-

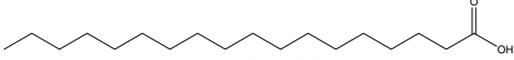
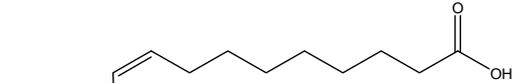
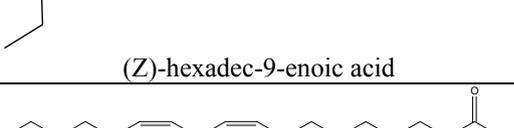
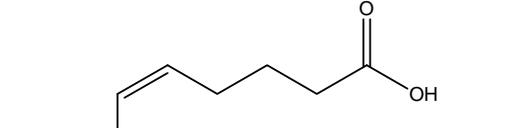
9	 <p>(8S,13S,14S,17S)-1,2,7,8,13,15,16,17-octahydro-17-hydroxy-13,17-dimethyl-6H-cyclopenta[a]phenanthren-3(14H)-one</p>	Methyltrienolon, R1881	-	-
10	 <p>(8S,9S,10S,13S,14S)-hexadecahydro-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthrene</p>	Androstan	-	-
11	 <p>(8R,9S,10R,13S,14S)-1,7,8,9,10,11,12,13,15,16-decahydro-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,17(6H,14H)-dione</p>	Androstendion	-	-
12	 <p>(5S,8R,9S,10S,13S,14S)-dodecahydro-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,17(4H,14H)-dione</p>	Androstandion	-	-
13	 <p>(3R,5S,8R,9S,10S,13S,14S)-tetradecahydro-3-hydroxy-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-17(14H)-one</p>	Androsteron	-	-

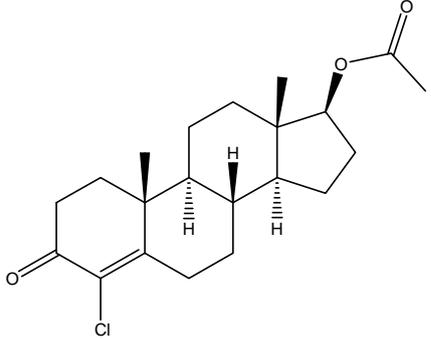
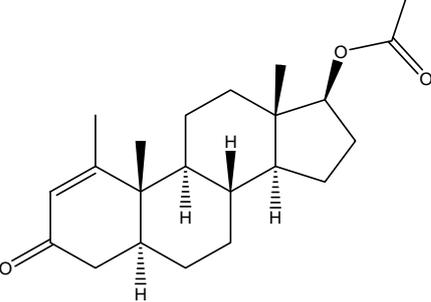
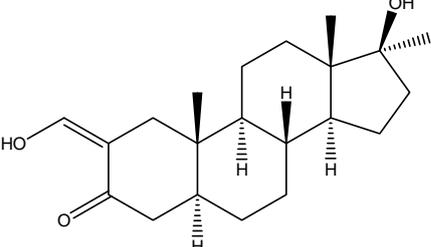
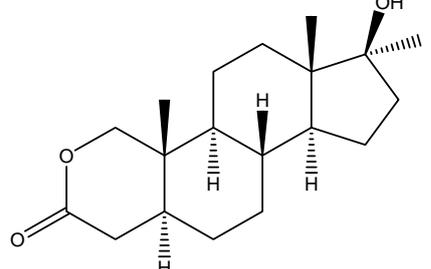
14	 <p>(5R,8R,9S,10S,13S,14S)-dodecahydro-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,17(4H,14H)-dione</p>	Aetiocholandion	-	-
15	 <p>(3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-tetradecahydro-3-hydroxy-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-17(14H)-one</p>	Aetiocholanolon	-	-
16	 <p>(3R,5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-hexadecahydro-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,17-diol</p>	Androstandiol	-	-
17	 <p>(3S,8R,9S,10R,13S,14S)-1,3,4,7,8,9,10,11,12,13,15,16-dodecahydro-3-hydroxy-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-17(14H)-one</p>	Dehydroepian-drosteron	-	-
18	 <p>(8R,9S,13S,14S,16R,17R)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-13-methyl-6H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,16,17-triol</p>	Östriol	-	-

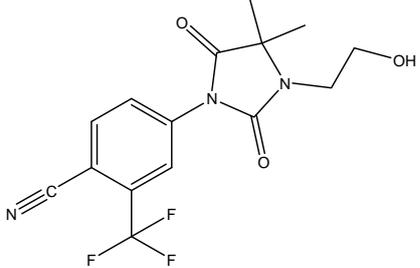
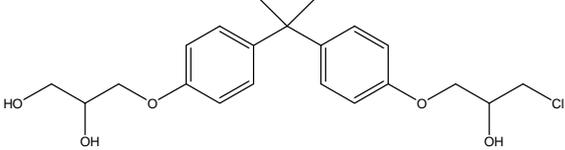
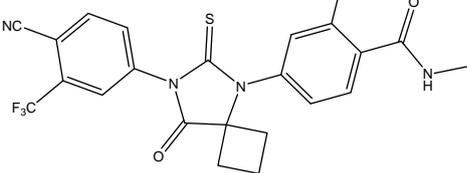
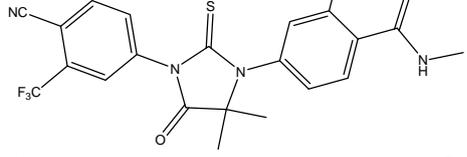
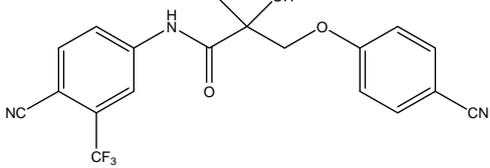
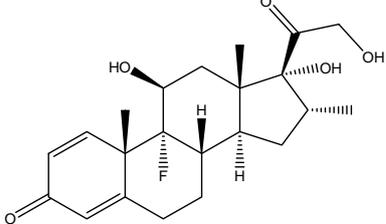
19	 <p>(8R,9S,13S,14S)-7,8,9,11,12,13,15,16-octahydro-3-hydroxy-13-methyl-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17(14H)-one</p>	Östron	-	-
20	 <p>1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane</p>	DDT	-	-
21	 <p>1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethene</p>	<i>p,p'</i> -DDE	-	-
22	 <p>3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea</p>	Linuron	-	-
23	 <p>3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyloxazolidine-2,4-dione</p>	Vinclozolin	-	-
24	 <p>(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)(phenyl)methanone</p>	Benzophenon-3	-	-

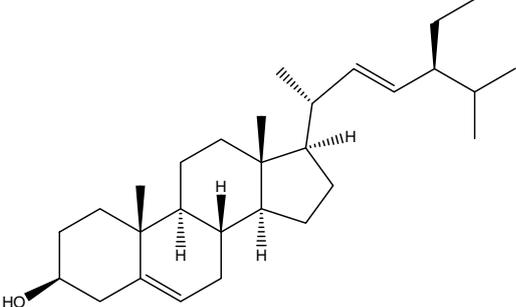
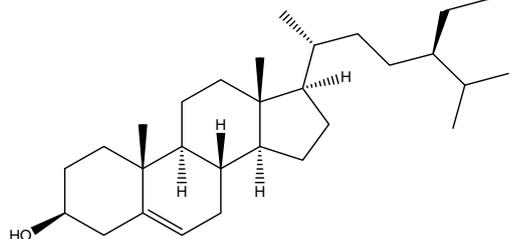
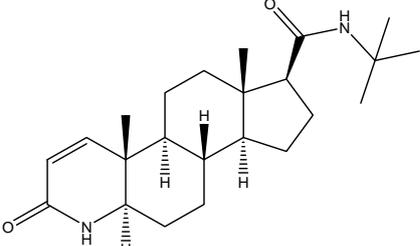
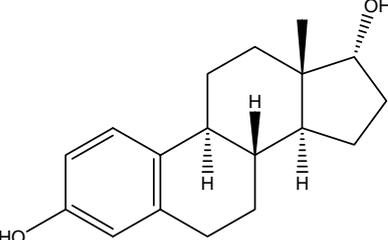
25	 <p>(1S,5S)-3,3,5-trimethylcyclohexyl 2-hydroxybenzoate</p>	Homosalat	-	-
26	 <p>(3S,5R,10S,13S,14S,17S)-2,3,4,5,6,7,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-4,4,10,13,14-pentamethyl-17-((R)-6-methylhept-5-en-2-yl)-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol</p>	Euphol	-	-
27	 <p>7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one</p>	Daidzein	-	-
28	 <p>(3S,5R,10S,13R,14R,17R)-2,3,4,5,6,10,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-17-((R,E)-7-hydroxy-6-methylhept-5-en-2-yl)-4,4,10,13,14-pentamethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol</p>	Ganoderol B	-	-
29	 <p>di(1H-indol-3-yl)methane</p>	3,3'-Diindolylmethan	-	-

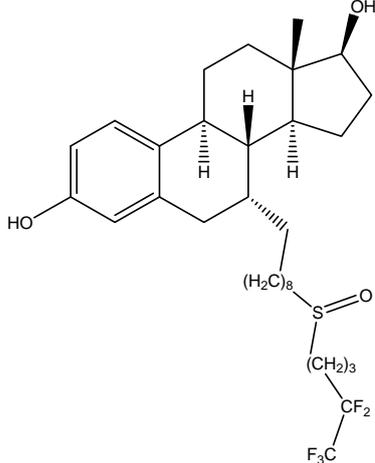
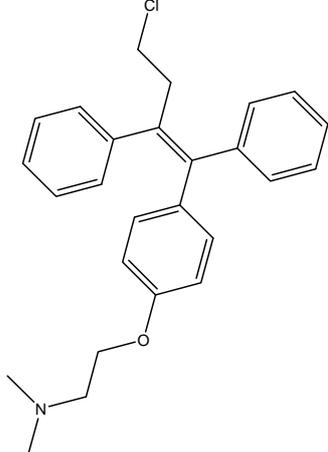
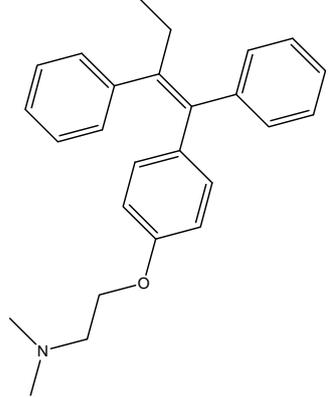
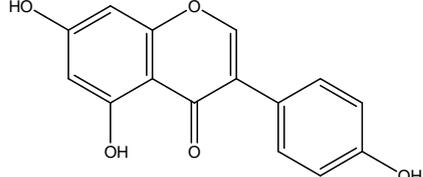
30	 <p>3-(4-fluorophenylsulfonyl)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-hydroxybutanamide</p>	Bicalutamid	-	-
31	 <p>N-butylbenzenesulfonamide</p>	N-Butylbenzenesulfonamid (NBBS)	-	-
32	 <p> R_1 CH₃ R_2 CH₂CH₃ R_3 CH₂CH₂CH₃ R_4 CH₂CH₂CH₂CH₃ </p> <p>methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate</p>	Atrarsäure R1 32 R2 33 R3 34 R4 35	-	-
36	 <p>(S)-3,4-dihydro-3-(4-hydroxyphenyl)-2H-chromen-7-ol</p>	Equol	-	-
37	 <p>(S)-2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one</p>	Naringenin	-	-
38	 <p>3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one</p>	Kämpferol	-	-
39	 <p>palmitic acid</p>	Palmitinsäure	-	-

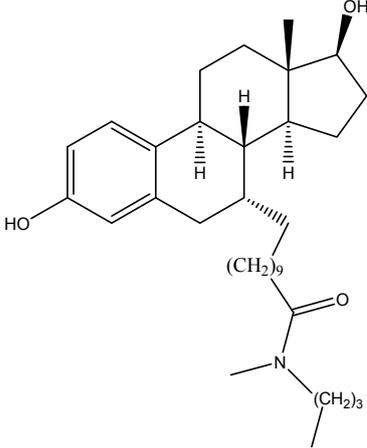
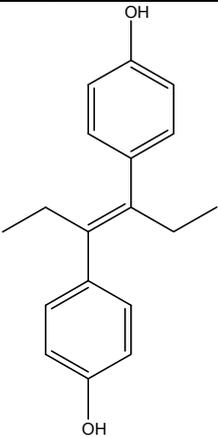
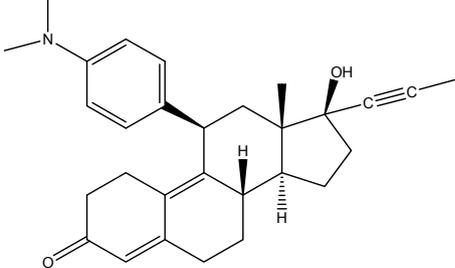
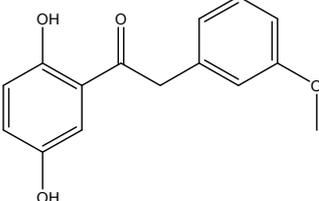
40	 <p>stearic acid</p>	Stearinsäure	-	-
41	 <p>(Z)-hexadec-9-enoic acid</p>	Palmitoleinsäure	-	-
42	 <p>(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid</p>	Linolsäure	-	-
43	 <p>(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid</p>	Arachidonsäure	-	-
44	 <p>(1S,5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-dodecahydro-17-hydroxy-1,10,13-trimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-3(4H,9H,14H)-one</p>	Mesterolon	-	-
45	 <p>(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-13-methyl-3-oxo-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl decanoate</p>	Nandrolondecanoat	-	-

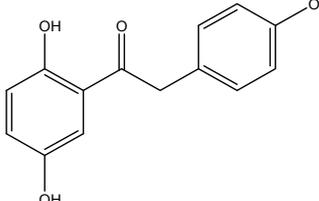
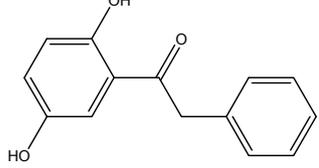
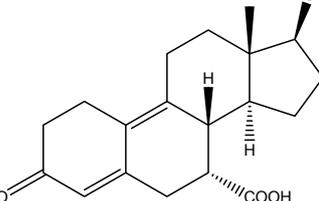
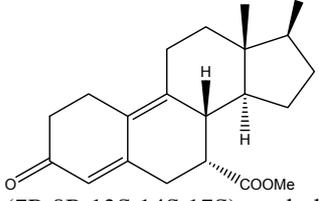
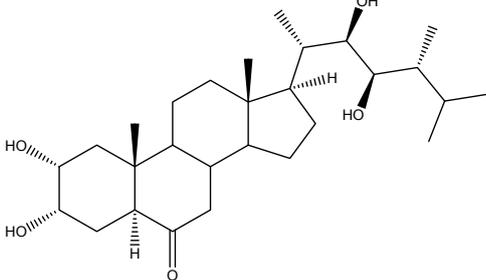
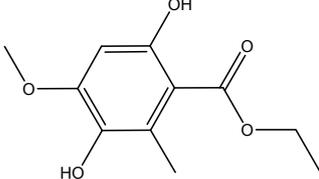
46	 <p>(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-4-chloro-2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-10,13-dimethyl-3-oxo-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl acetate</p>	Clostebolacetat	-	-
47	 <p>(5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1,10,13-trimethyl-3-oxo-3H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl acetate</p>	Metenolonacetat	-	-
48	 <p>(Z,5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-dodecahydro-17-hydroxy-2-(hydroxymethylene)-10,13,17-trimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-3(4H,9H,14H)-one</p>	Oxymetholon	-	-
49	 <p>(4aS,4bS,6aS,7S,9aS,9bR,11aS)-tetradecahydro-7-hydroxy-4a,6a,7-trimethylindeno[4,5-h]isochromen-2(1H)-one</p>	Oxandrolon	-	-

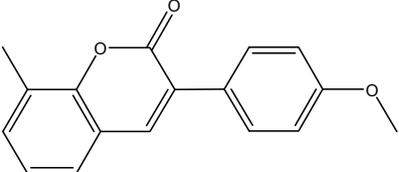
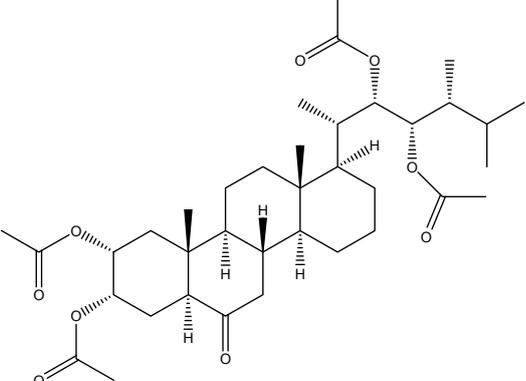
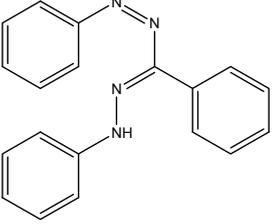
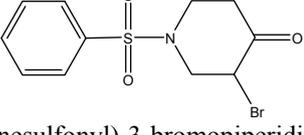
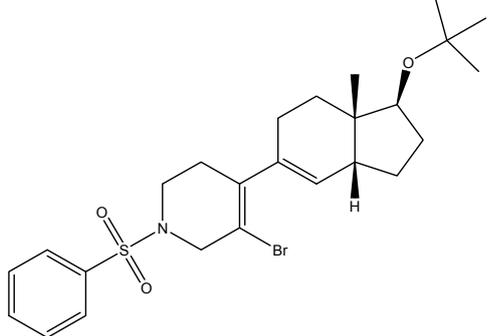
50	 <p>2-(trifluoromethyl)-4-(3-(2-hydroxyethyl)-4,4-dimethyl-2,5-dioximidazolidin-1-yl)benzonitrile</p>	RU 58841	-	-
51	 <p>3-(4-(2-(4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl)propan-2-yl)phenoxy)propane-1,2-diol</p>	EPI-001	-	-
52	 <p>4-[7-(4-Cyano-3-trifluoromethyl-phenyl)-8-oxo-6-thioxo-5,7-diaza-spiro[3.4]oct-5-yl]-2-fluoro-N-methylbenzamide</p>	RD 162	-	-
53	 <p>4-(3-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-5,5-dimethyl-4-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl)-2-fluoro-N-methylbenzamide</p>	MDV 3100	-	-
54	 <p>3-(4-cyanophenoxy)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxy-2-methylpropanamide</p>	SNARE-1	-	-
55	 <p>(8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-fluoro-7,8,11,12,13,15,16,17-octahydro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6H-cyclopenta[a]phenanthren-3(9H,10H,14H)-one</p>	Dexamethason	-	-

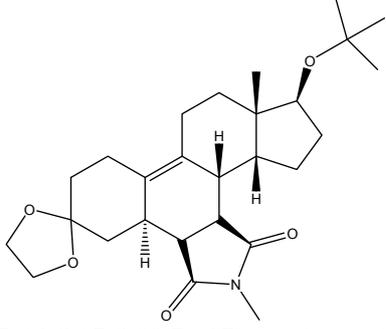
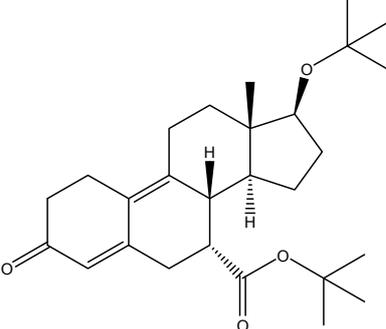
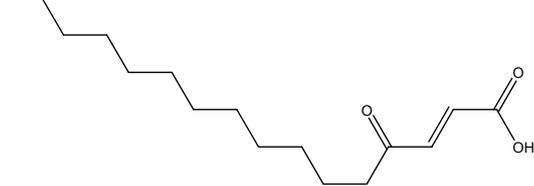
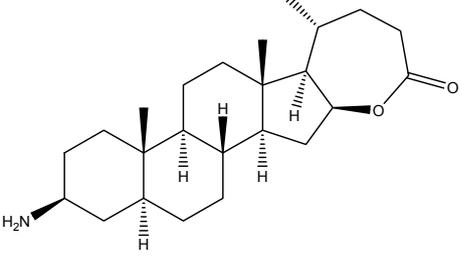
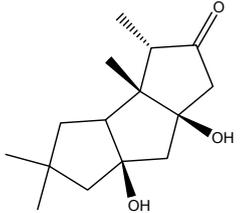
56	 <p>(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((E,2R,5S)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol</p>	Stigmasterol	-	-
57	 <p>(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol</p>	β -Sitosterol	-	-
58	 <p>(4aR,4bS,6aS,7S,9aS,9bS,11aR)-N-tert-butyl-2,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,9a,9b,10,11,11a-tetradecahydro-4a,6a-dimethyl-2-oxo-1H-indeno[5,4-f]quinoline-7-carboxamide</p>	Finasterid	-	-
59	 <p>(8R,9S,13S,14S,17R)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-13-methyl-6H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,17-diol</p>	17 α -Östradiol	-	-

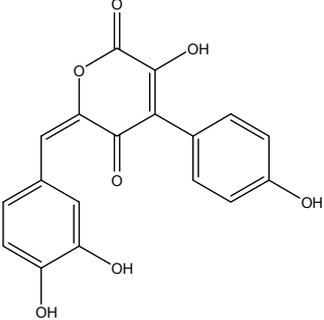
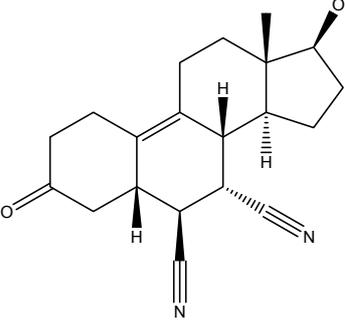
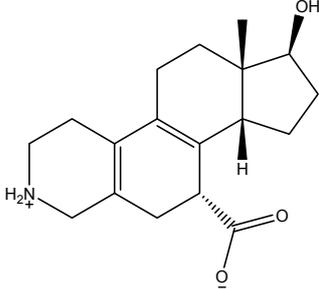
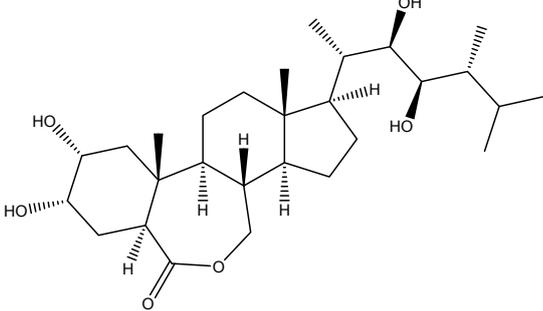
60	 <p>(1S,9R,10R,11S,14S,15S)-15-methyl-9-$\{9-[(4,4,5,5,5\text{-pentafluoropentane})\text{sulfinyl}]nonyl\}$tetracyclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]hepta-deca-2,4,6-triene-5,14-diol*</p>	Fulvestrant	-	-
61	 <p>2-(4-((Z)-4-chloro-1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy)-N,N-dimethylethanamine</p>	Toremifen	-	-
62	 <p>2-(4-((Z)-1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy)-N,N-dimethylethanamine</p>	Tamoxifen	-	-
63	 <p>5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one</p>	Genistein	-	-

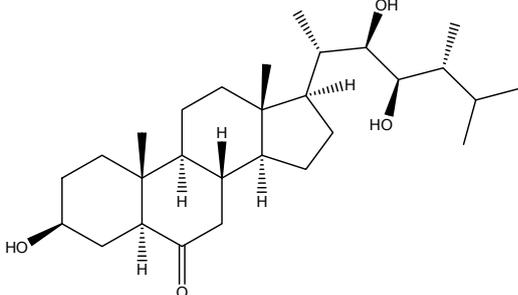
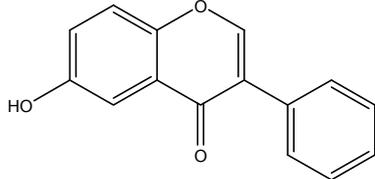
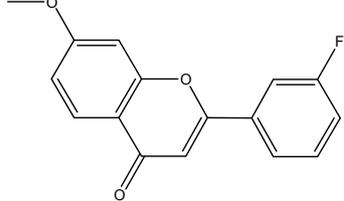
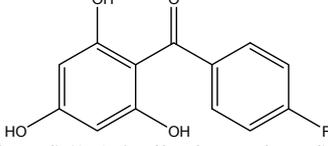
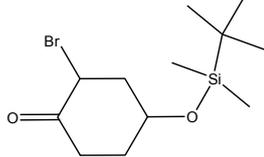
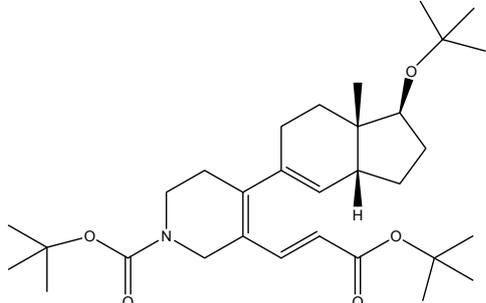
64	 <p>N-butyl-11-((7R,8R,9S,13S,14S,17S)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-3,17-dihydroxy-13-methyl-6H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl)-N-methylundecanamide</p>	ICI 164 384	-	-
65	 <p>4-((E)-4-(4-hydroxyphenyl)hex-3-en-3-yl)phenol</p>	Diethylstilbestrol	-	-
66	 <p>(8S,11R,13S,14S,17S)-11-(4-(dimethylamino)phenyl)-1,2,7,8,11,12,13,15,16,17-decahydro-17-hydroxy-13-methyl-17-(prop-1-ynyl)-6H-cyclopenta[a]phenanthren-3(14H)-one</p>	Mifepriston (Ru-486)	-	-
67	 <p>1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-(3-methoxyphenyl)ethanone</p>	-	1800	MAD994

68	 <p>1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)ethanone</p>	-	1801	MAD998
69	 <p>1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-phenylethanone</p>	-	1795	MAD925
70	 <p>(7R,8R,13S,14S,17S)-2,3,6,7,8,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-17-hydroxy-13-methyl-3-oxo-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-7-carboxylic acid</p>	-	2669	QDM255
71	 <p>(7R,8R,13S,14S,17S)-methyl 2,3,6,7,8,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-17-hydroxy-13-methyl-3-oxo-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-7-carboxylate</p>	-	2670	QDM276
72	 <p>(2R,3S,5S,10R,13S,17R)-tetradecahydro-2,3-dihydroxy-17-((2S,3R,4R,5R)-3,4-dihydroxy-5,6-dimethylheptan-2-yl)-10,13-dimethyl-9H-cyclopenta[a]phenanthren-6(14H)-one</p>	24-Epicastasteron	-	-
73	 <p>ethyl 3,6-dihydroxy-4-methoxy-2-methylbenzoate</p>	-	2113	MAD919

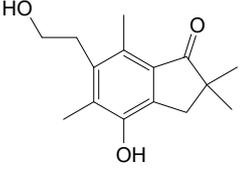
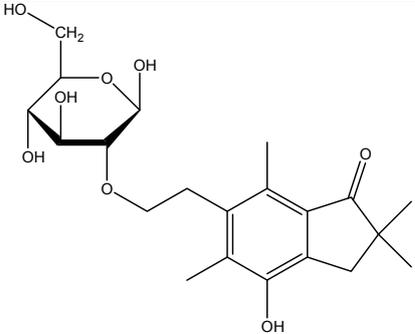
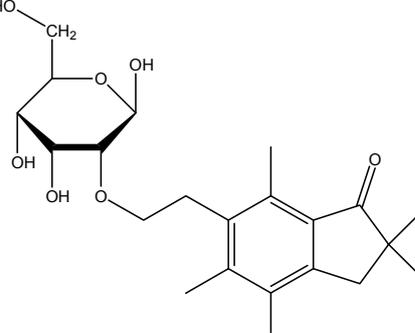
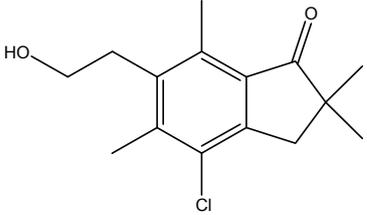
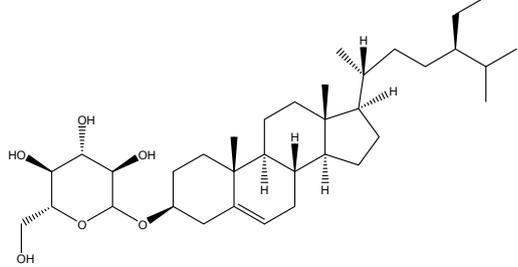
74	 <p>3-(4-methoxyphenyl)-8-methyl-2H-chromen-2-one</p>	-	1594	MAD968
75	 <p>(2R,3S,5S,10R,13S,17R)-17-[(2S,3S,4S,5R)-3,4-diacetoxy-5,6-dimethylheptan-2-yl]-2,3-diacetoxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,5,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-6-one</p>	Trisepicastasterontetraacetat	-	-
76	 <p>(2E,4Z)-1,3,5-triphenylformazan</p>	-	1266	ZAC000
77	 <p>1-(benzenesulfonyl)-3-bromopiperidin-4-one*</p>	-	3114	QDM101
78	 <p>4-[(1S,3aR,7aS)-1-(tert-butoxy)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1H-inden-5-yl]-1-(benzenesulfonyl)-5-bromo-1,2,3,6-tetrahydropyridine*</p>	-	3115	QDM103

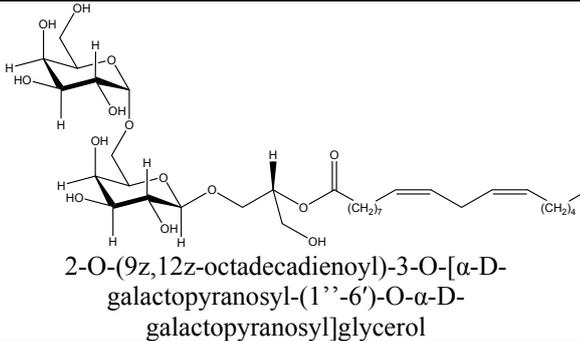
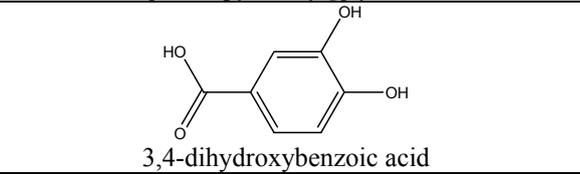
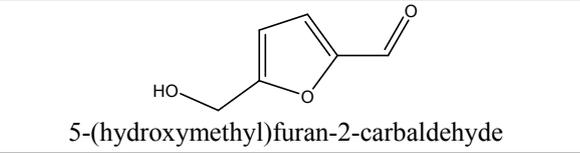
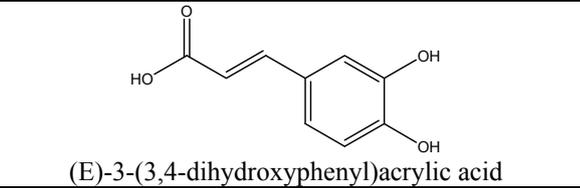
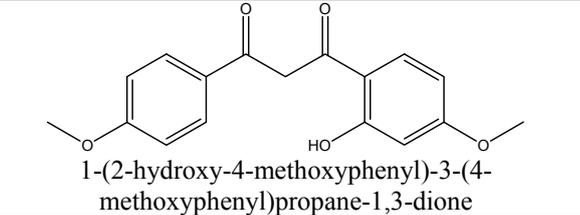
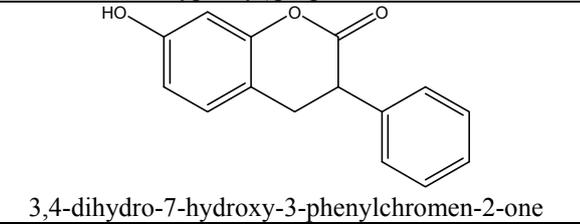
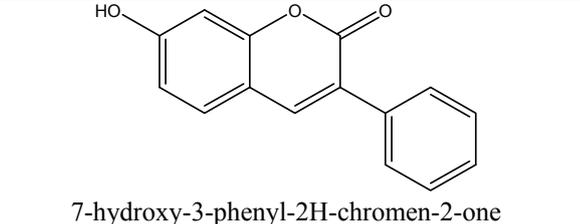
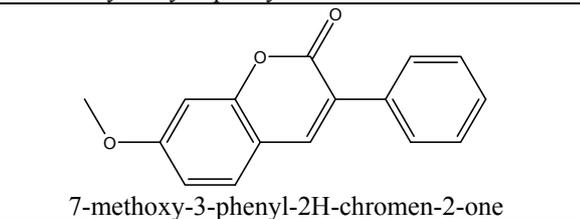
79	 <p>(1'R,7'R,16'S,17'S,20'R)-17'-(tert-butoxy)-4',16'-dimethyl-4'-azaspiro[1,3-dioxolane-2,9'-pentacyclo[11.7.0.0^{2,6}.0^{7,12}.0^{16,20}]jicosan]-12²-ene-3²,5²-dione*</p>	-	3118	QDM376
80	 <p>(7R,8R,13S,14S,17S)-tert-butyl 17-tert-butoxy-2,3,6,7,8,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-13-methyl-3-oxo-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-7-carboxylate</p>	-	3122	QDM441
81	 <p>(E)-4-oxohexadec-2-enoic acid</p>	-	5084	DRT173
82	 <p>(1R, 2S, 4S, 9R, 10R, 11S, 14S, 15S, 18S, 20S)-18-amino-9, 11, 15-trimethyl-5-oxapentacyclo[12.8.0.0^{2,11}.0^{4,10}.0^{15,20}]docosan-6-one*</p>	-	496	ZAB000
83	 <p>(2R,3S,6R,8R)-6,8-dihydroxy-2,3,10,10-tetramethyltricyclo[6.3.0.0^{2,6}]undecan-4-one*</p>	-	1482	ZAC000

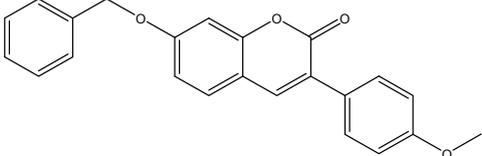
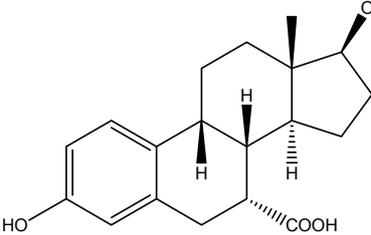
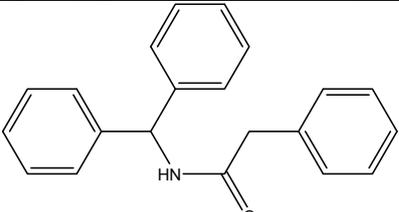
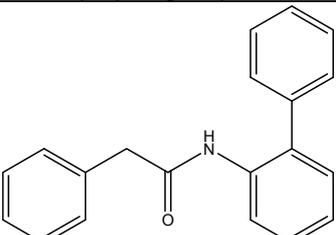
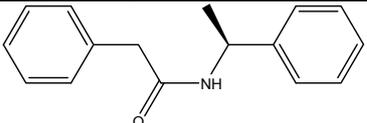
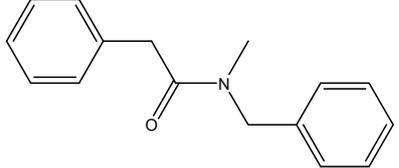
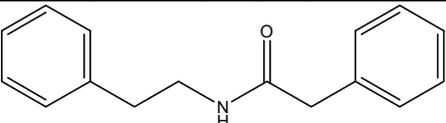
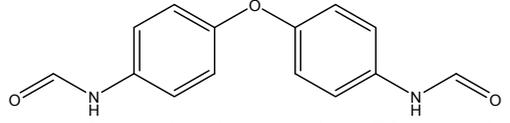
84	 <p>(6E)-6-(3,4-dihydroxybenzylidene)-3-hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-6H-pyran-2,5-dione</p>	-	1286	ZAC000
85	 <p>(5S,6S,7S,8R,13S,14S,17S)-2,3,4,5,6,7,8,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-17-hydroxy-13-methyl-3-oxo-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-6,7-dicarbonitrile</p>	-	2671	QDM520
86	 <p>(9R,11R,14S,15S)-14-hydroxy-15-methyl-5-azatetracyclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-1(10),2(7)-dien-5-ium-9-carboxylate*</p>	-	2673	QDM438
87	 <p>24-epi-(22R,23R)-2α,3α,22,23-tetrahydroxy-7α-homo-7-oxa-5α-campestan-6-one</p>	24-Epibrassinolid	-	-

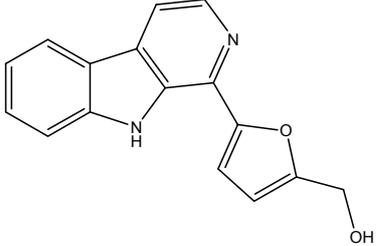
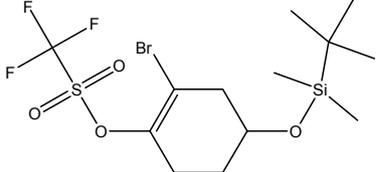
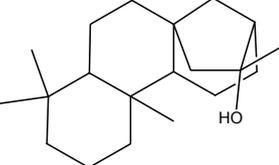
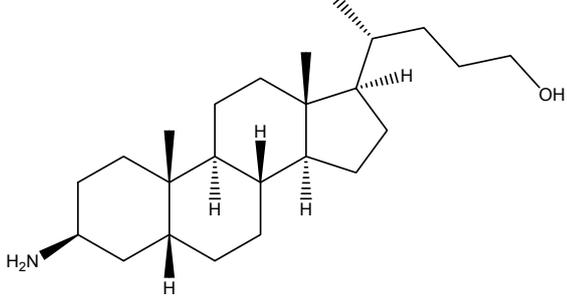
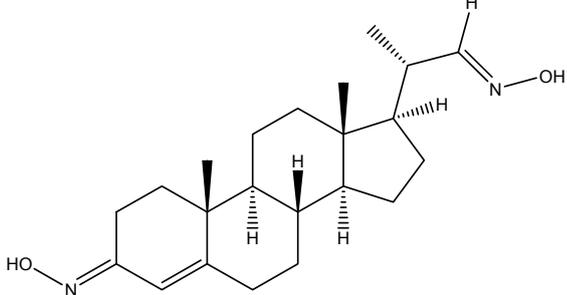
88	 <p>(3S,5S,8S,9S,10R,13S,14S,17R)-tetradecahydro-3-hydroxy-17-((2S,3R,4R,5R)-3,4-dihydroxy-5,6-dimethylheptan-2-yl)-10,13-dimethyl-9H-cyclopenta[a]phenanthren-6(14H)-one</p>	24-Epiteasteron	-	-
89	 <p>6-hydroxy-3-phenyl-4H-chromen-4-one</p>	-	1592	MAD970
90	 <p>2-(3-fluorophenyl)-7-methoxy-4H-chromen-4-one</p>	-	1587	MAD980
91	 <p>(4-fluorophenyl)(2,4,6-trihydroxyphenyl)methanone</p>	-	1569	DBC051
92	 <p>2-bromo-4-[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]cyclohexan-1-one*</p>	-	3113	QDM100
93	 <p>tert-butyl 3-((E)-2-(tert-butoxycarbonyl)vinyl)-4-((1S,3aR,7aS)-1-tert-butoxy-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-7a-methyl-1H-inden-5-yl)-5,6-dihydropyridine-1(2H)-carboxylate</p>	-	3119	QDM407

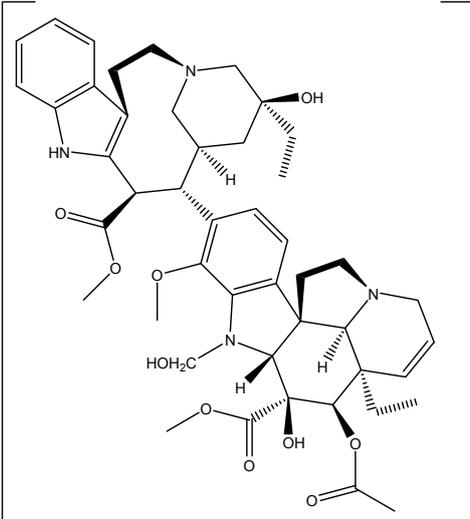
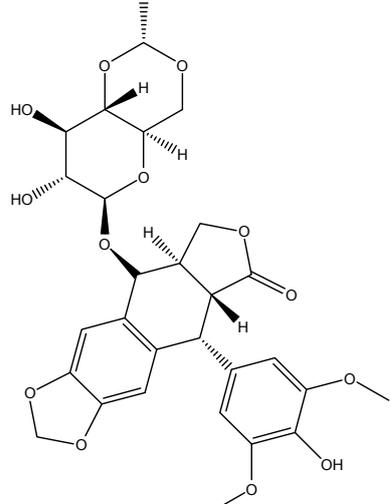
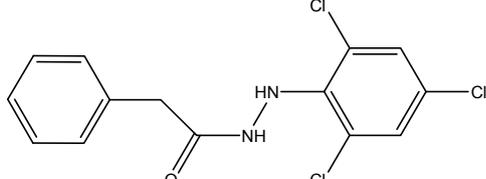
94	<p>tert-butyl (11R, 14S, 15S)-5-(benzenesulfonyl)-14-(tert-butoxy)-15-methyl-5-azatetracyclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-1(10),2(7)-diene-9-carboxylate*</p>	-	3125	QDM494
95	<p>(S)-4-((5R, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 17S)-hexadecahydro-10,13-dimethyl-3-oxo-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanoic acid</p>	-	2400	XSA108
96	<p>(1E, 3Z)-3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)deca-1,3-dien-5-one</p>	-	966	DFK043
97	<p>3,5-dihydroxyphenyl 4-bromobenzoate</p>	-	1742	DBC032
98	<p>5-(4-ethylphenyl)benzene-1,3-diol*</p>	-	3321	GUG333
99	<p>(1R, 2S, 6R, 7S, 16S, 17S, 20S)-17-hydroxy-4,16-dimethyl-4-azapentacyclo[11.7.0.0^{2,6}.0^{7,12}.0^{16,20}]icos-12-ene-3,5,9-trione*</p>	-	2672	QDM458

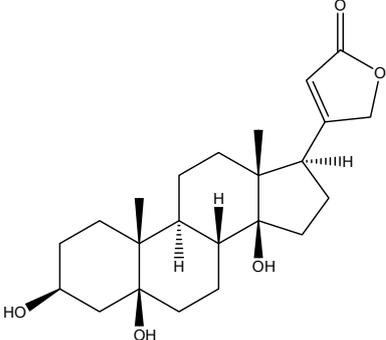
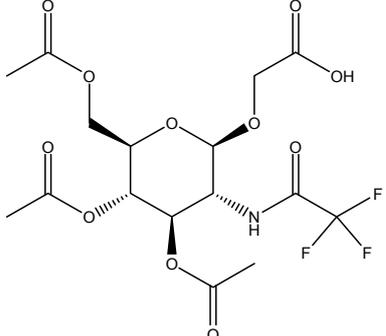
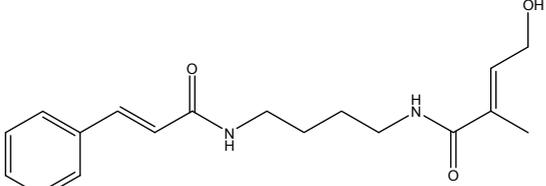
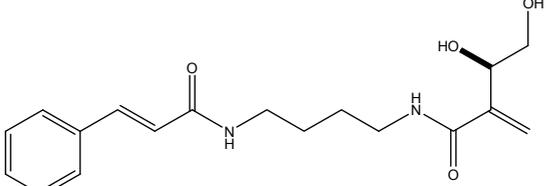
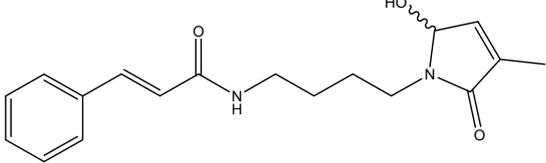
100	 <p>2,3-dihydro-4-hydroxy-6-(2-hydroxyethyl)-2,2,5,7-tetramethylinden-1-one</p>	Onitin	-	-
101	 <p>6-(2-((2R,3S,4R,5S)-tetrahydro-2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2H-pyran-3-yloxy)ethyl)-2,3-dihydro-4-hydroxy-2,2,5,7-tetramethylinden-1-one</p>	Onitin-2'-O-β-D-glukosid	-	
102	 <p>6-(2-((2R,3S,4S,5S)-tetrahydro-2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2H-pyran-3-yloxy)ethyl)-2,3-dihydro-4-hydroxy-2,2,5,7-tetramethylinden-1-one</p>	Onitin-2'-O-α-D-allosid	-	-
103	 <p>4-chloro-2,3-dihydro-6-(2-hydroxyethyl)-2,2,5,7-tetramethylinden-1-one</p>	Pterosin R	-	-
104	 <p>(3R,4S,5S,6R)-2-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-17-((2R,5R)-5-isopropylheptan-2-yl)-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yloxy)-tetrahydro-6-(hydroxymethyl)-2H-pyran-3,4,5-triol</p>	Daucosterol	-	-

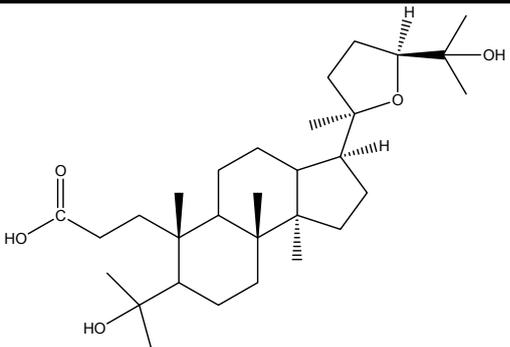
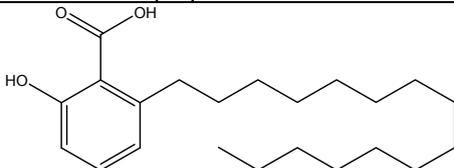
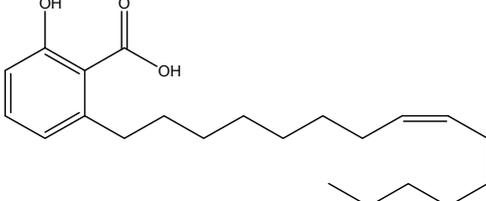
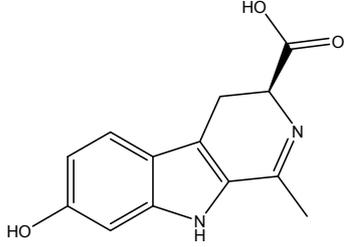
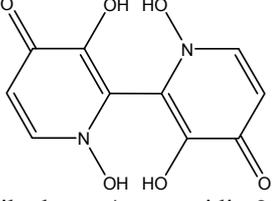
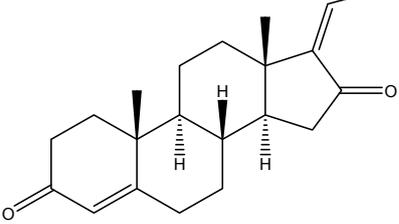
<p>105</p>  <p>2-O-(9z,12z-octadecadienoyl)-3-O-[α-D-galactopyranosyl-(1''-6')-O-α-D-galactopyranosyl]glycerol</p>	<p>Shinbarometin</p>	-	-
<p>106</p>  <p>3,4-dihydroxybenzoic acid</p>	<p>Protocatechusäure</p>	-	-
<p>107</p>  <p>5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde</p>	<p>5-Hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyd</p>	-	-
<p>108</p>  <p>(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid</p>	<p>Kaffeesäure</p>	-	-
<p>109</p>  <p>1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione</p>	-	1593	MAD969
<p>110</p>  <p>3,4-dihydro-7-hydroxy-3-phenylchromen-2-one</p>	-	1790	MAD955
<p>111</p>  <p>7-hydroxy-3-phenyl-2H-chromen-2-one</p>	<p>3-Phenylumbelliferone</p>	1789	MAD952
<p>112</p>  <p>7-methoxy-3-phenyl-2H-chromen-2-one</p>	-	1786	MAD958

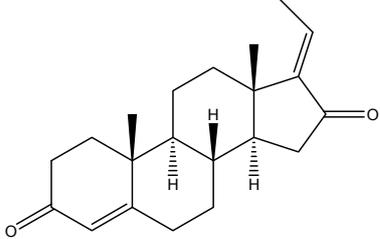
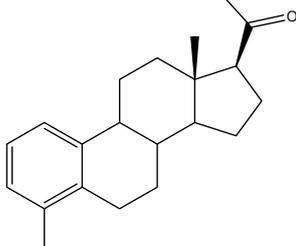
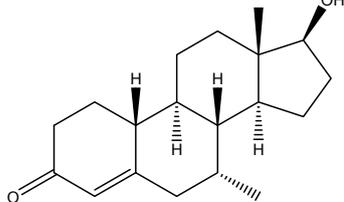
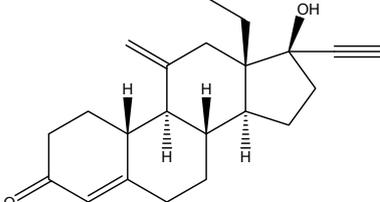
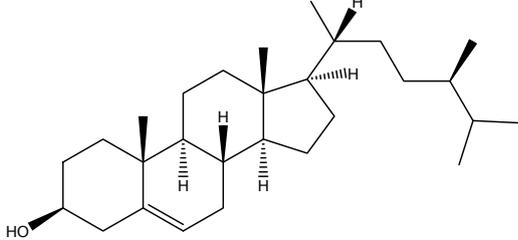
113	 <p>7-(benzyloxy)-3-(4-methoxyphenyl)-2H-chromen-2-one</p>	-	1781	MAD961
114	 <p>(7R,8R,9R,13S,14S,17S)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-3,17-dihydroxy-13-methyl-6H-cyclopenta[a]phenanthrene-7-carboxylic acid</p>	-	2668	QDM237
115	 <p>N-benzhydryl-2-phenylacetamide</p>	-	1988	TPT094
116	 <p>2-phenyl-N-(2-phenylphenyl)acetamide*</p>	-	1990	TPT095
117	 <p>2-phenyl-N-((S)-1-phenylethyl)acetamide</p>	-	1992	TPT097
118	 <p>N-benzyl-N-methyl-2-phenylacetamide</p>	-	1995	TPT100
119	 <p>N-phenethyl-2-phenylacetamide</p>	-	1996	TPT101
120	 <p>N-[4-(4-formamidophenoxy)phenyl]formamide*</p>	-	1885	XSA006

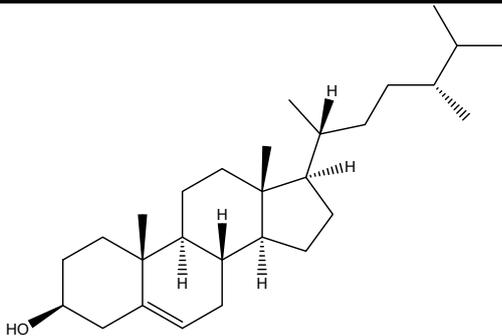
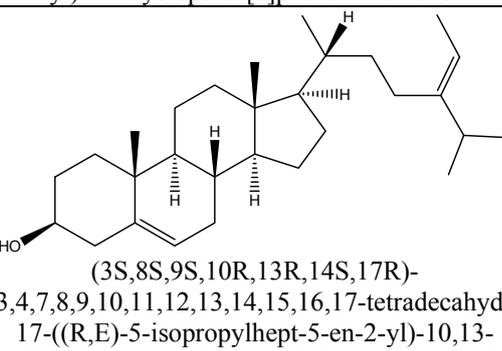
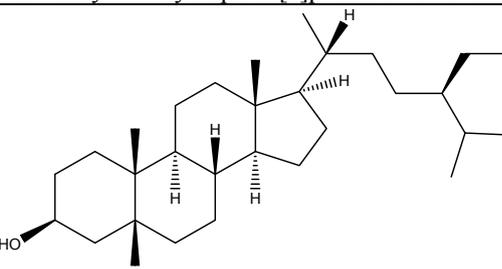
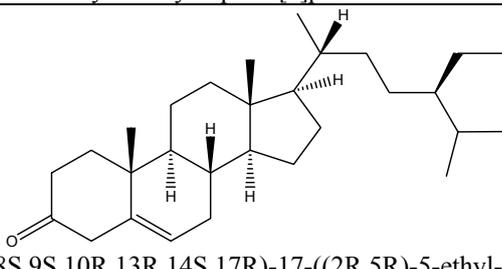
121	 <p>(5-(9H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)furan-2-yl)methanol</p>	-	1124	NHV015
122	 <p>2-bromo-4-[(tert-butyl dimethylsilyl)oxy]cyclohex-1-en-1-yl trifluoromethanesulfonate*</p>	-	3126	QDM507
123	 <p>1,4-Dimethoxycyclohex-1-en</p>	-	3111	QDM501
124	 <p>5,5,9,14-tetramethyltetracyclo[11.2.1.0^{1,10}.0^{4,9}]hexadecan-14-ol*</p>	-	535	ZAB000
125	 <p>(R)-4-((3S,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-amino-hexadecahydro-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentan-1-ol</p>	-	2415	XSA164
126	 <p>(E)-N-[(2S)-2-[(1R, 2R, 5E, 10R, 11R, 14R, 15S)-5-(hydroxyimino)-2,15-dimethyltetracyclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadec-6-en-14-yl]propylidene] hydroxylamine*</p>	-	2573	XSA134

127	 <p>H_2SO_4</p> <p>(1R,9R,10S,11R,12R,19R)-11-(acetyloxy)-12-ethyl-5-[(1R,13R,14S,15S,17S)-17-ethyl-17-hydroxy-13-(methoxycarbonyl)-1,11-diazatetracyclo[13.3.1.0^{4,12}.0^{5,10}]nonadeca-4(12),5,7,9-tetraen-1-ium-14-yl]-10-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-6-methoxy-10-[methoxy(oxo)methane]-8,16-diazapentacyclo[10.6.1.0^{1,9}.0^{2,7}.0^{16,19}]nonadeca-2(7),3,5,13-tetraen-16-ium sulfate*</p>	Vincristinsulfat	-	-
128	 <p>(10R,11R,15R)-16-{[(2R,4aR,6R,7R,8R,8aS)-7,8-dihydroxy-2-methyl-hexahydro-2H-pyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6-yl]oxy}-10-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4,6,13-trioxatetracyclo[7.7.0.0^{3,7}.0^{11,15}]hexadeca-1,3(7),8-trien-12-one*</p>	Etoposid	-	-
129	 <p>N'-(2,4,6-Trichlorophenyl)-2-phenylazetohydrazid</p>	-	1678	ZHM118-10

130	 <p>4-((3S,5S,8R,9S,10R,13R,14S,17R)-Hexadecahydro-3,5,14-trihydroxy-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)furan-2(5H)-on</p>	-	1913	MMK009
131	 <p>2-[[2R, 3R, 4R, 5S, 6R]-4,5-bis(acetyloxy)-6-[(acetyloxy)methyl]-3-(2,2,2-trifluoroacetamido)oxan-2-yl]acetic acid*</p>	-	363	ZAB000
132	 <p>(2E)-N-(4-(cinnamamido)butyl)-4-hydroxy-2-methylbut-2-enamide</p>	Dasyclamid	-	-
133	 <p>(R)-N-(4-(cinnamamido)butyl)-3,4-dihydroxy-2-methylenebutanamide</p>	Grandiamid D	-	-
134	 <p>(2E)-N-(4-(5-hydroxy-3-methyl-2-oxo-2H-pyrrol-1(5H)-yl)butyl)cinnamamide</p>	Gigantamid A	-	-

135	 <p>Dodecahydro-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-6,9a,9b-trimethyl-3-[(2,5)-tetrahydro-5-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-methyl-2-furanyl]-1H-benz[e]indene-6-propionic acid</p>	Foveolin B	-	-
136	 <p>2-hydroxy-6-pentadecylbenzoic acid</p>	Anacardsäure	-	-
137	 <p>2-hydroxy-6-((Z)-pentadec-8-enyl)benzoic acid</p>	Ginkgolsäure	-	-
138	 <p>(S)-4,9-dihydro-7-hydroxy-1-methyl-3H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid</p>	Brunnein A	-	-
139	 <p>2-(1,3-dihydroxy-4-oxopyridin-2-yl)-1,3-dihydroxypyridin-4-one</p>	Orellanin	-	-
140	 <p>(8R,9S,10R,13S,14S,17Z)-17-ethylidene-1,7,8,10,11,12,13,14,15,17-decahydro-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,16(6H,9H)-dione</p>	Guggulsteron Z	-	-

141	 <p>(8R,9S,10R,13S,14S,17E)-17-ethylidene-1,7,8,10,11,12,13,14,15,17-decahydro-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,16(6H,9H)-dione</p>	Guggulsteron E	-	-
142	 <p>1-((13S,17S)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-4,13-dimethyl-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)ethanone</p>	S42		
143	 <p>(7R,8R,9S,10R,13S,14S,17S)-1,7,8,10,11,12,13,15,16,17-decahydro-17-hydroxy-7,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-3(6H,9H,14H)-one</p>	MENT	-	-
144	 <p>(8S,9S,10R,13S,14S,17S)-13-ethyl-17-ethynyl-1,7,8,10,11,12,13,15,16,17-decahydro-17-hydroxy-11-methylene-2H-cyclopenta[a]phenanthren-3(6H,9H,14H)-one</p>	Etonogestrel	-	-
145	 <p>(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-10,13-dimethyl-17-((2R,5R)-5,6-dimethylheptan-2-yl)-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol</p>	Campesterol	-	-

146	 <p>(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-10,13-dimethyl-17-((2R,5R)-5,6-dimethylheptan-2-yl)-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol</p>	Dihydrobrassicasterol	-	-
147	 <p>(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-17-((R,E)-5-isopropylhept-5-en-2-yl)-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol</p>	Fucosterol	-	-
148	 <p>(3S,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-hexadecahydro-10,13-dimethyl-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol</p>	Stigmastanol	-	-
149	 <p>(8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-1,7,8,10,11,12,13,15,16,17-decahydro-10,13-dimethyl-2H-cyclopenta[a]phenanthren-3(4H,9H,14H)-one</p>	β -Sitosteron	-	-

B Verzeichnis der verwendeten Kits, Geräte und Materialien

Tabelle 38: Kits

<i>Method</i>	<i>Verwendete Kits</i>	<i>Firma</i>
Zellproliferation	Cell Proliferation Kit II, XTT	Roche Diagnostics Applied Science (Mannheim, BRD)
Fluoreszenzpolarisation	FP Standardization Reference Kit	PanVera Corporation, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
AR-Bindungsassay	PolarScreen™ Androgen Receptor Competitor Assay Kit, Green	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
ER α -Bindungsassay	PolarScreen™ Estrogen Receptor-alpha Competitor Assay Kit, Green	Invitrogen
ER β -Bindungsassay	PolarScreen™ Estrogen Receptor-beta Competitor Assay Kit, Green	Invitrogen
GR-Bindungsassay	PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit, Red	Invitrogen
PR-Bindungsassay	PolarScreen™ Progesteron Receptor Competitor Assay Kit, Red	Invitrogen
RNA-Isolation	RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, BRD)
DNase-Verdau	Deoxyribonuclease I Amplification Grade Kit	Invitrogen
Reverse Transkription	Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (Ontario, Kanada)
Quantitative Real Time-PCR	Platinum Sybr Green qPCR Super Mix – UDG Kit	Invitrogen
Klonierung der Plasmide	pCR2.1-TOPO Klonierungsvektor	Invitrogen
Plasmidpräparation	NucleoBond AX	Macherey-Nagel (Düren, BRD)

Tabelle 39: Geräte

<i>Method</i>	<i>Gerät</i>	<i>Firma</i>
Zellproliferation	ELISA Reader, MRX TC II	Dynex Technologies (Berlin, BRD)
Mikroskopie	Umkehrmikroskop Telaval 3	Carl-Zeiss-Jena (Jena, BRD)
Rezeptorbindungsassays	GENiosPro Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Bestimmung der RNA-Konzentration	BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, BRD)
Reverse Transkription	T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, BRD)
Quantitative Real Time-PCR	Rotor Gene 2000	Corbett Research (Sydney, Australien)
Automatische Extraktion	Dionex ASE 200®	Dionex (Sonnyvale, CA, USA)
HPLC	Pumpe, UV-Vis Detektor	Knauer (Berlin, BRD)

Tabelle 40: Materialien

<i>Method</i>	<i>Material</i>	<i>Firma</i>
Zellproliferation	96-Loch-Titerplatte (CellBIND surface)	Corning (NY, USA)
Mikroskopie	Neubauer-Zählkammer	Optik Labor (Balgach, BRD)
Rezeptorbindungsassays	96-Loch-Titerplatte, Schwarz, Halbvolumen, Nonbinding (NBST TM) surface, 3686	Corning
Molekularbiologische Methoden	RNAse-freies Wasser, Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi Austria GmbH (Graz, Österreich)
Gradientenextrographie	Isolute HM-N	Biotage (Uppsala, Schweden)
Säulenchromatographie	Sephadex LH20	Pharmacia (Uppsala, Schweden)

C Nachweise und Reagenzien

Vanillin-Schwefelsäure

Sprühreagenz für die Dünnschichtchromatographie

Lösung A: 5%ige Lösung von konzentrierter Schwefelsäure in Ethanol

Lösung B: 1%ige Lösung von Vanillin in Ethanol

Die Platte wurde zuerst mit der Lösung A und anschließend mit Lösung B besprüht.

Liebermann-Burchard-Reaktion

Nasschemischer Nachweis für Steroide

Die zu prüfenden Extrakte wurden im Rotationsverdampfer auf ein Volumen von ca. 5 ml eingengt. Dazu wurden ca. 2 ml Chloroform, anschließend ca. 2 ml Essigsäureanhydrid und zum Schluss 1 ml konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Bei Vorhandensein von Phytosterolen färbt sich die Lösung kräftig smaragdgrün.

D Wertetabellen

Tabelle 41: Angabe der Minimum- und Maximum-Werte, die in die Berechnung der AR-IC₅₀-Werte mit der 4-Parameter-Logistikkurve eingeflossen sind

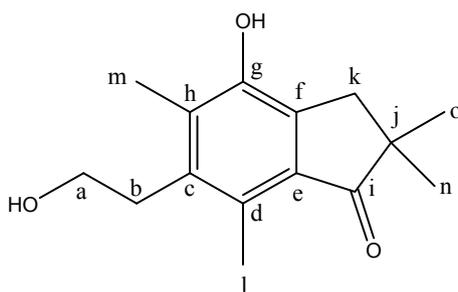
<i>Substanz</i>	<i>Minimum (mP)</i>	<i>Maximum (mP)</i>
QDM276 (71)	172,06 ± 2,87	256,99 ± 3,37
XSA134 (126)	176,42 ± 3,78	340,17 ± 2,19
QDM255 (70)	160,14 ± 7,12	253,31 ± 2,21
β-Sitosterol (57)	157,21 ± 3,94	260,34 ± 1,84
Guggulsteron Z (140)	151,51 ± 2,74	218,85 ± 1,12
Guggulsteron E (141)	154,79 ± 3,03	223,82 ± 1,21
XSA164 (125)	161,73 ± 8,81	372,72 ± 16,05
MAD952 (111)	171,62 ± 11,03	291,77 ± 2,97

E Strukturaufklärung der Substanz aus LAW540_E11 (Onitin)

NMR-Messungen

NMR: Varian Unity 500 Spektrometer, 499,83 MHz (^1H) und 125,69 MHz (^{13}C), Lösungsmittel CD_3OD .

Die chemischen Verschiebungen (ppm) wurden auf internes TMS ($\delta = 0$ ppm) für ^1H bzw. auf internes CD_3OD ($\delta = 49,0$ ppm) referenziert.

Abbildung 80: Onitin (**100**)Tabelle 42: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Onitin (**100**)

Position	Lösungsmittel: CD_3OD	
	δ (^1H) [ppm] <i>m</i> (J [Hz])	δ (^{13}C) [ppm]
a	3.578 t (8.0)	61.8
b	2.982 t (8.0)	33.4
c	---	137.8
d	---	130.1
e	---	131.9
f	---	138.6
g	---	151.4
h	---	132.5
i	---	214.8
j	---	46.6
k	2.799 s	39.6
l	2.562 s	13.3
m	2.134 s	13.0
n	1.160 s	25.9
o	1.160 s	25.9

Die ermittelten chemischen Verschiebungen stimmen mit den chemischen Verschiebungen aus der Literatur überein²³³. Damit konnte die Struktur aus LAW540_E11 als Onitin (**100**) identifiziert werden.

Hochauflösende Massenspektrometrie

Die hochauflösenden ESI-Massenspektren wurden von einem Bruker Apex III 70 eV FT-ICR-Massenspektrometer erhalten, welches mit einem 7,0 Tesla starken Hochleistungsmagneten und einer externen ESI-Quelle ausgestattet ist. Die Probelösung wurde kontinuierlich mit einer Flussrate von 120 µl/h injiziert.

Für $[M+H]^+$ m/z 249,1483120 wurde die Summenformel von $C_{15}H_{21}O_3$ ermittelt (für $C_{15}H_{21}O_3$ errechneter Wert $[M+H]^+$ m/z 249,1485210). Für $[M-H]^-$ m/z 247,1337010 wurde die Summenformel von $C_{15}H_{19}O_3$ ermittelt (errechnet $[M-H]^-$ m/z 247,1339681). Für die untersuchte Substanz ergibt sich daraus ein Molekulargewicht von 248 g/mol und eine Summenformel von $C_{15}H_{20}O_3$.

F Extraktionsschemata

Bumelia sartorum

Der wässrige Extrakt aus der Rinde von *Bumelia sartorum*, der in der Universität von Rio de Janeiro, Brasilien, präpariert wurde, ist mittels präparativer HPLC (RP18, MeOH 5% → H₂O 80%, 40 min) weiter fraktioniert worden. Es wurden 10 Fraktionen BOC 356_2A bis BOC 356_2J erhalten. Die Elutionszeiten der Fraktionen sind in Abbildung 81 dargestellt. Aktive Fraktionen sind grau unterlegt.

Fraktionierung mittels präparativer HPLC

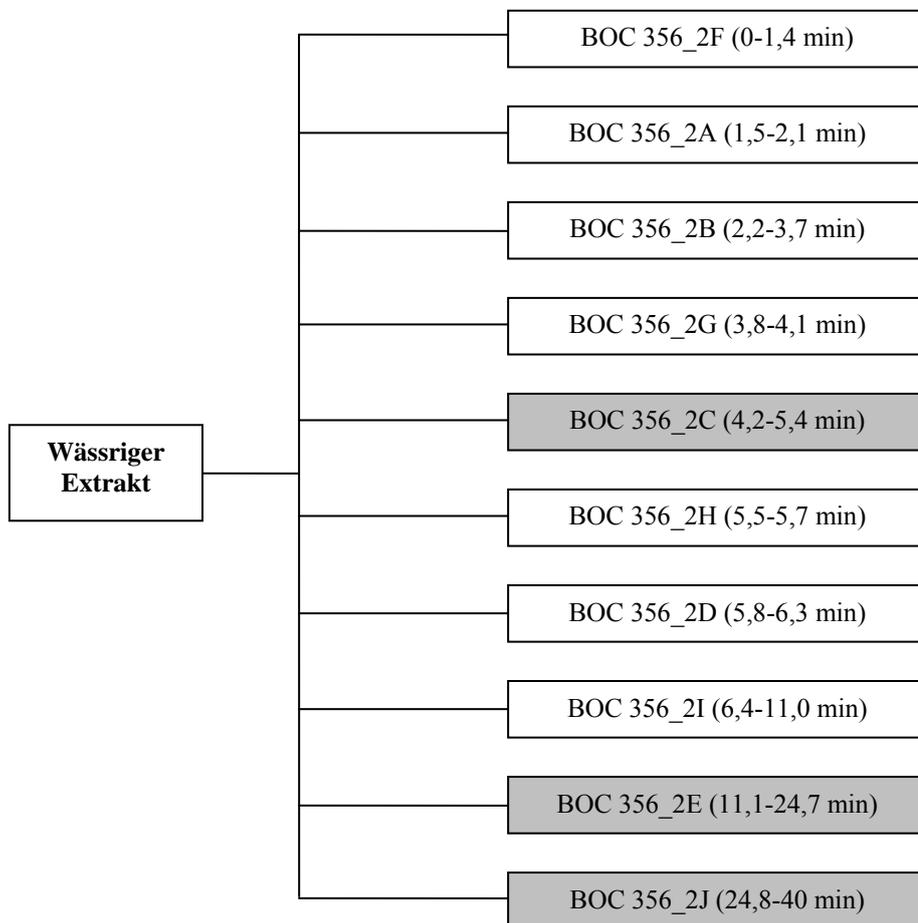
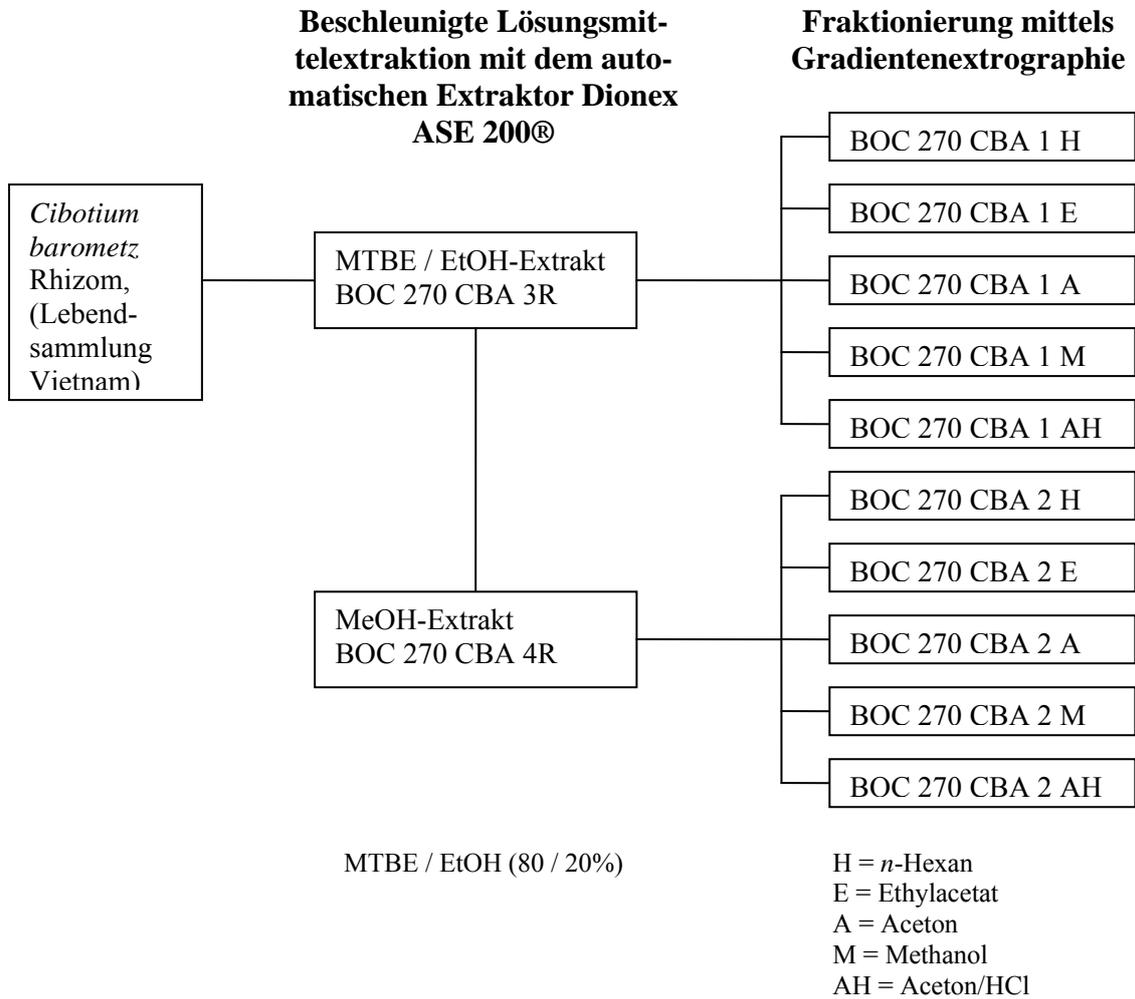


Abbildung 81: Fraktionierungsschema *Bumelia sartorum*

Cibotium barometzAbbildung 82: Fraktionierungsschema *Cibotium barometz* (BOC270_CBA-Fraktionen)

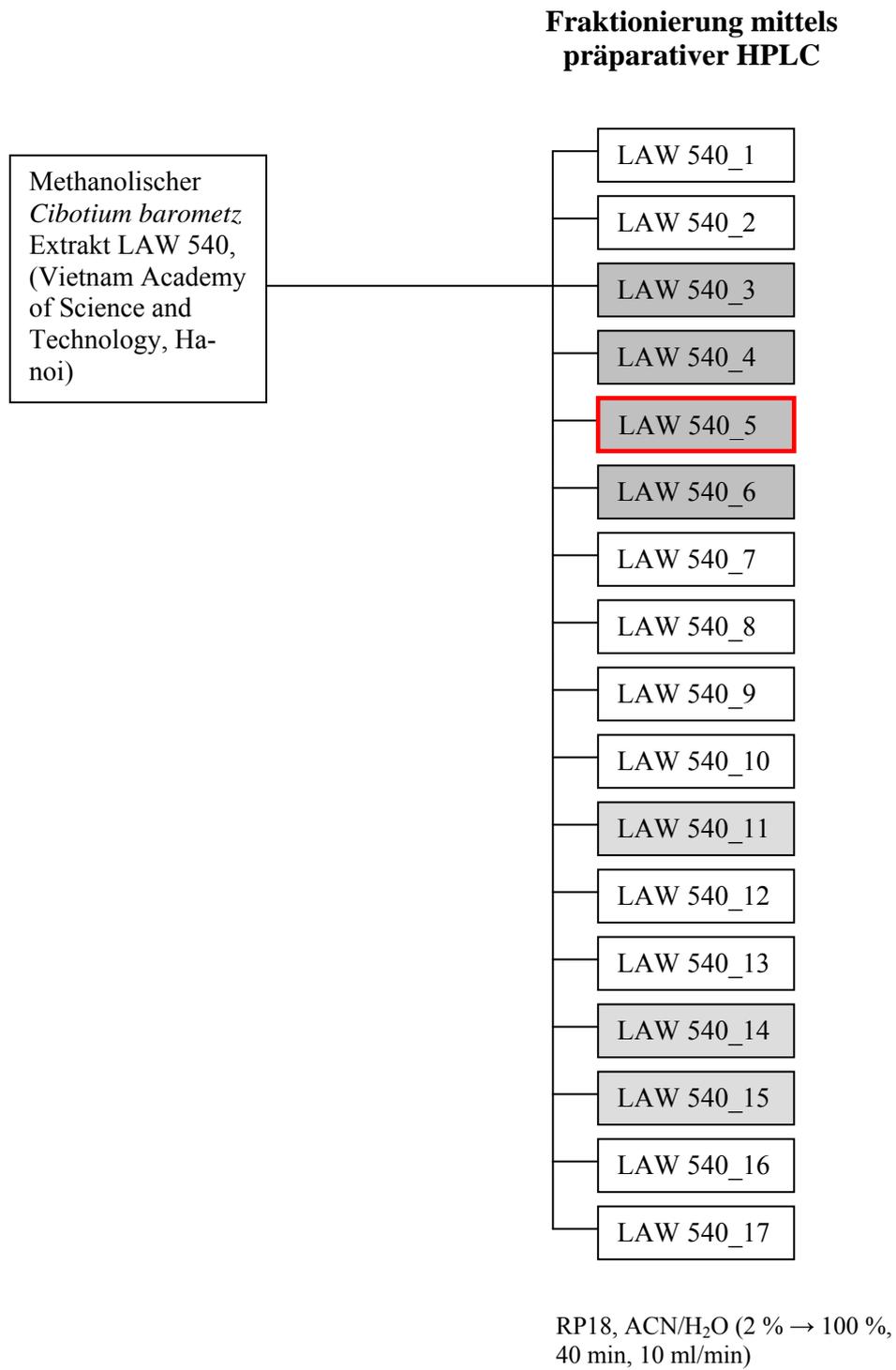


Abbildung 83: Fraktionierungsschema *Cibotium barometz* (LAW540-Fractionen)

Im Zellproliferationsassay stark aktive Fraktionen sind dunkelgrau, schwach aktive Fraktionen im Fraktionierungsschema (Abb. 83) hellgrau unterlegt. Die aktivste Fraktion ist rot umrandet.

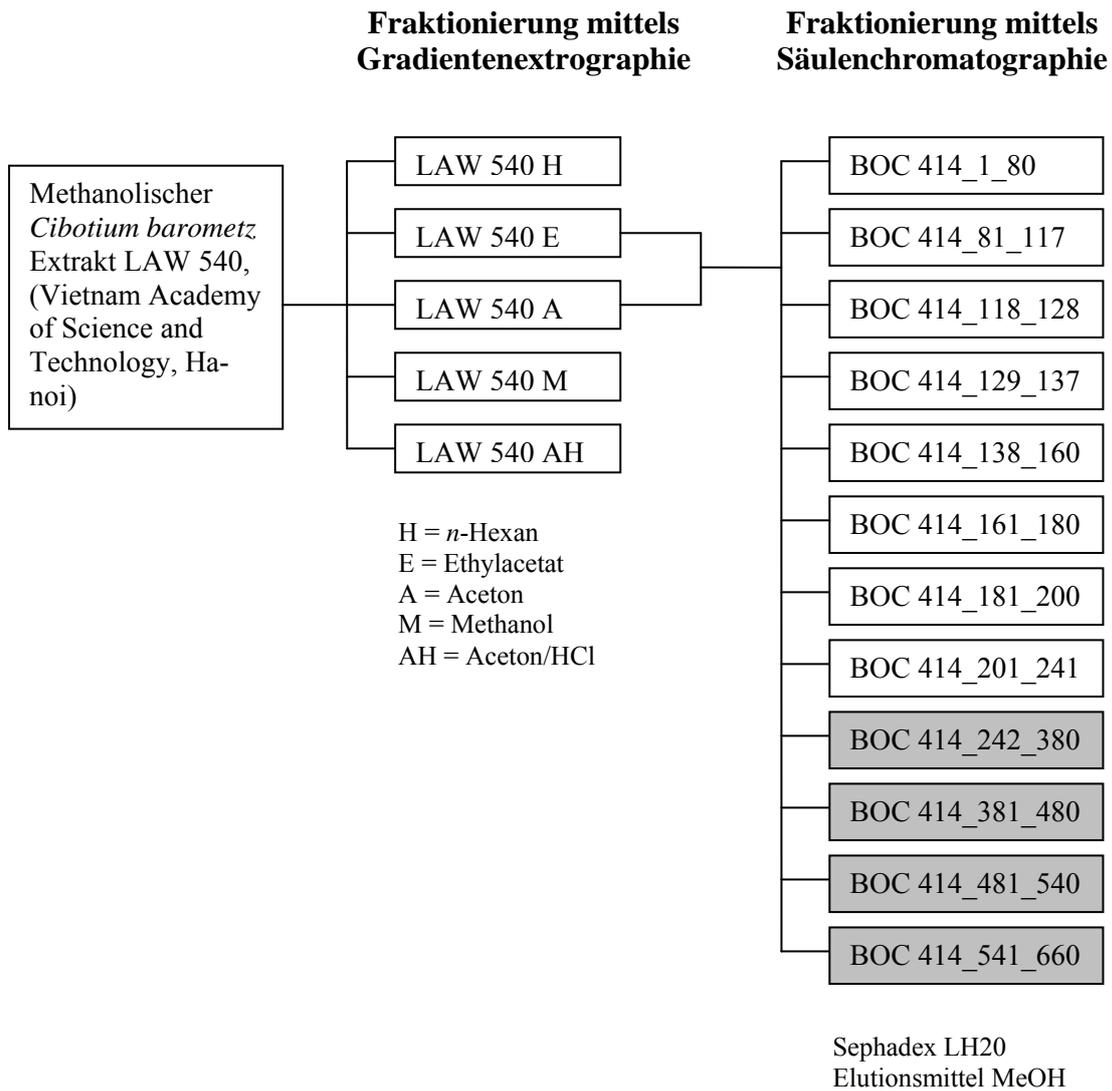


Abbildung 84: Fraktionierungsschema *Cibotium barometz* (BOC414-Fractionen)

Im Zellproliferationsassay aktive Fraktionen sind im Fraktionierungsschema (Abb. 84) grau unterlegt.

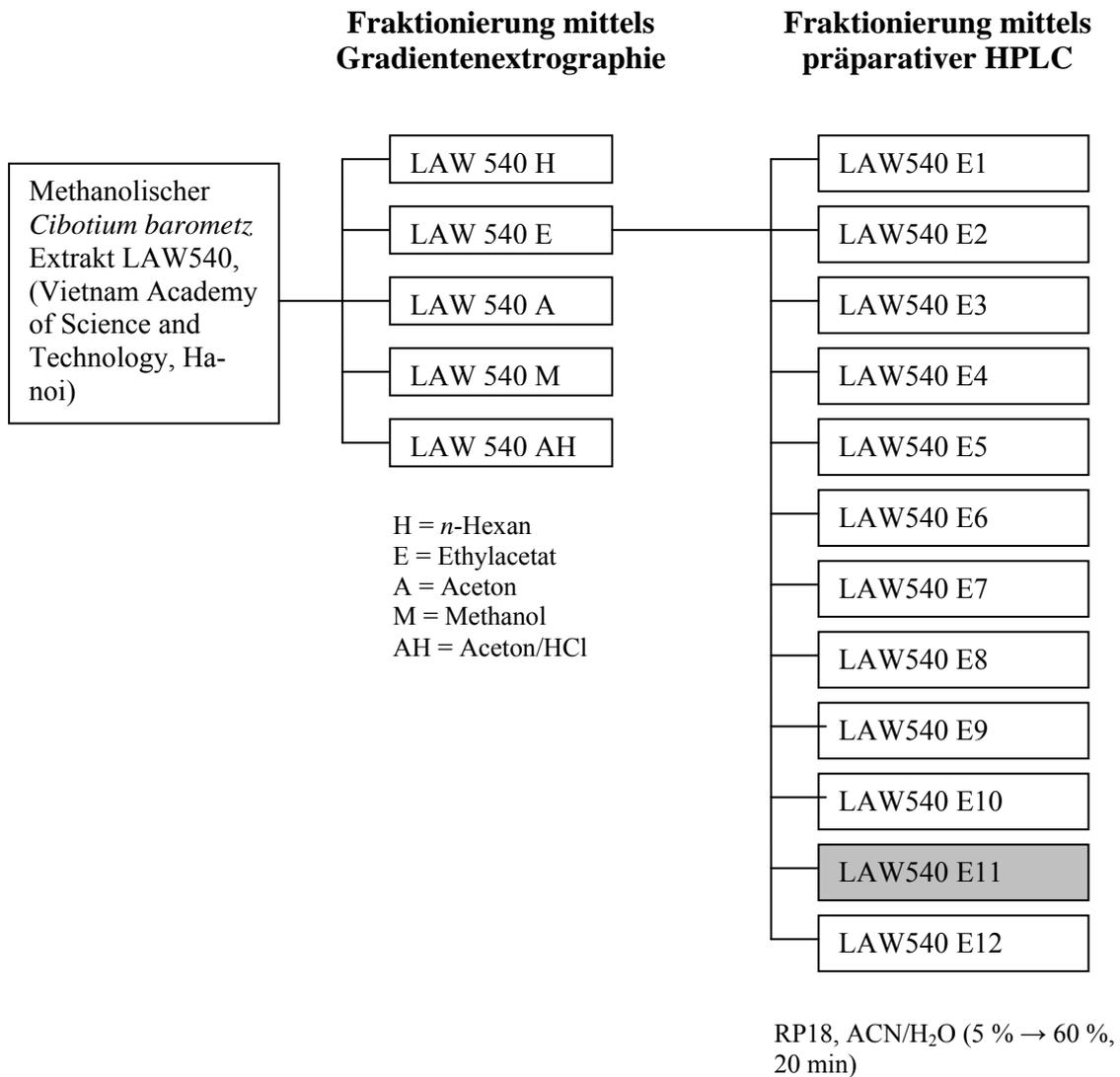


Abbildung 85: Fraktionierungsschema *Cibotium barometz* zur Isolierung von Onitin (100)

Die Onitin-haltige Fraktion ist im Fraktionierungsschema grau unterlegt (Abb. 85).

6 Index

- 17 α -Östradiol68, 71, 80
 17 β -Östradiol.....69, 71, 80, 103
 3,3'-Diindolylmethan15
 Aetiocholandion10
 Aetiocholanolon10
Aglaia gigantea31, 86, 101, 128
 Agonisten.....3
 Androgene2, 9, 17, 61
 Androgenrezeptor2, 4, 32, 109
 Androstan9
 Androstandion10
 Androstendion10
 Androsteron10
 Antagonisten.....3
 Antiandrogene20, 64
 Arachidonsäure.....17
Artemisia afra30, 53, 86
 Atrarsäure15
 Benzophenon-3.....13
 Bicalutamid....15, 20, 64, 71, 72, 74, 80,
 88
Brassica napus.....16
Bumelia sartorum31, 86, 96, 97, 99,
 128, 162
Carthamus tinctorius 30, 51, 53, 86, 101
Cibotium barometz30, 31, 53, 85, 86,
 88, 96, 119, 128, 163
Cibotium regale30, 53, 91, 92
Cibotium schiedei30, 53, 91, 92
 Coaktivator2, 3
 Cofaktoren6, 14
Cortinarius brunneus.....31, 53, 87, 101,
 128
Cortinarius speciosissimus31, 53, 96,
 101
 Cyproteronacetat.....20, 66, 71, 80
Cyrtomium falcatum30, 53, 87, 96
 Daidzein.....14
 Dehydroepiandrosteron10
 Dexamethason.....103
 Diethylstilbestrol.....76, 77
 Dihydrotestosteron 61, 71, 80, 103, 111,
 114
 Etoposid100
Eucommia ulmoides.....13
 Euphol.....13
Excoecaria bussei.....30, 53, 87
 Finasterid67, 71, 80
 Flutamid.....20
 Fulvestrant71, 72, 74, 76, 77, 88
Ganoderma lucidum14
 Ganoderol B.....14
 Genistein75
 genotroper Wirkmechanismus4
 Glukokortikoidrezeptor.....2, 32, 109
 Gradientenextrographie28, 51
 Guggulsteron E 109, 110, 115, 116, 119
 Guggulsteron Z 109, 110, 115, 116, 119
*Heteropterys chrysophylla*30, 53, 85, 87
 Homosalat.....13
 Hydroxyflutamid.....12, 112, 114
 IC₅₀-Wert45, 107
 ICI 164 38475
 Inverse Agonisten4
 K_i-Wert45, 107
 LAW54088, 113, 116, 119
 Linolsäure17
 Linuron12
 LNCaP-Zellen.....22, 32, 111
 MDA-kb2-Zellen24, 32, 111
 MENT120, 127
Microglossa pyrifolia.....30, 53
 Mifepriston77, 78
 Mineralokortikoidrezeptor2
Monanthotaxis buchananii30, 53, 87
 Naringenin16
 N-Butylbenzensulfonamid.....15

- Nephrolepis exaltata*.....30, 53, 96, 101, 128
nicht-genotroper Wirkmechanismus.....5
Onitin.....93, 94, 160
Östrogenrezeptor α32, 109
Östrogenrezeptor β32, 109
Ozoroa insignis.....30, 53, 101
Palmitinsäure.....17
Palmitoleinsäure.....17
PC-3-Zellen.....32
Phytoandrogene.....13
Phytoantiandrogene.....14
Polygonum multiflorum.....30, 53, 87
Progesteron.....103
Progesteronrezeptor.....2, 109
PSA.....8, 9, 39
PSA-mRNA-Regulation...111, 113, 115
Pygeum africanum.....15
QDM255.....81, 82, 103, 104, 108, 110, 112, 115, 116, 119, 127
QDM276.....81, 82, 103, 104, 108, 110, 112, 115, 116, 119, 127
R1881.....63, 71, 80
RU58841.....21
Salvia miltiorrhiza 30, 53, 84, 87, 96, 101
SARM.....18
Stearinsäure.....17
Stigmasterol.....50
Suregada zanzibariensis.....30, 53, 87
Tamoxifen.....76, 77
Teclea nobilis.....30, 53, 87
Testosteron.....9, 17, 62, 71, 80
Toremifen.....76, 77
Trichilia emetica.....31, 53, 85, 87
Trimeria grandifolia.....31, 53, 85, 87
Turraea cornucopia.....31, 53, 87
VCaP-Zellen.....23, 32, 113
Vinclozolin.....12
Vincristinsulfat.....100
XSA134.....95, 105, 110, 127
XSA164.....105, 110, 127
XTT.....59
 β -Sitosterol ... 81, 82, 94, 103, 104, 108, 110, 112, 115, 116, 119, 123, 128

Lebenslauf

Claudia Bobach, geb. Köhler, geb. 30.07.1977, Köthen/Anhalt

Schulische Ausbildung

1984–1991	Besuch der Polytechnischen Oberschule „Wolfgang Radtke“, Köthen
1991-1992	Besuch des Gymnasiums „An der Rüsternbreite“, Köthen
1992-1994	Besuch des Ludwigsgymnasiums in Köthen
1994-1995	Austauschjahr, Besuch der Shelley High School, Shelley, England
1995-1997	Besuch des Ludwigsgymnasiums in Köthen, Abitur

Akademische Laufbahn

1997–1999	Studium der Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg
2000	Geburt des ersten Kindes
2001	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2001-2003	Studium der Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg
2003	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2003-2004	Praktisches Jahr, Waisenhausapotheke Halle
2004	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Berufserfahrung

2004-2008	Doktorandin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle
2008	Geburt des zweiten Kindes
2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Ontochem GmbH, Halle
2010	Geburt des dritten Kindes

Veröffentlichungen

A Kiessling, C Hogrefe, S Erb, C Bobach, S Fuessel, L Wessjohann and B Seliger, *Expression, regulation and function of the ISGylation system in prostate cancer*, *Oncogene* (2009), 28, 2606-2620

C Bobach, K Franke, S Tennstedt, A Kiessling, B Seliger and L Wessjohann, *Screening of plant and fungi extracts for phytoandrogenic and phytoantiandrogenic potential*, Manuskript in Vorbereitung

S Tennstedt, C Bobach, A Denkert, K Palberg, W Brandt, B Seliger and L Wessjohann, *Screening of synthetic and natural product databases: Identification of novel (anti)androgens*, Manuskript liegt vor

S Tennstedt, C Bobach, A Denkert, K Palberg, A Kiessling, W Brandt, B Seliger and L Wessjohann, *Characterization of androgen receptor ligands for their antiandrogenic potential via androgen regulated gene analysis supported by molecule dynamic simulations of ligand receptor complexes*, Manuskript in Vorbereitung

S Tennstedt, C Bobach, A Denkert, K Palberg, W Brandt and L Wessjohann, *Insights into cross-binding activity of recently identified androgen receptor ligands by cross-docking of several nuclear receptors*, Manuskript in Vorbereitung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Ort, Datum, Unterschrift

Literaturverzeichnis

1. Pienta, K. J. and Esper, P. S. Risk-Factors for Prostate-Cancer. *Annals of Internal Medicine* **1993**, *118*, 793-803.
2. Kristal, A. R.; Arnold, K. B.; Schenk, J. M.; Neuhouser, M. L.; Goodman, P.; and Penson, D. F. Dietary patterns, supplement use, and the risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: Results from the prostate cancer prevention trial. *American Journal of Epidemiology* **2008**, *167*, 925-934.
3. Clardy, J. and Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature* **2004**, *432*, 829-837.
4. Feher, M. and Schmidt, J. M. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **2003**, *43*, 218-227.
5. Liegibel, U. M.; Boerscoek, I.; Sommer, U.; Nawroth, P.; and Kasperk, C. Androgen receptor isoforms differentially regulate primary bone and skin cell metabolism. *Journal of Bone and Mineral Research* **2002**, *17*, S288.
6. Evans, R. M. The Steroid and Thyroid-Hormone Receptor Superfamily. *Science* **1988**, *240*, 889-895.
7. Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; and Umesono, K. The Nuclear Receptor Superfamily - the 2nd Decade. *Cell* **1995**, *83*, 835-839.
8. Warnmark, A.; Treuter, E.; Wright, A. P. H.; and Gustafsson, J. A. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: Molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular Endocrinology* **2003**, *17*, 1901-1909.
9. Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. A.; and Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, *3*, 950-964.
10. Busch, B. B.; Stevens, W. C.; Martin, R.; Ordentlich, P.; Zhou, S.; and Sapp, D. W. Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 5593-5596.
11. Dewinter, J. A. R.; Trapman, J.; Vermey, M.; Mulder, E.; Zegers, N. D.; and Vanderkwast, T. H. Androgen receptor expression in human tissues - an immunohistochemical study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1991**, *39*, 927-936.

12. Blauer, M.; Vaalasti, A.; Pauli, S. L.; Ylikomi, T.; Joensuu, T.; and Tuohimaa, P. Location of androgen receptor in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* **1991**, *97*, 264-268.
13. Psarra, A. M. G. and Sekeris, C. E. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **2008**, *60*, 210-223.
14. Kousteni, S.; Bellido, T.; Plotkin, L. I.; O'Brien, C. A.; Bodenner, D. L.; and Han, L. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: Dissociation from transcriptional activity. *Cell* **2001**, *104*, 719-730.
15. Kim, S. B.; Kanno, A.; Ozawa, T.; Tao, H.; and Umezawa, Y. Nongenomic activity of ligands in the association of androgen receptor with Src. *American Chemical Society - Chemical Biology* **2007**, *2*, 484-492.
16. Yeh, S. Y.; Miyamoto, H.; and Chang, C. S. Hydroxyflutamide may not always be a pure antiandrogen. *Lancet* **1997**, *349*, 852-853.
17. Miyamoto, H.; Yeh, S. Y.; Wilding, G.; and Chang, C. S. Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 7379-7384.
18. Lanzino, M.; De Amicis, F.; McPhaul, M. J.; Marsico, S.; Panno, M. L.; and Ando, S. Endogenous coactivator ARA70 interacts with estrogen receptor alpha (ER alpha) and modulates the functional ER alpha/androgen receptor interplay in MCF-7 cells. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 20421-20430.
19. Kang, H. Y.; Yeh, S. Y.; Fujimoto, N.; and Chang, C. S. Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 8570-8576.
20. Rahman, M. M.; Miyamoto, H.; Lardy, H.; and Chang, C. Inactivation of androgen receptor coregulator ARA55 inhibits androgen receptor activity and agonist effect of antiandrogens in prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 5124-5129.
21. Fujimoto, N.; Yeh, S. Y.; Kang, H. Y.; Inui, S.; Chang, H. C.; and Mizokami, A. Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 8316-8321.
22. Adler, H. L.; McCurdy, M. A.; Kattan, M. W.; Timme, T. L.; Scardino, P. T.; and Thompson, T. C. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *Journal of Urology* **1999**, *161*, 182-187.

23. Yeh, S. Y.; Lin, H. K.; Kang, H. Y.; Thin, T. H.; Lin, M. F.; and Chang, C. S. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: A novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 5458-5463.
24. Nessler-Menardi, C.; Jotova, I.; Culig, Z.; Eder, I. E.; Putz, T.; and Bartsch, G. Expression of androgen receptor coregulatory proteins in prostate cancer and stromal-cell culture models. *Prostate* **2000**, *45*, 124-131.
25. Zhu, M. L.; Partin, J. V.; Bruckheimer, E. M.; Strup, S. E.; and Kyprianou, N. TGF-beta signaling and androgen receptor status determine apoptotic cross-talk in human prostate cancer. *Prostate* **2008**, *68*, 287-295.
26. Fujimoto, N.; Mizokami, A.; Harada, S.; and Matsumoto, T. Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate. *Urology* **2001**, *58*, 289-294.
27. Xu, L. L.; Su, Y. P.; Labiche, R.; Segawa, T.; Shanmugam, N.; and Mcleod, D. G. Quantitative expression profile of androgen-regulated genes in prostate cancer cells and identification of prostate-specific genes. *International Journal of Cancer* **2001**, *92*, 322-328.
28. Lundwall, A. and Lilja, H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **1987**, *214*, 317-322.
29. Israeli, R. S.; Powell, C. T.; Fair, W. R.; and Heston, W. D. W. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Research* **1993**, *53*, 227-230.
30. Yeh, L. C. C.; Lee, A. J.; Lee, N. E.; Lam, K. W.; and Lee, J. C. Molecular cloning of cDNA for human prostatic acid-phosphatase. *Gene* **1987**, *60*, 191-196.
31. He, W. W.; Sciavolino, P. J.; Wing, J.; Augustus, M.; Hudson, P.; and Meissner, P. S. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics* **1997**, *43*, 69-77.
32. Lin, B. Y.; Ferguson, C.; White, J. T.; Wang, S. Y.; Vessella, R.; and True, L. D. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Research* **1999**, *59*, 4180-4184.
33. Xu, L. L.; Shanmugam, N.; Segawa, T.; Sesterhenn, I. A.; Mcleod, D. G.; and Moul, J. W. A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate. *Genomics* **2000**, *66*, 257-263.
34. Ngan, S.; Stronach, E. A.; Photiou, A.; Waxman, J.; Ali, S.; and Buluwela, L. Microarray coupled to quantitative RT-PCR analysis of androgen-

- regulated genes in human LNCaP prostate cancer cells. *Oncogene* **2009**, 28, 2051-2063.
35. Kiessling, A.; Hogrefe, C.; Erb, S.; Bobach, C.; Fuessel, S.; Wessjohann, L.; and Seliger, B. Expression, regulation and function of the ISGylation system in prostate cancer. *Oncogene* **2009**, 28, 2606-2620.
 36. Wang, M. C.; Papsidore, L. D.; Kuriyama, M.; Valenzuela, L. A.; Murphy, G. P.; and Chu, T. M. Prostate antigen - a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate* **1981**, 2, 89-96.
 37. Herrala, A.; Kurkela, R.; Vihinen, M.; Kalkkinen, N.; and Vihko, P. Androgen-sensitive human prostate cancer cells, LNCaP, produce both N-terminally mature and truncated prostate-specific antigen isoforms. *European Journal of Biochemistry* **1998**, 255, 329-335.
 38. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; and Murphy, R. C. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **2005**, 46, 839-861.
 39. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; and Schäfer-Korting, M. *Arzneimittelwirkungen*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Birkenwaldstraße 44, D-70191 Stuttgart: **2001**.
 40. Thews, G.; Mutschler, E.; and Vaupel, P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Birkenwaldstraße 44, D-70191 Stuttgart: **1999**.
 41. Kelce, W. R.; Stone, C. R.; Laws, S. C.; Gray, L. E.; Kemppainen, J. A.; and Wilson, E. M. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* **1995**, 375, 581-585.
 42. Chang, C. S. and Liao, S. S. Topographic recognition of cyclic hydrocarbons and related compounds by receptors for androgens, estrogens and glucocorticoids. *Journal of Steroid Biochemistry* **1987**, 27, 123-131.
 43. Lambright, C.; Ostby, J.; Bobseine, K.; Wilson, V.; Hotchkiss, A. K.; and Mann, P. C. Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: An anti-androgenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicological Sciences* **2000**, 56, 389-399.
 44. Kelce, W. R.; Monosson, E.; and Gray, L. E. In-vitro and in-vivo evidence that vinclozolin (V) is an environmental antiandrogen. *Biology of Reproduction* **1994**, 50, 102.
 45. Wong, C.; Kelce, W. R.; Sar, M.; and Wilson, E. M. Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, 19998-20003.
 46. Nellesmann, C.; Dalgaard, M.; Lam, H. R.; and Vinggaard, A. M. The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo. *Toxicological Sciences* **2003**, 71, 251-262.

47. Molina-Molina, J. M.; Hillenweck, A.; Jouanin, I.; Zalko, D.; Cravedi, J. P.; and Fernandez, M. F. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2006**, *216*, 44-54.
48. Scippo, M. L.; Argiris, C.; Van de Weerd, C.; Muller, M.; Willemsen, P.; and Martial, J. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 664-669.
49. Ma, R. S.; Cotton, B.; Lichtensteiger, W.; and Schlumpf, M. UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences* **2003**, *74*, 43-50.
50. Ong, V. Y. C. and Tan, B. K. H. Novel phytoandrogens and lipidic augmenters from *Eucommia ulmoides*. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine* **2007**, *7*.
51. Chen, J. J. and Chang, H. C. By modulating androgen receptor coactivators, daidzein may act as a phytoandrogen. *Prostate* **2007**, *67*, 457-462.
52. Liu, B.; Ordonez-Ercan, D.; Edgerton, S. M.; Alvarez, K. M.; Yang, X.; and Thor, A. D. Estrogen (E2) promotes mammary tumorigenesis in MMTV-*neu* transgenic mice independent of MMTV activation. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **2006**, *47*.
53. Liu, J.; Shimizu, K.; Konishi, F.; Kumamoto, S.; and Kondo, R. The anti-androgen effect of ganoderol B isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 4966-4972.
54. Le, H. T.; Schaldach, C. M.; Firestone, G. L.; and Bjeldanes, L. F. Plant-derived 3,3'-diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 21136-21145.
55. Schleich, S.; Papaioannou, M.; Baniahmad, A.; and Matusch, R. Extracts from *Pygeum africanum* and other ethnobotanical species with antiandrogenic activity. *Planta Medica* **2006**, *72*, 807-813.
56. Schleich, S.; Papaioannou, M.; Baniahmad, A.; and Matusch, R. Activity-guided isolation of an antiandrogenic compound of *Pygeum africanum*. *Planta Medica* **2006**, *72*, 547-551.
57. Lund, T. D.; Munson, D. J.; Haldy, M. E.; Setchell, K. D.; Lephart, E. D.; and Handa, R. J. Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. *Biology of Reproduction* **2004**, *70*, 1188-1195.
58. Fang, H.; Tong, W.; Branham, W. S.; Moland, C. L.; Dial, S. L.; and Hong, H. Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chemical Research in Toxicology* **2003**, *16*, 1338-1358.

59. Han, H. Y.; Shan, S.; Zhang, X.; Wang, N. L.; Lu, X. P.; and Yao, X. S. Down-regulation of prostate specific antigen in LNCaP cells by flavonoids from the pollen of *Brassica napus* L. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 338-343.
60. Raile, K.; Hoflich, A.; Kessler, U.; Yang, Y.; Pfuender, M.; Blum, W. F.; Kolb, H.; Schwarz, H. P.; and Kiess, W. Human osteosarcoma (U-2 Os) cells express both insulin-like growth-factor-I (IGF-I) receptors and insulin-like growth factor-II mannose-6-phosphate (IGF-II / MGP) receptors and synthesize IGF-II - autocrine growth-stimulation by IGF-II via the IGF-I receptor. *Journal of Cellular Physiology* **1994**, *159*, 531-541.
61. Ito, Y. Z.; Mashimo, S.; Kako, M.; Futawatari, T.; and Arai, M. Effect of fatty acids and prostaglandin on androgen receptor binding in human prostatic cancer cells. *The Annual Reports of College of Medical Care and Technology* **1992**, *13*, 145-154.
62. Mitsuhashi, N.; Mizuno, M.; Miyagawa, A.; and Kato, J. Inhibitory effect of fatty-acids on the binding of androgen receptor and R1881. *Endocrinologia Japonica* **1988**, *35*, 93-96.
63. Prinsloo, S. E. and van Aswegen, C. H. Effect of fatty acids on estradiol and testosterone binding to whole DU-145 prostate cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **2002**, *66*, 419-425.
64. Sanchez-Medal, L.; Gomez-Leal, A.; Duarte, L.; and Guadalupe Rico, M. Anabolic androgenic steroids in the treatment of acquired aplastic anemia. *Blood* **1969**, *34*, 283-300.
65. Ranke, M. B. and Bierich, J. R. Treatment of growth-hormone deficiency. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* **1986**, *15*, 495-510.
66. Johnson, F. L. Hepatoma associated with androgenic steroids. *Lancet* **1975**, *1*, 1294-1295.
67. Johnson, F. L. The association of oral androgenic-anabolic steroids and life-threatening disease. *Medicine and Science in Sports* **1975**, *7*, 284-286.
68. Bhasin, S.; Calof, O. M.; Storer, T. W.; Lee, M. L.; Mazer, N. A.; and Jasuja, R. Drug Insight: testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* **2006**, *2*, 146-159.
69. World Anti-Doping Agency *The 2009 prohibited list world anti-doping code*; **2009**.
70. Chen, J. Y.; Kim, J.; and Dalton, J. T. Discovery and therapeutic promise of selective androgen receptor modulators. *Molecular Interventions* **2005**, *5*, 173-188.
71. Yin, D. H.; Gao, W. Q.; Kearbey, J. D.; Xu, H. P.; Chung, K. W.; and He, Y. L. Pharmacodynamics of selective androgen receptor modulators. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, *304*, 1334-1340.

72. GTx Inc. Ostarine - product information. <http://www.gtxinc.com/Pipeline/OstarineMK2866.aspx?Sid=4> 03-12-**2009**.
73. Gao, W. Q. and Dalton, J. T. Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs). *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 241-248.
74. Ostrowski, J.; Kuhns, J. E.; Lupisella, J. A.; Manfredi, M. C.; Beehler, B. C.; and Krystek, S. R., Jr. Pharmacological and x-ray structural characterization of a novel selective androgen receptor modulator: potent hyperanabolic stimulation of skeletal muscle with hypostimulation of prostate in rats. *Endocrinology* **2007**, *148*, 4-12.
75. van Oeveren, A.; Motamedi, M.; Mani, N. S.; Marschke, K. B.; Lopez, F. J.; and Schrader, W. T. Discovery of 6-N,N-bis(2,2,2-trifluoroethyl)amino-4-trifluoromethylquinolin-2(1H)-one as a novel selective androgen receptor modulator. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 6143-6146.
76. Miner, J. N.; Chang, W.; Chapman, M. S.; Finn, P. D.; Hong, M. H.; and Lopez, F. J. An orally active selective androgen receptor modulator is efficacious on bone, muscle, and sex function with reduced impact on prostate. *Endocrinology* **2007**, *148*, 363-373.
77. Piu, F.; Gardell, L. R.; Son, T.; Schlienger, N.; Lund, B. W.; and Schiffer, H. H. Pharmacological characterization of AC-262536, a novel selective androgen receptor modulator. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2008**, *109*, 129-137.
78. Abrahamsson, L.; Hackl, H.; Lindstrom, B.; and Sogn, J. Long-term treatment of virilized women with cyproterone acetate. *Wiener Klinische Wochenschrift* **1981**, *93*, 552-556.
79. Dotzlaw, H.; Moehren, U.; Mink, S.; Cato, A. C.; Iniguez Lluhi, J. A.; and Baniahmad, A. The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Molecular Endocrinology* **2002**, *16*, 661-673.
80. Fenton, M. A.; Shuster, T. D.; Fertig, A. M.; Taplin, M. E.; Kolvenbag, G.; and Bubley, G. J. Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer. *Clinical Cancer Research* **1997**, *3*, 1383-1388.
81. Masiello, D.; Cheng, S.; Bubley, G. J.; Lu, M. L.; and Balk, S. P. Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 26321-26326.
82. Bohl, C. E.; Gao, W.; Miller, D. D.; Bell, C. E.; and Dalton, J. T. Structural basis for antagonism and resistance of bicalutamide in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 6201-6206.

83. McGinley, P. L. and Koh, J. T. Circumventing anti-androgen resistance by molecular design. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 3822-3823.
84. Battmann, T.; Bonfils, A.; Branche, C.; Humbert, J.; Goubet, F.; and Teutsch, G. Ru-58841, a new specific topical antiandrogen - a candidate of choice for the treatment of acne, androgenetic alopecia and hirsutism. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1994**, *48*, 55-60.
85. Matias, J. R. and Gaillard, M. Prevention of acne, hirsutism, and baldness in experimental animal-models by the topical application of Ru-58841, a pure nonsteroidal androgen receptor inhibitor. *Journal of Investigative Dermatology* **1995**, *104*, 577.
86. Matias, J. R. and Gaillard, M. Local inhibition of sebaceous gland growth by topically applied Ru-58841. *Steroid Receptors and Antihormones* **1995**, *761*, 56-65.
87. Andersen, R. J.; Mawji, N. R.; Wang, J.; Wang, G.; Haile, S.; Myung, J. K.; Watt, K.; Tam, T.; Yang, Y. C.; Banuelos, C. A.; Williams, D. E.; McEwan, I. J.; Wang, Y. Z.; and Sadar, M. D. Regression of Castrate-Recurrent Prostate Cancer by a Small-Molecule Inhibitor of the Amino-Terminus Domain of the Androgen Receptor. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 535-546.
88. Narayanan, R.; Yepuru, M.; Szafran, A. T.; Szwarc, M.; Bohl, C. E.; Young, N. L.; Miller, D. D.; Mancini, M. A.; and Dalton, J. T. Discovery and Mechanistic Characterization of a Novel Selective Nuclear Androgen Receptor Exporter for the Treatment of Prostate Cancer. *Cancer Research* **2010**, *70*, 842-851.
89. Tran, C.; Ouk, S.; Clegg, N. J.; Chen, Y.; Watson, P. A.; Arora, V.; Wongvipat, J.; Smith-Jones, P. M.; Yoo, D.; Kwon, A.; Wasielewska, T.; Welsbie, D.; Chen, C. D.; Higano, C. S.; Beer, T. M.; Hung, D. T.; Scher, H. I.; Jung, M. E.; and Sawyers, C. L. Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Science* **2009**, *324*, 787-790.
90. Geck, P.; Szelei, J.; Jimenez, J.; Lin, T. M.; Sonnenschein, C.; and Soto, A. M. Expression of novel genes linked to the androgen-induced, proliferative shutoff in prostate cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1997**, *63*, 211-218.
91. Veldscholte, J.; Risstalpers, C.; Kuiper, G. G. J. M.; Jenster, G.; Berrevoets, C.; and Claassen, E. A mutation in the ligand-binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1990**, *173*, 534-540.
92. Veldscholte, J.; Voorhorstogink, M. M.; Boltdevries, J.; Vanrooij, H. C. J.; Trapman, J.; and Mulder, E. Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor-cell line LNCaP - high-affinity for pro-

- gestagenic and estrogenic steroids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1990**, *1052*, 187-194.
93. Yu, S.; Wang, M.; Yao, X.; and Chan, F. L. Establishment of a novel immortalized human prostatic epithelial cell line stably expressing androgen receptor and its application for the functional screening of androgen receptor modulators. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, *382*, 756-761.
94. Szelei, J.; Jimenez, J.; Soto, A. M.; Luizzi, M. F.; and Sonnenschein, C. Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* **1997**, *138*, 1406-1412.
95. Deroo, B. J. and Archer, T. K. Differential activation of the I kappa B alpha and mouse mammary tumor virus promoters by progesterone and glucocorticoid receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2002**, *81*, 309-317.
96. Simon, S. and Mueller, S. Human reporter gene assays: Transcriptional activity of the androgen receptor is modulated by the cellular environment and promoter context. *Toxicology* **2006**, *220*, 90-103.
97. Vinggaard, A. M.; Joergensen, E. C. B.; and Larsen, J. C. Rapid and sensitive reporter gene assays for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1999**, *155*, 150-160.
98. Terouanne, B.; Tahiri, B.; Georget, V.; Belon, C.; Poujol, N.; and Avances, C. A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2000**, *160*, 39-49.
99. Wilson, V. S.; Bobseine, K.; Lambright, C. R.; and Gray, L. E. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological Sciences* **2002**, *66*, 69-81.
100. Araki, N.; Ohno, K.; Takeyoshi, M.; and Iida, M. Evaluation of a rapid in vitro androgen receptor transcriptional activation assay using AR-EcoScreen cells. *Toxicology in Vitro* **2005**, *19*, 335-352.
101. Sonneveld, E.; Jansen, H. J.; Riteco, J. A. C.; Brouwer, A.; and van der Burg, B. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicological Sciences* **2005**, *83*, 136-148.
102. Horoszewicz, J. S.; Leong, S. S.; Kawinski, E.; Karr, J. P.; Rosenthal, H.; and Chu, T. M. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research* **1983**, *43*, 1809-1818.
103. Bhattacharyya, R. S.; Krishnan, A. V.; Swami, S.; and Feldman, D. Fulvestrant (ICI 182,780) down-regulates androgen receptor expression and dimin-

- ishes androgenic responses in LNCaP human prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, *5*, 1539-1549.
104. Lau, K. M.; LaSpina, M.; Long, J.; and Ho, S. M. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: Regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Research* **2000**, *60*, 3175-3182.
 105. Setlur, S. R.; Mertz, K. D.; Hoshida, Y.; Demichelis, F.; Lupien, M.; and Perner, S. Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **2008**, *100*, 815-825.
 106. Kim, H. J.; Park, Y. I.; and Dong, M. S. Comparison of prostate cancer cell lines for androgen receptor-mediated reporter gene assays. *Toxicology in Vitro* **2006**, *20*, 1159-1167.
 107. Yan, T. Z.; Jin, F. S.; Xie, L. P.; and Li, L. C. Relationship between glucocorticoid receptor signal pathway and androgen-independent prostate cancer. *Urologia Internationalis* **2008**, *81*, 228-233.
 108. Kaighn, M. E.; Narayan, K. S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J. F.; and Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology* **1979**, *17*, 16-23.
 109. Korenchuk, S.; Lehr, J. E.; McLean, L.; Lee, Y. G.; Whitney, S.; and Vessella, R. VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *In Vivo* **2001**, *15*, 163-168.
 110. Sequenz-Datenbank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/03-12-2009>.
 111. Allen, M.; Reeves, J.; and Mellor, G. High throughput fluorescence polarization: A homogeneous alternative to radioligand binding for cell surface receptors. *Journal of Biomolecular Screening* **2000**, *5*, 63-69.
 112. Burgisser, E. Radioligand receptor-binding studies - whats wrong with the scatchard analysis. *Trends in Pharmacological Sciences* **1984**, *5*, 142-144.
 113. Johnson, M. L. Why, when, and how biochemists should use least-squares. *Analytical Biochemistry* **1992**, *206*, 215-225.
 114. Cheng, Y. and Prusoff, W. H. Relationship between inhibition constant (K_i) and concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 3099-3108.
 115. Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R. X.; Fang, X. L.; Pan, H. G.; Tomita, Y.; and Li, P. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization. *Analytical Biochemistry* **2004**, *332*, 261-273.
 116. Kenakin, T. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interactions*; Lippincott Williams & Wilkins; 3rd edition: **1997**.

117. Swillens, S. Interpretation of binding curves obtained with high receptor concentrations - practical aid for computer-analysis. *Molecular Pharmacology* **1995**, *47*, 1197-1203.
118. Munson, P. J. and Rodbard, D. An exact correction to the Cheng-Prusoff correction. *Journal of Receptor Research* **1988**, *8*, 533-546.
119. Munson, P. J. Correction. *Journal of Receptor Research* **1990**, *9*, 511.
120. K_i -Calculator. http://sw16.im.med.umich.edu/software/calc_ki/index.jsp 03-12-**2009**.
121. Lozán, J. L. and Kausch, H. *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler; Wissenschaftliche Auswertungen*, Hamburg: **2007**.
122. Tennstedt, S. *In silico* Identifizierung und Untersuchung von Agonisten und Antagonisten des Androgenrezeptors. Dissertation in Vorbereitung. *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Hrsg. L. Wessjohann, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie* **2009**.
123. Carruba, G.; Miceli, M. D.; Comito, L.; Farruggio, R.; Sorci, C. M. G.; and Oliveri, G. Multiple estrogen function in human prostate cancer cells. *Basis for Cancer Management* **1996**, *784*, 70-84.
124. Bryhan, M. D., Cagnon, P. E., LaChance, O. V., Shen, Z. H., and Wang, H. Method for creating a cell growth surface on a polymeric substrate. [US 6617152]. 9-9-**2003**.
125. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Information sheet for cell lines. http://www.dsmz.de/dsmz/main.php?menu_id=5 **2007**.
126. Langeler, E. G.; Vanuffelen, C. J. C.; Blankenstein, M. A.; Vansteenbrugge, G. J.; and Mulder, E. Effect of culture conditions on androgen sensitivity of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Prostate* **1993**, *23*, 213-223.
127. Hasenson, M.; Hartleyasp, B.; Kihlfors, C.; Lundin, A.; Gustafsson, J. A.; and Pousette, A. Effect of hormones on growth and ATP content of a human prostatic carcinoma cell line, LNCaP-r. *Prostate* **1985**, *7*, 183-194.
128. Kirschenbaum, A.; Ren, M. Y.; and Levine, A. C. Enhanced androgen sensitivity in serum-free medium of a subline of the LNCaP human prostate cancer cell line. *Steroids* **1993**, *58*, 439-444.
129. Hobisch, A.; Hoffmann, J.; Lambrinidis, L.; Eder, I. E.; Bartsch, G.; and Klocker, H. Antagonist/agonist balance of the nonsteroidal antiandrogen bicalutamide (Casodex) in a new prostate cancer model. *Urologia Internationalis* **2000**, *65*, 73-79.
130. Harkonen, P.; Torn, S.; Kurkela, R.; Porvari, K.; Pulkka, A.; and Lindfors, A. Sex hormone metabolism in prostate cancer cells during transition to an androgen-independent state. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2003**, *88*, 705-712.

131. Shoemaker, M.; Cohen, I.; and Campbell, M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *93*, 381-384.
132. Rücker, G.; Neugebauer, M.; and Willems, G. G. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Birkenwaldstraße 44, D-7000 Stuttgart: **1992**.
133. Kaighn, M. E.; Kirk, D.; Szalay, M.; and Lechner, J. F. Growth control of prostatic carcinoma cells in serum-free media - Interrelationship of hormone response, cell-density, and nutrient media. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences* **1981**, *78*, 5673-5676.
134. Belanger, C.; Veilleux, R.; and Labrie, F. Stimulatory effects of androgens, estrogens, progestins, and dexamethasone on the growth of the LNCaP human prostate cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1990**, *595*, 399-402.
135. Schuurmans, A. L. G.; Bolt, J.; Voorhorst, M. M.; Blankenstein, R. A.; and Mulder, E. Regulation of growth and epidermal growth-factor receptor levels of LNCaP prostate tumor cells by different steroids. *International Journal of Cancer* **1988**, *42*, 917-922.
136. Schuurmans, A. L. G.; Bolt, J.; and Mulder, E. Androgens and transforming-growth-factor beta modulate the growth response to epidermal-growth-factor in human prostatic tumor cells (LNCaP). *Molecular and Cellular Endocrinology* **1988**, *60*, 101-104.
137. Schuurmans, A. L. G.; Bolt, J.; and Mulder, E. Androgens stimulate both growth rate and epidermal-growth-factor receptor activity of the human prostate tumor cell LNCaP. *Prostate* **1988**, *12*, 55-63.
138. Fujii, Y.; Kawakami, S.; Okada, Y.; Kageyama, Y.; and Kihara, K. Regulation of prostate-specific antigen by activin A in prostate cancer LNCaP cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **2004**, *286*, E927-E931.
139. AstraZeneca Österreich GmbH *Fachinformation Casodex*; Documed AG, Basel: **2008**.
140. Schuurmans, A. L. G.; Bolt, J.; Veldscholte, J.; and Mulder, E. Stimulatory effects of antiandrogens on LNCaP human prostate tumor cell growth, EGF-receptor level and acid-phosphatase secretion. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1990**, *37*, 849-853.
141. Estebanez-Perpina, E.; Arnold, A. A.; Nguyen, P.; Rodrigues, E. D.; Mar, E.; and Bateman, R. A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 16074-16079.

142. Wilkinson, J. M.; Hayes, S.; Thompson, D.; Whitney, P.; and Bi, K. Compound profiling using a panel of steroid hormone receptor cell-based assays. *Journal of Biomolecular Screening* **2008**, *13*, 755-765.
143. Castagnetta, L. A.; Miceli, M. D.; Sorci, C. M. G.; Pfeffer, U.; Farruggio, R.; and Oliveri, G. Growth of LNCaP human prostate cancer cells is stimulated by estradiol via its own receptor. *Endocrinology* **1995**, *136*, 2309-2319.
144. Yemelyanov, A.; Czwarnog, J.; Gera, L.; Joshi, S.; Chatterton, R. T.; and Budunova, I. Novel steroid receptor phyto-modulator compound A inhibits growth and survival of prostate cancer cells. *Cancer Research* **2008**, *68*, 4763-4773.
145. Wilding, G.; Chen, M.; and Gelmann, E. P. Aberrant response in vitro of hormone responsive prostate cancer cells to antiandrogens. *Prostate* **1989**, *14*, 103-115.
146. Maucher, A. and Vonangerer, E. Antiproliferative activity of casodex (ICI-176.334) in hormone dependent tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1993**, *119*, 669-674.
147. Bologna, M.; Muzi, P.; Biordi, L.; Festuccia, C.; and Vicentini, C. Finasteride dose dependency reduces the proliferation rate of the LNCaP human prostatic cancer cell line in vitro. *Urology* **1995**, *45*, 282-290.
148. Hoffmann, R.; Niiyama, S.; Huth, A.; Kissling, S.; and Happle, R. 17 alpha-estradiol induces aromatase activity in intact human anagen hair follicles ex vivo. *Experimental Dermatology* **2002**, *11*, 376-380.
149. Berns, E. M. J. J.; Deboer, W.; and Mulder, E. Androgen dependent growth regulation of and release of specific protein(s) by the androgen receptor containing human prostate tumor cell line LNCaP. *Prostate* **1986**, *9*, 247-259.
150. Kuiper, G. G. J. M.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; and Nilsson, S. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **1997**, *138*, 863-870.
151. Carruba, G.; Pfeffer, U.; Fecarotta, E.; Coviello, D. A.; Damato, E.; and Locasto, M. Estradiol inhibits growth of hormone nonresponsive PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Research* **1994**, *54*, 1190-1193.
152. Kawashima, H.; Tanaka, T.; Cheng, J.; Sugita, S.; Ezaki, K.; and Kurisu, T. Effect of anti-estrogens on the androgen receptor activity and cell proliferation in prostate cancer cells. *Urological Research* **2004**, *32*, 406-410.
153. Blanchere, M.; Berthaut, I.; Portois, M. C.; Mestayer, C.; and Mowszowicz, I. Hormonal regulation of the androgen receptor expression in human prostatic cells in culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, *66*, 319-326.

154. Mobbs, B. G.; Johnson, I. E.; Connolly, J. G.; and Thompson, J. Concentration and cellular distribution of androgen receptor in human prostatic neoplasia - can estrogen treatment increase androgen receptor content. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1983**, *19*, 1279-1290.
155. Denis, L. J.; Behre, H. E.; Bracke, M.; Griffiths, K.; Krieg, M.; and Kyprianou, N. Estrogens and prostatic disease. *Prostate* **2000**, *45*, 87-100.
156. Bonkhoff, H.; Fixemer, T.; Hunsicker, I.; and Remberger, K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *American Journal of Pathology* **1999**, *155*, 641-647.
157. Nanni, S.; Narducci, M.; Della Pietra, L.; Moretti, F.; Grasselli, A.; and De Carli, P. Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation* **2002**, *110*, 219-227.
158. Raghov, S.; Hooshdaran, M. Z.; Katiyar, S.; and Steiner, M. S. Toremifene prevents prostate cancer in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Cancer Research* **2002**, *62*, 1370-1376.
159. Huynh, H.; Alpert, L.; Alaoui-Lamali, M. A.; Ng, C. Y.; and Chan, T. W. M. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *Journal of Endocrinology* **2001**, *171*, 109-118.
160. Takahashi, Y.; Perkins, S. N.; Hursting, S. D.; and Wang, T. T. Y. 17 beta-estradiol differentially regulates androgen-responsive genes through estrogen receptor-beta- and extracellular-signal regulated kinase-dependent pathways in LNCaP human prostate cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* **2007**, *46*, 117-129.
161. Maggiolini, M.; Recchia, A. G.; Carpino, A.; Vivacqua, A.; Fasanella, G.; and Rago, V. Oestrogen receptor beta is required for androgen-stimulated proliferation of LNCaP prostate cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **2004**, *32*, 777-791.
162. Bektic, J.; Berger, A. P.; Pfeil, K.; Dobler, G.; Bartsch, G.; and Klocker, H. Androgen receptor regulation by physiological concentrations of the isoflavonoid genistein in androgen-dependent LNCaP cells is mediated by estrogen receptor beta. *European Urology* **2004**, *45*, 245-251.
163. Taylor, R. A.; Cowin, P.; Couse, J. F.; Korach, K. S.; and Risbridger, G. P. 17 beta-Estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ER alpha or ER beta. *Endocrinology* **2006**, *147*, 191-200.
164. Nawaz, Z.; Stancel, G. M.; and Hyder, S. M. The pure antiestrogen ICI 182,780 inhibits progesterin-induced transcription. *Cancer Research* **1999**, *59*, 372-376.
165. Stettner, M.; Kaulfuss, S.; Burfeind, P.; Schweyer, S.; Strauss, A.; Ringert, R. H.; and Thelen, P. The relevance of estrogen receptor-beta expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors

- and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**, *6*, 2626-2633.
166. Lau, K. M.; LaSpina, M.; Long, J.; and Ho, S. M. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: Regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Research* **2000**, *60*, 3175-3182.
167. Wu, W. L.; Chang, W. L.; and Chen, C. F. Cytotoxic activities of tanshinones against human carcinoma cell lines. *American Journal of Chinese Medicine* **1991**, *19*, 207-216.
168. Ryu, S. Y.; Lee, C. O.; and Choi, S. U. In vitro cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica* **1997**, *63*, 339-342.
169. Tierra, M. and Tierra, L. *Chinese Traditional Herbal Medicine: Materia medica and herbal resource*; Lotus Press: **1998**.
170. Creasey, W. A. Antitumoral activity of fern cibotium schiedeii. *Nature* **1969**, *222*, 1281-1282.
171. Lai, H. Y.; Lim, Y. Y.; and Tan, S. P. Antioxidative, tyrosinkinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2009**, *73*, 90018-1-90018-5.
172. Ryu, M. and Lee, I. S. Antioxidant constituents from the rhizomes of *Cibotium barometz*. *Planta Medica* **2008**, *74*, 994.
173. Li, J.; Wang, Z. H.; Wang, C. T.; Cao, C. X.; Dong, Q. F.; and Jia, T. Z. Influence of *Cibotium barometz* and its processed samples on haemorheology index in mice with adjuvant arthritis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2008**, *33*, 2170-2173.
174. Murakami, T.; Satake, T.; Ninomiya, K.; Iida, H.; Yamauchi, K.; and Tanaka, N. Chemical and chemotaxonomic studies on filices .25. Pterosin derivative from pteridaceae family. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1743-1746.
175. Kim, S. T.; Han, Y. N.; Son, J. K.; Jang, H. S.; Kim, S. J.; and Shin, J. S. Isolation of bioactive constituents for neuronal regeneration from *Cibotium barometz*. *Yakhak Hoechi* **2002**, *46*, 398-404.
176. Zhang, C. and Wang, Z. Studies on constituents of *Cibotium barometz* (L.) rhizomes. *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi* **2001**, *11*, 279-280.
177. Yuan, Z.; Su, S.; Jiang, Z.; and Wang, J. Study on chemical constituents of TCM drug Gouzhi, *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. *Zhongcaoyao* **1996**, *27*, 76.
178. Cruz, M. C. S.; Santos, P. O.; Barbosa, A. M.; De Melo, D. L. F. M.; Alviano, C. S.; and Antoniolli, A. R. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *111*, 409-412.

179. Naik, S. R.; Filho, J. M. B.; Dhuley, J. N.; and Deshmukh, V. Probable mechanism of hypoglycemic activity of bassic acid, a natural product isolated from *bumelia sartorum*. *Journal of Ethnopharmacology* **1991**, *33*, 37-44.
180. Almeida, R. N.; Barbosa, J. M.; and Naik, S. R. Chemistry and pharmacology of an ethanol extract of *bumelia sartorum*. *Journal of Ethnopharmacology* **1985**, *14*, 173-185.
181. Bennani, H.; Drissi, A.; Giton, F.; Kheuang, L.; Fiet, J.; and Adlouni, A. Anti-proliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detection and Prevention* **2007**, *31*, 64-69.
182. Drissi, A.; Bennani, H.; Giton, F.; Charrouf, Z.; Fiet, J.; and Adlouni, A. Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer Investigation* **2006**, *24*, 588-592.
183. Myint Myint Khine Isolation and Characterization of Phytoconstituents from Myanmar Medicinal Plants; Dissertation. *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*; Hrsg. L. Wessjohann, *Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie* **2006**.
184. Ueda, J.; Tezuka, Y.; Banskota, A. H.; Le Tran, Q.; Tran, Q. K.; and Saiki, I. Constituents of the Vietnamese medicinal plant *Streptocaulon juvenas* and their antiproliferative activity against the human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Journal of Natural Products* **2003**, *66*, 1427-1433.
185. Duong, T. N.; Edrada, R.; Ebel, R.; Wray, V.; Frank, W.; and Duong, A. T. Putrescine bisamides from *Aglaia gigantea*. *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 1640-1643.
186. Loo, W. T. Y.; Cheung, M. N. B.; and Chow, L. W. C. The inhibitory effect of a herbal formula comprising ginseng and *carthamus tinctorius* on breast cancer. *Life Sciences* **2004**, *76*, 191-200.
187. Rea, A. I.; Schmidt, J. M.; Setzer, W. N.; Sibanda, S.; Taylor, C.; and Gwebu, E. T. Cytotoxic activity of *Ozoroa insignis* from Zimbabwe. *Fitoterapia* **2003**, *74*, 732-735.
188. Teichert, A.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; and Wessjohann, L. Brunneins A-C, beta-carboline alkaloids from *Cortinarius brunneus*. *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 1529-1531.
189. Spoerke, D. G. and Rumack, B. H. *Handbook of mushroom poisoning: diagnosis and treatment*; CRC Press: **1994**.
190. Palberg, K. Hormonassay mit Phytosterolen und Steroidderivaten; Staatsexamensarbeit. *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*; Hrsg. L. Wessjohann, *Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie* **2008**.
191. Walters, W. P. and Namchuk, M. Designing screens: How to make your hits a hit. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 259-266.

192. Motulsky, H. Analyzing Data with GraphPad Prism. *GraphPad Software, Inc.*, 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 USA **1999**.
193. Min, L.; Yanase, T.; Tanaka, T.; Fan, W. Q.; Nomura, M.; Kawate, H.; Okabe, T.; Takayanagi, R.; and Nawata, H. A Novel Synthetic Androgen Receptor Ligand, S42, Works as a Selective Androgen Receptor Modulator and Possesses Metabolic Effects with Little Impact on the Prostate. *Endocrinology* **2009**, *150*, 5606-5616.
194. Young, C. Y. F.; Montgomery, B. T.; Andrews, P. E.; Qiu, S. D.; Bilhartz, D. L.; and Tindall, D. J. Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger-RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Research* **1991**, *51*, 3748-3752.
195. Montgomery, B. T.; Young, C. Y. F.; Bilhartz, D. L.; Andrews, P. E.; Prescott, J. L.; and Thompson, N. F. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate* **1992**, *21*, 63-73.
196. Banham, A. H.; Boddy, J.; Launchbury, R.; Han, C.; Turley, H.; and Malone, P. R. Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated both with hypoxia inducible factors (HIFs) and the androgen receptor in prostate cancer but is not directly regulated by androgens or hypoxia. *Prostate* **2007**, *67*, 1091-1098.
197. Craft, N.; Shostak, Y.; Carey, M.; and Sawyers, C. L. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nature Medicine* **1999**, *5*, 280-285.
198. Sadar, M. D. Androgen-independent induction of prostate-specific antigen gene expression via cross-talk between the androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 7777-7783.
199. Teyssier, C.; Bianco, S.; Lanvin, O.; and Vanacker, J. M. The orphan receptor ERR alpha interferes with steroid signaling. *Nucleic Acids Research* **2008**, *36*, 5350-5361.
200. Burris, T. P.; Montrose, C.; Houck, K. A.; Osborne, H. E.; Bocchinfuso, W. P.; and Yaden, B. C. The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Molecular Pharmacology* **2005**, *67*, 948-954.
201. Cleutjens, K. B. J. M.; vanEekelen, C. C. E. M.; vanderKorput, H. A. G. M.; Brinkmann, A. O.; and Trapman, J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 6379-6388.
202. Yang, X.; Chen, M. W.; Terry, S.; Vacherot, F.; Bemis, D. L.; and Capodice, J. Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells. *Oncogene* **2006**, *25*, 3436-3444.

203. Alimirah, F.; Panchanathan, R.; Chen, J.; Zhang, X.; Ho, S. M.; and Choubey, D. Expression of androgen receptor is negatively regulated by p53. *Neoplasia* **2007**, *9*, 1152-1159.
204. Burnstein, K. L.; Maiorino, C. A.; Dai, J. L.; and Cameron, D. J. Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* **1995**, *115*, 177-186.
205. Sunnemann, H. W.; Hofmeister, A.; Magull, J.; and de Meijere, A. Stille-Heck coupling sequences applied in a versatile new access to steroid skeletons. *Chemistry* **2007**, *13*, 3739-3756.
206. Noe, G.; Suvisaari, J.; Martin, C.; Moo-Young, A. J.; Sundaram, K.; and Saleh, S. I. Gonadotrophin and testosterone suppression by 7 alpha-methyl-19-nortestosterone acetate administered by subdermal implant to healthy men. *Human Reproduction* **1999**, *14*, 2200-2206.
207. Ramachandra, S. G.; Ramesh, V.; Krishnamurthy, H. N.; Kumar, N.; Sundaram, K.; and Hardy, M. P. Effect of chronic administration of 7 alpha-methyl-19-nortestosterone on serum testosterone, number of spermatozoa and fertility in adult male bonnet monkeys (*Macaca radiata*). *Reproduction* **2002**, *124*, 301-309.
208. von Eckardstein, S.; Noe, G.; Brache, V.; Nieschlag, E.; Croxatto, H.; and Alvarez, F. A clinical trial of 7 alpha-methyl-19-nortestosterone implants for possible use as a long-acting contraceptive for men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2003**, *88*, 5232-5239.
209. Cummings, D. E.; Kumar, N.; Bardin, C. W.; Sundaram, K.; and Bremner, W. J. Prostate-sparing effects in primates of the potent androgen 7 alpha-methyl-19-nortestosterone: A potential alternative to testosterone for androgen replacement and male contraception. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998**, *83*, 4212-4219.
210. Walton, M. J.; Kumar, N.; Baird, D. T.; Ludlow, H.; and Anderson, R. A. 7 alpha-methyl-19-nortestosterone (MENT) vs testosterone in combination with etonogestrel implants for spermatogenic suppression in healthy men. *Journal of Andrology* **2007**, *28*, 679-688.
211. Anderson, R. A.; Wallace, A. M.; Sattar, N.; Kumar, N.; and Sundaram, K. Evidence for tissue selectivity of the synthetic androgen 7 alpha-methyl-19-nortestosterone in hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2003**, *88*, 2784-2793.
212. Prasad, P. V.; Arumugam, R.; Willman, M.; Ge, R. S.; Sitruk-Ware, R.; and Kumar, N. Distribution, metabolism and excretion of a synthetic androgen 7 alpha-methyl-19-nortestosterone, a potential male-contraceptive. *Steroids* **2009**, *74*, 121-131.
213. Lamorte, A.; Kumar, N.; Bardin, C. W.; and Sundaram, K. Aromatization of 7-alpha-methyl-19-nortestosterone by human placental microsomes in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1994**, *48*, 297-304.

214. De Gooyer, M. E.; Oppers-Tiemissen, H. M.; Leysen, D.; Verheul, H. A. M.; and Kloosterboer, H. J. Tibolone is not converted by human aromatase to 7 alpha-methyl-17 alpha-ethynylestradiol (7 alpha-MEE): Analyses with sensitive bioassays for estrogens and androgens and with LC-MSMS. *Steroids* **2003**, *68*, 235-243.
215. Attardi, B. J.; Pham, T. C.; Radler, L. M.; Burgenson, J.; Hild, S. A.; and Reel, J. R. Dimethandrolone (7 alpha,11 beta-dimethyl-19-nortestosterone) and 11 beta-methyl-19-nortestosterone are not converted to aromatic A-ring products in the presence of recombinant human aromatase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2008**, *110*, 214-222.
216. Kumar, N.; Didolkar, A. K.; Monder, C.; Bardin, C. W.; and Sundaram, K. The biological activity of 7-alpha-methyl-19-nortestosterone is not amplified in male reproductive tract as is that of testosterone. *Endocrinology* **1992**, *130*, 3677-3683.
217. Agarwal, A. K. and Monder, C. In vitro metabolism of 7-alpha-methyl-19-nortestosterone by rat liver, prostate, and epididymis. *Endocrinology* **1988**, *123*, 2187-2193.
218. Shao, T. C.; Li, H. L.; Kasper, S.; Matusik, R.; Ittmann, M.; and Cunningham, G. R. Comparison of the growth-promoting effects of testosterone and 7-alpha-methyl-19-nor-testosterone (MENT) on the prostate and levator ani muscle of LPB-Tag transgenic mice. *Prostate* **2006**, *66*, 369-376.
219. Mendoza, P.; Sanchez, C.; Contreras, H. R.; Vergara, J.; Acevedo, C.; and Cabezas, J. Evaluation of MENT on primary cell cultures from benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. *International Journal of Andrology* **2008**.
220. Beri, R.; Kumar, N.; Savage, T.; Benalcazar, L.; and Sundaram, K. Estrogenic and progestational activity of 7 alpha-methyl-19-nortestosterone, a synthetic androgen. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, *67*, 275-283.
221. Markiewicz, L. and Gurpide, E. Estrogenic and progestagenic activities of physiologic and synthetic androgens, as measured by in vitro bioassays. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* **1997**, *19*, 215-222.
222. Ju, Y. H.; Clausen, L. M.; Allred, K. F.; Almada, A. L.; and Helferich, W. G. beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, and a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *Journal of Nutrition* **2004**, *134*, 1145-1151.
223. Awad, A. B.; Downie, A. C.; and Fink, C. S. Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. *International Journal of Molecular Medicine* **2000**, *5*, 541-545.

224. Touillaud, M. S.; Pillow, P. C.; Jakovljevic, J.; Bondy, M. L.; Singletary, S. E.; and Li, D. H. Effect of dietary intake of phytoestrogens on estrogen receptor status in premenopausal women with breast cancer. *Nutrition and Cancer - An International Journal* **2005**, *51*, 162-169.
225. Awad, A. B.; Gan, Y. M.; and Fink, C. S. Effect of beta-sitosterol, a plant sterol, on growth, protein phosphatase 2A, and phospholipase D in LNCaP cells. *Nutrition and Cancer - An International Journal* **2000**, *36*, 74-78.
226. von Holtz, R. L.; Fink, C. S.; and Awad, A. B. beta-sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer - An International Journal* **1998**, *32*, 8-12.
227. Malikova, J.; Swaczynova, J.; Kolar, Z.; and Strnad, M. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 418-426.
228. Fahy, D. M.; O'Callaghan, Y. C.; and O'Brien, N. M. Phytosterols: lack of cytotoxicity but interference with beta-carotene uptake in Caco-2 cells in culture. *Food Additives and Contaminants* **2004**, *21*, 42-51.
229. Awad, A. B.; Hartati, M. S.; and Fink, C. S. Phytosterol feeding induces alteration in testosterone metabolism in rat tissues. *Journal of Nutritional Biochemistry* **1998**, *9*, 712-717.
230. Kassen, A.; Berges, R.; and Senge, T. Effect of β -Sitosterol on the expression and secretion of growth factors in primary human prostate stromal cell cultures in vitro. *Poster der 4. Internationalen BPH-Konferenz, Paris* **1997**.
231. Qi, W.; Gao, S.; and Wang, Z. X. Transcriptional regulation of the TGF-beta 1 promoter by androgen receptor. *Biochemical Journal* **2008**, *416*, 453-462.
232. Nguyen, X. C.; Chau, V. M.; Phan, V. K.; Hoang, T. H.; Ninh, K. B.; Nguyen, X. N.; Nguyen, H. T.; Jung, J. W.; Kim, H. J.; Kim, S. Y.; Kim, J. A.; and Kim, Y. H. Inhibitors of Osteoclast Formation from Rhizomes of *Cibotium barometz*. *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 1673-1677.
233. Satake, T.; Murakami, T.; Saiki, Y.; Chen, C. M.; Gomez, P.; and Luis, D. Chemical and chemotaxonomical studies on filices. LI. Chemical studies on the constituents of Costa Rican ferns. *Chem Pharm. Bull (Tokyo)* **1984**, *32*, 4620-4624.