

Abteilung für Physiologie
ZIEL Weihenstephan
Technische Universität München

**Funktionelle Genexpressionsassays für androgen /
antiandrogen wirksame Liganden**

Anita Joanna Hartel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Harun Parlar
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Heinrich H. D. Meyer
2. Univ.-Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 31. 08. 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18. 10. 2004 angenommen.

VORWORT

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2001 bis Mai 2004 am Institut für Physiologie, ZIEL Weihenstephan, der Technischen Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. Heinrich H. D. Meyer angefertigt.

Prof. Dr. Heinrich H. D. Meyer ermöglichte mir mit der Überlassung des spannenden Themengebiets die Durchführung der Dissertation. Ihm wie auch Dr. Andreas Daxenberger und Dr. Andrea Didier danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen, ihre fachlichen Ratschläge und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Inge Celler, Tamara Dicker, Christine Fochtman, Waltraud Schmidt und Doreen Tetzlaff sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie sei Dank für ihr Engagement, ihre Unterstützung und die Vermittlung ihres methodischen Wissens.

Mein besonderer Dank gebührt auch Brigitte Dötterböck und Angela Sachsenhauser für ihre Geduld und tatkräftige Mithilfe. Durch ihre Unterstützung bei der RNA Extraktion der zahlreichen Proben haben sie einen großen Anteil am Entstehen dieser Arbeit.

In weiteren gilt mein herzlicher Dank den Bachelor Studenten Cordula Pertl, Michael Wierer und Sandra Baumann für ihr intensives und hilfreiches Mitwirken beim Gelingen dieses Werkes.

Bei den Mitarbeitern des Schlachthofs Grub, insbesondere bei Herrn Möstel möchte ich mich für die Bereitstellung von Gewebeproben und die fachlichen Hilfsleistungen bedanken.

Für das angenehme Arbeitsklima sei allen Mitarbeitern des Institutes, besonders der „Denkerzentrale“, ganz herzlichen gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	iii
1. EINFÜHRUNG	1
1.1 Endokrine Disruptoren	1
1.2 Testsysteme für endokrine Disruptoren	5
1.3 Androgene / Antiandrogene und ihre Wirkungsweise	6
1.4 Beispiele für Androgene und Antiandrogene	8
1.5 Androgen / Antiandrogen regulierte Zielgene	11
2. AUFGABENSTELLUNG	12
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1 Zellkulturen	14
3.1.1 Humane Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1	14
3.1.2 Primäre, normale Schweine Prostata Epithelzellkultur (NPE)	15
3.2 Immunhistologische Methoden	15
3.2.1 Nachweis der Steroidrezeptoren in 22RV1 Zellen	16
3.2.2 Differenzierung der NPE Zellen	16
3.3 Western-Blot	17
3.4 Relative Bindungsaffinität, AR Assay	17
3.5 Expositionsversuche	17
3.6 Real-time RT-PCR	18
3.7 Sequenzierung	18
4. RESULTATE	19
4.1 Zellkultur 22RV1	19
4.1.1 Morphologie und Wachstumsverhalten	19
4.1.2 Steroid-Rezeptor-Status	19
4.1.2.1 Real-time RT-PCR	19
4.1.2.2 Western-Blot, AR Assay, Immunhistologie	20
4.1.3 Relative Bindungsaffinitäten	21
4.1.4 Sequenzierung	21
4.2 Zellkultur NPE	21
4.2.1 Morphologie und Wachstum	21

4.2.2	Steroid-Rezeptor-Status	23
4.3	Vergleich der Kultivierung mit und ohne Lösungsmittel	23
4.4	Ergebnisse der Expositionsuntersuchungen	24
4.4.1	Zelllinie 22RV1	27
4.4.1.1	DHT, Testosteron und 19-Nortestosteron	27
4.4.1.2	R1881	28
4.4.1.3	Fentinacetat	28
4.4.1.4	Difenoconazol	28
4.4.1.5	Tetramethrin	28
4.4.1.6	Östradiol-17 β , Progesteron und Cortisol	29
4.4.1.7	Ligandenvergleich (22RV1)	29
4.4.2	Zelllinie NPE	30
4.4.2.1	Testosteron	30
4.4.2.2	Fentinacetat	30
4.4.2.3	Difenoconazol	30
4.4.2.4	Tetramethrin	31
4.4.2.5	Östradiol-17 β , Progesteron und Cortisol	31
4.4.2.6	Ligandenvergleich (NPE)	31
4.4.3	Zusammenstellung der Expositionsversuche	31
4.4.3.1	Zelllinie 22RV1	31
4.4.3.2	Zelllinie NPE	33
5.	DISKUSSION	35
5.1	Rational für Testsystem	36
5.2	Etablierung der primären NPE Zellkultur	38
5.3	Steroid-Rezeptor-Status	40
5.4	Wild- und Mutagentyp AR	41
5.5	Expositionsversuche	43
6.	ZUSAMMENFASSUNG	48
7.	SUMMARY	50
8.	LITERATUR	52
	ANHANG	69
	LEBENS LAUF	69
	PUBLIKATIONEN	70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

22RV1	humane Prostata Karzinom Zelllinie
5 α Red	5 alpha Reduktase
ADI	akzeptierte tägliche Aufnahmemenge
AK	Antikörper
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen Response Element
ARG	Androgenregulierte Gene
bp	Basenpaare
BPA	Bisphenol A
cDNA	complementary DNA
CP	crossing point
DAB	Diaminobenzidin
DDT	Dichlorodiphenyltrichlorethan
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Drg1	Differentiation-related gene 1
ED	endokriner Disruptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPA	Environmental Protection Agency
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER β	Östrogenrezeptor beta
FCS	Fetales Kälberserum
For	Forward

Abkürzungsverzeichnis

GluR α	Glukokortikoidrezeptor alpha
GluR β	Glukokortikoidrezeptor beta
GR	Gestagenrezeptor
hAR	humaner Androgenrezeptor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRE	Hormone Response Element
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
M	mol/l
NKX3.1	Homeobox gene
NPE	normale primäre Schweine Prostata Epithelzellkultur
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMEPA1	Transmembrane prostate androgen-induced protein
PSA	Prostate-specific antigene
PSM	Prostate-specific membranantigene
R1881	Methyltrienolon
RBA	relative Bindungsaffinität
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBT	Tributyltin
TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2
TPT	Triphenyltin
TPTA	Triphenyltinacetate
WHO	World Health Organisation

1. EINFÜHRUNG

Synthetische Chemikalien sind heute unauflöslich mit dem modernen Leben unserer Gesellschaft verflochten. Seit etwa 50 Jahren nimmt deren Verwendung rasant zu und es ist eine zunehmende Anreicherung anthropogener Verbindungen in den Stoffkreisläufen der Natur zu beobachten [Danzo, 1998]. Eine Vielzahl dieser Substanzen zeigen in der Tierwelt und auch beim Menschen eine hormonähnliche Wirkung in bereits geringsten Konzentrationen, die zu zahlreichen Schädigungen führen können. Diese Substanzen greifen häufig in das endokrine System des Menschen ein und werden daher auch als „endokrine Disruptoren“ (ED) bezeichnet. In der vorliegenden Dissertation „Funktionelle Genexpressionsassays für androgen / antiandrogen wirksame Liganden“ wird die erfolgreiche Entwicklung eines Untersuchungssystems beschrieben, mit dessen Hilfe das endokrin disruptive Potential von androgenen oder antiandrogenen Substanzen systematisch bestimmt werden kann.

1.1 Endokrine Disruptoren

Die Thematik der hormonell wirksamen Industriechemikalien erweckte 1996 mit dem Erscheinen des viel beachteten, allgemeinverständlichen Buches von Dr. Theo Colborn mit dem Titel „Die bedrohte Zukunft“ größere öffentliche Aufmerksamkeit und brachte das Schlagwort von der „Verweiblichung“ in das gesellschaftliche Bewusstsein. Darin werden die Zusammenhänge zwischen Fortpflanzungsstörungen bei Mensch und Tier und der Belastung mit anthropogenen Umweltchemikalien (Xenobiotika) anschaulich dargelegt [Colborn et al., 1996].

Auf wissenschaftlicher Seite wurden diese Phänomene bereits deutlich früher diskutiert. Seit Mitte der 80-er Jahre finden sich in der Literatur vermehrt Berichte über Brutstörungen, Verweiblichungen, Vermännlichungen und

Reproduktionsprobleme bei wildlebenden Tierpopulationen [Daxenberger, 2002] wie z.B. beim Adler [Broley, 1952; Grier, 1982], Otter [Mason et al., 1986; Mason et al., 1993], Nerzen [Aulerich et al., 1973], Alligatoren [Jennings et al., 1988; Guillette et al., 1994; Guillette et al., 1995] und Fischen [Leatherland et al., 1982; Morrison et al., 1985; Sumpter et al., 1995]. Zum Teil gehen diese mit subtilen Missbildungen der Sexualorgane einher [Alzieu, 2000]. Die ersten konkreten Zusammenhänge zwischen diesen Phänomenen und der Anreicherung von Umweltgiften in der Natur konnten dabei im aquatischen Lebensraum beobachtet werden, etwa bei dem Populationsrückgang von Fisch-fressenden Vögeln der Great Lakes in den USA Ende der achtziger Jahre, oder auch der abnormalen sexuellen Entwicklung von jungen männlichen Alligatoren im Apopka See in Florida [Bruhn et al., 1999; US EPA 1997]. Die Gelege der Alligatoren zeigten dort eine ungewöhnlich hohe Embryonensterblichkeit. Ein großer Teil der männlichen Nachkommen war aufgrund verkümmerter Reproduktionsorgane zeugungsunfähig oder unfruchtbar. Als Ursache hierfür wurde ein Störfall in einer chemischen Fabrik angesehen, durch den größere Mengen des DDT-haltigen Pestizids Dicofol in den See gelangt waren [Colborn, 1995; Guillette et al., 1994; Guillette et al., 1996]. Die Feminisierung der männlichen Alligatoren wurde anfangs auf die östrogenen Eigenschaften von DDT-Isomeren zurückgeführt; inzwischen ist für den persistierenden Metaboliten p,p'-DDE eine ausgeprägte antiandrogene Wirkung nachgewiesen worden [Kelce et al., 1995]. Ein weiteres Beispiel ist die Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane bei weiblichen Vorderkiemenschnecken. Hierfür wird maßgeblich die Substanz Tributyltin (TBT) verantwortlich gemacht [Yamabe et al., 2000; Alzieu, 2000; Meredith et al., 2001]. Die wissenschaftlichen Aktivitäten zur Erforschung dieser Phänomene konzentrierten sich zunächst auf den Einfluss von hormonähnlichen Substanzen auf den Östrogenrezeptor. Die Wechselwirkung mit dem Androgenrezeptor (AR) wurde

erstmals zu Beginn der achtziger Jahre untersucht, nachdem es zum selektiven Ausbruch einer Epidemie unter Haitianischen Männern kam, die alle an der sexuellen Fehlentwicklung Gynäcomastie litten. In einer Bindungsstudie konnte in diesem Fall eine kompetitive Hemmung des Androgenrezeptor durch Pyrethroid-haltige Insektizide nachgewiesen werden [US EPA 1997].

In der letzten Zeit haben sich Berichte über die Anzahl von Umweltstoffen, die androgene bzw. antiandrogene Effekte auslösen, deutlich vergrößert. Prominente Beispiele hierfür sind etwa p,p'-DDT, o,p'-DDT, BPA, Butylbenzylphthalat, Nonylphenol und Metoxychlor [Sohoni et al., 1998; Hossaini et al., 2001]. Den beschriebenen Effekten ist gemein, dass sie zu einer Störung des endokrinen Systems führen, die auslösenden Substanzen nennt man daher „endokrine Disruptoren“. Auf der im Dezember 1996 in Weybridge, England [Bruhn et al., 1999], abgehaltenen Konferenz „European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife“ unter Federführung der EU-Kommission DG XII, der European Environment Agency und dem European Center for Environmental Health der WHO hat man sich auf folgende Definition für endokrine Disruptoren geeinigt:

„Bei den endokrinen Disruptoren handelt es sich um körperfremde Verbindungen, die in das endokrine System eines gesunden Organismus oder das seiner Nachkommen eingreifen und zu signifikanten Gesundheitsstörungen führen.“

Zu den endokrinen Disruptoren gehören Chemikalien synthetischer oder natürlicher Herkunft sowie deren Metabolite, die entweder wie körpereigene Hormone (agonistisch) wirken oder deren Wirkung abschwächen (antagonisieren) können. Endokrine Modulatoren können über verschiedene Mechanismen auf das endokrine System einwirken. Häufig treten Wechselwirkungen der Stoffe mit den körpereigenen Hormonrezeptoren auf, aber auch die Biosynthese, der Transport und Abbau körpereigener Hormone können moduliert werden [Thierfelder et al., 1995]. Alternativ

kann eine Wirkung auch über die Beeinflussung der Rezeptorsignalwege erfolgen. Indirekte Effekte können ferner über eine Induktion oder eine Hemmung von Enzymen bewirkt werden, was zu Veränderungen bei der Produktion oder dem Abbau endogener Hormone führt.

In der Diskussion um Umweltchemikalien mit endokrin disruptiver Wirkung finden Substanzen mit androgenen und mit antiandrogenen Eigenschaften bisher wenig Aufmerksamkeit. Es ist unstrittig, dass solche Stoffe in hormonell gesteuerte Prozesse eingreifen können und dadurch die prinzipielle Möglichkeit besteht, dass Entwicklung und Reproduktion gestört [Czeizel, 1985] oder Krebserkrankungen gefördert werden [Forman et al., 1994].

Endokrine Disruptoren aus Trinkwasser, Boden, Lebensmitteln, kosmetischen Produkten, Arzneimitteln und Bedarfsgegenständen finden seit einiger Zeit als potentielle Ursachen für bestimmte körperliche Fehlfunktionen wie Zyklusverschiebungen, Beeinträchtigung der Fertilität, vermehrte Inzidenz maligner Neoplasien in hormonabhängigem Gewebe bis hin zu Verhaltensänderung bei *in-utero* exponierten Individuen zunehmend öffentliche und wissenschaftliche Beachtung. Inzwischen mehren sich die Anzeichen, dass Fertilitätsstörungen, welche zunächst nur in der Tierwelt beobachtet wurden, auch beim Menschen auftreten können [Thierfelder et al., 1995]. In einem umstrittenen Bericht wurde die Hypothese aufgestellt, dass die durchschnittliche Spermienanzahl bei Männern im allgemeinen in den letzten Jahrzehnten durch dem Einfluss von Fremdstoffen aus der Umwelt abgesunken ist. [Carlsen et al., 1992; Sharpe et al., 1993; Sharpe und Skakkebaek 1993]. Das Phänomen der zunehmenden Verschlechterung der Spermienqualität [Comhaire et al., 1996] wurde allerdings schon seit längerem bei Männern mit hoher Organochlorexposition am Arbeitsplatz beobachtet [Thrupp, 1991]. Ein starker Anstieg der Zahl von Hodenkrebs-, Brustkrebs- und Prostatakrebsfällen wurde in den

westlichen Ländern verzeichnet [Colburn et al., 1992; Colburn et al., 1996; Platt, 1995; Forman et al., 1994; Czeizel, 1985; Møller, 2001; Sasco, 2001]. Als eine Folge ungenügender Androgenexposition treten bei Männern Cryptorchismus und Hypospadie auf [Weybridge, 1996]. Außer den Auswirkungen auf das Reproduktionssystem des erwachsenen Menschen werden auch neurologische und immunologische Effekte bei Säuglingen und Kindern beobachtet [Jacobsen et al., 1984; Gladen et al., 1988; Rogan et al., 1986].

1.2 Testsysteme für endokrine Disruptoren

Der derzeitige Kenntnisstand über das Vorkommen, die Persistenz und den Verbleib endokrin wirksamer Verbindungen in der Umwelt ist sehr lückenhaft. Der Nachweis und die Bestimmung der verantwortlichen Substanzen bereitet der Umweltanalytik nach wie vor große Schwierigkeiten. Insbesondere fehlt es an Analyseverfahren, welche eine wirkungsbezogene Detektion verschiedener Einzelstoffe im extremen Spurenbereich erlauben. Zur Prüfung von Stoffen auf androgene oder antiandrogene Aktivität können verschiedene *in-vitro* und *in-vivo* Methoden herangezogen werden. Sie sind unterschiedlich aufwendig, haben verschiedene Empfindlichkeiten und unterscheiden sich in der Qualität ihrer Aussagekraft. Bislang konnten anhand von Veränderungen androgenspezifischer biologischer Parameter, kompetitiver Rezeptorbindungsstudien, Rezeptorassays oder Zellproliferationstests zahlreiche (anti)androgenwirksame Substanzen identifiziert werden, die sich weltweit u.a. in Wasser sowie Lebensmittel pflanzlicher und tierischen Ursprungs nachweisen lassen, wie bspw. Antrazin, p,p'-DDT, o,p'-DDT, Dieldrin, Lindan, Linuron, Methoxychlor, Nonylphenol oder Vinclozolin [Gray et al., 1989; Kelce et al., 1995; Sohoni et al., 1998; Hossaini et al., 2001].

Negative proliferative Effekte von Androgenen konnten in AR-positiven Brustkrebszellen [Poulin et al., 1991; Hackenberg et al., 1993; Bentel et al., 1999] und in AR-transfizierten Brust- oder Prostatakarzinomzellen [Szelei et al., 1997; Yuan et al., 1993] festgestellt werden. Liganden-aktivierte Rezeptoren initiierten die Transkription eines Rezeptorgens [Fuhrmann et al., 1992; Vinggaard et al., 1999, 2000; Terouanne et al., 2000]. Auf subzellulärer Ebene lieferten kompetitive Rezeptorassays Informationen über Bindungsaffinitäten einzelner Substanzen [Bauer et al., 1998]. Jüngst gelang es, ein Testsystem auf der Basis eines rekombinant hergestellten humanen AR aufzubauen [Bauer et al., 2002]. In einer androgenresponsiven humanen Brustkrebszelllinie (MDA-MB-453) konnten durch Androgenbehandlung die endogenen androgen-regulierten Gene für die Fettsäuresynthese, das „gross-cystic-disease-fluid-protein“ und der Prolaktinrezeptor induziert werden [Hall et al., 1994].

In-vivo konnte im Rattenexperiment gezeigt werden, dass Vinclozolin, p,p'-DDE und Flutamid in der Prostata eine Testosteron-reprimierte Antwort (TRPM-2) induzieren und eine Testosteron-induzierte Antwort (Prostatein Untereinheit C3) reprimieren [Kelce et al., 1996]. Eine Forschungsgruppe in Dänemark berichtete vor einigen Jahren von der Etablierung eines Genexpressionsassay für östrogenregulierten Gene auf Basis von humanen Brustkarzinomzellen (MCF7) [Jørgensen et al., 1998, 2000; Kleda et al., 2000]. Bei der Untersuchung einer Reihe östrogenwirksamer Substanzen konnten genspezifische Unterschiede zwischen Östradiol-17 β , Zeranol und Diethylstilbestrol aufgezeigt werden [Leffers et al., 2001].

1.3 Androgene / Antiandrogene und ihre Wirkungsweise

Die Androgene stellen die klassischen männlichen Sexualhormone dar. Ihre „androgene“ Wirkung beruht auf der Stimulation spezifischer Stoffwechselfvorgänge

in den Zielorganen. Dazu gehört die Kehlkopfvergrößerung in der Pubertät, der Haarwuchs, die Ausbildung der männlichen Geschlechtsorgane wie Prostata, Hoden, Samenblasen usw., sowie die Steuerung der Spermienbildung [Voss, 1973]. Schon während der Schwangerschaft bewirken sie die Differenzierung des Sexualzentrums im Embryo. Die Androgene wurden auch in kleinen Konzentrationen im weiblichen Organismus gefunden. Androgene bilden dort ein Substrat für die Östrogensynthese und beeinflussen das Wachstum und die Aufrechterhaltung von preovulatorischen Follikeln sowie auch das epitheliale Wachstum im Uterus.

Zu den nicht sexualspezifischen Aufgaben von Androgenen zählen die Erhöhung der neuronalen Überlebensdauer [Nordeen et al., 1985], die Stimulation der Muskelzellenproliferation [Joubert et al., 1994] und die Regulation der Freisetzung von Somastostatin [Argente et al., 1990]. Die anabole Wirkkomponente der Androgene führt zu einem gesteigerten Proteinmetabolismus, wodurch Längen-, Nieren- und Muskelwachstum angeregt werden. Bei Anwesenheit von exogenen Antiandrogenen wird die Wirkung der endogenen Androgene inhibiert oder teilweise verhindert. Dies kann auf direktem Wege durch Antagonismus am Androgenrezeptor geschehen. Daneben kann aber auch indirekt der Metabolismus von Androgenen oder die Synthese von Androgenrezeptoren beeinflusst werden. In beiden Fällen tritt eine verminderte Konzentration oder Wirkung der endogenen Androgene im Zielgewebe auf.

Ihre hormonale Wirkung vermitteln Androgene, indem sie an spezifische Rezeptoren binden. Der humane Androgenrezeptor besteht aus einer Polypeptidkette mit 917 Aminosäuren [Lubhan et al., 1988; Tilly et al., 1989] und hat ein Molekulargewicht von 110 kDa. Die kodierte Sequenz ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und in 8 Exons unterteilt [Kuiper et al., 1997]. In Abwesenheit von Hormonen liegt der AR als Monomer im Zytoplasma vor. Nach der Bindung mit einem Liganden bildet sich unter

Abspaltung des „heat-shock-protein“ und anschließender Konformationsänderung ein aktiver Rezeptor-Effektor-Komplex [Veldscholte et al., 1992]. Es folgen Phosphorylierung [von Larr et al., 1991], Dimerisierung und Translokation in den Zellkern. Der Komplex bindet hiernach an den spezifischen Sequenzen des „hormone-responsive-element“ (HRE), was wiederum zur Induktion oder Repression der Expression der entsprechenden mRNA führt.

1.4 Beispiele für Androgene / Antiandrogene

Erst in neuerer Zeit wurde die androgene / antiandrogene Wirkung einiger Umweltchemikalien untersucht. Diese Stoffe wirken agonistisch bzw. antagonistisch auf den AR. Eine Studie von Bauer et al., [Bauer et al., 2002] zeigte, dass die Pestizide Fentinacetat, Difenoconazol und Tetramethrin eine relative Bindungsaffinität (RBA) zum AR aufweisen.

Fentinacetat

Fentinacetat (Triphenyltin – TPT) bzw. Triphenyltinacetate (TPTA; Abb.1a.) ist eine organische Zinnverbindung und war in der EU bis zum Jahr 2002 als nicht systematisches Fungizid zur Bekämpfung der Knollenfäule bei Kartoffeln und der Blattfleckenkrankheit bei Zuckerrüben zugelassen [Sattelberger, 2002]. Darüber hinaus werden Triphenylzinnverbindungen als Algizid und Molluskizid für Schiffsanstriche, in Holzschutzmitteln und als UV-Stabilisator in Kunststoffen verwendet. Gelangen diese Verbindungen in die Umwelt, so können sie aufgrund ihres lipophilen Charakters sehr leicht in Sedimenten oder Organismen akkumulieren, was besonders Meeres- und Süßwasserorganismen betrifft [Yamabe et al., 2000]. Das Umweltbundesamt in Berlin hat in einer 2001 veröffentlichten Untersuchung in limnischen Ökosystemen gezeigt, dass Dreikantmuscheln (*Dreissena polymorpha*) und Brasseln (*Abramis brama*) hohe TPT Gehalte aufwiesen

[Sattelberger, 2002]. Seit ein paar Jahren wird vermutet, dass Triphenylzinn als endokriner Disruptor für eine Reihe von sexuellen Fehlentwicklungen in Meeresorganismen verantwortlich ist [Yamabe et al., 2000; Schulte-Oehlmann et al., 2001]. Bei der japanischen Felsmuschel (*Thais clavigera*) einer Gastropodenart konnten bei einer TPT Konzentration von 1 ng/l bereits Imposex-Phänomene beobachtet werden, bei denen weibliche Tiere männliche Geschlechtsorgane entwickelten [Sekizewa, 1999]. Trotz eines Verbots für TPT-haltige Anti-fouling Mittel in Japan wurden 1992-1995 in einem Durchschnittswert aus 30 Messpunkten in japanischen Häfen und Flussmündungen noch Werte von 2.5-3.0 ng/l TPT ermittelt. In Schweizer Yachthäfen konnten 1988-1990 bis zu 191 ng/l Fentinacetat ermittelt werden [Sekizewa, 1999]. Für Larven der Dickkopf-Elritze (*Pimephales promelas*) wurde bei einer 30 Tage-Exposition ein reduziertes Wachstum bei 230 ng/l beobachtet [Jarvinen et al., 1988].

Fentinacetat besitzt eine relativ hohe Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor, die mit Hilfe eines rekombinanten AR-Konstruktes von Bauer et al. auf 1.42% bestimmt worden ist [Bauer et al., 2002].

Difenoconazol

Difenoconazol (Abb. 1b.) gehört zu der Gruppe der Triazole und ist ein weitläufig eingesetztes Blattfungizid im Anbau von Getreide, Zuckerrüben, Obst und Gemüse [Thom et al., 1997]. Die erlaubten Konzentrationen für den Gemüseanbau betragen 100 g/ha bei einer Wartezeit von 3 (Gurken) bis 35 (Spinat) Tagen [Keßler, 2004; Gemüse Infoservice, Syngenta, 2004]. Über eine mögliche endokrine Wirkung von Triazol-Fungiziden gibt es derzeit noch keine Studien. Ein Effekt scheint jedoch möglich, da die relative Bindungsaffinität von Difenoconazol zum rekombinanten AR im Vergleich zu DHT mit 0.011% noch im messbaren Bereich liegt [Bauer et al., 2002].

Tetramethrin

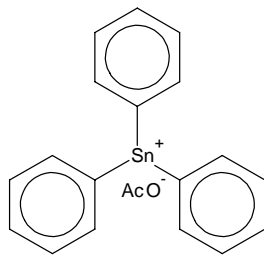
Tetramethrin (Abb. 1c.) ist ein Vertreter der Pyrethroid-Insektizide, die wegen ihrer geringen Toxizität für Säugetiere zu den meist verwendeten Insektiziden im Ackerbau, Forst, Garten und Heimgebrauch zählen. Neben Raumsprays gegen Insekten aller Art, finden sich Pyrethroid-Derivate auch in Präparaten zur Behandlung von Kopfläusen wieder [Heudorf et al., 2001; Go et al., 1999]. Die Firma Bayer gibt für sein Blattanex Fliegenspray eine Tetramethrin-Konzentration von 0.2% an [Bayer CropScience, 2004].

Pyrethroide sind strukturelle Analoga zu den Pyrethrinen, die aus der Chrysantheme (*Crysanthemum cinerariaefolium*) isoliert wurden, jedoch äußerst lichtinstabil sind. Pyrethroide dagegen sind hoch lipophile, photostabile und bioaktive Verbindungen [Go et al., 1999; Kim et al., 2004]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Pyrethroide neben einem Einfluss auf die Thyroid-Hormon-Regulation auch östrogenes und antiandrogenes Potential besitzen [Danzo, 1998; Go et al., 1999; Kim et al., 2004]. Eine Forschergruppe aus Japan hat die Samenqualität von berufsmäßigen Kammerjägern, die hauptsächlich mit Pyrethroiden in Kontakt kamen mit der einer Kontrollgruppe aus Studenten und Medizinerinnen, die in der Testzeit keinen Kontakt zu den Insektiziden hatten, verglichen und eine signifikant schlechtere Samenqualität bei der Testgruppe festgestellt. Da der Unterschied nur während der hauptsaisonalen Arbeit der Kammerjäger auftrat, schlossen sie, dass die beobachtete geringere Samenqualität der Sprayer mit der arbeitsmäßigen Pestizidbelastung zusammenhängt [Kamijima et al., 2004].

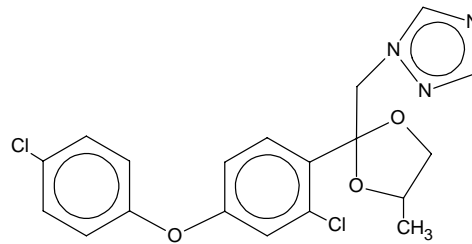
Im Vergleich zu der geringen Toxizität für Säugetiere, reagieren Fische bis zu 1000-mal empfindlicher auf Pyrethroide, was auf ihrem speziellen Pyrethroid-Metabolismus beruht. Dies führt zu einer erhöhten Anfälligkeit des piscinen Nervensystems gegenüber Pyrethroid-Insektiziden. Zugleich wurde auch bei Fischen ein endokrin

disruptives Potential von Pyrethroiden beobachtet, welches sich in einer verringerten Reproduktionsleistung äußerte [Moore et al., 2001]. Die relative Bindungsaffinität von Tetramethrin zum rekombinanten Androgen-Rezeptor wurde auf 0.0089% bestimmt [Bauer et al., 2002].

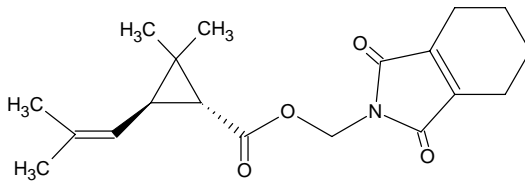
Abbildung 1: Strukturformel von Fentinacetat, Difenoconazol und Tetramethrin.



a) Fentinacetat



b) Difenoconazol



c) Tetramethrin

1.5 Androgen / Antiandrogen regulierte Gene

Eine Reihe androgenregulierter Gene (ARG) sind in der Prostata unterschiedlicher Spezies identifiziert [Linde et al., 2001] und charakterisiert worden und wurden in der vorliegenden Arbeit und den bisherigen Aktivitäten der Arbeitsgruppe verwendet; Prostata spezifisches Antigen (PSA) [Kitty et al., 1996], Prostata spezifisches Membran Antigen (PSM) [Israeli et al., 1994], homeobox gene NKX3.1 (NKX3.1) [He et al., 1997], Differentiation-related gene 1 (Drg1) [Urlix et al., 1999], Cyclin D₁, Transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) [Lin et al., 1999], Transmembrane prostate androgen-induced protein (PMEPA1) [Xu et al., 2000], AR und 5 α -Reduktase [Jenkins et al., 1991].

2. AUFGABENSTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Dissertation „Funktionelle Genexpressionsassays für androgen / antiandrogen wirksame Liganden“ war die Entwicklung eines Untersuchungssystems, mit dessen Hilfe das endokrin disruptive Potential von androgenen oder antiandrogenen Substanzen systematisch bestimmt werden kann. Es sollte ein System entworfen werden, dass die Kaskade der genspezifischen Reaktionen nach der Behandlung von (anti)androgen-wirksamen Xenobiotika mit ausgewählten Liganden erfasst. Hintergrund hierzu waren die Untersuchungen von Leffers et al. [Leffers et al., 2001], die bei einer Reihe östrogenen Substanzen genspezifische Unterschiede zwischen Östradiol-17 β , Zeranol und Diethylstilbestrol aufzeigen konnten, was auf dem unterschiedlichen Wirkungsmuster der Substanzen beruhte.

Zunächst mussten geeignete Zelllinien etabliert werden. Hierbei sollte zunächst auf eine Zelllinie mit attestierten Eigenschaften zurückgegriffen werden, um gezielt die Wirkung der ausgesuchten Liganden bei bekannter Androgensensitivität und sicher positivem Androgenrezeptor-Status untersuchen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu die humane Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1 [Sramkoski et al., 1999] ausgewählt, und zunächst die Charakterisierung der Zelllinie bezüglich der Steroidrezeptorexpression durchgeführt. Ziel war hier eine Zelllinie zu finden, die selektiv nur den AR exprimiert. Zusätzlich sollte ein zweites Zellmodell etabliert werden, das einem intakten *in-vivo* System nahe steht. Hierzu wurde eine Prostata-Primärzellkultur etabliert.

Nach abgeschlossener Etablierung der Zelllinien, sollten auf der Basis der vorhandenen wissenschaftlichen Literatur geeignete androgenabhängige Gene selektiert werden. Hierfür wurden zahlreiche Kriterien festgelegt. Die Funktionen der ausgewählten Gene sollten bekannt sein, sie sollten aber verschiedenen

Funktionskreisen angehören. Die Expression durch Androgene sollte hochsensitiv und dosisabhängig up- oder down-reguliert gesteuert werden können. Im Promotorbereich jeden Genes sollte das „Androgen-Response-Element“ (ARE) vorhanden, sowie die Intron/Exon-Übergänge bekannt sein.

Im weiteren sollte eine Auswahl von endogenen, synthetischen und umweltrelevanten Pestiziden erfolgen, sowie eine Festlegung von Dosen und Dauer der Exposition, basierend auf bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen. Die in vorangegangenen Projekten [Bauer et al., 2002] bereits eingesetzten Verbindungen Fentinacetat, Difenoconazol und Tetramethrin sollten hier eingehend charakterisiert und mit den natürlichen Steroiden Testosteron, Dihydrotestosteron (DHT) und 19-Nortestosteron sowie mit dem synthetischen Androgen Methyltrienolon (R1881) verglichen werden. Zusätzlich sollte auch der mögliche Einfluss von weiteren Steroidhormonen wie Östradiol-17 β , Progesteron und Cortisol auf die Expression der androgenregulierten Gene untersucht werden, um mögliche Kreuzreaktion mit dem AR auszuschließen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine systematische Untersuchung der Genexpressionsmuster nach der zeit- und konzentrationskinetischen Exposition der untersuchten Liganden erstellt werden.

Methodische Grundlage für die Quantifizierung der Expressionsmuster war die real-time RT-PCR Technik mittels LightCycler[®]. Die Standardisierung wurde durch Intra- und Interassy Variation für alle Primer abgesichert.

Besonderes Interesse lag auf dem qualitativen und quantitativen Vergleich der induzierten Expressionsmuster, um endogene Androgene und potentiell androgenwirksame Umweltkontaminanten anschließend in Bezug auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Regulation der Genexpression zu charakterisieren.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkulturen

3.1.1 Humane Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1

Die humane Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1 wurde aus einem humanen Karzinom nach Xenografttransplantation gewonnen [Sramkoski et al., 1999] und bezüglich des Steroid-Rezeptor-Status charakterisiert [Hartel et al., 2004 A].

Die 22RV1 Zellen wurden in Kulturflaschen (25 cm²) kultiviert. Für die Stimulationsversuche wurden unbeschichtete 12-Lochkulturplatten verwendet. Die Häufigkeit des Mediumwechsels richtete sich nach der ausgesäten Zellmenge sowie nach dem Verbrauch von Nährstoffen. Der Verbrauch an Glucose war am Farbumschlag von im Medium enthaltenen Phenolrot erkennbar.

Nachdem sich in der Kulturflasche ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, wurde die Kultur passagiert. Zunächst wurden die Zellen für 2 min mit PBS gespült. Nach Entfernen des PBS ließen sich die Zellen mit Hilfe einer 0.25% Trypsinlösung (1ml/Kulturflasche) vom Kulturboden ablösen. Die Effektivität der enzymatischen Wirkung erhöhte sich, in dem die Behandlung mit der Trypsinlösung für eine Minute im Brutschrank bei 37°C erfolgte. Danach musste die Lösung schnell abgesaugt werden, um eine schädigende Wirkung auf die Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden nun mit frischem Medium (2-3 ml) vom Kulturboden gespült. Von der entstandenen Zellsuspension wurden ca. 200-300 µl entnommen und zur Bestimmung der Zellzahl eingesetzt. Nach der Aussaat der Zellen wurden die Kulturgefäße 24h bis 48h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 24h vor der Behandlung wurden die Zellen in Medium mit fetalem Kälberserum (FCS), welches zuvor mit Dextran beschichteter Kohle gereinigt („gestrippt“) wurde, kultiviert.

3.1.2 Primäre, normale Schweine Prostata Epithelzellkultur (NPE)

Die Prostata stammten von kastrierten Schweinen im Alter ca. 6-7 Monate aus dem Schlachthof Grub. Die Präparation folgte mit einigen Modifikationen [Hartel et al., 2004] der publizierten Arbeitseinleitung [Classen-Linke et al., 1997]. Die Gewebeentnahme nach Schlachtung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die für die Zellkultur vorgesehenen Gewebeproben mussten sofort in Ringerlösung überführt werden, um die Vitalität der Zellen zu erhalten. Bei der Präparation verwendete Lösungen und Materialien waren steril. Nach erfolgter Präparation wurden Zellen oder auch kleine Zellhaufen in Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden über die ersten 6 Tage im Medium mit FCS kultiviert. Der Präparationstag entsprach dem Tag 0. Ab dem 6. Tag wurde dann zu Medium mit gestrippten FCS gewechselt.

Die Zählung der Zellen erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Hierbei wurden nur die lebenden Zellen am Ende der Präparation gezählt, um die richtige Konzentration der Zellsuspension für die Zellaussaat zu ermitteln. Dazu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Nach kurzer Zeit dringt Trypanblau in tote Zellen ein, da deren Membran durchlässig geworden ist und färbt diese blau. Dabei ist zu beachten, dass Trypanblau selbst zytotoxisch ist und bei langer Inkubation mit diesem Stoff die Zellen absterben. Die Zellzählung der lebenden Zellen wurde dreimal wiederholt.

3.2 Immunhistologische Methoden

In diesem Arbeitsschritt werden immunhistochemische Untersuchungen zur Charakterisierung des Steroid-Rezeptor-Status in 22RV1 Zelllinie und zur Differenzierung bezüglich der Morphologie der Primärzellkultur NPE beschrieben.

3.2.1 Nachweis der Steroidrezeptoren in 22RV1 Zellen

Der Nachweis von Gestagenrezeptor (GR), Östrogenrezeptor α (ER α) und Östrogenrezeptor β (ER β) an Zellkulturen mittels Immunhistochemie wird klassischerweise nach Methoden von Mervil et al. [Mervil et al., 1994] und Classen-Linke et al. [Classen-Linke et al., 1997] durchgeführt. Bei den Untersuchungen zur immunologischen Charakterisierung der 22RV1 Zellkultur wurde mit der Meerrettichperoxidase („HRP-Technik“) Technik gearbeitet [Hartel et al., 2004 A]. Dafür wurden folgende Reagenzien benötigt: Primärantikörper, Sekundärantikörper konjugiert mit HRP, sowie ein Farbstoff (DAB, 3,3-Diaminobenzidinehydrochlorid) zur Sichtbarmachung. Für die Charakterisierung der 22RV1 Zellen wurden GR, ER α und ER β Primärantikörper verwendet.

3.2.2 Differenzierung der NPE Zellen

Eine Aufgabe bei der Etablierung der Primärzellkultur bestand in der morphologischen Charakterisierung der Kultur. Mit Hilfe der Immunhistochemie ist es möglich, bestimmte Proteine einer Zelle, die für den morphologischen Aufbau typisch sind, nachzuweisen. Die Präparation der Epithelzellen für die Primärzellkultur [Hartel et al., 2004 B] erfolgte aus einem Gewebeverband verschiedener Zellarten heraus. Durch die Filtrationsschritte ließ sich der überwiegende Teil der Stroma- und Blutzellen entfernen. Der Filtrerrückstand enthielt allerdings immer noch einige unvollständig dissoziierte Zellaggregate, weswegen er nochmals mit Kollagenase A verdaut wurde. Bei der Präparation der Zellsuspension konnte davon ausgegangen werden, dass noch einige Stromazellen am Ende vorhanden waren. Da die Zellen im kultivierten Zustand nicht mehr eindeutig ihrem histologischen Ursprung zuzuordnen waren, war es schwierig, ohne Hilfsmittel die vorliegende Zellart zu bestimmen. Deshalb wurde die Immunhistologie zur Differenzierung von Epithel- und

Stromazellen herangezogen [Birkenfeld et al., 1988; Classen-Linke et al., 1997; Haining et al., 1996; Marshburn et al., 1992; Mervil et al., 1994, Hartel et al., 2004 B]. Bei der Differenzierung der primären Zellkultur wurden der Cytokeratin- und der Vimentin- Primärantikörper verwendet.

3.3 Western-Blot

Eine weitere Untersuchung der Expression von GR, ER α und ER β Rezeptoren auf der Proteinebene in 22RV1 Zellen wurde mittels Western-Blot Technik durchgeführt [Hartel et al., 2004 A].

3.4 Relative Bindungsaffinität, AR Assay

Die Konzentration von freien AR in 22RV1 Zellen und die relative Bindungsaffinitäten wurden nach dem bearbeiteten Protokoll von Bauer et al. [Bauer et al., 2002] bestimmt [Hartel et al., 2004 A].

3.5 Expositionsversuche

Anhand von Expositionsversuchen sollte der Einfluss von Fentinacetat, Difenoconazol und Tetramethrin sowie von dem synthetischem Steroidhormon R1881 und von den natürlichen Steroidhormonen DHT, 19-Nortestosteron, Testosteron, Progesteron, Cortisol und Östradiol-17 β auf die Expression von prostataspezifischen ARG in den beiden Zellkulturen untersucht werden. Die Stimulationen erfolgten in 12-Lochkulturplatten. Alle Stoffe wurden in 9 Konzentrationen eingesetzt. Es wurden um den Faktor 10 absteigende Konzentrationsreihen hergestellt (10^{-6} M bis 10^{-15} M). Die Substanzen wurden in Ethanol als Lösungsmittel aufgenommen. Die entsprechenden Stammlösungen wurden so hergestellt, dass nach Zugabe der Stammlösung zum Inkubationsmedium

das Medium 0.1% Ethanol enthielt (siehe Kapitel 4.3) [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 A; Hartel et al., 2004 B].

Nach der Aussaat mit einer Zelldichte von 1.5 bis 1.8×10^5 bei $500 \mu\text{l}$ Zellsuspension/Vertiefung wurde wie üblich in Medium mit gereinigtem FCS kultiviert. Es wurden vier Kontrollgruppen mitgeführt. Die Aussaat der Zellen in die 12-Lochkulturplatten erfolgte mit der gleichen Konzentration wie bei den NPE Zellen. Expositionsmedium war das RPMI – Medium mit gestrippten FCS. Die Ethanolkonzentration betrug auch hier 0.1%.

3.6 Real-time RT-PCR

Die Extraktion der Gesamt-RNA wurde mit peq-Gold TriFast™ durchgeführt, das auf der Guanidinium-Isocyanat-Methode basiert [Hartel et al., 2003]. Die RT-Reaktion wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Die Quantifizierung der cDNA erfolgte im LightCycler® unter Verwendung der LightCycler® DNA Master SYBR® Green I Technologie [Morrison et al., 1998] und den hochspezifischen und empfindlichen Primern [Hartel et al., 2003]. Die Analyse der Daten wurde mit REST® Quantifizierungs-Software durchgeführt [Pfaffl et al., 2002].

3.7 Sequenzierung

Die Primer-Sequenzen der H-Domäne des humanen Androgenrezeptor wurden entsprechend den Literaturdaten [Lubhan et al., 1989] von MWG (Deutschland) synthetisiert. Die Sequenzen waren: 5'-GAGGCCACCTCCTTGTC AACCCTG-3' (sense) und 5'-GGAACATGTTTCATGACAGACTGTACTA-3' (antisense). Die Produktlänge des PCR Produktes betrug 374 Basenpaare [Hartel et al., 2004 A]. Die Sequenzierung wurde kommerziell durch die Firma Medigenomix GmbH (Deutschland) durchgeführt.

4. RESULTATE

4.1 Zellkultur 22RV1

4.1.1 Morphologie und Wachstumsverhalten

Die 22RV1 Zelllinie wuchs in der Kulturflasche oder auf der Kulturplatte zu einem Monolayer. Dieser Monolayer war sehr homogen, die Zellen waren in ihrer Gestalt uniform. Da es sich um transformierte Zellen mit unbegrenzter Lebensdauer handelt war ihr Proliferationsverhalten durch eine exponentielle Zellvermehrung gekennzeichnet. Bei einer Aussaatkonzentration von 10.000 Zellen/cm² war nach etwa 6 Tagen die Kulturflasche oder Fläche vollständig mit Zellen bedeckt.

Nach Erreichen des konfluenten Zellrasens bildeten die 22RV1 Zellen übereinanderliegende Zellaggregate aus [Hartel et al., 2004 A]. Ebenfalls typisch für transformierte Zellen ist deren verringerte Adhäsionsfähigkeit, welche sich im leichten Ablösen des Zellrasens äußerte. Dies war ein wichtiger Unterschied im Vergleich zur Kultivierung der primären, normalen NPE Zellen. Die Teilungsrate der 22RV1 Zellen wird mit 49h angegeben [Sramkoski et al., 1999].

4.1.2 Steroid-Rezeptor-Status

Der Status des AR, ER α und ER β sowie aller drei Isoformen des Gestagenrezeptors in der 22RV1 Zelllinie wurden auf der mRNA- und Proteinebene analysiert. Die Rezeptoren Glukokortikoid α (GluR α) und Glukokortikoid β (GluR β) wurden nur auf der mRNA-Ebene untersucht.

4.1.2.1 Real-time RT-PCR

In der humanen Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1 konnte mittels real-time RT-PCR mRNA vom AR und GluR β detektiert werden [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 A]. Nicht nachweisbar war hingegen die mRNA von ER α und ER β , den drei

Isoformen des Gestagenrezeptor sowie von GluR α [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 A]. Die Intensität der AR mRNA Expression war um den Faktor 5 und damit signifikant höher als die Expression der GluR β mRNA [Hartel et al., 2004 A].

4.1.2.2 Western-Blot, AR Assay, Immunhistologie

Die Proteinexpression von ER α , ER β und GR wurde *in-vitro* mit monoklonalen Antikörpern mittels der Western-Blot Technik analysiert, die *in-vitro* Expression von AR-Protein mit dem Radiorezeptorassay. Western-Blot offenbarte die drei Isoformen von GR in der Positivkontrolle (Endometrium), in der 22RV1 Zelllinie konnte der GR nicht nachgewiesen werden [Hartel et al., 2004 A]. Die beobachteten Banden in den Endometriumproben mit den Größen 116, 92 und 65 kDa [Hartel et al., 2004 A] entsprachen den Gestagenrezeptor Isoformen A, B und C [Haluska et al., 2002].

Mit dem Antikörperagonist ER α konnte eine 60 kDa Bande in der Positivkontrolle (Endometrium) detektiert werden, nicht aber in der humanen Zelllinie 22RV1 [Hartel et al., 2004 A]. Mit Hilfe des Antikörperagonisten ER β waren Banden mit der Größe 62 und 58 kDa in der Positivkontrolle detektierbar, nicht aber in den untersuchten Proben [Hartel et al., 2004 A].

Mit der AR Assay Methode wurde die Androgenrezeptorproteinkonzentration in den 22RV1 Zellen zu 9.8 fmol/mg Protein ermittelt [Hartel et al., 2004 A].

Die oben beschriebenen Ergebnisse konnten immunhistologisch bestätigt werden. So konnte mit dem monoklonalen Antikörper MA1-410 in den Proben das GR-Protein nicht detektiert werden. Ebenso wurde für die Rezeptoren ER α , ER β eine negative immunhistologische Reaktion beobachtet.

4.1.3 Relative Bindungsaffinitäten

Die relative Bindungsaffinität des AR zu natürlichen Steroiden wurde bestimmt. Diese nahm in der Reihenfolge DHT > Testosteron > Östradiol-17 β > Progesteron ab. Die höchste relative Bindungsaffinität zum AR zeigte das Testosteron mit 35% im Vergleich zu 100% bei DHT. Die Bindungsaffinitäten bei den Hormonen Östradiol-17 β und Progesteron lagen bei deutlich geringeren relativen Bindungsaffinitäten, und zwar bei Östradiol-17 β bei 7.4% und bei Progesteron bei 3.6% im Vergleich zu 100% bei DHT [Hartel et al., 2004 A].

4.1.4 Sequenzierung

Die Ligandenbindedomäne des AR aus der humanen Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1 wurde im Exon H auf Mutationen untersucht. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine deutliche Bande zwischen der 300 bp und 400 bp Bande des 100 bp Markers erkennbar, welche dem 347 bp langen DNA-Fragment des Exons H entsprach. Der Sequenzvergleich mit der H-Domäne des hAR zeigte eine Mutation im Codon 874 von CAT, welches für Histidin codiert, zu TAT für Tyrosin [Hartel et al., 2004 A]. Im Exon H konnten keine weiteren Mutationen gefunden werden. Dies belegt, dass auch der AR der Zelllinie 22RV1 die für den Xenograften bei Tan et al. [Tan et al., 1997] beschriebene Mutation H874Y beinhaltet.

4.2 Zellkultur (NPE)

4.2.1 Morphologie und Wachstum

Die NPE Zellen werden nach der Präparation und Aussaat in den ersten 6 Tagen in Medium mit normalen FCS kultiviert. Diese Zeit benötigten die Epithelzellen, um sich auf der Kulturfläche anzuheften und um Zellinseln zu bilden. Es wuchs etwa 35% der

ausgesäten Zellmenge auf der Kunststoffoberfläche an. Die weitere Proliferation der Zellen konnte trotz eines Wechsel nach 6 Tagen auf FCS Medium, dass zuvor mit Dextran beschichteter Kohle gereinigt wurde, beobachtet werden. Die Zellinseln konfluieren und bildeten einen Zellrasen. Der Zellrasen war durch Heterogenität gekennzeichnet, die Zellen waren verschieden groß und unterschiedlich geformt. Oft bildeten die Zellen über relativ lange Entfernungen untereinander feine dünne zytoplasmatische Ausläufer aus, die wie Dendriten der Nervenzellen erschienen. Die Degeneration der Zellen hat bereits nach 20 Tagen eingesetzt. Die meisten Kulturen proliferierten etwa 3 bis 4 Wochen. Bevor sich eine Zelle ablöste, wurde sie kugelförmig, was die Haftung an der Kulturoberfläche reduzierte. Auffällig war, dass ein Teil der Zellen sich bereits nach der ersten Passage morphologisch veränderte und sich in ihrer Form der von langgestreckten Stromazellen annäherten. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach Einfrieren und Auftauen weiter kultiviert werden konnten, ohne dass dabei ein Einfluss auf die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zellen zu beobachten war.

Die Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen war die Etablierung einer Epithelzellkultur der Schweineprostata. Anfangs musste folglich geklärt werden, ob es sich nach der Präparation und Aussaat der Zellen bei dem erhaltenen Zellrasen um die gewünschte Epithelzellkultur handelte. Die intermediären Filamente Cytokeratin und Vimentin wurden hierzu immunhistochemisch gefärbt, um Epithel- von Stromazellen unterscheiden zu können und somit den Kontaminationsgrad mit Stromazellen bestimmen zu können. Die mit dem Cytokeratin-Antikörper nachgewiesenen Epithelzellen [Hartel et al., 2004 B] waren polymorph gestaltete, große, teilweise kuboidale Zellen, die typischerweise in Inseln zusammenwuchsen. Häufig hatten diese Inseln vor allem zu Beginn der Kulturzeit ein „Wirbelähnliches“ Aussehen. Mit dem Vimentin-Antikörper ließen sich Epithelzellen ebenfalls

nachweisen, aber, und dies ist das Entscheidende, auch all diejenigen Zellen, die um die Epithelzellinseln herum wuchsen, die Stromazellen. Die Stromazellen waren anfangs gut dissoziierte Einzellzellen von schmaler, länglicher Gestalt und sehr uniform [Hartel et al., 2004 B]. Im Zentrum der Kulturflasche siedelten sich die Epithelzellen an, zum Rand hin die Stromazellen. Der Anteil der unveränderten Epithelzellen überwog jedoch mit über 95% [Hartel et al., 2004]. In den späteren Passagen nahm der Anteil der mutierten Zellen stark zu, in Passage 4 waren fast ausschließlich mutierte Zellen zu sehen [Hartel et al., 2004 B; Kleinmann et al., 1983; Mervil et al., 1994]. Die Teilungsrate der NPE Zellen wurde zu 68h ermittelt [Hartel et al., 2004 B].

4.2.2 Steroid-Rezeptor-Status

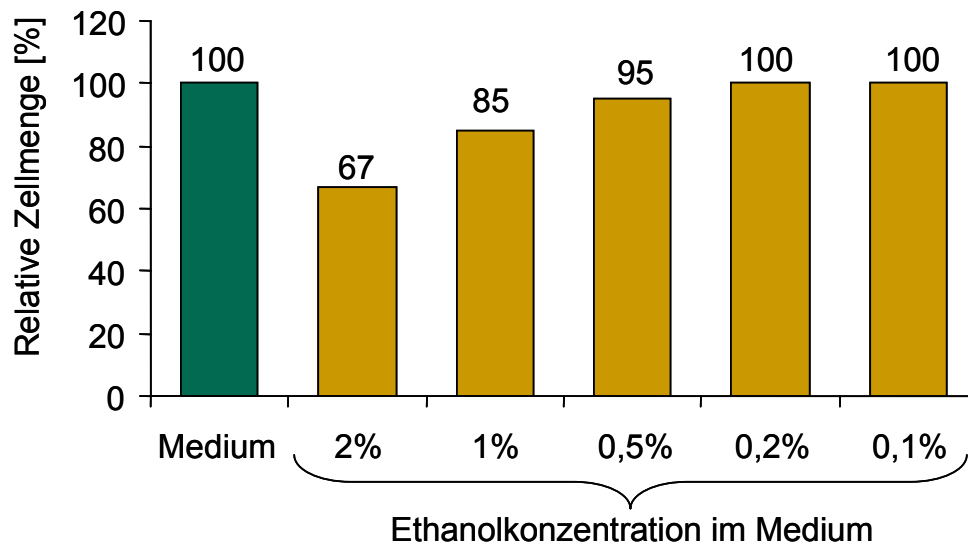
In der primären NPE Zelllinie konnte die mRNA aller Steroidhormonrezeptoren mit real-time RT-PCR Technik nachgewiesen werden.

4.3 Vergleich der Kultivierung mit und ohne Lösungsmittel

Bei den Expositionsuntersuchungen wurde die jeweils zu untersuchende Substanz in Form einer ethanolischen Lösung dem Medium hinzugefügt. Dabei wurden die Stammlösungen derart angesetzt, dass der Lösungsmittelanteil (Ethanol) im Medium bei 0.1% lag. In Vorversuchen wurde der Einfluss der Lösungsmittelkonzentration auf die Proliferation der 22RV1 Zellen untersucht. Dem Medium wurde dabei jeweils Ethanol in 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1% und 2% zugesetzt. Indizierte man die relative Zellzahl im Medium ohne Ethanol auf 100%, so erniedrigte sich die Zellmenge in den jeweiligen Experimenten nach Ethanolgabe wie folgt: Bei 2% Ethanol auf 67%, bei 1% Ethanol auf 84.7%, bei 0.5% Ethanol auf 95%, bei 0.2% Ethanol auf 100% und bei 0.1% auf 100.15%. Eine Ethanolkonzentration von 0.1% hat damit praktisch

keinen Einfluss auf die Zellrate (siehe Abb. 2.) [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 A; Hartel et al., 2004 B].

Abbildung 2: Vergleich der 22RV1-Zellkultivierung mit und ohne Ethanol



Aufbauend auf den Erkenntnissen vom Einfluss der Lösungsmittelkonzentration auf das Proliferationsverhalten der 22RV1 Zellen, wurde auch bei den Versuchen mit den primären NPE Zellen mit einem Ethanolgehalt von 0.1% gearbeitet [Hartel et al., 2004]. Um die Wirkung des Ethanols auf die Proliferation der primären Zellen zu ermitteln, wurde zusätzlich zum Kontrollansatz (Medium + 0.1% Ethanol ohne Testsubstanz) eine zweite Kontrolle mit nur in Medium kultivierten Zellen durchgeführt.

4.4 Ergebnisse der Expositionsuntersuchungen

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, einen Vergleich der Wirkung von natürlichen und synthetischen Androgenen sowie von ausgewählten Pestiziden auf die Genexpression der androgenabhängigen Gene in der 22RV1 und primären NPE

Zelllinie zu untersuchen. Ein Schwerpunkt war daher auch die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Wirkmuster.

Die Konzentration der Pestizide orientierte sich an den Werten von Bauer et al. [Bauer et al., 2002]. Bei den Steroidhormonen korrelierten die ausgewählten Konzentrationen mit dem Bereich der physiologischen Werte. Um eine umfassendere Aussage zu konzentrationsabhängigen Wirkungen zu machen, wurden auch hierzu jeweils niedrigere und höhere Konzentrationen getestet. Die Exposition der Zellen mit diesen Substanzen lag daher im Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-15} M [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 A].

Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte wie beschrieben mit der real-time RT-PCR Methode. Alle Primer bildeten hochspezifische PCR-Produkte, deren Länge mittels Gelelektrophorese ermittelt wurde. Es konnten nach 40 Zyklen keine Primerdimere in der real-time RT-PCR beobachtet werden. Zur Ermittlung der Präzision und Reproduzierbarkeit der real-time RT-PCR wurde die Intra- und Interassay Variation bestimmt (siehe Tab. 1.). Die designeten Primer sind auf humane und porcine Systeme abgestimmt. Es wurde eine Vierfachbestimmung pro Konzentration und Substanz und je Expositionszeit durchgeführt.

	NKX3.1	PMEPA1	TMPRSS2	Drg1	Cyclin D1	PSA	PSM	5α-Reduktase	AR	Ubiquitin
Start Template	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA
PCR Effizienz	1,90	1,92	1,98	1,98	1,98	2,07	2,13	2,13	1,99	1,99
Quantification limit [molecules]	19	13	42	9	33	21	18	35	22	12
Quantification range [molecules]	190-1.9 x 10 ⁹	130-1.3 x 10 ¹⁰	35-3.4 x 10 ¹⁰	9-9.4 x 10 ⁹	33-3.2 x 10 ¹⁰	21-2.1 x 10 ⁸	46-4.6 x 10 ⁹	35-3.5 x 10 ⁸	22-2.1 x 10 ⁸	12-1.1 x 10 ⁹
Test linearity correlation	22RV1 total RNA (r = 1.00)	22RV1 total RNA (r = 1.00)	22RV1 total RNA (r = 0.98)	22RV1 total RNA (r = 0.89)	22RV1 total RNA (r = 0.92)	22RV1 total RNA (r = 0.90)	22RV1 total RNA (r = 0.99)	22RV1 total RNA (r = 0.98)	22RV1 total RNA (r = 0.92)	22RV1 total RNA (r = 0.95)
Intra-assay variation (n = 3)	0.5 %	0.4%	1.0%	0.8 %	1.2 %	0.3%	0.8%	0.5 %	1.6%	0.7%
Inter-assay variation (n = 3)	4.4 %	3.5%	2.3%	3.7 %	2.9 %	2.6%	3.2%	4.0 %	4.9%	1.8%

Tabelle 1. Charakterisierung der real-time RT-PCR Produkte. Intra- (Testpräzision) und Interaassay Variation, n = 3. Die Kalkulation der Testpräzision und Testvariation basiert auf den Mittelwerten der "Crossing Points"(CP).

4.4.1 22RV1 Zelllinie

4.4.1.1 DHT, Testosteron und 19-Nortestosteron

Die Stimulation der 22RV1 Zellen mit 10nM DHT beeinflusste die Expression der androgenregulierten Gene PSA, PSM, AR, NKX3.1, TMPRSS2 und PMEPA1. Nach 6h zeigte sich eine up-Regulation der Gene PSM und PMEPA1 und eine deutliche down-Regulation der übrigen Gene, wobei der höchste Wert bei Homeobox NKX3.1 erreicht wurde (1.4-fach) [Hartel et al., 2004 A]. Nach einer Expositionszeit von 24h kam es zu einer Abnahme der jeweiligen up- und down-Regulation in Richtung Ausgangsniveau.

In der weiteren DHT-Studie wurde sowohl die Zeitkinetik (0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h) als auch die Konzentrationskinetik (10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} M) erweitert. Gleichzeitig wurde der Umfang der untersuchten Gene um 5 α -Reduktase, Drg1 und Cyclin D₁ vergrößert.

In allen drei Konzentrationsbereichen konnte bei DHT- und Testosteronstimulation ein ähnlicher Verlauf der Expressionsmuster bei 6h, 12h und 24h beobachtet werden. Mit Ausnahme des Genes NKX3.1, welches in den Zeiträumen 6h, 12h und 24h eine Repression zeigte, zeichneten sich alle anderen Gene durch eine up-Regulation aus. Erst nach 48h und 72h war ein Unterschied zwischen DHT und Testosteron aufgrund der Veränderung der Genexpression von TMPRSS2, NKX3.1 und PSM erkennbar, die nun down-reguliert wurden [Hartel et al., 2004 A].

Die Behandlung mit Testosteron nach 6h, 12h und 24h ergab ähnliche Ergebnisse wie bei der Behandlung mit DHT, nur nahm hier mit der fortschreitenden Zeit die Höhe der up-Regulation ab. Die höchste down-Regulation der mRNA von PMEPA1, TMPRSS2, NKX3.1 und PSM wurde nach 48h und 72 h beobachtet.

Exposition der 22RV1 Zellen mit 19-Nortestosteron führte bereits nach 12h zur einer down-Regulation der mRNA Expression. Diese Tendenz verstärkte sich nach 24h bei

der Mehrheit der untersuchten Gene. Die down-Regulation war nach 48h und 72h nicht mehr nachweisbar und es konnte im Gegenteil eine up-Regulation aller Gene beobachtet werden [Hartel et al., 2004 A].

4.4.1.2 R1881

Im Unterschied zu den natürlichen Androgenen konnte nach der Stimulation mit dem synthetischen Androgen R1881 (1nM) eine statistisch signifikante down-Regulation aller analysierten Gene beobachtet werden. Eine generelle Abnahme der Expression wurde hier erst nach 24h erreicht [Hartel et al., 2003].

4.4.1.3 Fentinacetat

Sowohl nach 6h wie auch nach 24h war ein vergleichbares Expressionsmuster nach der Behandlung mit dem 100 nM Fungizid Fentinacetat erkennbar. Ähnlich den Ergebnissen der Behandlung mit den Steroidhormonen DHT und Testosteron war eine deutliche down-Regulation des Genes NKX3.1 zu sehen [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 B].

4.4.1.4 Difenoconazol

Das Fungizid Difenoconazol beeinflusste die Expression der ARG folgendermassen: Nach 6h waren alle Gene ausser PSM down-reguliert, wobei PMEPA1 den höchsten Wert (2.1-fach) erreichte. Die Expression nach 24h zeigte ein anderes Muster. Die up-Regulation betraf nun auch das AR Gen, gleichzeitig konnte sich eine ausgeprägte down-Regulation bei NKX3.1 aufbauen [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 B].

4.4.1.5 Tetramethrin

Die Expression der ARG nach der Tetramethrin-Stimulation (100 nM) wurde nach 6h nicht wesentlich beeinflusst. Erst nach Ablauf von 24h konnte eine deutliche up-Regulation der Gene PSA und TMPRSS2 beobachtet werden [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 B].

4.4.1.6 Östradiol-17 β , Progesteron und Cortisol

Östradiol-17 β , Progesteron und Cortisol lieferten keine Expressionsmuster.

4.4.1.7 Ligandenvergleich (22RV1)

Werden den 22RV1 Zellen Fentinacetat, Difenconazol und Tetramethrin sowie natürliche bzw. synthetische Androgene zugesetzt, kann die Ausbildung von substanzspezifischen Expressionsmustern der ARG beobachtet werden [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 B]. Dieses Ergebnis überrascht nicht und steht in direkter Beziehung mit dem erwarteten aktivierenden Effekten auf die mRNA-Transkription durch endokrine Disruptoren. Die Expressionsmuster waren abhängig von der Substanz, Substanzklasse und der Expositionsdauer. Die substanzspezifischen Merkmale sind bei den untersuchten Pestiziden am stärksten ausgeprägt, trotz unterschiedlicher chemischer Strukturen. Bemerkenswert ist, dass die Stimulation mit Fentinacetat zu nahezu identischen Genexpressionsmustern bei beiden Untersuchungszeitpunkten führte. Bei Tetramethringabe war hingegen erst nach 24h Behandlung eine Expression zu beobachten. Das Pestizid Difenconazol führte überwiegend zu einer starken down-Regulation während der gesamten Zeitkinetik. Eine Differenzierung zwischen den natürlichen, potenten Androgenen DHT und Testosteron konnte erst mit steigender Zeitkinetik beobachtet werden, wobei sich eine deutliche down-Regulation der Gene PMEPA1, TMPRSS2, NKX3.1 und PSM ausbildete.

Bei 19-Nortestosteron kam es zu einer starken up-Regulation der mRNA der ARG hingegen erst zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich zwischen 48h und 72h [Hartel et al., 2004 A]. Bezüglich der Behandlung mit dem synthetischen Androgen R1881 lässt sich eine starke Ausbildung der down-Regulation aller Gene schon nach 6h beobachten, die sich aber nach 24h wieder dem Ausgangspunkt nähert.

Interessant zeigte sich der Expressionsverlauf von Homeobox NKX3.1, welcher bei allen untersuchten Substanzen mit der Ausnahme von 19-Nortestosteron down-reguliert wurde.

4.4.2 NPE Zelllinie

4.4.2.1 Testosteron

Die Titration von Testosteron ergab im wesentlichen eine up-Regulation für die drei Androgen-regulierten Gene AR, Drg1 und 5 α -Reduktase [Hartel et al., 2004 B]. Ausnahmen waren die down-Regulation des AR bei 10⁻⁸ M und der 5 α -Reduktase bei 10⁻⁷ M. Der negative Wert der relativen Expression von Drg1 bei 10⁻¹¹ M war aber nicht signifikant, weshalb der Effekt nicht weiter untersucht wurde. Die Effekte auf Cyclin D₁ zeigten bis auf eine leichte down-Regulation im Bereich <10⁻¹⁰ M keine Beeinflussung durch Testosteron-Stimulation.

4.4.2.2 Fentinacetat

Bei der Expression des AR sowie Drg1 war ein deutliches Genexpressionsmuster zu erkennen, das in weiten Teilen signifikant war. Fentinacetat induzierte eine 2 bis 5-fache up-Regulation des Androgenrezeptor im Bereich von 10⁻⁷-10⁻⁹ M und eine 2-fache up-Regulation von Drg1 bei 10⁻⁷-10⁻⁹ M (P=0.001) [Hartel et al., 2004 B]. Die Maxima der relativen Expression wurden in beiden Fällen bei 10⁻⁹ M (1nM) erreicht. Der Effekt der negativen relativen Expression bei den 10⁻⁶ M Proben könnte durch einen toxischen Einfluss des Pestizids auf die Zellen bei der hohen Konzentration von 1 μ M hervorgerufen worden sein.

4.4.2.3 Difenoconazol

Trotz eines sehr geringen Effektes durch Gabe von Difenoconazol, sind bei dem ARG AR sowie Drg1 Expressionsmuster zu erkennen. Bei beiden Genen ist zwischen 10⁻⁷ M und 10⁻⁸ M eine Abnahme der relativen Expression in den down-

regulierten Bereich zu verzeichnen, welche bei 10^{-9} M ins positive wechselt [Hartel et al., 2004 B]. Anschließend fällt die relative Expression wieder ab, bis sie bei 10^{-12} M gegen null tendiert.

4.4.2.4 Tetramethrin

Die Titration von Tetramethrin ergab zwei hochsignifikante Genexpressionsmuster im negativen relativen Expressionsbereich im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine maximale 3-fache down-Regulation von AR (10^{-7} M) und 3-fache maximale down-Regulation von Drg1 jeweils bei 10^{-9} M wurde erreicht [Hartel et al., 2004 B].

4.4.2.5 Östradiol-17 β , Progesteron und Cortisol

Die Stimulationen mit Cortisol, Progesteron und Östradiol-17 β zeigten keine Effekte bezüglich der Expression der ARG.

4.4.2.6 Ligandenvergleich (NPE)

Die Stimulationen mit Testosteron und Fentinacetat ergaben bis auf wenige Ausnahmen eine up-Regulation des AR über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-13} M (Testosteron) bzw. 10^{-6} - 10^{-12} M (Fentinacetat). Difenonazol zeigte ein charakteristisches Expressionsmuster, jedoch ohne große Signifikanz.

Die Expression von Drg1 wurde durch Testosteron und Fentinacetat im wesentlichen hochreguliert, wohingegen Tetramethrin einen gegenläufigen Effekt ausübte. Difenonazol lieferte keine signifikante Veränderung der Expressionsmuster.

4.4.3 Zusammenstellung der Expositionsversuche

4.4.3.1 22RV1

Es konnte gezeigt werden, dass der funktionelle Genexpressionsassay, basierend auf der humanen Karzinom Zelllinie, für eine sensitive Unterscheidung natürlicher

und synthetischer Androgene sowie für eine Differenzierung der drei untersuchten Pestizide einsetzbar ist (siehe auch Abb. 3 und 4).

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

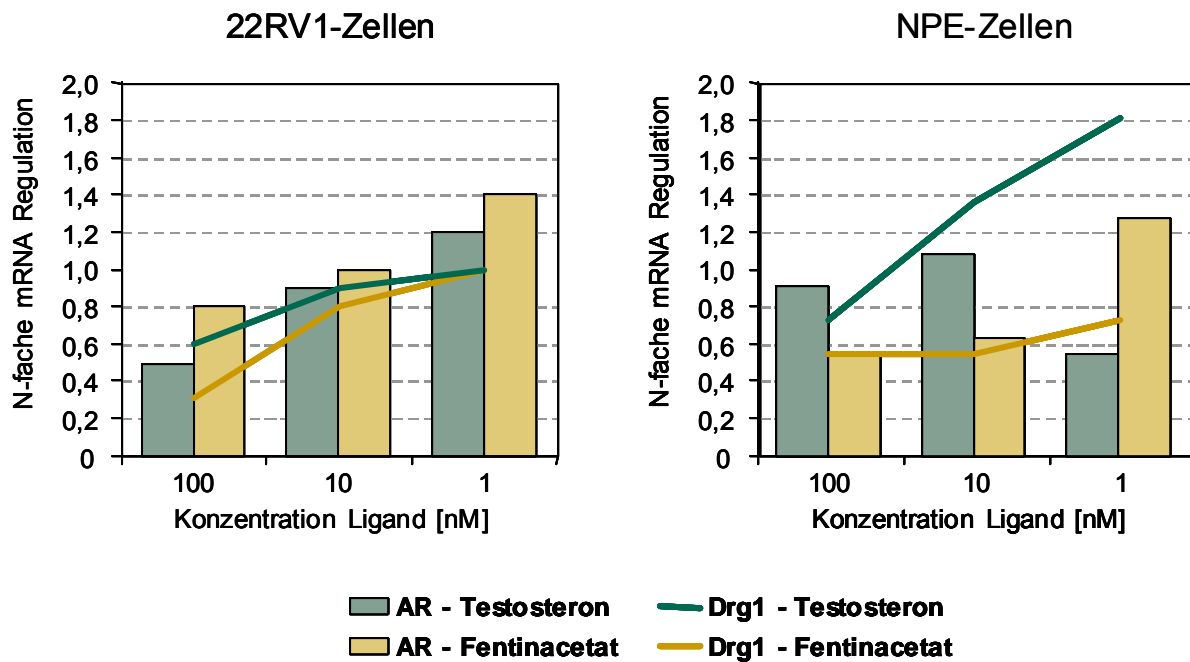
- Selektive Charakterisierung der natürlichen Androgene DHT, Testosteron, 19-Nortestosteron und des synthetischen Androgens R1881
- Selektive Charakterisierung der Pestizide Fentinacetat, Difenconazol und Tetramethrin unter der Einbeziehung der Genexpressionsmuster aller 9 untersuchten Gene (Abb. 3)
- Ähnlicher schematischer Verlauf der Expressionsmuster von Testosteron und Fentinacetat bei ausschließlicher Analyse der Expressionsmuster von AR und Drg1 (Abb. 4)

Abbildung 3: Einfluss verschiedener Liganden auf Genexpression von 22RV1 Zellen nach 2-stündiger Behandlung

Gene	Liganden						
	Testosteron	19-Nor-testosteron	DHT	R1881	Fentin-acetat	Difeno-conazol	Tetramethrin
PSA	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green
PSM	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red
AR	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Red
Drg1	Green	Green	Green	Red	Green	Red	Red
NKX3.1	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red
PMEPA1	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green
TMPRSS2	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Green
5 α Red	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Green
Cyclin D ₁	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red

■ Hochregulierung der Genexpression
■ Runterregulierung der Genexpression

Abbildung 4: Expressionsmuster von AR & Drg1 bei Testosteron und Fentinacetat



4.4.3.2 NPE

Das funktionelle Testsystem basierend auf der primären NPE Zelllinie ermöglicht folgende Schlussfolgerungen (siehe auch Abb. 4, 5 und 6):

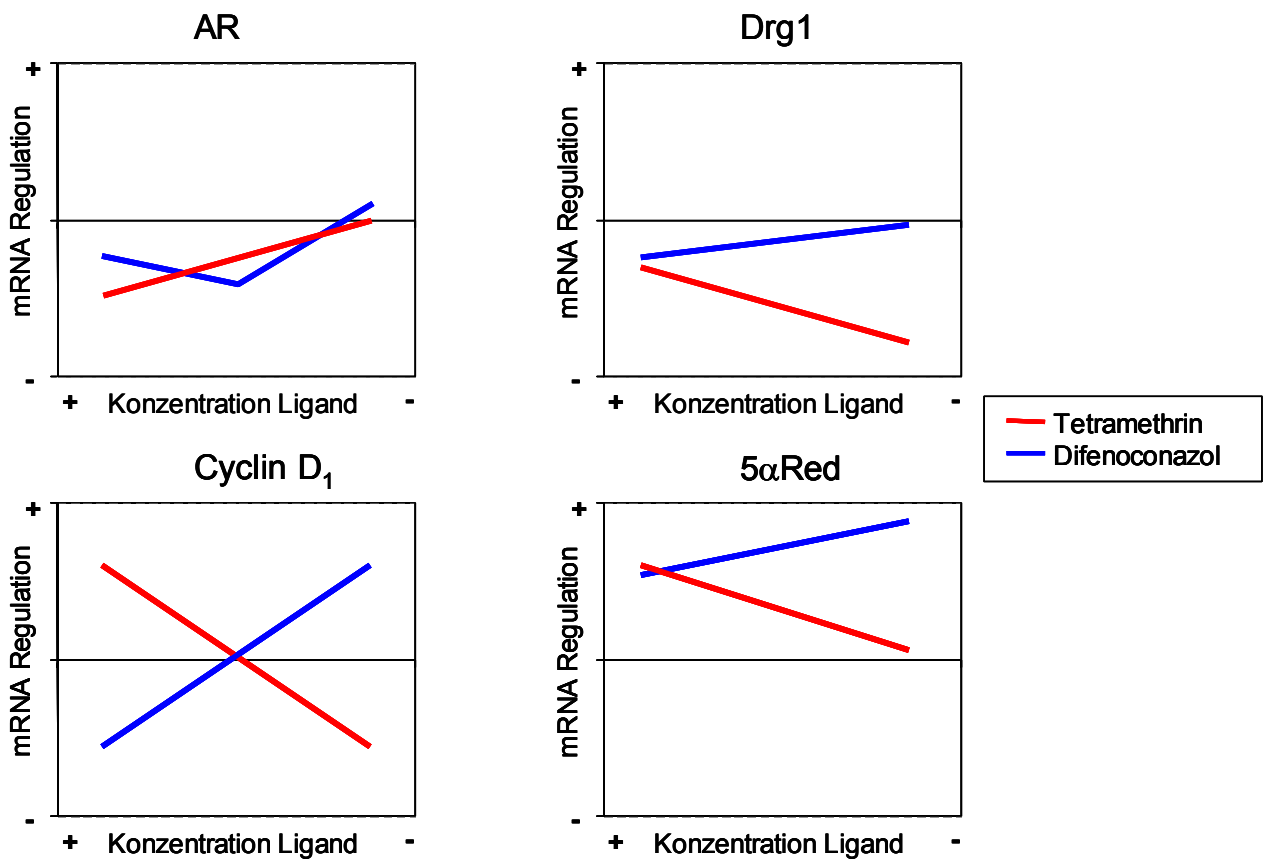
- Selektive Charakterisierung der Pestizide Difenoconazol und Tetramethrin durch Genexpressionsanalyse von Drg1, 5 α -Reduktase, Cyclin D₁ und AR
- Bestätigung einer androgen-disruptiven Wirkung von Fentinacetat aufgrund eines vergleichbaren Genexpressionsmuster mit Testosteron (Abb. 4)

Abbildung 5: Einfluss verschiedener Liganden auf Genexpression von NPE Zellen nach 2-stündiger Behandlung

Gene	Liganden			
	Testosteron	Fentin-acetat	Difenoconazol	Tetramethrin
AR				
Drg1				
5 α Red				
Cyclin D1				

■ Hochregulierung der Genexpression
■ Runterregulierung der Genexpression

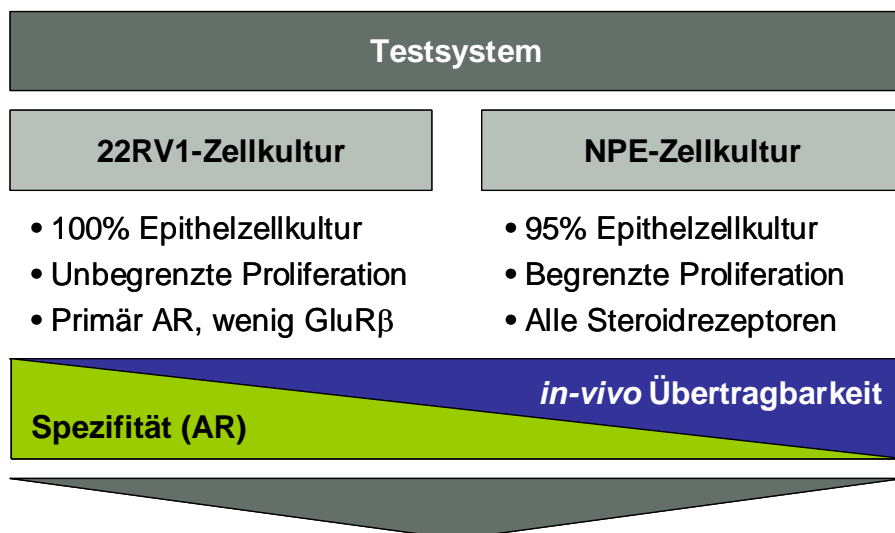
Abbildung 6: Schematischer konzentrationsabhängiger Verlauf der Genexpression verschiedener Gene bei NPE-Zellen nach 4-stündiger Behandlung



5. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Dissertation „Funktionelle Genexpressionsassays für androgen / antiandrogen wirksame Liganden“ war die Entwicklung eines Untersuchungssystems, mit dessen Hilfe das endokrin disruptive Potential von androgenen oder antiandrogenen Substanzen systematisch bestimmt werden kann. Es sollte ein System entworfen werden, dass die Kaskade der genspezifischen Reaktionen nach der Behandlung von (anti)androgen-wirksamen Xenobiotika mit ausgewählten Liganden erfasst. Hierzu sollte sowohl ein geeignetes Zellkultursystem als auch ein funktioneller Genexpressionsassay etabliert werden, um die Wirkung der untersuchten Liganden auf die Expressionsmuster androgenregulierter Gene zu bestimmen. Die ausgewählten Pestizide zeigten in vorangegangenen Untersuchungen eine messbare relative Bindungsaffinität an den rekombinanten Androgenrezeptor [Bauer et al., 2002].

Abbildung 7: Zusammenfassung beider Testsysteme



**Funktioneller Genexpressionsassay zur selektiven
Charakterisierung androgen / antiandrogen wirksamer Liganden**

In hier vorgestellten Zellkulturmodellen konnte gezeigt werden, dass die Liganden messbare Effekte auf die Expression des ARG auslösen und damit eine selektive Charakterisierung der untersuchten Substanzen aufgrund der Genexpressionsmuster ermöglichen [Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 A; Hartel et al., 2004 B]. Die Zellkultursysteme von NPE und 22RV1 sind ein gut zu handhabendes Werkzeug zur Untersuchung von endokrinen Disruptoren mit einem androgenen Potential sowie zur Differenzierung zwischen natürlichen und synthetischen Androgenen (Abb.7).

5.1 Rational für Testsystem

Umweltrelevante Androgene umfassen eine Vielzahl verschiedener Substanzen [Daxenberger, 2002] mit unterschiedlichsten chemischen Strukturen. Die Ableitung der androgenen Wirksamkeit einer Substanz allein von der Struktur ist daher in der Regel nicht möglich. Für eine systematische Untersuchung auf potentiell androgene Wirksamkeit machten wir uns daher die spezifische Wechselwirkung entsprechender Substanzen mit dem Androgenrezeptor zunutze. Dieser spezifische Effekt auf die Expression „endogener“ Gene wurde in bisher beschriebenen Testsystemen nicht explizit berücksichtigt. Es existieren zwar *in-vivo* Testsysteme [Shelby et al., 1996; O'Connor et al., 1999; Reel et al., 1996; Laskey et al., 1993], die komplexe phänotypische Veränderungen erfassen. Dies beruht auf dem Zusammenspiel verschiedenster Zelltypen, die häufig unterschiedlich sensitiv auf Androgene reagieren. Unterschiedliche Sensitivitäten innerhalb der Tierstämme, der Organe und Entwicklungsstadien sowie individuelle Ausprägungen führen zu einer weiteren Erhöhung der Komplexität in diesen Systemen. Auch aufgrund ethischer Beweggründe ist es daher anzustreben, *in-vivo* Tests durch *in-vitro* Systeme zu ersetzen. Neben den Rezeptorbindungsstudien haben sich auf diesem Gebiet Zellproliferationsassays [Poulin et al., 1991; Hackenberg et al., 1993; Bentel et al.,

1999; Yuan et al., 1993; Szelei et al., 1997] und Reportergenassays [Leffers et al., 2001] etabliert. Letztere [Fuhrmann et al., 1992; Vinggaard et al., 1999, Vinggaard et al., 2000; Terouanne et al., 2000] haben gegenüber den reinen Rezeptorbindungsstudien [Bauer et al., 1998] den Vorteil, über die Rezeptorbindung hinaus die Eigenschaft der Rezeptoren als Transkriptionsfaktoren zu erfassen. Diese Testsysteme basieren jedoch stets auf der Aktivierung einzelner artifizierender Genkonstrukte, die nicht geeignet sind, androgeninduzierte Veränderungen der Expression androgen-regulierter Gene in ihrer Komplexität wiederzuspiegeln. Zellproliferationsassays hingegen kommen den *in-vivo* Zuständen zwar am nächsten, doch sind hier viele Effekte komplexer indirekter Natur. *In-vitro* Genexpressionsassays in Zellkulturen hingegen lassen eine differenzierte Aussage über die Wirkungsweise von Androgenen innerhalb der von ihnen *in-vivo* ausgelösten Signalkaskade zu.

In dieser Arbeit wurde eine Zelllinie ausgewählt, mit der gezielt die Wirkung von Pestiziden bei bekanntem Androgenrezeptorstatus untersucht werden kann. Dafür bot sich die humane Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1 an, die laut dem Hersteller den Androgenrezeptor stabil und selektiv exprimieren soll [Sramkoski et al., 1999, Hartel et al., 2003; Hartel et al., 2004 A]. Es handelt sich hierbei um eine transformierte "Tumorzelle" mit unbegrenztem Wachstum, also ein System, das in dieser Hinsicht nicht die natürlichen physiologischen Eigenschaften widerspiegelt. Zusätzlich wurde erfolgreich ein zweites Zellmodell etabliert, das einem intakten *in-vivo* System näher kommt. Hierzu wurde eine Prostata-Primärzellkultur etabliert [Hartel et al., 2004 B]. Diese war meist heterogen, verfügte aber über gewebespezifische Enzymaktivitäten [Wobus et al., 1997], die den *in-vivo* Bedingungen entsprechen. Die ständige Kontamination von androgenrezeptorhaltigen Geweben mit Gestagen-, Östrogen- und

Glukokortikoidrezeptoren [Sauerwein et al., 1995; Sauerwein et al., 1989; Adams et al., 2002; Adesanya-Famuyiwa et al., 1999] stellt ein typisches Problem bei der Auswahl einer geeigneten Zelllinie dar. Es wurde daher eine Prostata Zelllinie ausgewählt, da dieses Gewebe die höchste Akkumulation an Androgenrezeptorprotein aufweist [Blondeau et al., 1982]. Ein weiterer Nachteil einer Primärzellkultur ist, dass die Zellen wegen der kurzen Lebensdauer nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen und nur die bei der Präparation gewonnenen Zellen verwendet werden können. Somit ist auch die Anzahl der Untersuchungen mit einer Kultur begrenzt.

5.2 Etablierung der primären NPE Zellkultur

Bei der Etablierung der Primärzellen [Hartel et al., 2004 B] der porcinen Prostata wurde teilweise auf die Erfahrungen der Arbeitsgruppe Classen-Linke et al. [Classen-Linke et al., 1997] zurückgegriffen. Die Wahl der Kulturbedingungen wurde durch die Vorversuche mit Fentinacetat, Difenoconazol und Tetramethrin bestimmt. Diese Stoffe sind als Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung [Fisher, 2004; Sattelberger, 2002; Yamabe et al., 2000; Sekizawa et al., 1999; Jarvinen et al., 1988; Thom et al., 1997; Heudorf et al., 2001, Moore et al., 2001] bekannt. Demzufolge waren sowohl toxische Effekte als auch der Hormonwirkung ähnliche Phänomene bei der Verwendung im Zellkulturmodell zu erwarten.

Um bei der Untersuchung dieser Wirkungen andere Einflussgrößen weitestgehend zu minimieren, wurde bei den Kulturen nach der Anwachsphase nur fetales Kälberserum verwendet, dass zuvor mit Dextran beschichteter Kohle behandelt wurde. FCS enthält wie alle Seren eine Vielzahl von Inhaltsstoffen zu denen auch Hormone und Wachstumsfaktoren gehören. Die genaue inhaltliche Zusammensetzung sowie die Mengenverteilung der einzelnen Substanzen

unterliegen der individuellen Variationsbreite und sind nur bedingt durch den Hersteller beeinflussbar [Lindl et al., 1994]. Ein weiterer negativer Effekt des Serums ist, dass es das unerwünschte Wachstum von Stromazellen in der Primärkultur begünstigt [Lindl et al., 1994; Mervil et al., 1994]. In serumfreien Kulturen wird die Stromazellenproliferation hingegen unterdrückt [Casslen et al., 1991]. Durch die beschriebene Verwendung von „gestripptem FCS“ waren zwar in der Primärzellkultur immer noch ein geringer Anteil an Stromazellen erkennbar [Harte et al., 2004], es kam in den ersten Passagen jedoch nicht zu einem „Überwachsen“ der Epithelzellen durch die Stromazellen.

Eine Aufgabe bei der Etablierung der Primärzellkultur bestand in der strukturellen Charakterisierung der Kultur. Hierzu wurde auf die Immunhistologie zurückgegriffen. Diese ermöglicht es, bestimmte Proteine einer Zelle, die für den morphologischen Aufbau typisch sind, nachzuweisen. Mit Hilfe des Cytokeratin- und Vimentin-Antikörpers konnte nachgewiesen werden, dass es sich nach der beschriebenen Präparation der primären NPE Zelllinie nicht um eine reine Epithelzellkultur handelte, sondern um eine Epithelzellkultur mit einem 5%-igen Anteil von Stromazellen [Hartel et al., 2004 B]. Diese Form der Mischkultur hat den Vorteil, dass die Kultur den *in-vivo* Bedingungen stärker ähnelt als eine Monokultur von Epithelzellen. Die wenigen Stromazellen behinderten das Wachstum der Epithelzellen nicht. Hinsichtlich der Morphologie der Zellen in Kultur konnten die Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden. Es wird von wirbelartigen Ansammlungen der mehr rundlichen Epithelzellen [Birkenfeld et al., 1988; Marshburn et al., 1992] mit Ausprägung von zytoplasmatischen Ausläufern sowie von elongierten Stromazellen [Matthews et al., 1992; Mervil et al., 1994] berichtet. Damit war der erste Schritt dieses Projektes erreicht und die Voraussetzungen für die Durchführung der Stimulationsuntersuchungen geschaffen.

5.3 Steroid-Rezeptor-Status

Um gezielt die Wirkung der analysierten Substanzen auf den Androgenrezeptor zu charakterisieren, wurde ein Zellmodell benötigt, das sowohl einem *in-vivo* System möglichst nahe kommt, als auch einen definierten Androgenrezeptorstatus besitzt. Bislang ist mit diesen geforderten Eigenschaften nur die humane Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1 bekannt. Detaillierte Angaben zu dem Steroid-Rezeptor-Status in den 22RV1 Zellen waren in der gängigen Literatur allerdings nicht vorhanden. Deshalb wurden sie im Rahmen dieser Arbeit auf der mRNA- (RT-PCR) und Proteinebene (Western-Blot, Immunhistologie) zunächst untersucht.

Der Nachweis der Steroidrezeptoren an Primärzellkulturen mittels real-time RT-PCR führten erstmals Pfaffl et al. [Pfaffl et al., 2002; Pfaffl et al., 2003] durch. In den hier verwendeten 22RV1 Zellkultur konnten $ER\alpha$, $ER\beta$, und GR auf der mRNA- und Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Der Glukokortikoidrezeptor α war auf der mRNA-Ebene ebenfalls nicht nachweisbar [Hartel et al., 2004 A]. Damit konnte die Möglichkeit der Aktivierung dieser Gene durch die untersuchten Liganden ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu bisherigen Befunden im Gewebe [Adams et al., 2002; Adesanya-Famuyiwa et al., 1999; Sauerwein et al., 1998] und anderen Zelllinien [Poulin et al., 1991; Hackenberg, 1993], die alle Steroidrezeptoren in unterschiedlichen Konzentrationen aufweisen, kann man hier von einer selektiven Expression des AR sprechen.

Eine Wechselwirkung des $GluR\beta$ mit den untersuchten Liganden konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, da dieser ebenfalls in geringen Konzentrationen nachweisbar war. Eine Aktivierung mit Hydrocortison übte aber keine messbaren Effekte aus; das AR Transkript war fünf mal stärker exprimiert als das des $GluR\beta$ [Hartel et al., 2004 A]. In der primären Zellkultur NPE konnten mit der real-time RT-PCR Technik alle Steroidrezeptoren nachgewiesen werden.

Die Anwesenheit des AR wurde neben der real-time RT-PCR Methode zusätzlich auch quantitativ mit dem radioaktiven AR-Assay ermittelt. Die zytosolische Konzentration an dem funktionellen AR in der humanen Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1 wurde mit 10 fmol AR/mg Protein ermittelt [Hartel et al., 2004 A]. Bei der Extraktion aus intaktem, bovinem Gewebe konnten in der Skelettmuskulatur (m. trapezius) bis zu 2 fmol AR/mg Protein [Sauerwein et al., 1989], in der bovinen Prostata bis zu 52 fmol AR/mg Protein isoliert werden, die aber häufig mit anderen Steroidrezeptoren kontaminiert sind. Bei der rekombinanten Herstellung von humanem AR (hAR) wurde von der Gewinnung von bis zu 150 fmol AR/mg Protein berichtet [Bauer et al., 2000]. Die Brustkrebszelllinie MFM-223 [Hackenberg et al., 1993] produziert bis zu 160 fmol AR/mg Protein in Gegenwart von anderen Hormonrezeptoren ($ER\alpha$, $ER\beta$, GR, $GluR\alpha$ und $GluR\beta$) (ca. 20 fmol Hormonrezeptoren/mg Protein). Eine weitere Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 [Bentel et al., 1999] exprimiert zwar über 100 fmol AR/mg Protein, ist aber wegen der komplizierten und aufwendigen Kultivierungsbedingungen für einen Genexpressionsassay nicht einsetzbar. Als Fazit lässt sich festhalten, dass die 22RV1 Zelllinie den funktionellen AR zwar nur in geringen Mengen exprimiert, dafür allerdings hochselektiv, weswegen sie für den beschriebenen Genexpressionassay hervorragend geeignet ist. Die Kultivierung der Zellen ist ein weiterer Vorteil, sie ist in der Regel relativ unkompliziert.

5.4 Wild- und Mutagentyp AR

Die Zelllinie 22RV1 ist aus dem Maus-Xenograft CWR22 hervorgegangen, für den eine Mutation in der Liganden-Bindungsdomäne (Exon H) bekannt ist, die einen Wechsel im Codon 874 von Histidin zu Tyrosin bewirkt [Tan et al., 1997]. In einem von Tan et al. entwickelten rekombinanten Expressionsassay wurde für den aus dem

Xenograft gewonnenen Androgenrezeptor eine verminderte Ligandenspezifität [Tan et al., 1997] ermittelt. Östradiol-17 β und Progesteron zeigten eine stärkere Induktion der transkriptionalen Reaktion mit dem mutanten AR H874Y als mit dem wilden AR Typ. Eine aktuelle *in-vivo* Studie mit dem CWR22 Xenograft konnte das Ergebnis jedoch nicht bestätigen [Shao et al., 2003]. Die Sequenzierung des Androgenrezeptors aus der Zelllinie 22RV1 sollte diesen Sachverhalt im Hinblick auf bereits vorliegende Expressionsdaten überprüfen. Der Sequenzvergleich der H-Domäne vom Wild-Typ des humanen Androgenrezeptor mit der H-Domäne des humanen Androgenrezeptor der Zelllinie 22RV1, zeigte die Mutation im Codon 874 von CAT, welches für Histidin codiert, zu TAT für Tyrosin. Im Exon H konnte keine weitere Mutation gefunden werden [Hartel et al., 2004 A].

In einer weiteren Studie wurde die relative Bindungsaffinität (RBA) des mutanten Androgenrezeptors zur den natürlichen Steroid-Liganden bestimmt. Diese nahm in der Reihenfolge DHT > Testosteron > Östradiol-17 β > Progesteron ab. Die höchste relative Bindungsaffinität zum AR zeigte das Testosteron mit 35% im Vergleich zu 100% bei DHT. Die Bindungsaffinitäten bei den Hormonen Östradiol-17 β und Progesteron lagen bei deutlich geringeren relativen Bindungsaffinitäten, und zwar bei Östradiol-17 β bei 7.4% und bei Progesteron bei 3.6% [Hartel et al., 2004 A]. Die Untersuchungen von Bauer et al. [Bauer et al., 2000] zur relativen Bindungsaffinität des rekombinanten humanen Androgenrezeptor-Wildtyp lagen im vergleichbaren Bereich. Die höchste RBA zeigte das Testosteron mit 31% im Vergleich zu 100% bei DHT; Östradiol-17 β lag bei 4.9% und das Progesteron bei 3.8% der RBA. Einen ähnlichen Verlauf der RBA beim AR wird bei Scipoo et al. [Scipoo et al., 2002] berichtet. Somit konnte gezeigt werden, dass der mutierte AR der humanen Karzinom Zelllinie 22RV1 seine Ligandenspezifität beibehalten hat [Hartel et al., 2004 A]. Dies ist ein weiteres wichtiges Argument für die hervorragende Eignung der

22RV1 Zelllinie für Expressionsassays zur Untersuchung von potentiellen androgenen Disruptoren. Die ähnlichen Ergebnisse bei den Zellsysteme NPE und 22RV1 für die Stimulation mit Fentinacetat und Testosteron bestätigen dies.

5.5 Expositionsversuche

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung der (anti)androgen-wirksamen Xenobiotika Fentinacetat, Difenconazol und Tetramethrin auf die Genexpression androgenregulierter Gene einer humanen Karzinomepithelzellkultur und einer porcinen Epithelzellkultur der Prostata untersucht. Die Verwendung eines organischen Agens zur Auflösung der wasserunlöslichen Testsubstanzen war hierbei unumgänglich. Hierfür kam Ethanol zur Anwendung. Der zu Beginn verwendete Anteil von 2% im Medium hatte eine hohe Toxizität und führte zu einer drastischen Reduzierung der Zellmenge um 33%. Der negative Effekt verringerte sich in den Maße, wie die Alkoholkonzentration im Medium reduziert wurde (siehe auch Abb. 2). Obwohl schon 0.2% Ethanol keinen negativen Einfluss mehr auf die Vitalität der Zellen hatte, erwies sich eine Konzentration von 0.1% Ethanol im Medium als optimal. Dieser Anteil lag auch im Bereich der in der Literatur verwendeten Konzentrationen [Kleinmann et al., 1983]. Der Lösungsmiteleinfluss wurde im Anschluss auch an der verwendeten primären NPE Zellen überprüft. Hier konnte das gleiche Verhalten gegenüber Ethanol festgestellt werden wie bei den 22RV1 Zellen. Die Stimulation der 22RV1 Zelllinie mit den natürlichen Androgenen DHT und Testosteron lieferte bei den getesteten Zeitpunkten 6h, 12h, 24h einen ähnlichen Verlauf der Genexpressionsmuster [Hartel et al., 2004 A]. Eine Differenzierung zwischen den beiden Hormonen war erst nach 48h und 72h unter der Berücksichtigung der Gene PSM, NKX3.1, TMPRSS2 und PMEPA1 erfolgreich. Die ausgeprägte down-Regulation von dem auf der Oberfläche lokalisierten PSM Gen

nach 48h könnte eine anfängliche Schutzreaktion der Zelle darstellen und dem Erhalt und der Proliferation des Prostatakarzinomgewebes dienen. Die Genexpression von TMPRSS2 und NKX3.1 wurde in den ersten 24h nur minimal reguliert. Bei längeren Expositionszeiten von 48h und 72h geht sie in eine starke down-Regulation über, was eine hemmende Reaktion der Zelle auf toxische Prozesse sein kann, bei denen die beiden Gene eine Rolle spielen. Das dritte natürliche Androgen, 19-Nortestosteron, bewirkte eine up-Regulation aller Gene bereits nach 6-stündiger Behandlung. Der schwache androgene Effekt reichte aber nicht aus, um die up-Regulation aufrechtzuerhalten. Bereits nach 12h kam es zur down-Regulation und somit zur Ausbildung eines differenzierten Expressionsmusters.

Methyltrienolon (R1881), ein stark anaboles, synthetisches Androgen bewirkte bereits nach 6h Behandlung (1 nM) eine deutliche Repression der ARG, die nach 24h allerdings wieder zurück ging [Hartel et al., 2004 A]. Möglicherweise fand bei dieser Konzentrationen ein pathologischer Effekt auf die Zellen statt, was sich in der Runterregulierung der mRNA Expression äußerte.

Die Wirkung von Fentinacetat und Testosteron auf beide verwendeten Zellkultursysteme zeigte ein vergleichbares Muster (siehe Abb. 4). Fentinacetat besitzt, wie bereits erwähnt, eine vergleichsweise hohe Affinität zum Androgenrezeptor (1.42% RBA) [Bauer et al., 2002]. Außerdem scheint es denkbar, dass der androgene Effekt von Triphenylzinnverbindungen direkt über den Androgenrezeptor vermittelt wird. Die relative Bindungsaffinität lässt dabei keine Rückschlüsse auf die Höhe der Expressionsregulation zu, wie in den beschriebenen Experimenten gezeigt werden konnte. Bezogen auf den Androgenrezeptor wurde eine maximale up-Regulation durch Fentinacetat bei 1 nM erreicht, welche etwa 3-mal so groß war, wie der Einfluss von DHT bei gleicher Konzentration. In der Literatur wurde für einen Transkriptionsassay mit einer humanen Prostata-Karzinom

Zelllinie ein Transkriptions-aktivierender Effekt bei 1 nM TPT gefunden, der einem Effekt von 10 nM DHT entsprach [Bauer et al., 2002]. Die Genexpressionsmuster von Fentinacetat für Androgenrezeptor und Drg1 bei der NPE Zelllinie konnten diese Ergebnisse bestätigen [Hartel et al., 2004 B], was die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse selbst mit unterschiedlichen Testsystemen unterstreicht.

Bei einem Molekulargewicht von 409 g/mol für Fentinacetat und einer angenommenen Dichte von 1 kg/l für den menschlichen Körper entspräche der ADI einer Konzentration von $1.22 \cdot 10^{-9}$ M und damit exakt dem von uns ermittelten Maximum der Genregulation bei 1 nM, vorausgesetzt TPT würde im Organismus zu 100% absorbiert. Allerdings können Organozinnverbindungen aufgrund ihres lipophilen Charakters leicht im Körper akkumuliert werden. Für Karpfen wurden etwa Biokonzentrationsfaktoren (BCF) von 2090 in Niere, 912 in Leber, 269 in Muskel und 257 in der Gallenblase bestimmt [Sekizawa et al., 1999].

Eine im Jahr 2000 vom deutschen Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) veröffentlichte Studie über die Gefahr von zinnorganischen Verbindungen in Lebensmitteln und verbrauchernahen Produkten sieht die Hauptbelastungsquelle für TPT im Verzehr von Fischprodukten. In den nördlichen Bundesländern liegt der durchschnittliche Fischverzehr bei 100 g pro Tag. Ausgehend von einer TPT-Belastung von 10-30 µg/kg Frischgewicht ergeben sich somit tägliche Aufnahmemengen von 0.017-0.050 µg/kg Körpergewicht. Dies sind jedoch nur Durchschnittswerte, die in Belastungsregionen um ein Vielfaches überstiegen werden können. Das Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie hat aus einer Umweltprobenbank einen Maximalgehalt für Brassenmuskulatur von 253 µg TPT/kg Frischgewicht ermittelt [BgVV, 2000].

Über die Aufnahme von Fentinacetat über pflanzliche Lebensmittel, die mit dem Pestizid behandelt wurden, gibt es nach dessen Verbot in Deutschland im Jahr 2002 keine aktuellen Studien.

Der Verlauf der Expressionsmuster von AR, Drg1, Cyclin D₁ und 5 α -Reduktase Gen nach der Stimulation der primären NPE Zelllinie mit Tetramethrin und Difenconazol erlauben eine eindeutige, konzentrationsabhängige und substanzspezifische Differenzierung zwischen den beiden Liganden [Hartel et al., 2004].

Der beschriebene östrogene Charakter vor dem Pyrethroid-Insektiziden Tetramethrin [Go et al., 1999; Kim et al., 2004] konnte durch die Ergebnisse in dieser Arbeit ergänzt werden. Die down-Regulation nahm dabei mit sinkender Konzentration ab und erreichte maximale Werte (Faktor 3 für AR und für Drg1) bei einer Konzentration von 10⁻⁹ M bzw. 10⁻⁷ Tetramethrin.

Tetramethrin besitzt, verglichen mit der geringen Affinität zum Androgenrezeptor (0.0089% RBA) [Bauer et al., 2002], eine sehr hohe endokrine Aktivität. Es lässt sich vermuten, dass Tetramethrin nicht mit dem Androgenrezeptor direkt, sondern mit anderen Elementen des endokrinen Systems wechselwirkt. Zu diesem Ergebnis kam auch eine Studie, die Pyrethroide als endokrine Disruptoren für eine verringerte Reproduktion beim atlantischen Seelachs verantwortlich macht. So reduzieren bereits geringe Konzentrationen (<0.4 ng/l) des Pyrethroids Cypermethrin signifikant die Pheromon-induzierte Antwort des männlichen Seelachses, die sich normalerweise in einem Anstieg der Sexualhormone im Plasma äußert. Da ein direkter Effekt auf die Hoden durch *in-vitro* Versuche ausgeschlossen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die endokrine Wirkung von Cypermethrin nicht über den Androgenrezeptor vermittelt wird [Moore et al., 2001].

Das Triazol Difenconazol zeigte einen entgegengesetzt konzentrationsabhängigen und spezifischen Verlauf der Drg1, Cyclin D₁ und 5 α -Reduktase Expression im

Vergleich zur Tetramethrin. Über eine mögliche endokrine Wirkung von Triazol-Fungiziden gibt es noch keine Studien. Ein Effekt scheint jedoch denkbar, da die RBA zum rekombinanten hAR messbar war.

Die Frage, ob den beobachteten Wirkungen der analysierten Pestizide androgenrezeptorvermittelte Prozesse zugrunde liegen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [Steinmetz et al., 1996]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Induktion und Repression der Genaktivität auf einem androgenunabhängigen Weg erfolgt. Neben den zytoplasmatischen Hormonrezeptoren existieren auch membranständige Hormonrezeptoren, welchen ihre Wirkung über eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration und die Aktivierung der MAP-Kinase vermitteln [Bender et al., 2003]. Des Weiteren ist es denkbar, dass die Expression nicht nur durch die Bindung der Testsubstanz an die Hormonrezeptoren reguliert werden kann, sondern dass es durch die Stimulation mit den Testsubstanzen zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren oder Coaktivatoren kommt, welche wiederum die Genexpression beeinflussen können [Bender et al., 2003].

Für eine weitergehende Analyse von endokrinen Disruptoren ist es wichtig, additive und synergistische Effekte zu untersuchen. Weiterhin sollte die Anzahl der verwendeten Gene wie bei dem NPE System auf wenige begrenzt werden, um den methodischen Aufwand zu minimieren.

Zusätzlich sollte für die weitere Aufklärung der androgenen Eigenschaften von Fentinacetat mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie die Struktur des fentinacetataktivierenden Androgenrezeptors sowie deren Ligandenbindedomänen untersucht werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Vielzahl anthropogener Chemikalien durch hormonähnliche Wirkungen einen schädigenden Einfluss auf Mensch und Tier haben können. Während bereits eine große Anzahl an östrogen- oder antiöstrogenwirkenden Verbindungen durch zahlreiche etablierte Testsysteme identifiziert werden konnte, so ist der Kenntnisstand bei den endokrinen Disruptoren mit einem androgenen oder antiandrogenen Potential weitaus geringer. Dies spiegelt sich auch in der deutlich geringeren Anzahl an beschriebenen Testsystemen zur Untersuchung der Wirkung auf zelluläre Strukturen wieder.

Eine Testmethode stellt dabei der Genexpressionsassay dar, der die Wechselwirkungen von endokrinen Disruptoren mit dem endokrinen System auf Basis der exprimierten mRNA untersucht. Im Gegensatz zu bisherigen *in-vivo* Modellen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Testsystem angestrebt, das nur den Androgenrezeptor exprimiert. Unter Einwirkung von umweltrelevanten Liganden mit einer (anti)androgenen Wirkung sollte die Expression der androgenregulierten Gene erfasst werden. Die vorliegende Arbeit beschreibt die erfolgreiche Entwicklung eines solchen *in-vitro* Testsystems.

Basis des beschriebenen funktionellen Testsystems sind zwei Zellkulturmodelle mit der Humanen Prostata Karzinom Zelllinie 22RV1 sowie einer primären, normalen Schweine Prostata Epithelzellkultur (NPE). Beide Zellkulturmodelle konnten erfolgreich etabliert und charakterisiert werden. Während die Zelllinie 22RV1 neben geringen Mengen von GluR β selektiv den Androgenrezeptor ausbildete, konnten bei der NPE Kultur die Steroidrezeptoren für Androgen, Östrogen α , Östrogen β , Progesteron, Glukokortikoid α und Glukokortikoid β nachgewiesen werden. Somit ergänzten sich beide Systeme hinsichtlich Selektivität (AR bei Zelllinie 22RV1) und *in-vivo* Vergleichbarkeit (NPE-Zelllinie).

Nach abgeschlossener Etablierung der Zelllinien wurden die androgenabhängigen Gene selektiert und die Expressionsmuster durch real-time RT-PCR mittels LightCycler[®] quantifiziert. Darauffolgend wurden verschiedene Steroide und Pestizide auf ihre Fähigkeit zur selektiven Steuerung der Expression der ausgesuchten androgenregulierten Gene hin untersucht.

Mit dem entwickelten funktionellen Genexpressionsassay basierend auf der 22RV1 Zelllinie war eine sensitive Differenzierung der erhaltenen Expressionsmuster von natürlichen und synthetischen Androgenen sowie eine Differenzierung der drei untersuchten Pestizide möglich. Das auf der primären NPE Zelllinie aufbauende Testsystem erlaubte eine noch selektivere Zuordnung der Genexpressionsmuster der untersuchten Pestizide. Es konnte außerdem bestätigt werden, dass Fentinacetat ein endokriner Disruptor mit androgenen Eigenschaften ist.

Die Zellkultursysteme von NPE und 22RV1 sind ein gut zu handhabendes Werkzeug zur Untersuchung von endokrinen Disruptoren mit einem androgenen Potential sowie zur Differenzierung zwischen natürlichen und synthetischen Androgenen.

7. SUMMARY

In numerous publications it has been shown that various environmental pollutants have harmful effects on wildlife and man due to their hormonal activity. Whereas a substantial amount of substances with estrogenic or antiestrogenic activity have already been identified by different methods, the scientific work on endocrine disruptors with androgenic or antiandrogenic effects is much less. As a result, the number of published systems for testing androgenic activity on a cellular level is rather small.

One method for measuring the interaction of endocrine disruptors and the endocrine system is by the use of endogenous gene expression assays, based on expression of mRNA. In contrast to previous *in-vivo* models, our group aimed at establishing a system that expresses only the androgen receptor (AR). The expression of androgen-regulated genes should then be assayed after exposure to androgenic / antiandrogenic substances to determine their endocrine-disruptive potential. This publication describes the successful development of such an *in-vitro* test system.

The basis of the described functional test system are two epithelial cell culture models of human prostate carcinoma cell line 22RV1 and primary porcine prostate epithelial cells (NPE). Both models have been successfully established and characterized. Cell line 22RV1 expresses selectively the androgen receptor and only minor amounts of GluR β . On the other hand, steroid receptors for androgen, estrogen α / β , progesterin and glucocorticoid α / β , have been identified in the NPE cell line. Thus, the two systems complement one another regarding selectivity (AR in cell line 22RV1) and *in-vivo* comparability (NPE cell line).

After successfully establishing the cell lines, the androgen-dependent genes have been selected and the expression patterns were quantified with real-time RT-PCR based on LightCycler[®] methodology. Different steroids and pesticides have then been

investigated to measure their ability to influence the expression of the selected androgen-dependent genes.

The newly developed functional gene expression assay based on the 22RV1 cell line provided a sensitive and substance-specific determination of differential gene expression patterns of natural and synthetic androgens, as well as a differentiation of the investigated pesticides. The NPE system, based on a primary cell line provided an even more selective determination of the pesticides based on the induced gene expression patterns. Furthermore, it was shown, that Fentinacetate acts as an endocrine disruptor with androgenic properties, due a comparable expression pattern with testosterone.

Epithelial cell culture systems 22RV1 and NPE proved to be an easily manageable tool for both the evaluation of endocrine disruptors with androgenic potential and for differentiation between natural and synthetic androgens.

8. LITERATUR

Adams JY, Leav I, Lau KM, Ho MO, Pflueger SM

Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate

Prostate 2002, 52:69-81

Adesanya-Famuyiwa OO, Zhou J, Wu G, Bondy C,

Localization and sex steroid regulation of androgen receptor gene expression in rhesus monkey uterus

Obstet Gynecol 1999, 93:265-270

Alzieu C

Environmental impact of TBT: the French experience

The Science of the Total Environment 2000, 258:99-102

Argente J, Chowen-Breed JA, Steiner RA, Clifton DK

Somatostatin messenger RNA in hypothalamic neuorns is increased by testosterone trough activation of androgen receptor and not by aromatization t o estradiol

Neuroendocrinology 1990, 52:342-9

Aulerich RJ, Ringer RK, Iwamoto S

Reproductive failure and mortality in mink fed on Great Lakes fish

J Reprod Fertil Suppl 1973, 19:365-376

Bauer ER, Meyer HHD, Stahlschmidt-Aller P, Sauerwein H

Application of an androgen receptor assay for the characterisation of the androgenic or antiandrogenic activity of various phenylurea herbicides and their derivatives

Analyst 1998, 123:2485-2487

Bauer ER, Daxenberger A, Petri T, Sauerwein H, Meyer HHD

Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormone to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progesterin receptor

APMIS 2000,108:838-846

Literatur

Bauer ER, Bitsch N, Brunn H, Sauerwein H, Meyer HDD

Development of an immuno-immobilized androgen receptor assay (IRA) and its application for the characterization of the receptor binding affinity of different pesticides

Chemosphere 2002, 46:1107-1115

Bender HG, Niederacher D

Identifizierung und Charakterisierung tumorassoziierter Kandidatengenen in gynäkologischen Tumoren

<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/modelus.php?name=News&file=article&sid=42>

Bentel JM, Birrell SN, Pickering MA, Holds DJ, Horsfall DJ, Tilley WD

Androgen receptor agonist activity of the synthetic progestin, medroxyprogesterone acetate, in human breast cancer cells

Mol Cell Endocrinol 1999, 154:11-20

Birkenfeld A, Ezra Y, Ron N, Navot D, Grankovsky S, Schenker JG, Levij IS, Vlodavsky I

Indication of selective growth of human endometrial epithelial cells on extracellular matrix

In vitro cellular and Development Biology 1988, 24(12):1188-1192

Blondenau JP, Baulieu EE, Robel P

Androgen-dependent regulation of androgen nuclear receptor in the rat ventral prostate

Endocrinology 1982, 110:1926-1932

Brolley C

The plight of the American bald eagle

Audubon Magazine 1952, 60:162-168

Bruhn T, Gülden M, Ludewig S, Seibert H,

Einstufung von Schadstoffen als endokrin wirksame Substanzen

UBA-Texte 65/99, hrsg. V. Umweltbundesamt (1999)

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE

Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years

BMJ 1992, 305(6854):609-613

Literatur

Casslen BG, Harper JK

Human endometrial epithelial cells grown on collagen in serum free medium. Estrogen responsiveness and morphology

Acta Endocrinol 1991, 125(1):101-108

Classen-Linke I, Kusche M, Knauthe R, Beier HM

Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells

Cell and Tissue Research 1997, 287:171-185

Colborn T

Environmental estrogens : health implications for humans and wildlife

Environ Health Perspect 1995, 103 Suppl 7: 735-6

Colborn T, Dumanoski D, Myers JP,

Die bedrohte Zukunft – Gefährden wir unsere Fruchtbarkeit und Überlebensfähigkeit?

1996, Droemer Knaur, München

Colborn T, Clemmens C

Chemically Induces Alterations in Sexual Functional Development, *The Wildlife/Human Connection*, Princeton:

Princeton Scientific NJ 1992

Comhaire F, Von Waelegem K, De Clercq N, Schoonjans F

Declining sperm quality in European men

Andrologia 1996, 28:300

Czeizel A

Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia

Lancet 1985, 1(8426):462-463

Danzo BJ

The effects of environmental hormones on reproduction

Cell Mol Life Sci 1998, 54:1249-1264

Literatur

Daxenberger A

Pollutants with androgen-disrupting potency

Eur J Lipid Sci Technol 2002, 104:124-130.

Degen GH, Ferh H, Käbl R, Kappus H, Neumann HG, Oesch F, Dchulte-Hermann R,

Hormon aktive Substanzen in der Umwelt: Xenooestrogene – Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der DGPT

Forum 1996, 24:30-36

Fisher JS

Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome

Reproduction 2004, 127:305-315

Forman J, Moller H

Testicular cancer

Cancer Surv 1994, 19-20:323-341

Fuhrmann U, Bengtson C, Repenthin G, Schillinger E

Stable transfection of androgen receptor and MMT-CAT into mammalian cells: inhibition of cat expression by anti-androgens

J Steroid Biochem Molec Biol 1992, 42:787-793

Gemüse Infoservice. XIV. 2004. Syngenta

Gladen B, Rogan W, Hardy P, Thullen J, Tinglestad J, Tully M

Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichlorethene transplacentally and through human milk

J Pediatrics 1988, 11:39-41

Go V, Garey J, Wolff MS, Pogo BGT

Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line

Environmental Health Perspectives 1999, 107:173-177

Literatur

Gray LE, Ostgy J, Ferrell J, Rehenberg G, Linder R, Goldman J, Slott V, Laskey

A dose-response analysis of methoxychlor-induced alternations of reproductive development and function in the rat

Fundam Appl Toxicol 1989, 12:92-108

Grier JW

Ban of DDT and subsequent recovery of Reproduction in bald eagels

Science 1982, 218:1232-5

Guillette LJ, Gross TS, Gross DA, Rooney AA, Percival HF

Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes

Environ Health Perspect 1995, 103 Suppl 4:31-36

Guillette LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR

Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated or control lakes

Environ Health Perspect 1994, 102:680-688

Hackenberg R, Hawighorst T, Filmer D, Huschmand D, Schulz K

Medroxyprogesterone acetate inhibits the proliferation of estrogen- and progesterone-receptor negative MFM-223 human mammary cancer cells via the androgen receptor

Breast Cancer Research and Treatment 1993, 25:217-224

Haining REB Papendorp C, Devenport AP, Prentce A, Thomas EJ, Smith SK

Epidermal growth factor in human endometrium: proliferative effects in culture and immuncytochemie, localisation in normal and endometriotic tissues

Hum Reprod 1996, 6(9):1200-1205

Hall RE, Birrell SN, Tilley WD, Sutherland RL

MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression

Eur J Cancer 1994, 30A:484-490

Literatur

Haluska GJ, Wells TR, Hirst JJ, Brenner RM, Sadowsky DV, Novy DJ

Progesterone receptor localisation and isoforms in myometrium, deciduas, and fetal membranes from rhesus macaques: evidence for functional progesterone withdrawal at parturition

J Soc Gynecol Invest 2002, 9 (3):125-136

Hartel A, Didier A, Pfaffl MW, Meyer HHD

Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds

J Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2003, 84:231-238

(A) Hartel A, Didier A, Ulbrich SE, Wierer M, Meyer HHD

Characterisation of steroid receptor expression in the human prostate carcinoma cell line 22RV1 and quantification of androgen effects on mRNA regulation of prostate specific genes

J Steroid Biochemistry & Molecular Biology, received 24 November 2003, accepted 13 July 2004 in press

(B) Hartel A, Pertl C, Wierer M, Meyer HHD

Endocrine disrupting chemicals – assaying androgenicity by quantitating the induced expression levels in two different prostate cell lines: human prostate carcinoma cells 22RV1 and normal primary porcine epithelial cells

FEB 2004 13(11) in press

He WW, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, Curtis RT, Shell BK, Bostwick DG, Tindall DJ, Gelamnn EP, Abate-Shen C, Carter KC

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

Heudorf U, Angerer J

Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: Current exposure in an urban population in Germany

Environmental Health Perspectives 2001, 109:213-217

Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Frandsen H, Laresen JJ

In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol

Reprod Toxicol 2001, 15:537-543

Literatur

Israeli RS, Thomas Powell C, Corr JG, Fair WR, Heston WDW

Expression of the Prostate-specific Membrane Antigen

Cancer Research 1994, 54:1807-1811

Jacobson J, Jacobson S, Schwartz P, Fein G, Dowler J

Prenatal exposure to an environmental toxin: A test of the multiple effects model

Developmental Psychology 1984, 20:523

Jarvinen AW, Tanner DK, Kline ER, Knuth ML

Acute and chronic toxicity of triphenyltin hydroxide to fathead minnows (*Pimephales promelas*) following brief or continuous exposure

Environ Pollut 1988, 52:289-301

Jenkins EP, Hsieh C, Milatovich A, Normington K, Berman M, Francke U, Russell W

Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5 α reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue

Genomics 1991, 11:1102-1112

Jennings MI, Percival HF, Woodward AR

Evaluations of alligators hatchlings and egg removal from three Florida lakes

Proc Ann Conf Southeast Assoc Fish Wild Agencies 1988, 42:283-294

Jørgensen M, Vandelbo B, Skakkabaek NE, Leffers H

Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes

Environ Health Perspect 2000, 108:403-412

Jorgensen M, Hummel R, Bevort M, Andersson AM, Skakkebaek NE, Leffers H

Detection of oestrogenic chemicals by assaying the expression level of oestrogen regulated genes

APMIS 1998, 106:245-251

Joubert Y, Tobin C, Lebart Mc

Testosterone-induced masculinization of the rat levator ani muscle during puberty

Dev Biol 1994, 162:104-110

Literatur

Kamijima M, Hibi H, Gotoh M

A survey of semen indices in insecticide sprayers

Journal of Occupational Health 2004, 46:109-118

Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kempainen JW, Wilson EM

Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist

Nature 1995, 375:581-585

Kelce WR, Lambright CR, Earl Grey JR, Roberts KP

Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: In vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism

Toxicology and Applied Pharmacology 1996, 142: 192-200

Keßler J

Erteilbare einzelbetriebliche Genehmigungen nach § 18b PflSchG für Fungizide in Gemüsekulturen. 2004. Bonn, Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen

Kim IY, Shin JH, Kim HS

Assessing Estrogenic Activity of Pyrethroid Insecticides Using In Vitro Combination Assays

Journal of Reproduction and Development 2004, 50:245-255

Kitty BJM, Conny CEM

Two Androgen Response Regions Cooperate in Steroid Hormone Regulated Activity of the Prostate-specific Antigen Promoter

J Biol Chem 1996, 271:6379-6388

Kledal TJS, Jorgensen M, Mengarda F, Skakkebaek NE, Leffers H

New method for detection of potential endocrine disruptors

Andrologia 2000, 32:271-278

Kleinman D, Sharon Y, Inster V

Human endometrium in cells culture: A new method for culturing human endometrium as separate epithelial culture and stromal components

Arch Gynecol 1983, 234 (2):103-112

Literatur

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Höggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA

Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alpha and beta

Endocrinology 1997, 138 (3):863-870

Laskey JW, Berman E

Steroidogenic assessment using ovary culture in cycling rats: Effects of bis(2-diethylhexyl) phthalate on ovarian steroid production

Reprod Toxicol 1993, 7:25-33

Laird SM; Fucksennann EM, Saravelos H, Li TC

The production of tumor necrosis factor alpha by human endometrium cells in culture

Hum Reprod 1996, 11(6):1318-1313

Leffers H, Naesby M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, Jorgensen M

Oestrogenic potencies of zeranol, oestradiol, diethylstilbesterol, bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters

Reproduction 2001, 16:1037-1045

Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, Tue LD, Hood L, Nelson PS

Prostate-localised and Androgen-regulated Expression of the membrane-bound Serine protease TMPRSS2

Cancer Research 1999, 59:4180-4184

Linda LX, Su YP, Labiche R, Sagawa T, Shanmugam N, McLeod DG,

Quantitative expression profile of androgen regulated genes in prostate cancer cells and identification of prostate specific genes

Int J Cancer 2001, 92:322-328

Lindl T, Bauer J

Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen

3. Aufl Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York 1994

Lubhan DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS

Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome

Science 1988, 249:327-330

Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon Cj, Wilson EM, French FA

Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity

Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:9534-9538

Marshburn PB, Head GR, MacDonald PC, Casey ML

Culture characteristics of human endometrium glandular epithelium throughout the menstrual cycle: Modulation of deoxyribonuclein acid synthesis by 17 beta estradiol and medoxyprogesteron acetate

Am J Obstet Gynecol 1992, 167:1888-1898

Mason C, Ford T, Last N

Organochlorine residues in british otters

Environ Cont Toxicol 1986, 33:656-661

Mason C, MacDonald SM

Impact of organochlorine pesticides residues and PCBs on otters (*Lutra lutra*) in eastern England

Sci Total Environ 1993, 138:147-160

Matthews CJ, Redfern ChPF, Hirst BH, Thomas E

Characterisation of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture

Fertil Steril 1992, 57:990-997

Meredith P, Gooding A, Gerald A

Biotransformation and Disposition of testosterone in the Eastern Mud Snail *Lilyanassa obsoleta*

General and Comparative Endocrinology 2001, 122:172-180

Mervil PH, Calvo F,

Normal human endometrial cells in culture: Characterisation and localisation of epithelial and stromal cells by SV 40 large T antigen

Biol Cell 1994, 80:187-193

Møller H

Trends in incidence of testicular cancer and prostate cancer in Denmark

Literatur

Hum Reprod 2001, 16:1007-1011

Moore A, Waring CP

The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)

Aquatic Toxicology 2001, 52:1-12

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT

Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification

Biotechniques 1998, 24: 954-8,960-962

Nordeen EJ, Nordeen KW, Sengelaub DR, Arnold AP

Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus

Science 1985, 229:671-3

O'Connor JC, Frame Sr, Davis LG, Cool J

Detection of the environmental antiandrogens p,p-DDT in CD and logn-evans rats using a tier I screening battery and a hersberger assay

Toxicol Sci 1999, 51:44-53

Pfaffl MW, Daxenberger A, Hageleit M, Meyer HHD

Effects of synthetic progestagens on the mRNA expression of androgen receptor, progesterone receptor, estrogen receptor α and β , insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-1 receptor in heifer tissues

J Vet Med A 2002, 49:57-64

Pfaffl MW, Lange IG, Daxenberger A, Meyer H.H.D

Tissue-specific expression pattern of estrogen receptor (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with RT-PCR

APMIS 2001, 109 (5):345-355

Pfaffl MW, Lange IG, Meyer HHD

The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: Quantification of steroid receptor mRNA expression (AR, ER α , ER β and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCT

J Steroid Biochem Mol Biol 2003, 84:159-166

Literatur

Pfaffl MW

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR

Nucleic Acids Researc 2001, 29:2002-2007

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L

Relative Expression Software Tool (REST[®], Weihong et al. 2002) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR

Nucleic Acids Res. 2002, 30:e36

Platt AE

Breast and prostate cancer rising

Vital Signs 1995, 136

Poulin R, Baker D, Poirier D, Labrie L

Multiple actions of synthetic 'progestins' on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an in vitro model for the simultaneous assay of androgen, progestin, estrogen and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids

Breast Cancer Res Treat 1991, 17:197-210

Reel JR, Lamb J, Neal BH

Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterisation

Fund Appl Toxicol 1996, 34:288-305

Rogan W, Gladen B, McKinney J, Careras N, Hardy P, Thullen J, Tinglestand J, Tully M

Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE

J Pediatrics 1986, 109:335

Sattelberger R

Organozinnverbindungen in der aquatischen Umwelt

BE-124. 2002 Umweltbundesamt Österreich.

Sekizawa J

Triphenyltin Compounds. Concise International Assessment Document 13

1999, Geneva, World Health Organization.

Literatur

Sasco AJ

Epidemiology of breast cancer: an environmental disease?

APMIS 2001, 109:321-332

Sauerwein H, Meyer HHD

Androgen and estrogen receptors in bovine skeletal muscle: relation to steroid-induced allometric muscle growth

J Anim Sci 1989, 67:206-212

Sauerwein H, Pfaffl M, Hagen-Mann K, Malucelli A, Meyer HHD

Expression of estrogen and androgen receptor in the bovine gastrointestinal tract

Dtsch Tierärztl Wschr 1995, 102:164-168

Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Casey D, Duft M, Markert B, Oehlmann J

Östrogenartige Wirkungen von Bisphenol A auf Vorderkeimenschnecken (Mollusca: Gastropoda:Prosobranchia)

UWSZ-Z Umweltchem Ökotox 2001, 13:319-333

Scipoo ML, Van De Weerd C, Willemsen P, Francois JM, Rentier-Delure F, Muller M, Martial JA, Maghiun-Rogister G

Detection of illegal growth promoters in biological samples using receptor binding assays

Analytica Chimica Acta 2002, 473:135-141

Sharpe RM, Skakkebaek NE

Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?

Lancet 1993, 341:1392-1395

Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP

Gestational and location exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production

Environ Health Perspect 1993, 103:1136

Shao TC, Li H, Eid W, Ittmann M, Unni E, Cunningham GR

In vivo preservation of steroid specificity in CWR22 xenografts having a mutated androgen receptor

The Prostate 2003, 57:1-7

Literatur

Shelby M, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL

Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays

Environ Health Perspect 1996, 104:1296-1300

Sohni P, Sumpter JP

Several environmental oestrogens are also anti-androgens

J Endocrinol 1998, 158:327-339

Sramkoski RM, Pretlow TG, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, Marengo SR, Rhim JS, Zhang D, Jacobberger JW

A new human prostate carcinoma cell line 22RV1

Dev Biol 1999, 34:403-409

Steinmetz R, Young PCM, Caparell-Grant A, Gize EA, Madhukar B, Ben-Jonathan N, Bibsby RM

Novel estrogenic action of the pesticides residue beta-hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells

Can Res 1996, 56:5403-5409

Sumpter JP, Jobling S

Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment

Environ Health Perspect 1995, 103 Suppl 7:173-8

Szalai J, Jimenez J, Soto AM, Luizze MF, Sonnenschein C

Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor

Endocrinology 1997, 138:1406-1412

Terouanne B, Tahiri B, Georget V, Belon C, Poujol N, Avances C, Orio J, Balaguer P, Sultan C

A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects

Mol Cell Endocrinol 2000, 160:39-49

Than J, Sharief Y, Hamil KG, Gregory CW, Zang DY, Sar M, Gumerlock PH, de Vere RW, White TG, Pretlow SE

Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells

Mol Endocrinol 1997, 11:450-459

Literatur

Thierfelder W, Mehnert WH, Laußmann D, Arndt D, Reineke HH

Der Einfluss umweltrelevanter östrogenener oder östrogenartiger Substanzen auf das Reproduktionssystem

Bundesgesundheitsblatt 1995, 38:337-341

Thom E, Ottow JCG, Benckiser G

Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment

Environmental Pollution 1997, 96:409-414

Thrupp LA

Sterilisation of workers from pesticide exposure: the causes and consequences of DBCP – induced damage in Costa Rica

Int J of Health Services 1991, 21:731

Tilly WD, Marcelli M, Wildon JD, McPhaul MJ

Characterisation and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor

Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:327-331

Wei Wu He, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS

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

US Environmental Protection Agency Special Report on environmental Endocrine Disruption

An Effects Assessment and Analysis Report no. EPA/60/R-96/012, 1997

US Environmental Protection Agency – Office of Prevention, Pesticides and toxic substances: EPA Activities on Endocrine Disruptors – Background Paper, 1997

Ulrix W, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G

The differentiation-related gene 1, Drg1, is markedly up regulated by androgens in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells

FEBS Letters 1999, 455:23-26

Literatur

Veldscholte J, Berrevoets CA, Zegers ND, van der Kwast TH, Grootegoed JA, Mulder E

Hormone-induced dissociation of the androgen receptor heat shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors

Biochemistry 1992, 31:7422-30

Viggaard, AM, Joergensen ECB, Larsen JC

Rapid and sensitive reporter gene assay for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals

Toxicol Appl Pharmacol 1999, 155:150-160

Vinggaard AM, Hinda C, Larsen JC

Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro

Toxicology 2000 145:173-183

Von Larr JH, Berrevoets CA, Trapman J, Zegers ND, Brinkmann A

Hormone-dependent androgen receptor phosphorylation is accompanied by receptor transformation in human lymph node carcinoma of the prostate cells

J Biol Chem 1991, 266:278-86

Voss HE (I, II, III)

In: Handbook of Experimental Pharmacology: Androgens I, Voss HE, Oertel G#Springer Verlag Berlin, eds.

Herken H 1973 p. 3, 195, 474

Weybridge: European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife

Weybridge UK 1996

Wobus A

Handbuch der molekularen Medizin Band I, Molekular- und Zellbiologische Grundlagen

Springer Berlin Heidelberg 1997, p. 305-337

Xu LL, Shanmugam N, Segawa T, Sesterhaenn IA, McLeod DG, Moul JW, Srivastava S

A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on Chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate

Genomics 2000,66:257-263

Literatur

Yamabe Y, Hoshino A, Imura N, Suzuki T, Himeno S

Enhancement of Androgen-Dependent Transcription and Cell Proliferation by Tributyltin and Triphenyltin in Human Prostate Cancer Cells

Toxicology and Applied Pharmacology 2000,169:177-184

Yuan S, Trachtenberg J, Mills GB, Brown TJ, Xu F, Keating A

Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary DNA

Cancer Research 1993, 53:1304-1311

ANHANG

LEBENS LAUF

Anita Joanna Hartel geb. Niemietz

Persönliche Daten

Geburtsdatum	03.04.1973
Geburtsort	Oppeln / Polen
Familienstand	verheiratet

Ausbildung

1980 – 1988	Grundschule in Oppeln / Polen
1988 – 1992	Gymnasium in Oppeln / Polen
1992	Abitur
1994	Sprachschule – Verein für Kultur, Bildung und Sprache e.V. in Krefeld
1995	Deutsches Abitur, Eichendorff – Kolleg Geilenkirchen
1996	Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie an der J. W. Goethe Universität in Frankfurt am Main
1998	Diplom – Chemiker – Vorprüfung (Note: 1,8)
2000	I. Staatsexamen (Note: 1,5)
2000 – 2001	Praktikum bei Nutrinova Nutrition Specialties & Food Ingredients GmbH, Frankfurt am Main
2001 – 2004	Promotion und Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte am Institut für Physiologie, TU München-Weihenstephan

PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

Hartel A, Didier A, Pfaffl MW, Meyer HHD

Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds

J Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2003, 84:231-238

(A) **Hartel A**, Didier A, Ulbrich SE, Wierer M, Meyer HHD

Characterisation of steroid receptor expression in the human prostate carcinoma cell line 22RV1 and quantification of androgen effects on mRNA regulation of prostate specific genes

J Steroid Biochemistry & Molecular Biology, received 24 November 2003, accepted 13 July 2004 in press

(B) **Hartel A**, Pertl C, Wierer M, Meyer HHD

Endocrine disrupting chemicals – assaying androgenicity by quantitating the induced expression levels in two different prostate cell lines: human prostate carcinoma cells 22RV1 and normal primary porcine epithelial cells

FEB 2004, 13(11) in press

Ein Abdruck der Originalarbeiten befindet sich im Anschluss

Review

Lange IG, **Hartel A**, Meyer HHD

Evolution of oestrogen functions in vertebrates

J Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2003, 83:219-226

Tagungsbeiträge

Hartel A, Didier A, Pfaffl MW, Meyer HHD

Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds In: Abstract band of Lectures and Poster Presentation, 15th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, München, 17.-20.05.2002, Abstr. No. 134-P

Hartel A; Didier A; Meyer H.H.D

Androgen-independent induction of androgen-responsive genes in human prostate carcinoma cell line 22RV1, In: Proceedings 2nd Copenhagen Workshop "Endocrine Disrupters: A possible role of Mixed Exposures for Reproductive Failures and Malignancies", Kopenhagen, Dänemark, 07.-09.12.2002, No. 36, S. 90

Hartel A

Biologische Screening anbolender Wirkstoffe, In: Dopingkleinkonferenz 2004 (Bundesinstitut für Sportwissenschaft), Kreischa bei Dresden, 22.10.2004

PUBLIKATIONSBEITRAG

Hartel A, Didier A, Pfaffl MW, Meyer HHD

Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds

J Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2003, 84:231-238



Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds[☆]

A. Hartel^{*}, A. Didier, M.W. Pfaffl, Heinrich H.D. Meyer

Institute of Physiology, Center of Milk and Food Research, Technical University Munich, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany

Abstract

Alteration of androgen receptor function due to hormonally active compounds in the environment, may be responsible for impaired reproductive function in aquatic wildlife. Based on human prostate carcinoma 22RV1 cells, a cell culture expression system was established to test effects of putative androgenic/antiandrogenic compounds on endogenous gene expression. 22RV1 cells were shown to express human androgen receptor, but not human progesterin (hPR) or human oestrogen receptor (hER) α and β . Six androgen-regulated genes (ARGs) were chosen to determine androgenic/antiandrogenic action using highly sensitive real-time RT-PCR. Results showed that gene expression is altered in a time-dependent manner. After stimulation of cells by DHT (10 nM), synthetic androgen R1881 (1 nM), or organic pesticides (difenoconazole, fentinacetate, tetramethrin) *TMPRSS2* mRNA expression was down-regulated by the factor 0.6 after 24 h of DHT treatment. Similar results were obtained when cells were assayed for mRNA expression of *PSA* after fentinacetate and R1881 stimulation. In contrast, *TMPRSS2* expression was up-regulated by the factor 0.9 when cells were stimulated by tetramethrin. Final goal of the work is a sensitive determination of differential gene expression by different compounds under study, achievement of substance-specific expression patterns and function related analysis of potential androgens/antiandrogens.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: 22RV1 cells; Androgen receptor; Androgen-regulated genes; Gene expression; Real-time RT-PCR

1. Introduction

Recent adverse trends in health and sexual development of aquatic wildlife animals may be linked to the presence of endocrine disruptors, i.e. substances that interfere with the endocrine system, in the environment [1,2]. The concept that environmental pollutants might have harmful effects on reproduction, is not based on theory, but is rather derived from observations of wildlife biologists in the field [3]. Even impairment of sexual development and reproduction in humans was proposed, although decrease of sperm counts during the past 50 years [4] could not be confirmed in worldwide studies [5]. The increase of reproductive organs pathology is commonly accepted for the last decades [6–9]. These diseases might be hormone dependent, but till now a causal relation between xenohormones and disorders observed could not be proven. Substances with androgenic or antiandrogenic

effects can be characterised as natural steroids originating from human or animal metabolism [10], as phytoestrogens and as synthetic androgens. From the first group, we selected DHT as a reference steroid. Synthetic androgens include medically used compounds in hormone replacement therapy or growth promoters in farm animals [11,12] as well as illegally used synthetic androgens for human or animal doping. For our tests, we used synthetic androgen R1881. The last group of androgenic/antiandrogenic substances includes chemicals or metabolites of chemicals showing hormonal activity as an unrequested side effect. Three of the most suspicious endocrine disrupting chemicals used in plant protection are included in our evaluation. Difenoconazole and fentinacetate [13] are used as fungicides; the third—tetramethrin—as an insecticide. Though known androgenic or antiandrogenic substances can be detected at concentrations in the ppt range by means of sensitive methods like GC–MS, LC–MS or EIA [14,15], no statement on hormonal activity or effects on gene expression can be made using these methods. To predict the influence of these compounds on man or the environment, in vitro systems and animal-based in vivo assays are available. In vitro assays are based either on measurement of direct binding to the isolated receptor, on induction of a reporter gene regulated through the androgen responsive element (ARE) or on cell

[☆] Poster paper presented at the 15th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, “Recent Advances in Steroid Biochemistry and Molecular Biology”, Munich, Germany, 17–20 May 2002.

^{*} Corresponding author. Tel.: + 49-8161-713508; fax: + 49-8161-714204.

E-mail addresses: anita.hartel@wzw.tum.de, physio@wzw.tum.de (A. Hartel).

Table 1

Primer sequences, product length and melting temperature of six androgen-regulated genes and housekeeping gene

	<i>PSA</i>	<i>PSM</i>	<i>AR</i>	<i>NKX3.1</i>	<i>TMPRSS2</i>	<i>PMEPA1</i>
Forward Primer (bp)	29–46	1195–1214	252–272	568–586	1104–1123	895–918
Reverse Primer (bp)	107–187	1345–1364	558–578	740–761	1235–1254	1017–1040
Product length (bp)	159	170	326	261	151	146
Product melting temperature (°C)	90.80	83.37	86.33	88.49	89.00	89.20

Selected genes are as follows: Prostate-specific antigen (*PSA* accession no. X14810) [41] belonging to kallekrein gene family is a common tumour marker in cancer diagnosis, prostate-specific membrane antigen (*PSM* accession no. M99487) is a cell surface marker in the prostate [42], homeobox gene *NKX3.1* (accession no. U860669) [43] is involved in cell growth and differentiation, *TMPRSS2* (accession no. AF270487) supports normal cell growth and morphology [44], androgen receptor (*AR* accession no. M3423) [45], and *PMEPA1* (accession no. AF224278) [46] is involved in calcium binding.

proliferation assays. Competitive receptor assays have been established to measure binding affinities of different substances [16]. Recently, Bauer et al. [17] succeeded in establishing a test system on the basis of recombinant human AR. These assays can be performed on whole cells or cell homogenates [18,19].

In recombinant reporter-gene assays after co-transfection of cells, the ligand-activated receptors initiate transcription of a reporter gene [20–23], e. g. luciferase. Activity of the reporter gene is directly related to the transcriptional activation by the test compound. Both, yeast [24–26] and mammalian cells are available. On cellular level, proliferation activity of cells bearing naturally or recombinantly expressed AR is used as test criterium. A negative proliferative effect of androgens can be found in AR positive breast cancer cells [27–29]. It can also be detected in AR transfected breast or prostate cancer cells [30,31].

The assay described herein is based on induction or repression of six marker genes selected from a collection of previously identified androgen-regulated genes described, e.g. in human prostate carcinoma cell line LNCaP. Choice-criteria for androgen-regulated genes (ARGs) were as follows: genes should have an ARE in the promoter region, biological function should be known and genes should originate from different functional groups. All genes we choose herein match these requirements. For overview see Table 1. Transcriptional alterations were assayed by real-time polymerase chain reaction. In the present study, we show that a cell-based endogenous gene expression assay is very sensitive and can be used to assay androgen/antiandrogen-like effects of various putative androgenic/antiandrogenic chemicals. Characteristic gene expression patterns could be achieved for all substances under study.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dihydrotestosterone (DHT, 5 α -androstan-17 β -ol-3-one) was received from Sigma–Aldrich (Germany). R1881 (17 β -hydroxy-17-methylestra-4, 9, 11-trien-3-one) as a gift from Schering AG (Germany). Difenoconazole and tetram-

ethrin were obtained from Dr. Ehrensdoerfer (Germany), fentinacetate from Riedel de Haën (Germany). Charcoal (Norit A), and dextran (research grade, MG 65000-73000) were purchased from Serva (Germany). All pesticides were dissolved in ethanol p.a. (final ethanol percentage of less than 0.1%).

2.2. Cell culture

Human prostate carcinoma cell line 22RV1 [32] was obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Germany, ACC 438) and routinely cultured in 40% RPMI 1640 medium, 40% Dulbecco's MEM supplemented with 20% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) plus 100,000 units/l penicillin and 100 mg/l streptomycin (Sigma, Germany). Steroids were removed from FBS essentially as described by Darbre et al. [33]. FBS was incubated with 0.5% activated charcoal and 0.05% dextran T-70 for 30 min at 55 °C the charcoal particles were removed by centrifugation at 4 °C for 20 min at 4.500 \times g. This step was repeated and stripped serum was sterile filtered and stored in aliquots at –20 °C. All media were obtained from Gibco-BRL (USA). Cells were split 1:6 every 7 days and cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.3. Cell treatment

Cells were seeded in medium containing 20% charcoal-stripped FBS for 72 h before treatment with steroids or pesticides and allowed to form a confluent monolayer. DHT (10 nM) or synthetic steroid R1881 (1 nM) was added and cells were harvested at 0, 6 and 24 h after stimulation for RNA extraction. Same procedure was carried out with other ligands: difenoconazole (100 nM), fentinacetate (100 nM) and tetramethrin (50 nM). Control cultures were continuously grown in steroid-depleted untreated medium for the same intervals of time.

2.4. RNA isolation and reverse transcription reaction

Total RNA was isolated from 22RV1 cells using peqGold TriFast™ (peqLab Biotechnologie GmbH, Germany)

with the guanidinium-isothiocyanate method [34] according to the manufacturer's instruction. Synthesis of first strand cDNA was performed by using 1000 ng of total RNA and 200 U MMLV-reverse transcriptase (Promega, USA) according to the manufacturer's protocol. RT reaction was carried out in 40 μ l reaction volume in a gradient cycler (Tgradient, Biometra[®], Germany).

2.5. Determination of nucleic acid concentration

All measurements of nucleic acid concentration were performed at 260 nm (OD₂₆₀) in a spectrophotometer (BioPhotometer[®], Eppendorf, Germany) with 220–160 nm Uvettes[®] (Eppendorf).

2.6. Human oestrogen (hER α and β) and human progesterin (hPR) receptor expression analysis in the cell line 22RV1

Total RNA from untreated cells was extracted and reverse-transcribed as mentioned above. Expression of receptors was investigated using following primers: progesterin 5'-GAGCTCATCAAGGCAATTG-3' (sense) and 5'-CACCATCCCTGCCAATATCTTG-3' (antisense) producing a 227 bp product; hER α primers 5'-AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC-3' (sense) and 5'-CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT-3' (antisense) yielding a 234 bp product; hER β 5'-GCTTCGTGGAGCTCAGCCTG-3' (sense) and 5'-AGGATCATGGCCTTGACACAGA-3' (antisense), generating a 262 bp product. Subsequently, PCR products were subjected to gel-electrophoresis on 1.5% agarose gels containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide.

2.7. Real-time PCR quantification

Quantification of genes of interest was carried out in LightCycler[®] (Roche Diagnostic, Germany) using LightCycler[®] DNA Master SYBR[®] Green I technology [35]. Mastermixes for each PCR run were prepared as follows: 6.4 μ l water, 1.2 μ l MgCl₂ (4 mM), 0.2 μ l Forward Primer (20 pmol), 0.2 μ l Reverse Primer (20 pmol) and 1 μ l

Fast Start DNA Master SYBR[®] Green I (Roche Diagnostics, Germany) mix 9 μ l of mastermix and 1 μ l (25 ng) of reverse-transcribed total RNA. Each sample was subjected to 40 cycles of PCR consisting of 15 s at 95 °C for denaturation, 10 s at corresponding annealing temperature and 20 s at 72 °C for elongation. Primers for all six androgen-regulated genes were designed using HUSAR-software (DKFZ, Heidelberg) and synthesised by MWG Biotech (Germany). For primer sequences and product length see Table 1.

Fluorescence data report was computed directly with LightCycler[®] software 3.5 (Roche Diagnostics, Germany). For the determination of crossing-points (CP) "Second Derivative Maximum" method was applied [36]. Data analysis was performed using relative quantification software REST[®] [37]. Relative expression (E) was automatically calculated according to equation: $E = 2^{\Delta\text{CP}}$. For depiction of up/down regulation $2 \log E$ was determined to set gene expression in control samples to zero.

2.8. Statistics

All data were statistically processed in SigmaPlot[®] 2000 (SPSS Inc., USA) and SigmaStat[®] 2.0 (Jandel Corporation, USA).

3. Results

3.1. Characterisation of 22RV1 cell line

Using real-time RT-PCR 22RV1 cells showed expression of human androgen receptor only. Neither mRNA of human oestrogen receptor α and β (hER α and β) nor mRNA of human progesterin receptor (hPR) could be detected (data not shown).

3.2. Primer specificity, real-time RT-PCR efficiencies, intra- and inter-assay variation

After real-time RT-PCR all primer pairs proved to generate amplicons showing one single melting peak with high

Table 2
Characterisation of real-time LightCycler[®] PCR

	<i>NKX3.1</i>	<i>PMEPA1</i>	<i>TMPRSS2</i>	<i>PSA</i>	<i>PSM</i>	<i>AR</i>	Ubiquitin
Start template	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA
PCR efficiency	1.90	1.92	1.98	2.07	2.13	1.99	1.99
Quantification limit (ng)	0.2	0.04	0.04	0.2	0.04	0.04	0.04
Quantification range (ng)	25–0.2	25–0.04	25–0.04	25–0.2	25–0.04	25–0.04	25–0.04
Test linearity correlation	22RV1 total RNA ($r = 1.00$)	22RV1 total RNA ($r = 1.00$)	22RV1 total RNA ($r = 0.98$)	22RV1 total RNA ($r = 0.98$)	22RV1 total RNA ($r = 0.99$)	22RV1 total RNA ($r = 0.92$)	22RV1 total RNA ($r = 0.95$)
Intra-assay variation (%, $n = 3$)	0.5	0.4	1.0	0.3	0.8	1.6	0.7
Inter-assay variation (%, $n = 3$)	4.4	3.5	2.3	2.6	3.2	4.9	1.8

Intra-assay (test precision) and inter-assay variation (test variability), $n = 3$. Calculation of test precision and test variability is based on the variation of crossing points (CP) from the CP mean value.

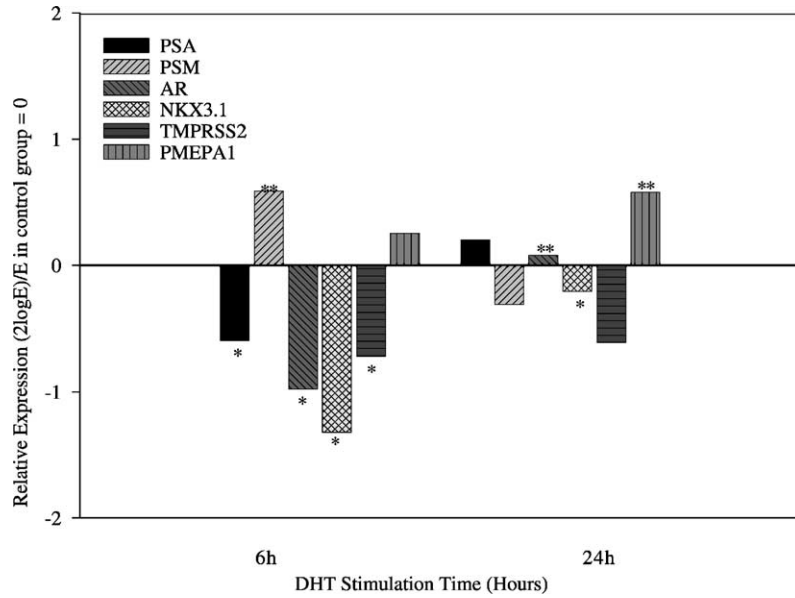


Fig. 1. Time response of DHT (10 nM) induction of ARGs mRNA in 22RV1 cells. *P < 0.01, **P < 0.05 indicates significant differences between treatment groups.

specificity and high sensitivity. Length of desired product was confirmed by high-resolution gel-electrophoreses, (for overview, see Table 2). After 40 cycles of real-time RT-PCR no primer–dimer formation could be observed. PCR efficiencies were calculated from the given slopes in LightCycler® Software 3.3 (Roche Diagnostic, Germany) (Table 2). To confirm accuracy and reproducibility of real-time PCR the intra-assay precision was determined in replicates of three within one LightCycler® run. Inter-assay variation was investigated in three different experimental runs performed on

3 days. Calculation of test precision and test variability is based on the CP variation from the CP mean value (Table 2).

3.3. Screening for androgen-regulated genes in 22RV1 cells

To test the different candidate marker genes, we exposed 22RV1 cells to either increasing concentrations of test compound for 24 h or a fixed concentration for different time periods. The candidate genes were then assayed for dose-

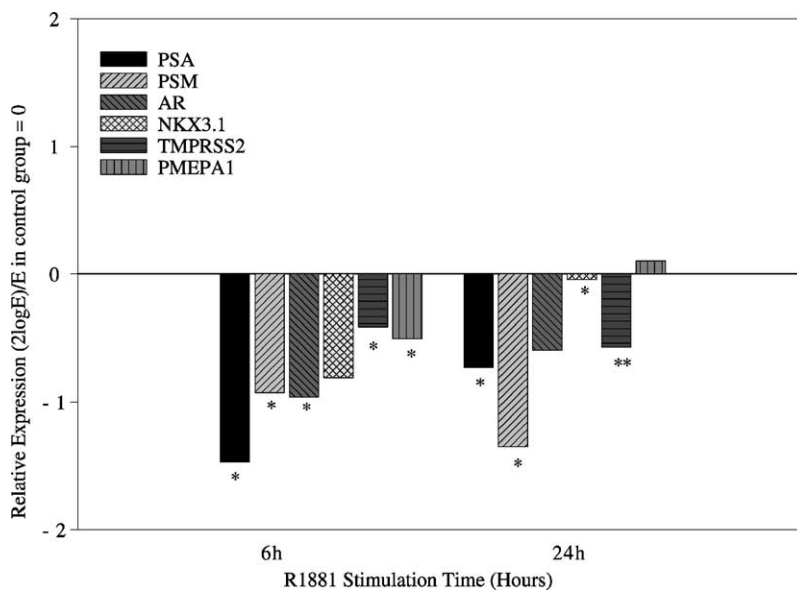


Fig. 2. Time response of R1881 (1 nM) induction of ARGs mRNA in 22RV1 cells. *P < 0.01, **P < 0.05 indicates significant differences between treatment groups.

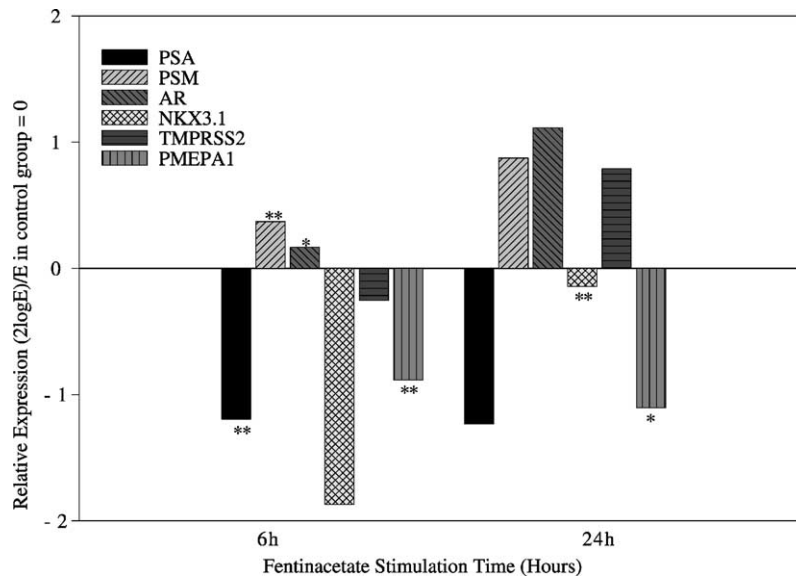


Fig. 3. Time response of fentinacetate (100nM) induction of ARGs mRNA in 22RV1 cells. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ indicates significant differences between treatment groups.

and time-dependent effects on mRNA expression. In this paper, we present treatment dependent expression profiles for six representative marker genes after 6 and 24h of treatment. Dose- and time-settings presented here were chosen according to optimal viability of treated cells and maximal alteration of gene expression. Lower dosages did not lead to significant changes of gene induction/repression. Higher doses, especially of pesticides proved to be cytotoxic in vitro. Concentration of DHT and R1881 were adopted from current literature [41,44,46].

3.4. Analysis of androgen-regulated gene expression in different treatment groups

Our experimental conditions 10 nM DHT treatment of 22RV1 cells for 6 and 24 h revealed consistent up/down regulation of six prostate relevant androgen-regulated genes: *PSA*, *PSM*, *AR*, *NKX3.1*, *TMPRSS2*, *PMEPA1* (Fig. 1). ARGs expression was also determined after 6 and 24 h of R1881 (1 nM) treatment (Fig. 2). After 6 h of culture treatment, all genes appeared to be down-regulated. *PMEPA1*

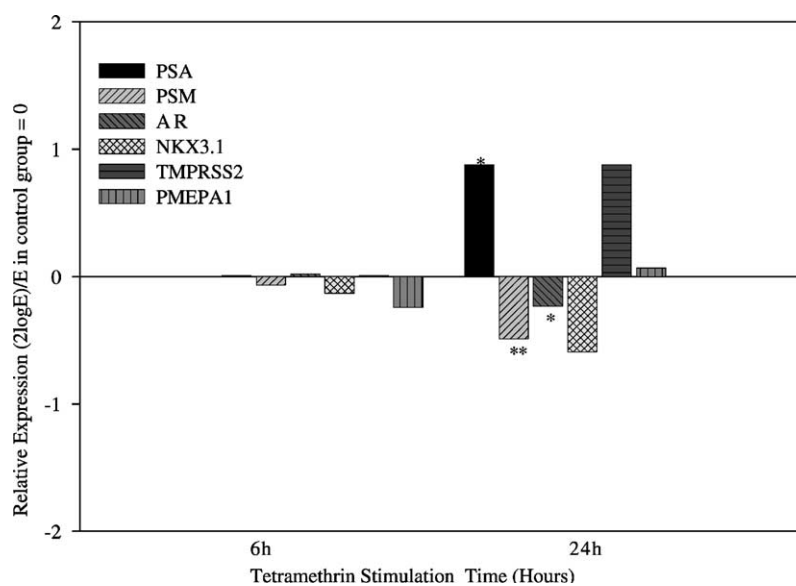


Fig. 4. Time response of tetramethrin (50nM) induction of ARGs mRNA in 22RV1 cells. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ indicates significant differences between treatment groups.

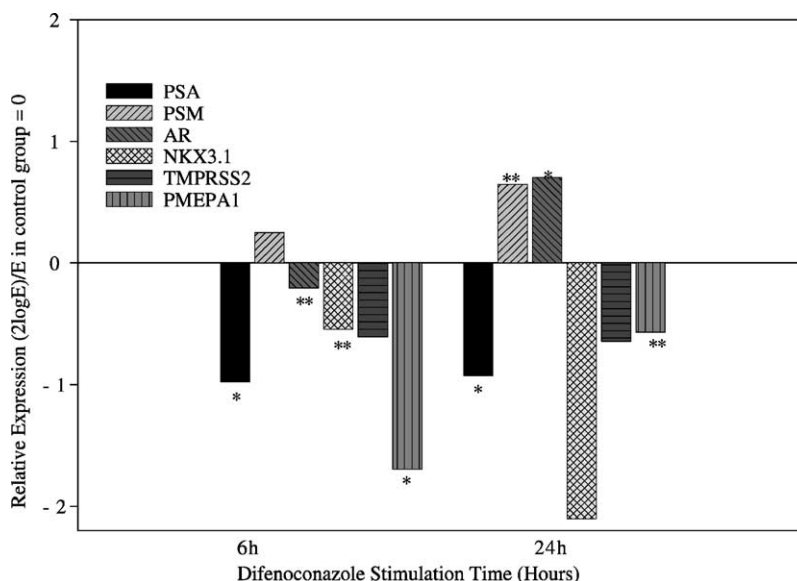


Fig. 5. Time response of difenoconazole (100 nM) induction of ARGs mRNA in 22RV1 cells. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ indicates significant differences between treatment groups.

gene expression was up-regulated after 24 h whereas all other genes remained down-regulated (Fig. 2). Homeobox *NKX3.1* gene was down-regulated by the factor 1.9 after 6 h in response to fentinacetate (Fig. 3). After 24 h, there was less than factor 0.1 increase in *NKX3.1* mRNA levels.

All six ARGs had no statistically significant increase at least 6 h after tetramethrin (Fig. 4) treatment. After 24 h, we detected induction of *PSA* by the factor 0.7 and of *TMPRSS2* (0.9) by tetramethrin. Prolonged treatment with 100 nM difenoconazole produced a further increase of *NKX3.1* transcription with a 0.5 and 2.1 increase of mRNA after 6 and 24 h, respectively (Fig. 5). For complete depiction of gene expression pattern see Figs. 1–5.

4. Discussion

The herein described assay is based on human prostate carcinoma 22RV1 that is an androgen-dependent, serially transplantable nude mouse xenograft derived from a primary human prostate cancer. Transplanted 22RV1 tumours are positive for AR and growth of 22RV1 is androgen dependent. The recurrent tumour 22RV1 expresses AR, but growth of this tumour becomes androgen independent [38]. As DSMZ could definitely not assure expression of hAR in 22RV1 cells only, receptor expression had first to be characterised. 22RV1 cells proved to express human androgen receptor only. Therefore, conclusion can be made that alteration of gene expression patterns may predominately be related to androgenic/antiandrogenic function of compounds under study. Nevertheless, induction/repression of gene activity due to an androgen independent pathway cannot totally be excluded. However, interferences with oestrogen or

progesterin signalling pathways are not possible in our system, because of lack of receptor expression. All other commercially available prostate cancer cell lines do express at least one additional steroid receptor. Therefore, they are not suited for selective androgen-related bioresponse analysis. Since one of the primary goals of our study was to define a panel of ARGs that could be used as a readout for androgen signaling status, setting, dosage and time of androgen treatment of 22RV1 cells selected for real-time analysis had to be established. Expression of all genes under study showed to be androgen dependent, although growth of cells was independent from the presence of androgens in the media.

All primers used, amplified the sequences of interest with excellent accuracy and precision. Intra- and inter-assay variances proved to be as low as mentioned by others [39]. Therefore, even slight differences in gene expression were statistically significant. Non-significant differences in expression patterns indicated by higher bars than lower but significant bars, are caused by higher variability in inter-assay performance of respective genes. An important parameter for us when selecting target genes, is that transcriptional alteration is highly sensitive to the treatment. Moreover, gene expression must be directly regulated by androgens/antiandrogens. For this purpose only genes bearing an ARE in were included in this study. In contrast to GAPDH or β -actin, ubiquitin expression was unaffected by cell treatment. Therefore, we chose ubiquitin for normalisation of target gene expression in the different treatment groups.

Finding that gene expression patterns in 22RV1 cells are altered in a time-dependent matter, suggests that studies on endogenous gene expression could be a useful tool for assaying compounds with potential androgenic/

antiandrogenic effects. After treatment with different compounds, each of them revealed a substance-specific expression pattern. *NKX3.1* proved to be the only gene, which was down-regulated in expression in all treatment groups. These observations contrast results of others [43], who were able to show that *NKX3.1* expression is up-regulated upon androgen treatment of LNCaP cells. Tetramethrin treatment for 6 h showed the weakest effect on gene expression. Using this compound in an androgen-receptor binding assay [40] revealed only weak relative binding activity and may therefore not be able to induce strong gene expression activity. In addition, it could be proven that various genes can respond differently to different putative androgens/antiandrogens. Nevertheless, using this system it remains unclear whether expression patterns found, will culminate in an androgenic/antiandrogenic effect when acting on a complex organism. To predict the influence of these compounds on man or livestock, animal-based in vivo assays still have to be carried out. They indicate complex changes in phenotype of test organisms as a result of various cell types interacting differently with the substances under study. Therefore, determination of androgenic/antiandrogenic effects leading to pathological alterations like cryptorchism, hypospadias, testicular cancer, prostate cancer and breast cancer still have to be analysed using animal experiments. Furthermore foetotoxic effects and impairment of fertility in the next generation can be assayed by animal experiments only.

On the other hand, reporter-gene assays are available to test androgenicity of chemicals or metabolites [20–23]. Concerning reporter-gene systems it has to be mentioned that artificially constructed plasmids are far apart from the more complex androgen dependent endogenous gene expression. Nevertheless, these assays show high sensitivity facilitating the distinction between receptor agonists and antagonists. However, expression of one gene of interest only can be measured in these systems, they are not suitable to achieve substance-specific expression patterns. Complex influences on gene expression like induction of one gene and repression of another one cannot be covered by reporter-gene assays. The third method established are the binding assays [16–19] that allow studies on binding efficiencies only. No statement concerning a functional bioresponse can be made. Distinction between different compounds concerning binding efficiencies can only be made in a “yes” or “no” manner. Therefore, these tests are hardly suited for functional analysis of substances. Due to the disadvantages of above-mentioned methods, we decided to choose an approach using an endogenous gene expression system. All this has been done with respect to characterisation and achievement of substance-specific expression pattern. Our test system revealed that changes in gene expression levels show a quantitative time-response-correlation. Results obtained, showed that cell harvest and gene expression analysis after 6 h of treatment is sufficient to get substance-specific expression patterns. In conclusion, applying an endogenous-gene expression system facilitates

the characterisation of the different activity spectra of androgenic/antiandrogenic substances.

References

- [1] R.J. Kavlock, G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, S. Kaattari, M. Luster, M.J. Mac, C. Maczka, et al., Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors a report of the US EPA-sponsored workshop, *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 4) (1996) 715–740.
- [2] A. Daxenberger, Pollutants with androgen-disrupting potency, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104 (2002) 124–130.
- [3] T. Colborn, C. Clemmens, *Chemically Induces Alterations in Sexual Functional Development, The Wildlife/Human Connection*, Princeton, Princeton Scientific, NJ, 1992.
- [4] E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N.E. Skakkebaek, Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *BMJ* 305 (6854) (1992) 609–613.
- [5] A. Giwercman, J.P. Bonde, Declining male fertility and environmental factors, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 27 (1998) 807–830.
- [6] A. Czeizel, Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia, *Lancet* 1 (8426) (1985) 462–463.
- [7] D. Forman, H. Moller, Testicular cancer, *Cancer Surv.* 19–20 (1994) 323–341.
- [8] H. Moller, Trends in incidence of testicular cancer and prostate cancer in Denmark, *Hum. Reprod.* 16 (2001) 1007–1011.
- [9] A.J. Sasco, Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? *APMIS* 109 (2001) 321–332.
- [10] A. Gies, Hormonell wirksame Substanzen in der Umwelt: ein Vorwort, in: 1995 Umweltbundesamt Texte 65/95 Seite 9, 1995.
- [11] A.J. Conway, D.J. Handelsman, D.W. Lording, B. Stuckey, J.D. Zajac, Use, misuse and abuse of androgens: The Endocrine Society of Australia consensus guidelines for androgen prescribing, *Med. J. Aust.* 172 (2000) 220–224.
- [12] P.A. Danhaive, G.G. Rousseau, Evidence for sex-dependent anabolic response to androgenic steroids mediated by muscle glucocorticoid receptors in the rat, *J. Steroid. Biochem.* 29 (1988) 575–581.
- [13] C.D.S. Tomlin, *The Pesticidemanual*, 11th ed., British Crop Protection Council, 1997, pp. 533–537.
- [14] A. Daxenberger, K. Meyer, M. Hageleit, H.H.D. Meyer, Detection of melengestrol acetate residues in plasma and edible tissues of heifers, *Vet. Quart.* 21 (1999) 154–158.
- [15] B. Le Bizec, P. Marchand, C. Gade, D. Maume, F. Monteau, F. Andre, Detection and identification of anabolic steroid residues in tissue by gas chromatography coupled to mass spectrometry, in: *Proceedings of the EuroPesticide IV Conference*, Veldhofen, The Netherlands, 8–10 May 2000, pp. 226–231.
- [16] E.R. Bauer, H.H.D. Meyer, P. Stahlschmidt-Allner, H. Sauerwein, Application of an androgen receptor assay for the characterisation of the androgenic or antiandrogenic activity of various phenylurea herbicides and their derivatives, *Analyst* 123 (1998) 2485–2487.
- [17] E.R. Bauer, A. Daxenberger, T. Petri, H. Sauerwein, H.H.D. Meyer, Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormone to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progestin receptor, *APMIS* 108 (2000) 838–846.
- [18] C.M. Taylor, B. Blanchard, D.T. Zava, A simple method to determine whole cell uptake of radiolabelled oestrogen and progesterone and their subcellular localisation in breast cancer cell lines in monolayer culture, *J. Steroid Biochem.* 20 (1984) 1083–1088.
- [19] S. Shafie, S.C. Brooks, Characteristics of the dextran-coated charcoal assay for estradiol receptor in breast cancer preparations, *J. Lab. Clin. Med.* 94 (1979) 784–798.
- [20] U. Fuhrmann, C. Bengtson, G. Repenthin, E. Schillinger, Stable transfection of androgen receptor and MMTV-CAT into mammalian cells: inhibition of cat expression by anti-androgens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 (1992) 787–793.

- [21] A.M. Viggaard, E.C.B. Joergensen, J.C. Larsen, Rapid and sensitive reporter-gene assay for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155 (1999) 150–160.
- [22] A.M. Vingaard, C. Hinda, J.C. Larsen, Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro, *Toxicology* 145 (2000) 173–183.
- [23] B. Terouanne, B. Tahiri, V. Georget, C. Belon, N. Poujol, F. Orio, P. Balaguer, C. Sultan, A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects, *Mol. Cell Endocrinol.* 160 (2000) 39–49.
- [24] P. Mak, C.Y. Young, D.J. Tindall, A novel yeast expression system to study androgen action, *Recent Prog. Horm. Res.* 49 (1994) 347–352.
- [25] K.W. Gaido, L.S. Leonard, S. Lovell, J.C. Gould, D. Babai, C.J. Portier, D.P. McDonnell, Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143 (1997) 205–212.
- [26] P. Sohni, J.P. Sumpter, Several environmental oestrogens are also anti-androgens, *J. Endocrinol.* 158 (1985) 327–339.
- [27] R. Poulin, D. Baker, D. Poirier, L. Labrie, Multiple actions of synthetic ‘progestins’ on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an in vitro model for the simultaneous assay of androgen, estrogen and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids, *Breast Cancer Res. Treat.* 17 (1991) 197–210.
- [28] R. Hockenbert, S. Luttmann, J. Hofmann, R. Kunzmann, F. Holzel, K.D. Schulz, Androgen sensitivity of the new human breast cancer cell line MFM-223, *Cancer Res.* 51 (1991) 5722–5727.
- [29] J.M. Bental, S.N. Birrell, M.A. Pickering, D.J. Holds, D.J. Horsfall, W.D. Tilly, Androgen receptor agonist activity of the synthetic progestin, medroxyprogesterone acetate in human breast cancer cells, *Mol. Cell Endocrinol.* 154 (1999) 11–20.
- [30] J. Szelei, J. Jimenez, A.M. Sato, M.F. Luizzi, C. Sonnenschein, Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor, *Endocrinology* 138 (1997) 1406–1412.
- [31] S. Yuan, J. Trachtenberg, G.B. Mills, T.J. Brown, F. Xu, A. Keating, Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary, *Cancer Res.* 53 (1993) 1304–1311.
- [32] R.M. Sramkoski, T.G. Pretlow, J.M. Giaconia, T.P. Pretlow, S. Schwartz, M.S. Sy, S.R. Marengo, J.S. Rhim, D. Zhang, J.W. Jacobberger, A new human prostate carcinoma cell line, 22RV1, *Dev. Biol.* 35 (1999) 403–409.
- [33] P. Darbre, J. Yated, S. Curtis, R.J.B. King, Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture, *Cancer Res.* 43 (1983) 349–354.
- [34] P. Chomczynski, A reagent for single-step simultaneous isolation of RNA, *DNA Protein Bio. Tech.* 15 (1993) 532–537.
- [35] T.B. Morrison, J.J. Weis, C.T. Wittwer, Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques* 24 (1998) 954–962.
- [36] R. Rasmussen, Quantification on the LightCycler®, *Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications*, Springer, Heidelberg, pp. 21–34.
- [37] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative Expression Software Tool (REST®) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e36.
- [38] M. Nagabhaushan, C.M. Miller, T.P. Pretlow, J.M. Giaconia, N.L. Edgehouse, S. Schwartz, H.J. Kung, P.H. Gumerlocl, P.H. Resnick, CWR22: the first human prostate cancer xenograft with strongly androgen-dependent and relapsed strains both in vivo and soft agar, *Cancer Res.* 56 (1996) 3042–3046.
- [39] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids Res.* 29 (2001) 2002–2007.
- [40] E.R. Bauer, N. Bitsch, H. Brunn, H. Sauerwein, H.H.D. Meyer, Development of an immuno-immobilised androgen receptor assay (IRA) and its application for the characterisation of the receptor binding affinity of different pesticides, *Chemosphere* 46 (2002) 1107–1115.
- [41] B.J.M. Kitty, C.E.M. Conny, Two androgen response regions co-operate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6379–6388.
- [42] R.S. Israeli, C. Thomas Powell, J.G. Corr, W.R. Fair, W.D.W. Heston, Expression of the prostate-specific membrane antigen, *Cancer Res.* 54 (1994) 1807–1811.
- [43] W.W. He, P.J. Sciavolino, J. Wing, M. Augustus, P. Hudson, P.S. Meissner, A novel human prostate-specific, androgen-regulated Homeobox gene (*NKX3.1*) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer, *Genomics* 43 (1997) 69–77.
- [44] B. Lin, C. Fergusson, J.T. White, S. Wang, R. Vessella, L.D. Tue, L. Hood, P.S. Nelson, Prostate-localised and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease *TMPRSS2*, *Cancer Res.* 59 (1999) 4180–4184.
- [45] L. Ravenna, C. Lubrano, F. Di Silverio, A. Vacca, M.P. Felli, M. Maroder, Androgenic and antiandrogenic control on epidermal growth factor, epidermal growth factor receptor in human prostate cancer cell line LNCaP, *Prostate* 26 (1995) 290–298.
- [46] L.L. Xu, N. Shanmungam, T. Segawa, I.A. Sesterhaenn, D.G. McLeod, J.W. Moul, S. Srivastava, A novel androgen-regulated gene, *PMEPA1*, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate, *Genomics* 66 (2000) 257–263.

PUBLIKATIONSBEITRAG

(A) **Hartel A**, Didier A, Ulbrich SE, Wierer M, Meyer HHD

Characterisation of steroid receptor expression in the human prostate carcinoma cell line 22RV1 and quantification of androgen effects on mRNA regulation of prostate specific genes

J Steroid Biochemistry & Molecular Biology, received 24 November 2003, accepted 13 July 2004 in press



Characterisation of steroid receptor expression in the human prostate carcinoma cell line 22RV1 and quantification of androgen effects on mRNA regulation of prostate-specific genes

A. Hartel*, A. Didier, S.E. Ulbrich, M. Wierer, H.H.D. Meyer

Physiology Weihenstephan, TU Munich, Weihenstephaner Berg 3, D-85354 Freising, Germany

Received 24 November 2003; accepted 13 July 2004

Abstract

In this study, the effect of natural androgens on the expression of androgen-regulated genes in the human prostate carcinoma cell line 22RV1 was characterised. To clarify the usefulness of the cells for in vitro studies concerning activation of androgen responsive genes by various steroidal compounds steroid receptor expression patterns had to be characterised intensively. Expression of androgen receptor (AR), estrogen receptor α (ER α) and β (ER β), progesterin receptor (PR) and glucocorticoid receptor α and β was investigated by the means of RT-PCR, immunocytochemistry, ligand binding or Western blot. 22RV1 cells were proved to express androgen receptor and less glucocorticoid receptor β on mRNA level. The confirmed mutation of the androgen receptor at codon H874 slightly apart from the steroid binding pocket seemed not to cause alteration of natural steroid hormone binding. mRNA expression of all progesterin and estrogen receptor isoforms as well as glucocorticoid receptor α could not be detected. To study functional relevance of above-mentioned findings nine androgen-regulated genes were chosen to characterise the cell line and to determine androgenic effects using highly sensitive real-time RT-PCR. Addition of the three natural steroids dihydrotestosterone (DHT), testosterone, and 19-nortestosterone significantly influenced mRNA expression profiles. All compounds under study showed clear time-dependent and androgen-specific effects on transcriptional level. The results demonstrate that the cultivated human prostate carcinoma epithelial cells have a hormonal sensitivity correlated with the presence of specific receptors and can, therefore, serve as a selective model to study hormone action.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Carcinoma; Prostate; Steroid receptor expression

1. Introduction

Gonadal steroid hormones do not only exert effects in organs related to reproductive function [1,2] or muscularity [3], but also in tissues that were not regarded as classical targets so far. The effects of steroid hormones are mediated through interaction with specific intracellular receptors, which are members of the nuclear receptor family [4,5]. Numerous tissues were shown to express mRNA transcripts for both estrogen receptors, subtypes estrogen receptor α (ER α) and β (ER β) [6–9], androgen receptor (AR) [10–12] and progesterin receptor (PR) [3,13]. However simultaneous occurrence of

steroid receptors can be seen, e.g. in bovine skeletal muscle [14] or in bovine gastrointestinal tract [15,16]. Adams et al. [17] reported for the first time, the existence of ER β on the protein level in the morphologically normal developing human fetal prostate. Androgen receptor gene expression in the monkey and dog uterus, that are typical organs for estrogen and progesterin receptor expression, was observed by Adesanya-Famuyiwa et al. [18] and Sauerwein et al. [19]. Furthermore, organ specific cell culture systems showed expression of other steroid receptors at low concentrations, e.g. the human breast cancer cell line ZR-751 [20] and human breast cancer cells MFM-223 [21].

A cell line expressing only androgen receptor will be advantageous to study selective hormonal activity. The cell line 22RV1 was established from a human prostatic carcinoma

* Corresponding author. Tel.: +49 8161 715552; fax: +49 8161 714204.
E-mail address: anita.hartel@wzw.tum.de (A. Hartel).

27 xenograft (CWR22R) that was serially propagated in mice af-
28 ter castration-induced regression and relapse of the parental,
29 androgen-dependent CWR22 xenograft [22]. In the present
30 study steroid receptor expression was characterised in above-
31 mentioned cells more detailed than currently known. Addi-
32 tionally, the role of AR-regulated genes (ARG) in androgen-
33 independent growth of 22RV1 cells was investigated.

34 The androgen receptor is a member of the nuclear recep-
35 tor superfamily [23,24] that functions as a ligand-inducible
36 transcription factor mediating expression of target genes in
37 response to receptor-specific ligands. Alteration of these reg-
38 ulation processes by environmental endocrine disruptors or
39 modified physiological androgen production can cause in-
40 complete masculinisation of the fetus and possibly impaired
41 male fertility in adults [25,26]. Endocrine disruptors are ex-
42 ogenous substances or mixtures that alter functions of the
43 endocrine system and cause adverse health effect in an intact
44 organism, or its progeny, or (sub)populations [59].

45 Our aim was to establish a system showing a gene expres-
46 sion profile selectively regulated via androgen receptor—a
47 system almost devoid of other steroid receptors unlike avail-
48 able biological tissues and most cell lines. Hence, the cell
49 line 22RV1 was screened for steroid hormone receptors at the
50 mRNA or protein level. Additionally, the AR was sequenced
51 at the ligand pocket region and relative binding of natural
52 steroid hormones was estimated. For expression profiling we
53 identified nine androgen-regulated genes (AR, PSA, PSM,
54 Drg1, TMPRSS2, PMEPA1, NKX3.1, 5 α -reductase, cycline
55 d1): AR is part of the steroid receptor family. Prostate-specific
56 antigen (PSA) is a member of the human kallikrein gene fam-
57 ily, and is well known as a prostate-specific tumour marker
58 [27]. Prostate-specific membrane antigen (PSM), a trans-
59 membrane glycoprotein is almost entirely prostate specific,
60 as is PSA. They may enable further delineation of the unique
61 functions and behaviour of the prostate [28]. Differentiation-
62 related gene (Drg1) is a gene showing to be diminished in
63 colon, breast and prostate tumours [29]. Serine protease (TM-
64 PRSS2) plays a role in prostate carcinogenesis [30]. PMEPA1
65 gene, along with other highly androgen-induced prostate-
66 specific genes, has potential to serve as an androgen sig-
67 nalling read-out biomarker in prostate tissue [31]. NKX3.1 is
68 a candidate gene for opposing processes of androgen-driven
69 differentiation of prostatic tissue and loss of differentiation
70 during the progression of prostate cancer [32]. The enzyme
71 steroid 5 α -reductase catalyses the conversion of testosterone
72 into the more powerful androgen, dihydrotestosterone [33].
73 Expression pattern of some genes had been assayed in an
74 earlier study [34].

75 2. Materials and methods

76 2.1. Reagents

77 Dihydrotestosterone (DHT, 5 α -androstan-17 β -ol-3-one)
78 was received from Sigma–Aldrich (Germany). Testosterone

(4-androsten-17 β -ol-3-one) and 19-nortestosterone (NT,
17 β -hydroxy-4-estren-3-one) were obtained from Sigma.
Charcoal (Norit A), and dextran (research grade, MG
65,000–73,000) were purchased from Serva (Germany). All
steroids were dissolved in ethanol p.a. (final ethanol concen-
tration was less than 0.1%).

2.2. Cell culture

22RV1 cells were obtained from Deutsche Sammlung
von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH,
Germany, ACC 438) and routinely cultured in 40%
RPMI 1640 medium, 40% Dulbecco's MEM supplemented
with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) plus
100,000 units/l penicillin and 100 mg/l streptomycin (Sigma,
Germany). Steroids were removed from FBS as described by
Darbre et al. [35]. All media were obtained from Gibco-BRL
(USA). Cells were split 1:6 every 7 days and cultures were
maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.3. RNA preparation, RT and real-time PCR

Total RNA was isolated from 22RV1 cells using peq-
Gold TriFast™ (peqLab Biotechnologie GmbH, Germany)
with the guanidinium–isothiocyanate method [36] according
to the manufacturer's instruction. Synthesis of first strand
cDNA was performed by using 1000 ng total RNA and 200
U MMLV-reverse transcriptase (Promega, USA) according
to the manufacturer's protocol. RT reaction was carried out
in 40 μ l reaction volume in a gradient cycler (Tgradient,
Biometra®, Germany). All measurements of nucleic acid
concentration were performed at 260 nm (OD₂₆₀) in a spec-
trophotometer (BioPhotometer®, Eppendorf, Germany).

Expression of steroid receptors was investigated using
listed primers (Table 1). Subsequently, PCR products were
subjected to gel-electrophoresis in 1.5% agarose gels contain-
ing 0.5 μ g/ml ethidium bromide. Quantification of genes of
interest was carried out in a LightCycler® (Roche Diagnostic,
Germany) using LightCycler® DNA Master SYBR® Green
I technology [37]. Master mixes for each PCR run were pre-
pared as follows: 6.4 μ l water, 1.2 μ l MgCl₂ (4 mM), 0.2 μ l
forward primer (20 pmol), 0.2 μ l reverse primer (20 pmol)
and 1 μ l Fast Start DNA Master SYBR® Green I mix (Roche
Diagnostics, Germany). Master mix (9 μ l) were combined
with 1 μ l (25 ng) reverse transcribed total RNA. Each sam-
ple was subjected to 40 PCR cycles (15 s at 95 °C for denat-
uration, 10 s at corresponding annealing temperature, 20 s at
72 °C for elongation and 3 s at 75–83 °C for a single fluores-
cence measurement). Primers for all nine androgen-regulated
genes were designed using HUSAR-software (DKFZ, Hei-
delberg) and synthesised by MWG Biotech (Germany). We
performed “second derivate maximum method” to deter-
minate the crossing point using LightCycler Software 3.5
(Roche Molecular Biochemicals). Crossing point is defined
as the point at which the fluorescence rises appreciably above
the background fluorescence [37]. In the “second derivate

Table 1
Selected androgen-regulated genes and steroid receptors in human prostate carcinoma cell line

Identity	Accession no.	Upstream primer	Downstream primer	Size (bp)
PR	M15716	GAGAGCTCATCAAGGCAATTG	CACCATCCCTGCCAATATCTTG	227
ER α	NM000125	AGGGAAGCTCCTATTGCTCC	CGGTGGATGTGGTCTTCTCT	234
ER β	NM001437	GCTTCGTGGAGCTCAGCCTG	AGGATCATGGCCTTGACACAGA	262
GR α	M10901	GAA GAG GGA GAT GGA GAC TG	TGT TGG AAT GAG AAG GGT GG	119
GR β	AA814178	TTA CCA CAA CTC ACC CCTAC	CAG AGC AAA TGC CAT AAGAAAC	252
AR	M63505	TTGATTTTTCAGCCCATCCACTGGA	CCTGGTTTTCAATGAGTACCGCATTG	217
Ubiquitin	NM174133	AGTCGACCCTGCACCTGGT	GCTCCACCTCCAGGGTGA	194
PSA	AF113132	TGTCCGTGACGTGGATTG	GGTCCACTGCTCCTCTGAG	159
5 α red	M32313	CCTAAATACGTGAAATGGAGG	CACACTTGGCAAGACATAGCC	131
TMPRSS2 β	AF270487	AAGCTGCAGAAGCCTCTGAC	CAGCGTTCAGCACTTCTGAG	151
PSM	M99487	TCAGCACCACCAGATAGCAG	GGTCCACTGCTCCTCTGAG	170
PMEPA1	AF224278	GGCAGAACAACCTCCGCGCTTCTTAG	CAAGCTCTCTTAGCTTGTGCATTG	146
NKX3.1	U80669	GCCAAGAACCTCAAGCTCAC	TCATAATGGTTGTACCTGAGC	261
Drg1	AF078103	TACGGTGTGACCTCATTTG	GGTGATGGGCAGAGATGG	149
Cycline D1	NM053056	CACGTCCAGGTTCAACCC	TGCCTCAAAGTCTCTGTTG	195

GenBank accession numbers indicate gene sequences primers were designed from.

131 maximum method”, a second derivative maximum within the
132 exponential phase of the amplification curve is linearly re-
133 lated to a starting concentration of template cDNA molecules
134 [37]. The PCR-product length was verified by gel elec-
135 trophoresis as a single band at the expected length (data not
136 shown). The specificity of the bands was confirmed by the
137 melting curve analysis of LightCycler software 3.5.

138 2.4. Statistics

139 Statistical analysis of group differences was done by pair
140 wise fixed reallocation randomisation test, which is imple-
141 mented in the REST-XL software [38,39]. Differences in ex-
142 pression between control and treated samples were assessed
143 in group means for statistical significance by randomisation
144 tests. The mathematical model was based on the PCR effi-
145 ciency and the group mean crossing point difference between
146 the treated versus the control group. The corresponding real-
147 time PCR efficiency (E) in the exponential phase was cal-
148 culated using the equation $E = 10^{[-1/\text{slope}]}$, applied to a dilu-
149 tion series ranging from 0.20 pg to 50 ng DNA in triplicate
150 [23].

151 All data were statistically processed in SigmaPlot® 2000
152 (SPSS Inc., USA) and SigmaStat® 2.0 (Jandel Corporation,
153 USA).

154 2.5. Radio receptor assay, relative binding affinities 155 (RBA) and Western blot analysis

156 The protein concentration was evaluated with the BCA
157 technique [40]. The AR assay and RBA estimation were per-
158 formed as described previously [41].

159 For protein extraction approximately 10^8 cells were ho-
160 mogenised in lysis buffer (PBA) containing protease in-
161 hibitor. Protein samples (4.4 μg per lane) were separated
162 on a 4–12% Bis-Tris Gel (NuPage, Invitrogen, CA, USA)
163 in MOPS running buffer and transferred onto nitrocellulose

164 membranes. Membranes were blocked with 1% skim milk
165 powder in TBS-Tween (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4,
166 0.1% Tween 20) over night followed by incubation with
167 a monoclonal antibody against PR (Clone 10A9, Coulter
168 Immunotech, Marseille, France), ER α (2–185, Santa Cruz
169 Biotechnology, CA, USA) or ER β (PA1-311 Affinity BioRe-
170 agents Inc., Golden, CA) in TBS-Tween, 1% dried skim milk
171 powder, for 75 min at room temperature. Antibody-dilutions
172 used were 1:200 (ER α), 1:500 (ER β) and 1:50 (PR), respec-
173 tively. After three times washing in TBS-Tween, 1% skim
174 milk powder, the membranes were incubated with anti-mouse
175 (ER α , PR) or anti-rabbit (ER β) horseradish peroxidase-
176 conjugated IgG secondary antibody (DAKO, Hamburg, Ger-
177 many) at a dilution of 1:2000 in TBS-Tween, 1% skim milk
178 for 45 min at room temperature. After washing in TBS-Tween
179 and TBS alone the membrane was incubated with enhanced
180 chemiluminescence reagent detection solution (Amersham,
181 Buckinghamshire, UK) for 3 min in the dark. An X-ray film
182 was exposed to the membrane to visualise protein expression.
183 As a positive control recombinant human ER α or PR protein
184 (Sigma, Munich, Germany) was used at a concentration of
185 30 ng per lane.

186 2.6. Immunocytochemistry of steroid receptors

187 Localisation for PR was performed as described previ-
188 ously [42]. The 22RV1 cells were cultured on microscope
189 slides with a silicone insert. The slides were fixed for 5 min
190 in 4% formaldehyde. Endogenous peroxidase activity was
191 blocked by incubation in 1% hydrogen peroxidase for 30 min
192 at room temperature. Non-specific binding was blocked by
193 goat serum (1:10 dilution in PBS-buffer) for 30 min at room
194 temperature. A primary antibody was added to each well
195 and the slides incubated in a humidified chamber at 4 °C
196 over night. A monoclonal mouse anti-PR antibody (MA1-
197 410 Affinity BioReagents Inc., Golden, CA) was used; it de-
198 tects both PR-A 94 kDa and PR-B 120 kDa protein isoforms

199 by staining at a concentration of 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. The ER α mouse
 200 monoclonal antibody from clone 1D5 (Coulter Immunotech
 201 Diagnostics, Germany) was applied at a dilution of 1:100. A
 202 rabbit polyclonal antibody (PA1-311 Affinity BioReagents
 203 Inc., Golden, CA) raised against the N-terminal region of
 204 ER β (amino acids 54–71 of rat ER β sequence, EMBL ac-
 205 cession number AJ002603: AEPQKSPWCEARSLEH) was
 206 incubated as described by Rosenfeld et al. [43]. For control
 207 sections either primary or secondary antibody were omit-
 208 ted and replaced by buffer. Sections were incubated with
 209 DAB (3,3'-diaminobenzidine hydrochloride from Sigma, Ger-
 210 many) alone to exclude residues of endogenous peroxidase
 211 activity. A lack of staining of controls showed the antigen
 212 specificity. After the incubation of PR or ER α , horseradish
 213 peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG (DAKO, Hamburg,
 214 Germany) diluted at 1:200 was applied at room temperature
 215 for 1 h. Incubation of ER β was followed by undiluted HRP-
 216 labelled goat secondary antibody detection systems against
 217 rabbit IgG (DAKO En-VisionTM+, Hamburg, Germany) on
 218 equal terms. Peroxidase was visualised by applying 0.01%
 219 DAB and 0.01% hydrogen peroxide in PBS-buffer for 10 min
 220 in darkness at room temperature.

221 2.7. Functional expression studies and AR 222 sequencing

223 Cells were seeded in medium containing 20% charcoal-
 224 stripped FBS for 72 h before treatment with steroids and al-
 225 lowed to form a 60–70% confluent monolayer. DHT, testos-
 226 terone or 19-nortestosterone (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M) was added
 227 and cells were harvested 0, 6, 24, 48 and 72 h after stimula-
 228 tion for RNA extraction. Control cultures were continuously
 229 grown in steroid-depleted untreated medium for the same
 230 time intervals.

231 The CWR22 mutant AR exon H was amplified using two-
 232 step PCR method as described [44,45]. The amplified frag-
 233 ments were commercially sequenced to specify the gained
 234 PCR product (Medogenomix, Germany).

235 3. Results

236 3.1. Receptor mRNA identification, primer and real-time 237 RT-PCR product specificity

238 In humane prostate epithelial cell line 22RV1 mRNA
 239 of AR und GR β were detected by real-time RT-PCR. Nei-
 240 ther mRNA of estrogen receptor α and β (ER α and ER β)
 241 nor mRNA of three isoforms of progesterin receptor (PR)
 242 and glucocorticoid receptor α could be found. Addition-
 243 ally, the intensity of androgen receptor expression was sig-
 244 nificantly higher by the factor five than expression of GR β
 245 on mRNA level. The effect of hydrocortisone via the GR β
 246 on the expression of the investigated genes was tested, but
 247 no significant effect was observed (data not shown). Speci-
 248 ficity of the desired products in 22RV1 cell line total RNA
 249 were documented by high resolution gel electrophoresis
 250 (Fig. 1), and additionally by melting curve analysis (data not
 251 shown).

252 3.2. In vitro protein expression

253 Protein expression for ER α , ER β and PR was tested in
 254 vitro with monoclonal anti-receptor antibodies by Western
 255 blot analysis. In vitro expression for AR protein was tested
 256 with radio receptor assay. Western blot revealed three
 257 isoforms of PR in the positive control of endometrium but
 258 was negative in 22RV1 cells (Fig. 2C). Observed bands
 259 correspond to 116, 92 and 65 kDa molecular weight, thus
 260 representing PR isoforms A, B and C [46]. The antibody
 261 against ER α detected a 60 kDa band in the positive control
 262 (endometrium) and was negative in the 22RV1 samples
 263 (Fig. 2A). The antibody against ER β identified two bands at
 264 approximately 62 and 58 kDa in the control endometrium in
 265 contrast to cell line samples where no band was detectable
 266 (Fig. 2B). 22RV1 human prostate carcinoma cells contained
 267 active androgen receptor at a binding capacity of 9.8 fmol/mg
 268 protein.

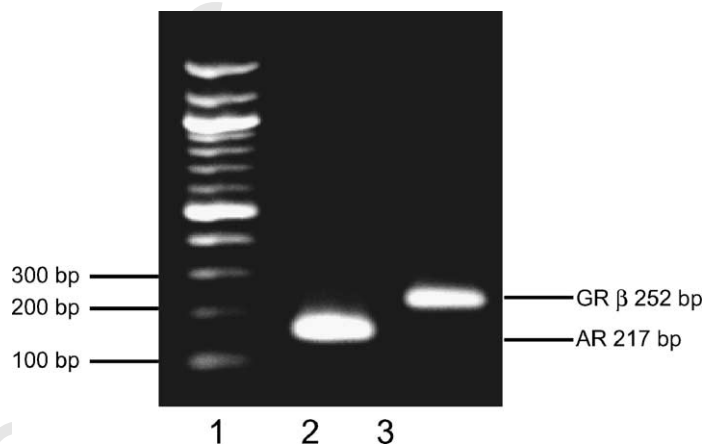


Fig. 1. Expression of AR and GR β (lane 1: MassRleTM DNA Ladder Mix; lane 2: AR RT-PCR product; lane 3: GR β RT-PCR product) in 22RV1 cell line.

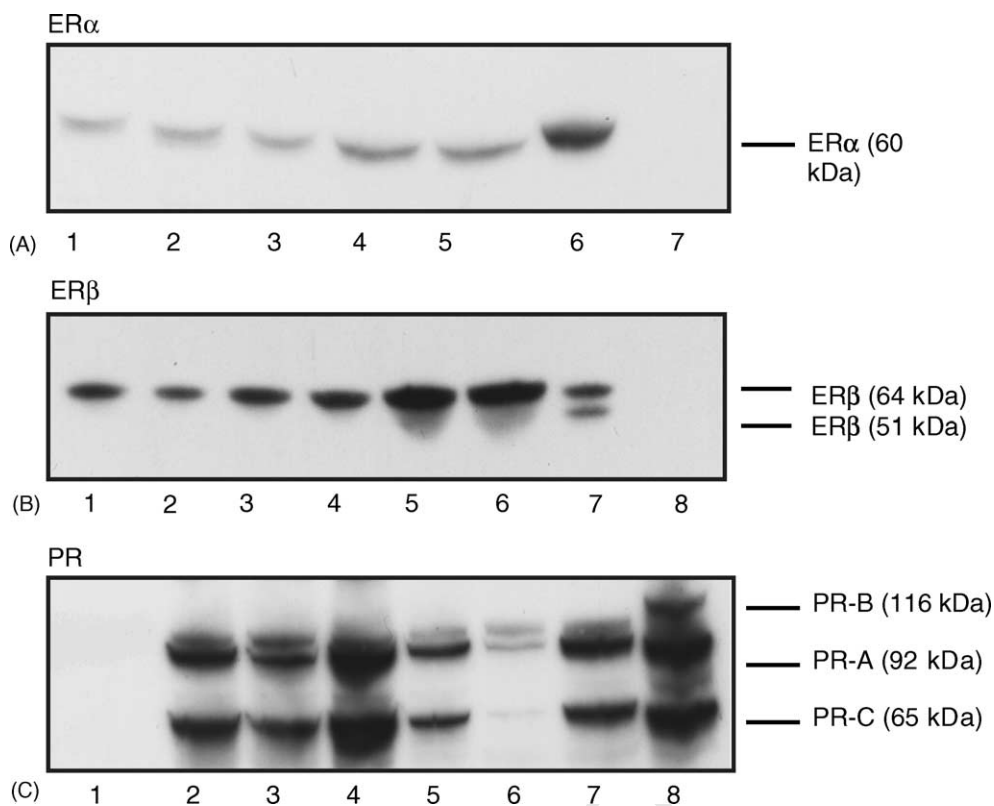


Fig. 2. Western blot analysis of ER α , ER β and PR of 22RV1 cells. (A) Lanes 1–5: endometrium; lane 6: ER α protein; lane 7: 22RV1 cell line. (B) Lanes 1–6: endometrium; lane 7: ER β protein; lane 8: 22RV1 cell line. (C) Lane 1: 22RV1 cell line; lanes 2–7: oviduct; lane 8: PR protein.

269 The order of relative binding affinities to the natural
 270 steroids was DHT > testosterone > estradiol > progesterone.
 271 The highest RBA to the AR showed the natural ligands DHT
 272 (100%) and testosterone (35%), in comparison the hormones
 273 estradiol and progesterone had low affinities of 7.4 and 3.6%,
 274 respectively (RBA for recombinant human wild type AR:
 275 DHT 100%, testosterone 31.3%, estradiol 4.9% and proges-
 276 terone 3.8% [47]).

277 Automated sequencing of androgen receptor exon H DNA
 278 from 22RV1 cells detected a C to T mutation at position 4046,
 279 numbered according to Lubahn et al. [44], that changed codon
 280 874 from CAT coding for histidine to TAT coding for tyrosine.
 281 In the region analysed only mutation H874 was found. No
 282 similar indication of an AR gene mutation was detected in
 283 exons A through G.

284 3.3. *In vitro* ER α , ER β and progesterin receptor protein 285 localisation

286 The PR protein was also not detectable by immunocy-
 287 tochemical methods using monoclonal antibody MA1-410.
 288 An intensive staining of nuclei was found in oviduct ep-
 289 ithelial cells before and after Mayer Haemalaun counterstain
 290 (Fig. 3). The immunocytochemical evaluation of ER α , ER β
 291 with monoclonal antibodies revealed a negative reaction in
 22RV1 cells (Fig. 4).

3.4. Steroid treatment

292 Results of mRNA profiles upon androgen stimulation dur-
 293 ing a 72 h time course are depicted in Figs. 5–7. As gene
 294 expression was similar for all three concentrations applied
 295 in this study, results were taken together and depicted as
 296 average value of concentrations 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M. DHT
 297 and testosterone showed similar expression pattern and will
 298 therefore be discussed together. The majority of androgen-
 299 responsive genes were clearly up-regulated up to 48 h of
 300 treatment. Thereafter especially TMPRS2, NKX3.1 and PSM
 301 were significantly down-regulated. In contrast to DHT that
 302 poses an up-regulatory effect on six genes during the overall
 303 period of time, this up-regulation weakens upon testosterone
 304 application within 24 h.
 305

306 For 19-nortestosterone a bi-phased effect could be ob-
 307 served. Up-regulation of all genes under study that was
 308 found after 6 h turned into down-regulation of six target
 309 genes within the 24 h incubation period. From this time on-
 310 ward the majority of target genes proved to be up-regulated
 311 again. Down-regulatory effects after 48 and 72 h of 19-
 312 nortestosterone exposure were not as strong as those seen af-
 313 ter DHT and testosterone treatment. For almost all androgen-
 314 responsive genes detected in the screening, the changes in
 315 gene expression were detectable within 6–24 h, suggesting
 316 that they are primary effects of androgens. The secondary

(A) PR

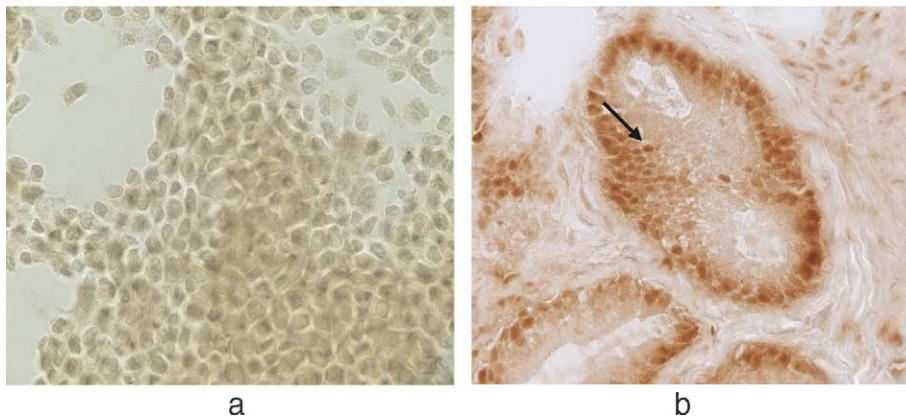


Fig. 3. Immunocytochemical localisation of PR. (a) Nuclei of 22RV1—negative; (b) oviduct epithelial cells—positive control (both 40× magnification).

317 effect was observed after 24 h. Upon stimulation with 19-
 318 nortestosterone a “shock-reaction” was observed after 6 h—all
 319 genes were up-regulated. After 48 h the expression pattern
 320 stabilised, and all genes showed characteristic expression ef-
 321 fects. The minimal AR expression was observed after 24 h,
 322 afterwards, expression strongly increased.

323 PSA, a prostate-specific tumour marker gene showed,
 324 as expected, up-regulation with all substances during the
 325 whole time of the experiment. After stimulation with
 326 DHT and testosterone up-regulation of 5 α -reductase gene
 327 was observed. Upon treatment with 19-nortestosterone up-
 328 regulation of 5 α -reductase is shifted to 48 h after stimulation.

329 DHT and testosterone prevented mRNA induction of PSM
 330 after 48 and 72 h. Maximal down regulation was observed
 331 after 72 h (1.85-fold). High expression of cyclin d1 (1.49-
 332 fold) was observed after 6 h stimulation with testosterone.

333 4. Discussion

334 The human prostate carcinoma cell line 22RV1 has been
 335 established 5 years ago [22] from the CWR22 xenograft. Nev-
 336 ertheless, detailed information on steroid receptor expres-
 337 sion of this cell line was not available from current literature.
 338 Herein we show an overview on steroid receptor expression
 339 on both mRNA and protein level. The fact that neither ER α ,
 340 ER β nor PR and GR α are expressed on mRNA and protein
 341 level indicates that interferences of compounds under study
 342 with respective receptor mediated gene activation pathways
 343 can be excluded. The human prostate carcinoma cell line pro-
 344 duces human androgen receptor almost devoid of any other
 345 steroid hormone receptor—in contrast, receptor preparation
 346 of animal or human tissues in principle contain all receptors.
 347 Interaction with GR β during treatment with androgenic lig-
 348 ands cannot be excluded completely, because this receptor
 349 is present on mRNA level. Anyhow, activation with hydro-
 350 cortisone did not affect expression of the genes investigated
 351 here and transcripts of AR are the predominate ones showing
 352 five-fold higher expression levels.

353 One potential limitation in using a CWR22 derived model
 354 might be the mutation at amino acid 874 from histidine to ty-
 355 rosine [48]. Sequencing of AR exon H from 22RV1 cells con-
 356 firmed the mutation at codon 874 close to the steroid binding
 357 pocket. Anyhow, relative binding affinity of natural steroids to
 358 AR from 22RV1 cells was very similar to wild type AR what
 359 agrees with an observation in CRW22 xenografts showing in
 360 vivo preservation of steroid specificity [49]. The induction of
 361 transcriptional activity in both mutant and wild type AR with
 362 higher concentrations natural steroid concentrations seems
 363 likely.

364 Taking into account this information 22RV1 cells seem
 365 to be highly suitable for our scientific approach. For the first
 366 time, we could prove that 22RV1 cells can be used for studies
 367 on endocrine disrupting potential of various compounds by
 368 selective expression analysis of androgen receptor regulated
 369 genes. For estrogen-responsive genes such a system is already
 370 available [50]. It is another major advantage of our system that
 371 cell growth is independent from the presence of androgens in
 372 the culture medium. Growth over 72 h in androgen depleted
 373 control medium does have no negative effect on cell viability
 374 and transcriptional potential.

375 Second important point in our study was to test the func-
 376 tionality of our cell culture based expression system in the
 377 presence of naturally occurring androgens. This question was
 378 covered by time and concentration dependent stimulation of
 379 22RV1 cells with three endogenous androgens. An in vitro
 380 system like ours contrasts the approach of reporter gene-
 381 assays. These test systems mainly focus on the expression
 382 of a single gene being under control of a respective steroid
 383 promoter region. In contrast our cell culture allows analysis
 384 of various androgen-responsive genes that are relevant under
 385 in vivo conditions.

386 22RV1 cells react to androgens with specific alteration of
 387 gene expression pattern in comparison to untreated control
 388 cells. Higher effects of DHT on transcription reflect that it is
 389 a more potent ligand for AR compared to testosterone. Inter-
 390 estingly, 5 α -reductase is more consistently expressed in DHT
 391 than in testosterone treated cells. 19-Nortestosterone that is

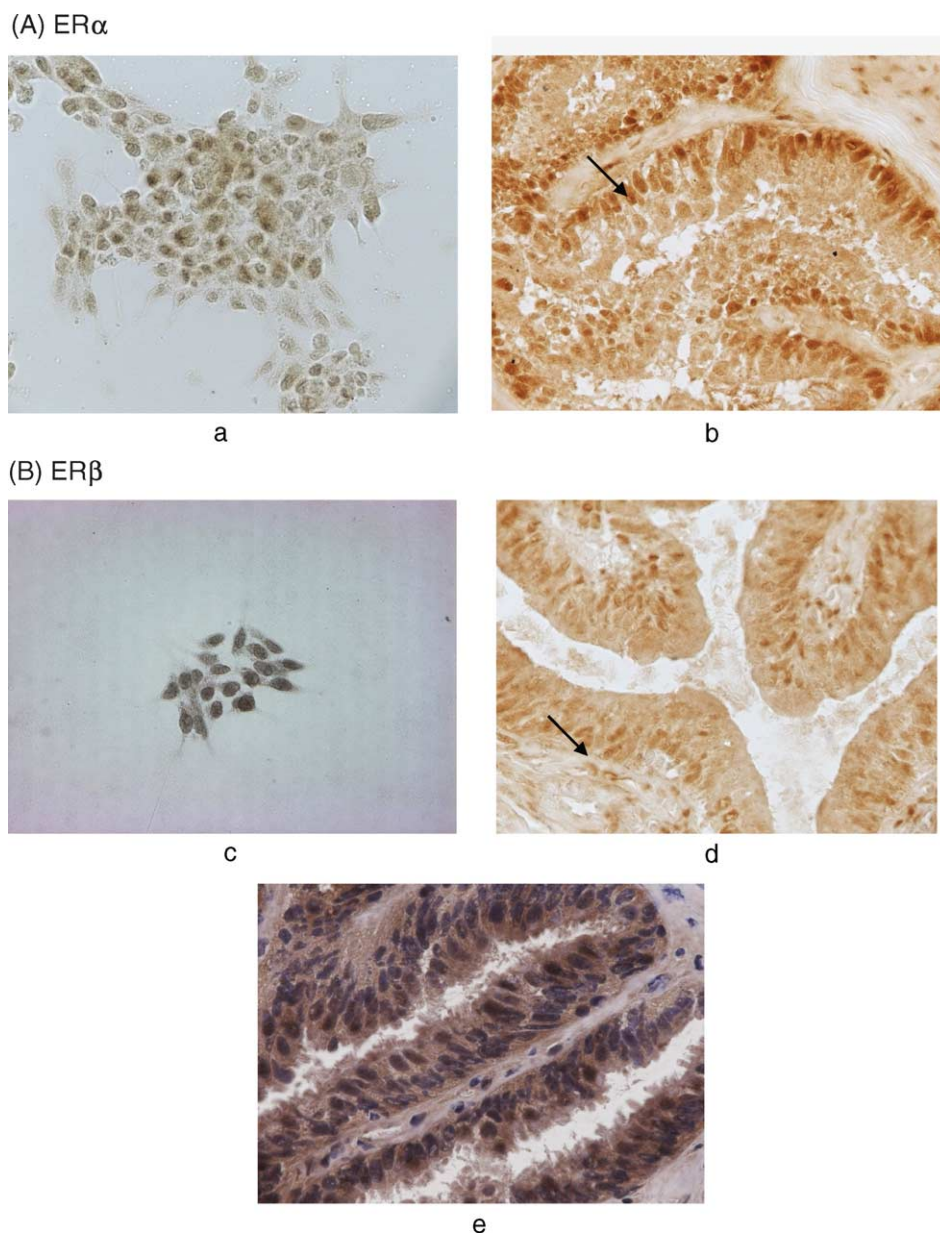


Fig. 4. Immunocytochemical localisation of ER α and ER β . A(a): ER α in the nuclei of 22RV1—negative; A(b): oviduct epithelial cells—positive control. B(c): ER β in the nuclei of 22RV1 cells—negative; B(d): oviduct epithelial cells—positive control; B(e): oviduct epithelial cells after Mayer Haemalaun counterstain (40 \times magnification).

392 structurally more different exhibits a modified gene expres-
 393 sion pattern with bi-phased up-regulation of target genes.
 394 19-Nortestosterone is known to be more resistant to bio-
 395 transformation in vivo than DHT or testosterone. This resis-
 396 tance may explain strong up-regulation after 48 and 72 h.
 397 Nevertheless, it remains unclear why transcriptional activity
 398 is mostly down-regulated after 24 h. The fact that AR ex-
 399 pression increased only after 24 h could be explained by the
 400 low AR concentration in 22RV1 cells (10 fmol/mg protein)
 401 and a longer activation period of AR. Expression of PSA
 402 mRNA is androgen-regulated [27] and after treatment with
 403 19-nortestosterone up-regulation of PSA genes was observed
 404 only after 48 h. Due to the fact that 19-nortestosterone is less

active compared to the other androgens, a longer regulation
 period is probably needed.

The non-identical effects of androgens on androgen-
 regulated genes (ARG) mRNA turnover in this cell line sug-
 gest that different mechanisms are involved in maintaining
 ARG mRNA expression. Presumably, the regulation of ARG
 in prostate carcinoma cell line is as complex as in intact
 prostate tissues [51]. This complexity necessitates future de-
 tailed studies on the molecular basis of androgenic regulation
 of ARG in prostate carcinoma cell lines.

Lately much attention has been turned to the potential ad-
 verse effects of endocrine disruptors to human health [52–57]
 or to the physiologically delicate hormonal balance e.g. by

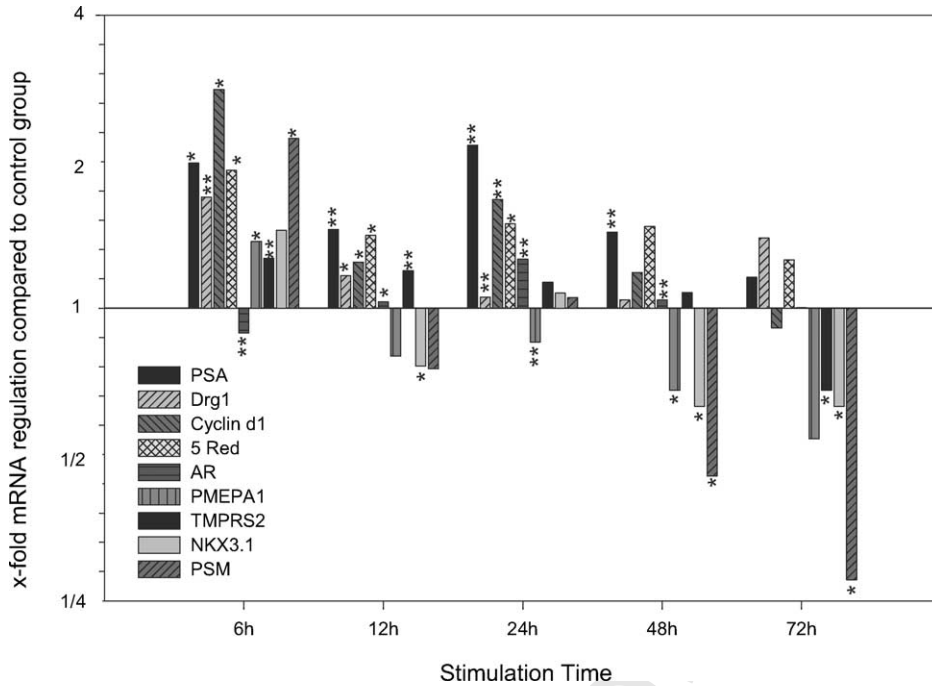


Fig. 5. Time response to testosterone (calculated mean values at 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M testosterone) induction of mRNA expression level in 22RV1 cells in comparison with untreated control (each $n=9$). Expression changes were shown as x -fold up- or down-regulation (mean \pm S.D.). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicate significant differences between treatment groups.

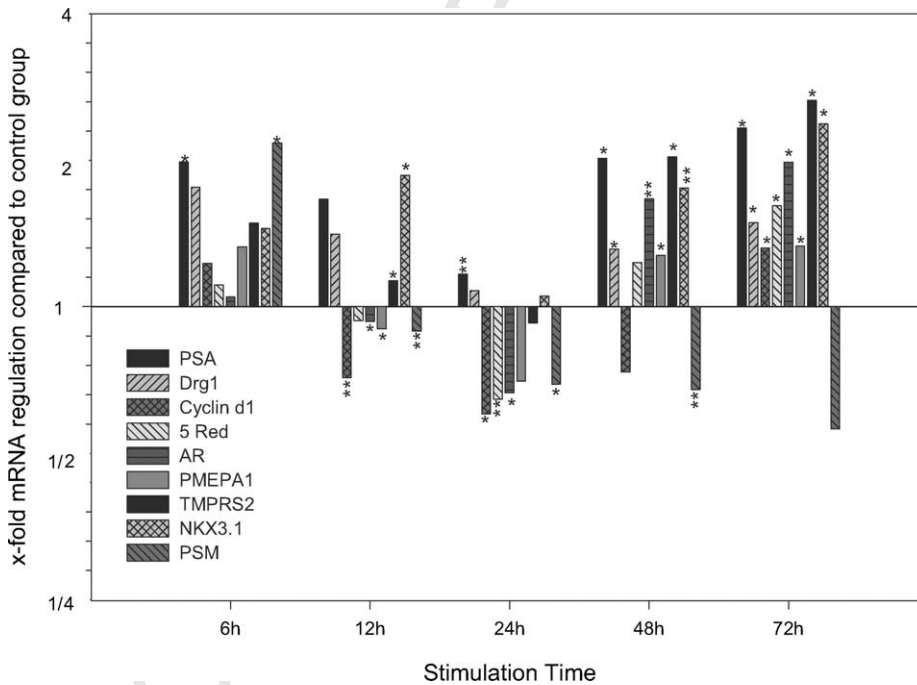


Fig. 6. Time response to 19-nortestosterone (calculated mean values at 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M 19-nortestosterone induction of mRNA expression level in 22RV1 cells in comparison with untreated control (each $n=9$). Expression changes were shown as x -fold up- or down-regulation (mean \pm S.D.). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicate significant differences between treatment groups.

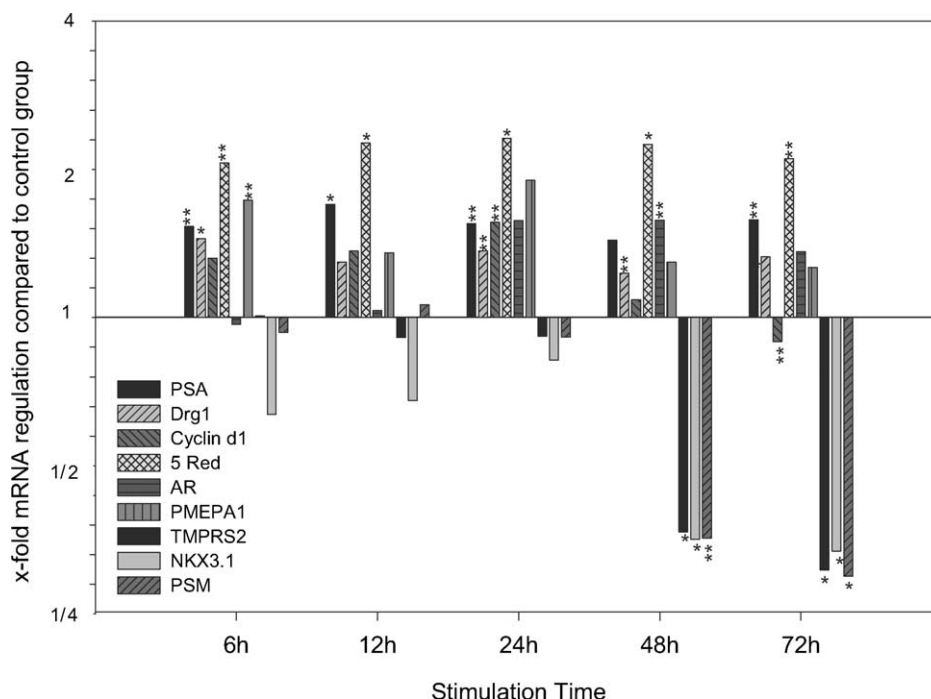


Fig. 7. Time response to DHT (calculated mean values at 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M DHT) induction of mRNA expression level in 22RV1 cells in comparison with untreated control (each $n=9$). Expression changes were shown as x-fold up- or down-regulation (mean \pm S.D.). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ indicate significant differences between treatment groups.

mimicking the activity of hormones or by suppressing the normal hormone action [58–60]. Gene expression in the described cell line may provide a selective tool to understand androgenic side activities more specifically.

References

[1] P.J. Shughure, M.V. Lane, P.J. Scrimo, I. Merchenthaler, Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract, *Steroids* 63 (10) (1998) 498–504.

[2] S. Saji, H. Sakaguchi, S. Andersson, M. Warner, J.A. Gustafsson, Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland, *Endocrinology* 142 (2001) 3177–3186.

[3] M.W. Pfaffl, A. Daxenberger, M. Hageleit, H.H.D. Meyer, Effects of synthetic progestagens on the mRNA expression of androgen receptor, progesterone receptor, estrogen receptor α and β , insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-1 receptor in heifer tissues, *J. Vet. Med. A* 49 (2002) 57–64.

[4] M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot, *Cell* 83 (6) (1995) 851–857.

[5] O.M. Conneely, Perspective: female steroid hormone action, *Endocrinology* 142 (6) (2001) 2194–2199.

[6] E. Emmark, M. Peltto-Huikko, K. Grandien, S. Lagercrantz, J. Lagercrantz, G. Fried, M. Nordenskjold, J.A. Gustafsson, Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 4258–4265.

[7] J.A. Gustafsson, Estrogen receptor beta; a new dimension in estrogen mechanism of action, *J. Endocrinol.* 163 (1999) 379–383.

[8] A.W. Brandenberger, M.K. Tee, J.Y. Lee, V. Chao, R.B. Jaffe, Tissue distribution of estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (10) (1997) 3509–3512.

[9] M.W. Pfaffl, I.G. Lange, A. Daxenberger, H.H.D. Meyer, Tissue-specific expression pattern of estrogen receptor (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with RT-PCR, *APMIS* 109 (5) (2001) 345–355.

[10] A.M. Brandstetter, M.W. Pfaffl, J.F. Hocquette, D.E. Gerrard, B. Picard, Y. Geay, H. Sauerwein, Effect of muscle type, castration, age, and compensatory growth rate on androgen receptor mRNA expression in bovine skeletal muscle, *J. Anim. Sci.* 78 (3) (2000) 629–637.

[11] A. Malucelli, H. Sauerwein, M.W. Pfaffl, H.H.D. Meyer, Quantification of androgen receptor mRNA in tissues by competitive co-amplification of a template in reverse transcription-polymerase chain reaction, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58 (5–6) (1996) 563–568.

[12] A.O. Brinkmann, G.G. Kuiper, C. Ris-Stalpers, H.C. von Rooij, G. Romalo, M. Trifiro, E. Mulder, L. Pinsky, H.U. Schweikert, J. Trapman, Androgen receptor abnormalities, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40 (1–3) (1991) 349–352.

[13] N. Uotinen, R. Puustinen, S. Pasanen, T. Manninen, M. Kivineva, H. Syvala, P. Touhimaa, T. Ylikomi, Distribution of progesterone receptor in female mouse tissues, *Gen. Comp. Endocrinol.* 115 (3) (1999) 429–441.

[14] H. Sauerwein, H.H.D. Meyer, Androgen and estrogen receptors in bovine skeletal muscle: relation to steroid-induced allometric muscle growth, *J. Anim. Sci.* 67 (1989) 206–212.

[15] H. Sauerwein, M. Pfaffl, K. Hagen-Mann, A. Malucelli, H.H.D. Meyer, Expression of estrogen and androgen receptor in the bovine gastrointestinal tract, *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 102 (1995) 164–168.

[16] M.W. Pfaffl, I.G. Lange, H.H.D. Meyer, The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: quantification of steroid receptor mRNA expression (AR, ER α , ER β and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCT, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84 (2003) 159–166.

[17] J.Y. Adams, I. Leav, K.M. Lau, S.M. Ho, S.M. Pflueger, Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate, *Prostate* 52 (2002) 69–81.

- [18] O.O. Adesanya-Famuyiwa, J. Zhou, G. Wu, C. Bondy, Localization and sex steroid regulation of androgen receptor gene expression in rhesus monkey uterus, *Obstet. Gynecol.* 93 (1999) 265–270.
- [19] H. Sauerwein, A. Brandstetter, W.M. Pfaffl, H.H.D. Meyer, E. Möstl, J. Handler, K. Arbeiter, Uterine androgen receptor mRNA expression in metestrous and anestrous bitches being healthy or suffering from pyometra, *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 105 (1998) 191–193.
- [20] R. Poulin, D. Baker, D. Poirier, L. Labrie, Multiple actions of synthetic 'progestins' on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an in vitro model for the simultaneous assay of androgen, progestin, estrogen and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids, *Breast Cancer Res. Treatment* 17 (1991) 197–210.
- [21] R. Hackenberg, T. Hawighorst, A. Filmer, A. Huschmand Nia, K. Schulz, Medroxyprogesterone acetate inhibits the proliferation of estrogen- and progesterone-receptor negative MFM-223 human mammary cancer cells via the androgen receptor, *Breast Cancer Res. Treatment* 25 (1993) 217–224.
- [22] R.M. Sramkoski, T.G. Pretlow, J.M. Giaconia, T.P. Pretlow, S. Schwartz, M.S. Sy, S.R. Marengo, J.S. Rhim, D. Zhang, J.W. Jacobberger, A new human prostate carcinoma cell line, 22RV1, *Dev. Biol.* 35 (1999) 403–409.
- [23] R.M. Evans, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science* 240 (1988) 889–895.
- [24] D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beat, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastne, M. Mar, P. Chambon, R.M. Evans, The nuclear receptor superfamily: the second decade, *Cell* 83 (1995) 835–839.
- [25] W.R. Kelce, C.R. Stone, S.C. Laws, L.E. Gray, J.A. Kempainen, E.M. Wilson, Persistent DDT metabolite *p,p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist, *Nature* 375 (1995) 581–585.
- [26] W.R. Lecl, E.M. Wilson, Environmental antiandrogens: development effects, molecular mechanisms and clinical implications, *J. Mol. Med.* 75 (1997) 198–207.
- [27] B.J.M. Kitty, C.E.M. Conny, Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6379–6388.
- [28] R.S. Israeli, C. Thomas Powell, J.G. Corr, W.R. Fair, W.D.W. Heston, Expression of the prostate-specific membrane antigen, *Cancer Res.* 54 (1994) 1807–1811.
- [29] W. Ulrix, J.V. Swinnen, W. Heyns, G. Verhoeven, The differentiation-related gene 1, *Drg1*, is markedly up regulated by androgens in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells, *FEBS Lett.* 455 (1999) 23–26.
- [30] B. Lin, C. Fergusson, J.T. White, S. Wang, R. Vessella, L.D. Tue, L. Hood, P.S. Nelson, Prostate-localised and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2, *Cancer Res.* 59 (1999) 4180–4184.
- [31] L.L. Xu, N. Shanmugam, T. Segawa, I.A. Sesterhaenn, D.G. McLeod, J.W. Moul, S. Srivastava, A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate, *Genomics* 66 (2000) 257–263.
- [32] W.W. He, P.J. Sciavolino, J. Wing, M. Augustus, P. Hudson, P.S. Meissner, A novel human prostate-specific, androgen regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer, *Genomics* 43 (1997) 69–77.
- [33] E.P. Jenkins, C. Hsieh, A. Milatovich, K. Normington, D.M. Berman, U. Francke, D.W. Russell, Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5 α reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue, *Genomics* 11 (1991) 1102–1112.
- [34] A. Hartel, A. Didier, M.W. Pfaffl, H.H.D. Meyer, Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84 (2002) 231–238.
- [35] P. Darbre, J. Yated, S. Curtis, R.J.B. King, Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture, *Cancer Res.* 43 (1983) 349–354.
- [36] P. Chomczynski, A reagent for single-step simultaneous isolation of RNA, *DNA Protein BioTechniques* 15 (1993) 532–537.
- [37] R. Rasmussen, Quantification on the LightCycler, RapidCycler, in: S. Meuer, C. Wittwer, K. Nakagawara (Eds.), *Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications*, Springer Press, Heidelberg, pp. 21–34.
- [38] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucl. Acids Res.* 29 (2001) 2002–2007.
- [39] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST[®], Weihong et al. 2002) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucl. Acids Res.* 30 (2002) e36.
- [40] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Chem.* 150 (1985) 76–85.
- [41] E.R. Bauer, H.H. Meyer, P. Stahlschmidt-Aller, H. Sauerwein, Application of an androgen receptor assay for the characterisation of the androgenic or antiandrogenic activity of various phenylurea herbicides and their derivatives, *Analyst* 123 (1998) 2485–2487.
- [42] R. Einspanier, M. Schonfelder, K. Muller, M. Stojkovic, M. Kosmann, E. Wolf, D. Schams, Expression of the vascular endothelial growth factor and this receptors and effects of VEGF during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes (COC), *Mol. Reprod. Dev.* 62 (1) (2002) 29–36.
- [43] C.S. Rosenfeld, X. Yuan, M. Manikkam, M.D. Calder, H.A. Garverick, D.B. Lubahn, Cloning, sequencing, and localisation of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle, *Biol. Reprod.* 60 (3) (2002) 691–697.
- [44] D.B. Lubahn, T.R. Brown, J.A. Simental, H.N. Higgs, C.J. Migeon, E.M. Wilson, F.A. French, Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 9534–9538.
- [45] A. De Ballis, C.A. Quigley, N.F. Cariello, M.K. El-Awady, M. Sar, M.V. Lane, E.M. Wilson, F.S. French, Single base mutations in the androgen receptor gene causing complete androgen insensitivity: rapid detection by a modified denaturing gradient gel electrophoresis technique, *Mol. Endocrinol.* 6 (1992) 1909–1920.
- [46] G.J. Haluska, T.R. Wells, J.J. Hirst, R.M. Brenner, D.W. Sadowsky, M.J. Novy, Progesterone receptor localisation and isoforms in myometrium, decidua, and fetal membranes from rhesus macaques: evidence for functional progesterone withdrawal at parturition, *J. Soc. Gynecol. Invest.* 9 (3) (2002) 125–136.
- [47] E.R. Bauer, A. Daxenberger, T. Petri, H. Sauerwein, H.H.D. Meyer, Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormone to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progesterin receptor, *APMIS* 108 (2000) 838–846.
- [48] J. Than, Y. Sharief, K.G. Hamil, C.W. Gregory, D.Y. Zang, M. Sar, P.H. Gumerlock, R.W. de Vere White, T.G. Pretlow, S.E. Harris, Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells, *Mol. Endocrinol.* 11 (1997) 450–459.
- [49] T.C. Shao, H. Li, W. Eid, M. Ittmann, E. Unni, G.R. Cunningham, In vivo preservation of steroid specificity in CWR22 xenografts having a mutated androgen receptor, *Prostate* 57 (2003) 1–7.
- [50] M. Jorgensen, B. Vandelbo, N.E. Skakkabaek, H. Leffers, Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes, *Environ. Health Perspect.* 108 (2000) 403–412.
- [51] B. Planz, Q. Wang, A.D. Kirley, C. Lin, W.S. McDougal, Androgen responsiveness of stromal cells of the human prostate: regulation of cell proliferation and keratinocyte growth factor by androgen, *J. Urol.* 160 (1998) 1850–1855.
- [52] A. Giwercman, J.P. Bonde, Declining male fertility and environmental factors, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 27 (1998) 807–830.

- 618 [53] A. Czeizel, Increasing trends in congenital malformations of male
619 external genitalia, *Lancet* 1 (8426) (1985) 462–463.
- 620 [54] D. Forman, H. Moller, Testicular cancer, *Cancer Surv.* 19–20 (1994)
621 323–341.
- 622 [55] H. Moller, Trends in incidence of testicular cancer and prostate cancer
623 in Denmark, *Hum. Reprod.* 16 (2001) 1007–1011.
- 624 [56] A.J. Sasco, Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? *APMIS* 109 (2001) 321–332.
- 625 [57] E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N.E. Skakkebaek, Evidence
626 for decreasing quality of semen during past 50 years, *Br. Med. J.*
627 305 (6854) (1992) 609–613.
- [58] R.J. Kavlock, G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. 628
Gray, S. Kaattari, M. Luster, M.J. Mac, C. Maczka, Research 629
needs for the risk assessment of health and environmental effects 630
of endocrine disruptors, *Environ. Health Perspect.* 104 631
(Suppl. 4) (1996) 715–740 (A report of the U.S. EPA-sponsored 632
workshop). 633
- [59] A. Daxenberger, Pollutants with androgen-disrupting potency, *Eur.* 634
J. Lipid Sci. Technol. 104 (2002) 124–130. 635
- [60] T. Colborn, C. Clemmens, *Chemically Induces Alterations in Sexual* 636
Functional Development, The Wildlife/Human Connection, Princeton 637
Scientific, Princeton, NJ, 1992. 638

UNCORRECTED PROOF

PUBLIKATIONSBEITRAG

(B) **Hartel A**, Pertl C, Wierer M, Meyer HHD

Endocrine disrupting chemicals – assaying androgenicity by quantitating the induced expression levels in two different prostate cell lines: human prostate carcinoma cells 22RV1 and normal primary porcine epithelial cells

FEB 2004, 13(11) in press

Endocrine disrupting chemicals - assaying androgenicity by quantitating the induced expression levels in two different prostate cell lines: human prostate carcinoma cells 22RV1 and normal primary porcine epithelial cells

A. Hartel, C. Pertl, M. Wierer, H.H.D. Meyer

Physiology Weihenstephan, TU Munich

Weihenstephaner Berg 3,

D-85354 Freising, Germany

Corresponding author:

Anita Hartel

Physiology Weihenstephan

Weihenstephaner Berg 3

D-85354 Freising

Germany

Tel.: +49-8161-715552

FAX: +49-8161-714204

Email: Anita.Hartel@wzw.tum.de

Abstract

First systematic data revealed that some “endocrine disruptors” act through mimicking or antagonising the physiological functions of estrogens. Later, endocrine disrupting pathways were described to influence the signal cascade of the androgen receptor (AR). Difenconazole and fenpropimorph (TPTA) are used as fungicides, a third - tetramethrin - as an insecticide. We have already established a gene expression assay for testing chemicals for androgen activity, which is performed in human prostate carcinoma 22RV1 cells growing androgen independently. A second newly established assay is based on normal primary porcine prostate epithelial cells (NPE). We have identified about nine androgen-regulated genes in the prostate, four of which are eligible to determine androgenic action using highly sensitive real-time RT-PCR: AR, differentiation related gene1 (drg1), 5 α -reductase and cyclin D₁. Expression of mRNA for AR and drg1 gene by 22RV1 and NPE cells shows a similar course after treatment with fenpropimorph and testosterone. In both assays the up-regulation was 2-5 fold for two investigated genes. Based on these results we provide indications that fenpropimorph is an endocrine disruptor with strong androgenic effects. Final goal of this work is to establish a sensitive system for differential gene expression by different compounds under study, substance-specific expression patterns and function related analysis of potential androgenic side activity.

Keywords: 22RV1 cells, normal primary porcine prostate cells, fenpropimorph, TPT, gene expression, real-time RT-PCR

Introduction

The term endocrine disrupting chemical has been defined as an exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body, which are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development and/or behaviour [1]. First systematic data revealed that some “endocrine disruptors” (ED) act through mimicking or antagonising the physiological functions of estrogens. In recent years growing evidence has emerged along the endocrine-disrupting pathways of the androgen receptor (AR) and corresponding signals [2-4]. Today the ED discussion has reached man, whose genital tract may be affected by ED possibly resulting in declining sperm counts, hypospadias, cryptorchism, testicular, and prostate cancer [5-9]. Immuno-immobilised radio AR assay with recombinant AR was successfully used to characterise xenobiotic steroids and to screen pesticides [10,11]. Three of the most suspicious endocrine disrupting chemicals are included in our evaluation. Difenconazole and fenitrothion [12] are used as fungicides; tetramethrin as an insecticide. A primary cell culture was seen as a model of choice to sensitively analyse the effects of the described substances in vivo and to avoid the use of animal testing.

A cell line expressing only AR will be advantageous to study selective hormonal activity. The cell line 22RV1 was established from a human prostatic carcinoma xenograft (CWR22R) [13]. This cell line expresses only AR with the point mutation H784Y [14]. We intended to establish a culture of primary porcine prostate epithelial cells (NPE) that expresses a wild type AR and to compare the obtained expression pattern with the results of our previous work [15]. In the present study, the role of AR-regulated genes (ARG) in androgen-independent growth of 22RV1 and NPE cells was investigated.

Our aim was also to establish a system showing a gene expression profile selectively regulated via androgen receptor. For expression profiling we identified four androgen-regulated genes: AR, differentiation-related gene (drg1) [17], 5 α -reductase [16] and cyclin D₁ [18].

Material and Methods

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM with L-glutamine, 15 mM HEPES, collagenase type IA, amphotericin B, penicillin, streptomycin and testosterone (4-androsten-17 β -ol-3-one) were from Sigma (Steinheim, Germany). Heat inactivated foetal bovine serum (FBS) was from Gibco™ (Eggenstein, Germany). Plastic materials, including centrifuge tubes, T25 cm² culture flasks, 12-well plates were obtained from "greiner bio-one" (Fickenhausen, Germany). Ringer solution was purchased from Braun (Melsungen, Germany). Difenoconazole and tetramethrin were from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany), fentinacetate (triphenyltinacetate, TPTA) from Riedel de Haën (Seelze, Germany).

Tissues

Prostate tissue was obtained from castrated pigs (100 – 120 kg) after slaughtering.

Isolation and culture

For isolating and culturing normal pig prostate epithelium cells we have modified the method of Classen-Linke et al. [19]. The prostate tissue was cut of the prostate immediately after slaughtering and transported on ice to the laboratory. The following procedures were performed under sterile conditions (laminar flow). The tissue was minced into small pieces of about 1 mm³. Digestion and shaking for 1-2 h in 0.300 type I A collagenase (470 U/mg) at 37 °C in DMEM/Ham's F12 with phenol red

containing 1% antibiotic (100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin) and 10% FBS followed. Further mechanical separation was performed by repeated section by pipetting. Epithelial cells were separated by two filtration steps. First, filtration was performed through a stainless steel sieve of 250 µm to remove mucous material or undigested tissue. The second filtration of the filtrate solution was carried out through a stainless steel sieve of 36 µm mesh size (Kufferath, Düren, Germany). The glands and epithelial cells were trapped on the 36 µm sieve, backwashed from the sieve with medium and freed of collagenase by centrifugation (10 min, 650 rpm, twice). The cell pellets were seeded with a density of $2-5 \times 10^5$ cells/cm² on plastic 12-well plates. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Human prostate carcinoma cell line 22RV1 [13] was obtained from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany, ACC 438) and routinely cultured in 40% RPMI 1640 medium, 40% Dulbecco's MEM (Gibco-BRL, USA) supplemented with 20% heat-inactivated FBS plus 100,000 units/l penicillin and 100 mg/l streptomycin. Steroids were removed from FBS as described [20]. FBS was incubated with 0.5% activated charcoal and 0.05% dextran T-70 for 30 min at 55°C. The charcoal particles were removed by centrifugation at 4°C for 20 min at 4.500 g. This step was repeated and stripped serum was sterile filtered and stored in aliquots at - 20°C. Cells were split 1:6 every 7 days and cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Growth response

To determine the growth rate of NPE cells, primary culture was seeded at a density of 3×10^5 cells/cm². At a confluence-level of 30-40% one part of the cells was stimulated with 100, 10 and 1 nM testosterone. Cells were trypsinised (trypsin/EDTA solution), washed and resuspended in PBS 0h, 4h, 8h, 12 h, 24h, 48h and 72h after

stimulation. Trypsinised cells were counted from triplicate wells using a hemocytometer.

Processing for immunocytochemistry

Stromal and epithelial cells in culture were identified and visualized by cell specific staining of cytoskeletal proteins. Primary antibodies to cytokeratins (MO821, DAKO Diagnostik, Hamburg, Germany), or vimentin (PO447, Immunotech, France) were used to examine epithelial and stromal specific markers respectively. Confluent primary prostate epithelial cells were cultured on microscope slides with a silicone insert. The slides were fixed for 30 min in 3.7% formaldehyde. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 1% hydrogen peroxide for 30 min at room temperature. Non-specific binding was blocked by goat serum (1:10 dilution in PBS-buffer) for 30 min at room temperature. A primary antibody dilutions was added to each well and the slides incubated in a humidified chamber at 4°C over night. In control sections either primary or secondary antibody were omitted and replaced by buffer. Sections were incubated with DAB alone to exclude residues of endogenous peroxidase activity. A lack of staining of controls showed the antigen specificity. After washing with PBS-buffer of horseradish peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG (DAKO, Hamburg, Germany) diluted 1:200 was applied at room temperature for 1h. Peroxidase was visualized by applying 0.01% 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride (DAB, Sigma, Steinheim, Germany) and 0.01% hydrogen peroxide in PBS-buffer for 10 min in darkness at room temperature.

Treatment

Cell were seeded in medium containing charcoal-stripped FBS (22RV1 20%, NPE 10%) for 24h before treatment with steroids and allowed to form a 60-70% confluent monolayer. Hormone and pesticide treatment was performed after an adhesion and

proliferating phase of 2-4 days. Pesticides and hormones were used at a concentration of 100, 10 and 1 nM and cells were harvested 0h and 4h after stimulation for RNA extraction. Control cultures were continuously grown in steroid-depleted untreated medium for the same time intervals.

RNA preparation, RT, and real-time PCR

Total RNA was isolated from prostate cells using peqGold TriFast™ (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) with the guanidinium-isothiocyanate method [21] according to the manufacturer's instruction. Synthesis of first strand cDNA was performed by using 1000 ng total RNA and 200 U MMLV-Reverse Transcriptase (Promega, USA) according to the manufacturer's protocol. RT reaction was carried out in 40 µl reaction volume in a gradient cycler (Tgradient, Biometra®, Germany). All measurements of nucleic acid concentration were performed at 260 nm (OD₂₆₀) in a spectrophotometer (BioPhotometer®, Eppendorf, Germany) with 220-160 nm Uvettes® (Eppendorf).

Primers for all ten androgen regulated genes were designed using HUSAR-software (DKFZ, Heidelberg, Germany) and synthesised by MWG Biotech (Ebersberg, Germany) (Table 1). Subsequently, PCR products were subjected to gel-electrophoresis in 1.5% agarose gels containing 0.5 µg/ml ethidium bromide. Quantification of genes of interest was carried out in a LightCycler® (Roche Diagnostic, Germany) using LightCycler® DNA Master SYBR® Green I technology [22]. Master mixes for each PCR run were prepared as follows: 6.4 µl water, 1.2 µl MgCl₂ (4 mM), 0.2 µl forward primer (20 pmol), 0.2 µl reverse primer (20 pmol) and 1 µl Fast Start DNA Master SYBR® Green I mix (Roche Diagnostics Germany). 9 µl mastermix were combined with 1 µl (25 ng) reverse transcribed total RNA. Each sample was subjected to 40 PCR cycles (15 sec at 95°C for denaturation, 10 sec at corresponding annealing temperature, 20 sec at 72°C for elongation and 3 sec at 75-

83°C for a single fluorescence measurement). We performed “second Derivate Maximum Method” to determinate the crossing point using LightCycler Software 3.5 (Roche Molecular Biochemicals). Crossing point is defined as the point at which the fluorescence rises appreciably above the background fluorescence [23]. In the “Second derivate Maximum Method”, a second derivate maximum within the exponential phase of the amplification curve is linearly related to a starting concentration of template cDNA molecules. The specificity of the bans was confirmed by the melting curve analysis using LightCycler software 3.5.

Statistics

Statistical analysis of group differences was done by Pair Wise Fixes Reallocation Randomisation Test, which is implemented in the REST-XL software [24,25]. Differences in expression between control and treated samples were assessed in group means for statistical significance by randomisation tests. The mathematical mode was based on the PCR efficiency and the group mean crossing point difference between the treated versus the control group. The corresponding real-time PCR efficiency (E) in the exponential phase was calculated using the equation $E = 10^{[-1/\text{slope}]}$, applied to a dilution series ranging from 0.20 pg to 50 ng DNA in triplicate [23].

All data were statistically processed in SigmaPlot[®] 2000 (SPSS Inc, USA) and SigmaStat[®] 2.0 (Jandel Corporation, USA).

Results

Cell culture characteristics

In materials and methods we have described a highly reproducible and simple procedure to isolate and culture normal porcine prostate epithelium cells (NPE). The technique involves a standard collagenase digest. The glands are then seeded to give a 10-40% confluent culture after 3 days of spreading. After 3 to 4 days the culture comprised predominantly epithelial colonies (shown in Figure 1a.) The cells were examined by light microscopy and were polygonal in shape and closely associated with each other, which is characteristic for cultured epithelial cells [26,27]. Single stromal cell colonies have been observed (Figure 1b.). These were elongated, spindle-shaped, and loosely associated with each other. This is characteristic for fibroblastic-type cells in culture.

The cell line 22RV1 grew slowly to high density (doubling time 49 h) [13]. In comparison, NPE cells grown on non-treated polymer surface had a doubling time of 68 h (data not shown). After stimulation with 100 nM, 10 nM and 1 nM testosterone the doubling time of NPE cells was not influenced.

Immunohistochemical characterisation of epithelial and stromal cells

The intermediate filaments vimentin and cytokeratins were detected immunohistochemically to proof the epithelial or stromal origin of the cultivated cells. Cytokeratin was positive for the epithelial cells (Figure 2a.) and negative for the fibroblast cells (Figure 2b.). We observed 5 % contamination with stromal cells. Vimentin was negative for epithelial cells and positive of stromal cells (data not shown).

Identification of androgenicity

We have tested the organotin compound fentinacetate at concentrations of 100 nM, 10 nM and 1 nM on human carcinoma cell line 22RV1 and normal porcine prostate epithelial cells. Both assays show similar up-regulation of androgen regulated genes

AR and drg1 to a 2-5 fold level with an increase of gene expression with decreasing concentrations of the pesticide (Figure 3.).

The level of relative gene expression of drg1 gene mRNA in NPE cells also increases with decreasing concentration of testosterone (Figure 4.), at 1 nM concentration it reaches its peak value (2-fold increase). A similar pattern can be observed by expression of drg1 gene in 22RV1 cells, yet relative expression increase is only half the value compared to NPE cells. The induction of AR in 22RV1 cells is described by an increase of relative expression with decreasing concentration of testosterone. This is in contrast to NPE cells, where similar values were detected at 100 nM and 10 nM and a decrease was observed only at lower concentrations.

The gene induction of AR, drg1, cycline D₁ and 5 α -reductase in 22RV1 cells after stimulation with both pesticides difenaconazole and tetramethrin (Figure 5.) showed a quite different pattern. Drg1 gene mRNA was down-regulated by both substances. After treatment with tetramethrin the down-regulation increased with decreasing concentration. Upon treatment with difenaconazole we observed a constant down-regulation at both 100 nM and 10 nM, but almost no effect at 1 nM.

Gene expression of 5 α -reductase behaved in a different manner. Whereas up-regulation decreased with decreasing tetramethrin concentration, difenaconazole treatment lead to an increase of expression with decreasing concentrations. AR gene expression showed mainly a down-regulation with both pesticides.

Cycline D₁ gene expression showed a very characteristic pattern depending on the concentration of both substances. Upon treatment with tetramethrin, the highest value was observed at 100 nM (2.5-fold). On the contrary, difenaconazole showed almost no effect at concentrations of 100 and 10 nM, but a strong up-regulation at 1 nM (2.5-fold).

Discussion

This paper describes the isolation and culture of normal primary porcine prostate epithelial cells and the analysis of androgenicity in two different prostate cell lines: human prostate carcinoma 22RV1 and normal primary porcine epithelial cells.

Isolation and monolayer culture of epithelial cells has previously been reported for endometrium from: women [28,19], cows [29], ewes [30], rabbits [31] and guinea-pigs [32]. The normal primary porcine prostate epithelial cell culture system established with experimentally separated epithelial cells, was assessed and proved by both immunohistochemical and ultrastructural investigations. The epithelial cells are morphologically and functionally intact. NPE were identified as epithelial by the presence of epithelial marker cytokeratins [33] and vimentin, the intermediate filament protein [34]. Examination after immunohistochemical characterisation by microscope revealed that stromal and epithelial cells were different in morphology. Cross-contamination of fibroblastic cells by epithelial cells was observed by 5%, which is comparable to the value found in living organs. Growth of NPE cells showed similar testosterone independency like epithelial cell line 22RV1 .

Second important point in our study was to test the functionality of our cell cultures based on gene expression in the presence of naturally occurring testosterone and pesticides fentinacetate, tetramethrin and difenoconazole. This question was covered by ligand concentration dependent stimulation of 22RV1 and NPE cells. An in vitro system like ours contrasts the approach of reporter gene-assays. These test systems mainly focus on the expression of a single gene being under control of a respective steroid promoter region. In contrast our cell culture allows analysis of various androgen-responsive genes that are relevant under in vivo conditions.

During the last years few in vitro test systems to study the androgenicity have been developed which are mainly based on cellular systems. In addition to systems using

cultivated breast cancer cells, in which the hormonal activity is evaluated via recording proliferation activity [35,36], cultivated mammalian cells are used as the basis for reporter gene assay [37-41]. Hereby the ligand-activated receptors initiate the transcription of a reporter gene. A similar approach is used with reporter gene assays in yeast cells. The prostate carcinoma cell line 22RV1 and the NPE cells are in vitro assays, with different origins and distinct properties. Assays based on carcinoma cells are often suspected of being too far away from in vivo conditions as their metabolism is adapted to autonomous proliferation.

One part of our test system consists of two androgen related genes in the prostate, AR and drg1, which are affected in both cell lines 22RV1 and NPE by the pesticide fentinacetate in a similar up-regulation of the gene expression at a concentration range of 100 nM to 1nM. This effect has been even more intense at the lowest concentration and resulted in an average 3-fold up-regulation compared to the control group. Almost identical gene expression profiles for both cell types were observed in concentrations from 100 nM to 1 nM after stimulation with powerful steroid hormone testosterone. As documented previously by Bauer et al. [11], fentinacetate shows a high relative binding activity (RBA) to the AR of about 1.42% compared to dihydrotestosterone (100%). Based on these results we could proof that fentinacetate is an endocrine disruptor with strong androgenic effects. Fentinacetate has been widely used as a fungicide on many different kinds of crops and vegetables, but also as algaecide and molluscicide on boats and ships. Triphenyltin (TPT corresponding to fentin) showed androgen-like action in an androgen-dependent transcription and cell proliferation assay [41]. Low concentrations of 1 nM TPT showed the same proliferate and transcription activating effects as does 10 nM DHT in human prostate cancer line. The information about the androgenic or anti-androgenic effects of fentin compounds evaluated by in vivo assays with mammalia

is quite rare. But the acceptable daily intake (ADI) value is stated to 0.5µg/kg body weight per day by the WHO based on the reduction of the body weight of the dam in reproductive studies in rats and rabbits [42].

Treatment of NPE cells with difenaconazole and tetramethrin showed a different expression effect on AR and drg1 gene than fentinacetate. Cycline D₁ gene expression showed a very different, substance-specific characteristic pattern depending on the concentration of both substances. The highest value was observed at 1 nM difenoconazole, on the contrary, tetramethrin showed a strong regulation at 100 nM. Tetramethrin and difenoconazole treatment showed for 5α-reductase same effects on gene expression as for cycline D₁ gene, but no alteration on expression activity of AR and drg1. Using this both compounds in an androgen-receptor binding assay [11] revealed only weak relative binding activity.

In conclusion we have established a sensitive gene expression system for testing chemicals for androgen-like action. In two prostate cell lines, 22RV1 and NPE, we have identified about nine androgen-regulated genes, of which 4 can be used in the ED assay. This required identification of genes expressed in prostate cells that are effected by exposure to putative endocrine-disruptor compounds. Our new test system enabled us to selectively identify the different expression patterns induced after stimulation with the respective analysed substances. Therefore, the highly sensitive gene expression assay based on epithelial cells described here provides a useful tool for differentiation and characterising of natural androgens and pesticides. Further investigations are necessary to evaluate especially the endocrine disruptive activity of other pesticides in in vivo experiments [43].

References

1. Kavlock, G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, J. Moore, R. Rolland, D.M. Sheehan, T. and Sinks, H.A (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors, A report of the US EPA-sponsored workshop, *Environ Health Perspect* 104, 715-740.
2. Kelce, W.R. Gray, L.E. and Wilson, E.M. (1998) Antiandrogens as environmental disruptors, *Reprod Fert Dev* 10, 105-111.
3. Gray, L.E. (1998) Xendoendocrine disruptors: laboratory studies on male reproductive effects, *Toxicol Lett* 102-103, 331-335.
4. Daxenberger, A. (2002) Pollutants with androgen-disrupting potency, *Eur J Lipid Sci Technol* 104, 124-130.
5. Carlsen, E. Giwercman, A. Keiding, N. and Skakkebaek, N.E. (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *BMJ* 305(6854), 609-613.
6. Giwercman, A. and Bonde, J.P. (1998) Declining male fertility and environmental factors, *Endocrinol Meta Clin North Am* 27, 807-830.
7. Czeizel, A. (1985) Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia, *Lancet* 1(8426), 462-463.
8. Forman, D. and Moller, H. (1994) Testicular cancer, *Cancer Surv* 19-20, 323-341.
9. Moller, H. (2001) Trends in incidence of testicular cancer and prostate cancer in Denmark, *Hum Reprod* 16, 1007-1011.A.
10. Bauer, E.R. Daxenberger, A. Petri, T. Sauerwein, H. and Meyer, H.H.D. (2000) Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormone to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progesterin receptor, *APMIS* 108, 838-846.

11. Bauer, E.R. Bitsch, N. Brunn, H. Sauerwein, H. and Meyer, H.H.D. (2002) Development of an immuno-immobilized androgen receptor assay (IRA) and its application for the characterisation of the receptor binding affinity of different pesticides, *Chemosphere* 46, 1107-1115.
12. Tomlin, C.D.S. *The pesticide manual*, 11th Ed. British crop Protection council (1997) 533-537.R.M.
13. Sramkoski, T.G. Pretlow, J.M. Giaconia, T.P. Pretlow, S. Schwartz, M.S. Sy, S.R. Marengo, J.S. Rhim, D. Zhang, J. and Jacobberger, W. (1999) A new human prostate carcinoma cell line, 22RV1, *Dev Biol* 35, 403-409.
14. Hartel, A. Didier, A. Ulbrich, S.E. Wierer, M. and Meyer, H.H.D. Characterisation of steroid receptor expression in the human prostate carcinoma cell line 22RV1 and quantification of androgen effects on mRNA regulation of prostate specific genes, *J Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (submitted).
15. Hartel, A. Didier, A. Pfaffl, M.W. and Meyer, H.H.D. (2003) Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds, *J Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 84, 231-238.
16. Jenkins, E.P. Hsieh, C. Milatovich, A. Normington, K. Berman, D.M. Francke, U. and Russell, D.W. (1991) Characterisation and chromosomal mapping of a human steroid 5 α reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue, *Genomics* 11, 1102-1112.
17. Ulrix, W. Swinnen, J.V. Heyns, W. and Verhoeven, G. (1999) The differentiation-related gene 1, Drg1, is markedly up regulated by androgens in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells, *FEBS Letters* 455, 23-26.

18. Kim, D.M. Yang, K. and Yang, B.S. (2003) Biochemical characterisations reveal different properties between CDK4/cyclin D1 and CDK2/cyclin A, *Exp Mol Med* 35 (5), 421-430.
19. Classen-Linke, Kusche, M. Knauthe, R. and Beier, H.M. (1997) Establishment of a human endometrial cell culture system and characterisation of its polarised hormone responsive epithelial cells, *Cell Tissue Res* 287, 171-185.
20. Darbre, P. Yated, J. Curtis, S. and King, R.J.B. (1983) Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture, *Cancer Res* 43, 349-354.
21. Chomczynski, P. (1993) A Reagent for Single-step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Protein *Bio Techniques* 15, 532-537.
22. Morrison. T.B. Weis, J.J and Wittwer, C.T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques* 24, 954-962.
23. Rasmussen, R. Quantification on the LightCycler, Rapid Cyclor. In Meuer, S. Wittwer, C. and Nakagawara, K. (Eds) *Rapid cycle real-time PCR, Methods and Applications*, Springer, Heidelberg, pp. 21-34.
24. Pfaffl, M.W. Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002) Relative Expression Software Tool (REST[®]), for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Research* 30, e36.
25. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids Research* 29, 2002-2007.
26. Satyaswaroop, P.G. Bressler, R.S. and De La Pena, M.M. (1979) Isolation and culture of human endometrial glands, *J Clin Endocrinol Metabo* 48, 639-641.
27. Varma, V.A. Melin, S.A. and Adamec, T.A. (1982) Monolayer culture of human endometrium: methods of culture and identification of cell types, *In Vitro* 18, 911-918.

28. Casey, M.L. Gal, D. Korte, K. MacDonald, J.R. and Mitchell, P.C. (1985) Metabolism of arachidonic acid by human endometrial glands and stromal cells maintained in monolayer culture, *Mechanism of Menstrual Bleeding* 107-127.
29. Fortier, M.A. Guibalt, L.A. and Grasso, F. (1988) Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows, *Journal of Reproduction and Fertility* 83, 293-248.
30. Cherny, R.A. and Findlay, J.K. (1990) Separation and culture of ovine endometrial epithelial and stromal cells: evidence of morphological and functional polarity, *Biology of Reproduction* 43, 241-250.
31. Ricketts, A.P. Hagensee, M. and Bullock, D.W. (1983) Characterisation in primary monolayer culture of separated cell types from rabbit endometrium, *Journal of Reproduction and Fertility* 67, 151-160.
32. Mahfoudi, A. Nicollier, M. Beck, L. Mularoni, A. Cypriani, B. Fauconnet, S. and Adessi, G.L. (1994) Effect of progesterone on proteins vectorially secreted by glandular epithelial cells of guinea-pig endometrium: modulation by homologous stroma, *Journal of Reproduction and Fertility* 100, 637-644.
33. Moll, R. Levy, R. Czernobilsky, B. Hohlweg-Majert, P. Dallenbach-Hellweg, G. and Franke, W.W. (1983) Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract, *Lab Invest* 49, 599-610.
34. Fernandez-Shaw, S. Shorter, S.C. Naish, C.E. Barlow, D.H. and Starkey, P.M. (1992) Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres, *Human Reprod* 7, 211-218.
35. Poulin, R. Baker, D. Poirier, D. and Labrie, L. (1991) Multiple actions of synthetic 'progestins' on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an in vitro model for the simultaneous assay of androgen, progestin, estrogen and

glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids, *Breast Cancer Res Treat* 17, 197-210.

36. Benti, J.M. Birrell, S.N. Pickering, M.A. Holds, D.J. Horsfall, D.J. and Tilley, W.D. (1999) Androgen receptor agonist activity of the synthetic progestin, medroxyprogesterone acetate, in human breast cancer cells, *Mol Cell Endocrinol* 154, 11-20.

37. Fuhrmann, U. Bengtson, C. Repenthin, G. and Schillinger, E. (1992) Stable transfection of androgen receptor and MMTV-CAT into mammalian cells: inhibition of cat expression by anti-androgens, *J Steroid Biochem Molec Biol* 42, 787-793.

38. Viggaard, A.M. Joergensen, E.C.B. and Larsen, J.C. (1999) Rapid and sensitive reporter gene assay for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals, *Toxicol Appl Pharmacol* 155, 150-160.

39. Vingaard, A.M. Hinda, C. and Larsen, J.C. (2000) Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro, *Toxicology* 145 173-183.

40. Terouanne, B. Tahiri, B: Georget, V. Belon, C. Poujol, N. Avances, C. Orio, Jr. Balaguer, P. and Sultan, C. (2000) A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects, *Mol Cell Endocrinol* 160, 39-49.

41. Yambe, Y. Hoshino, A. Imura, N. Suzuki, T. Himeno, S. (2000) Enhancement of androgen-dependent transcription and cell proliferation by tributyltin and triphenyltin in human prostate cancer cells, *Toxicol Appl Pharmacol* 169, 177-184.

42. Lu, F.C. (1995) A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by WHO, *Regul Toxicol Pharmacol* 21, 352-364.

43. Gill, W.B. Schumacher, G.F. Bibbo, M. Straus, F.H. and Schoenenberg, H.W. (1979) Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities, *J Urol* 122, 36-39.

44. Kitty, B.J.M. and Conny, C.E.M. (1996) Two Androgen Response Regions Cooperate in Steroid Hormone Regulated Activity of the Prostate-specific Antigen Promoter, *J Biol Chem* 271, 6379-6388.
45. Israeli, R.S. Thomas Powell, C. Corr, J.G. Fair, W.R. and Heston, W.D.W. (1994) Expression of the Prostate-specific Membrane Antigen, *Cancer Research* 54,1807-1811.
46. Wei Wu He, P.J. Sciavolino, J. Wing, M. Augustus, P. Hudson, P.S. and Meissner, (1997) A novel Human Prostate-Specific, androgen regulated Homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer, *Genomics* 43, 69-77.
47. Lin, B. Fergusaon, C. White, J.T. Wang, S. Vessella, R. Tue, L.D. Hood, L. and Nelson, P.S. (1999) Prostate-localised and Androgen-regulated Expression of the membrane-bound Serine protease TMPRSS2, *Cancer Research* 59, 4180-4184.
48. Xu, L.L. Shanmungam, N. Segawa, T. Sesterhaenn, I.A. McLeod, D.G. Moul, J.W. and Srivastava, S. (2000) A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on Chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate, *Genomics* 66, 257-263.

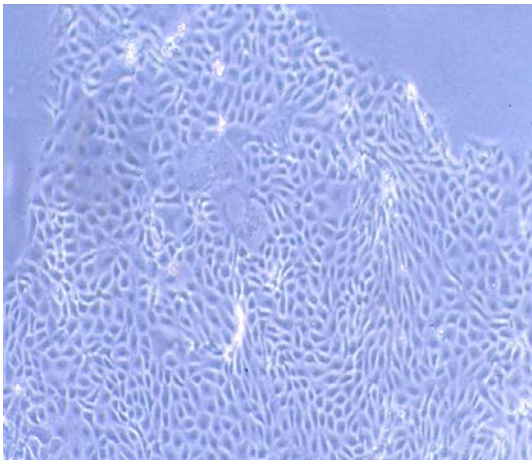
Table 1. Selected androgen-regulated genes and in human prostate carcinoma cell line 22RV1 and in normal primary porcine epithelial cells NPE. Gene bank accession number indicate gene sequences primers were designed from

Identity	Accession no.	Upstream primer	Downstream primer	Size (bp)
AR	M63505	TTGATTTTTTCAGCCCATCCACTGGA	CCTGGTTTTCAATGAGTACCGCATTG	217
Ubiquitin	NM174133	AGTCGACCCTGCACCTGGT	GCTCCACCTCCAGGGTGA	194
PSA	AF113132	TGTCCGTGACGTGGATTG	GGTCCACTGCTCCTCTGAG	159
5 α -red	M32313	CCTAAATACGCTGAAATGGAGG	CACACTTGGCAAGACATAGCC	131
TMPRSS2 β	AF270487	AAGCTGCAGAAGCCTCTGAC	CAGCGTTCAGCACTTCTGAG	151
PSM	M99487	TCAGCACCACCAGATAGCAG	GGTCCACTGCTCCTCTGAG	170
PMEPA1	AF224278	GGCAGAACACTCCGCGCTTCTTAG	CAAGCTCTCTTAGCTTGTGCATTG	146
NKX3.1	U80669	GCCAAGAACCTCAAGCTCAC	TCATAATGGTTGTACCTGAGC	261
Drg1	AF078103	TACGGCTGATGACCTCATTG	GGTGATGGGCAGAGATGG	149
Cycline D ₁	NM053056	CACGTCCAGGTTCAACCC	TGCCTCAAAGTCCTGCTTG	195

Selected genes are as follows: Prostate-specific antigen [44] belonging to kallekrein gene family is a common tumour marker in cancer diagnosis, Prostate-specific Membrane Antigen (PSM) is a cell surface marker in the prostate [45], homeobox gene NKX3 [46] is involved in cell growth and differentiation, TMPRSS2 supports normal cell growth and morphology [47] and PMEPA1 [48] is involved in calcium binding.

Figure 1.

a)



b)

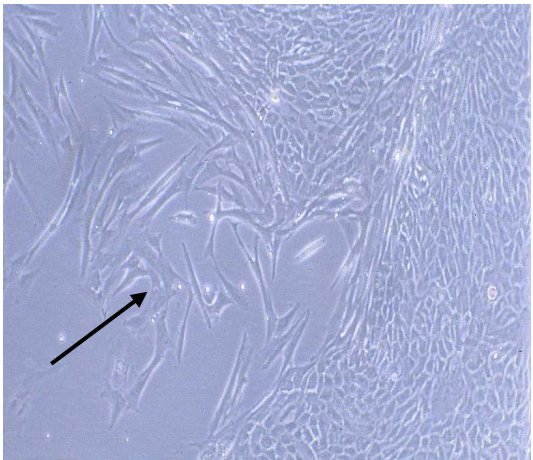
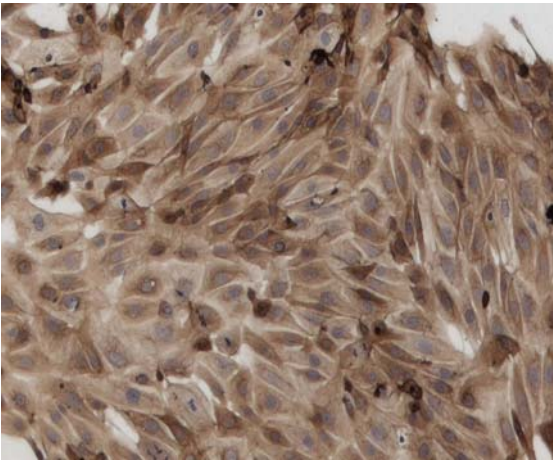


Figure 2.

a)



b)



Figure 3.

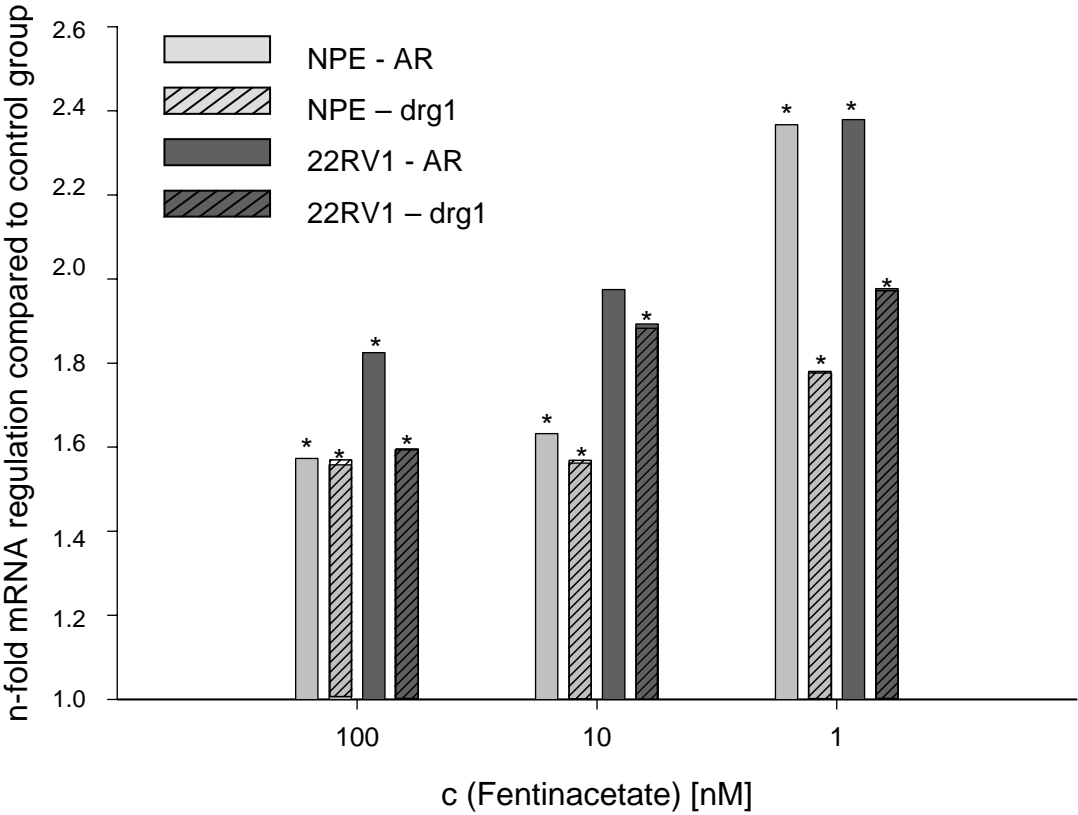


Figure 4.

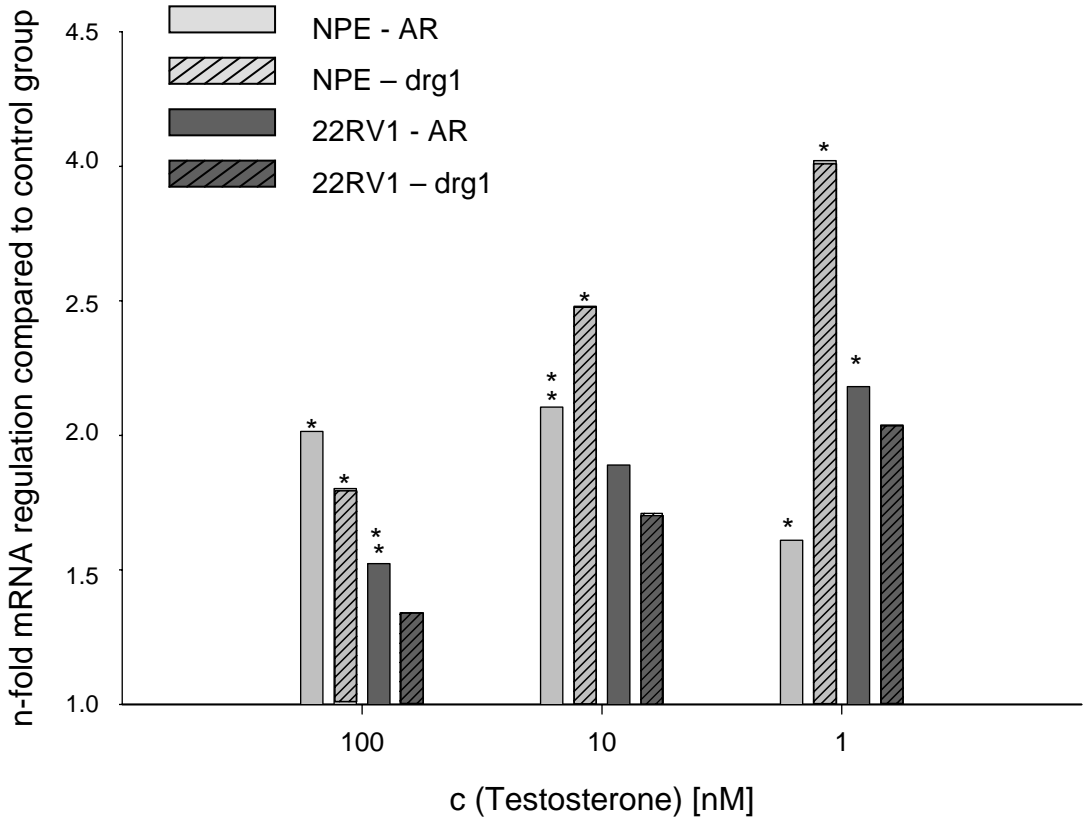
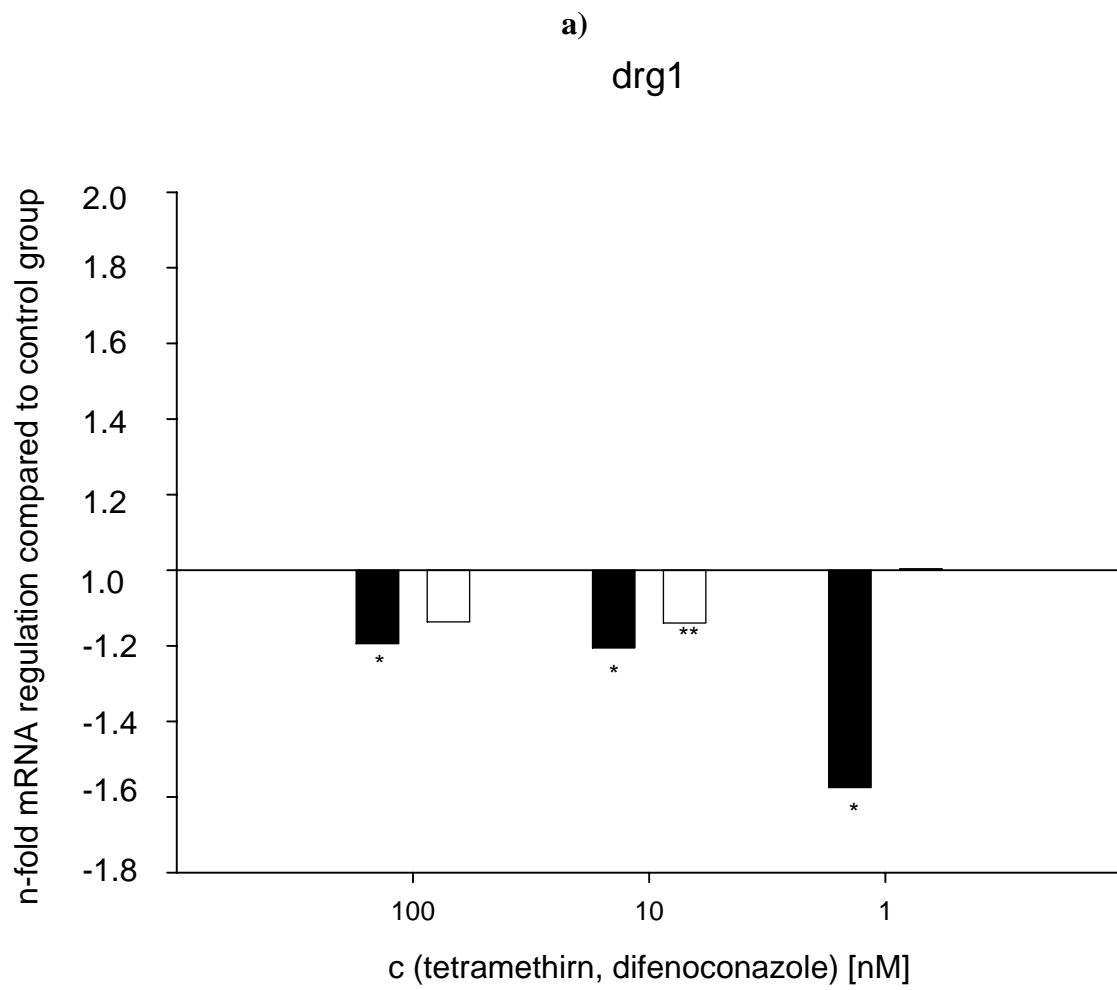
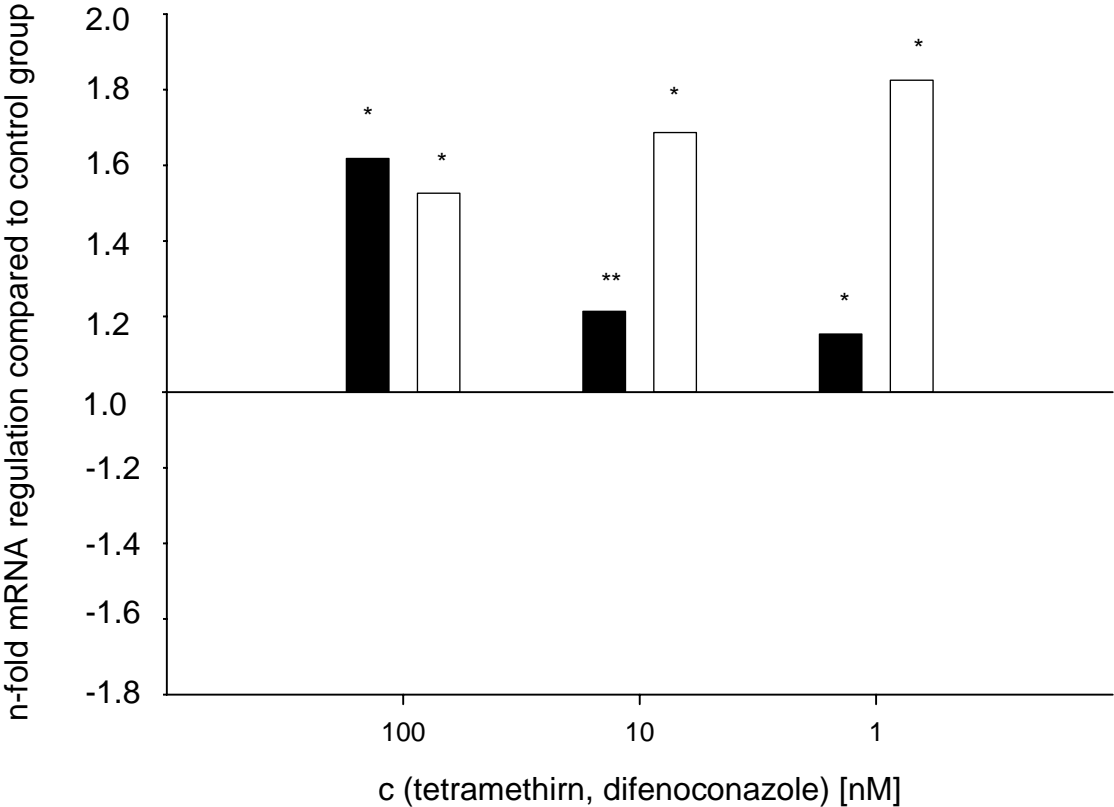


Figure 5.



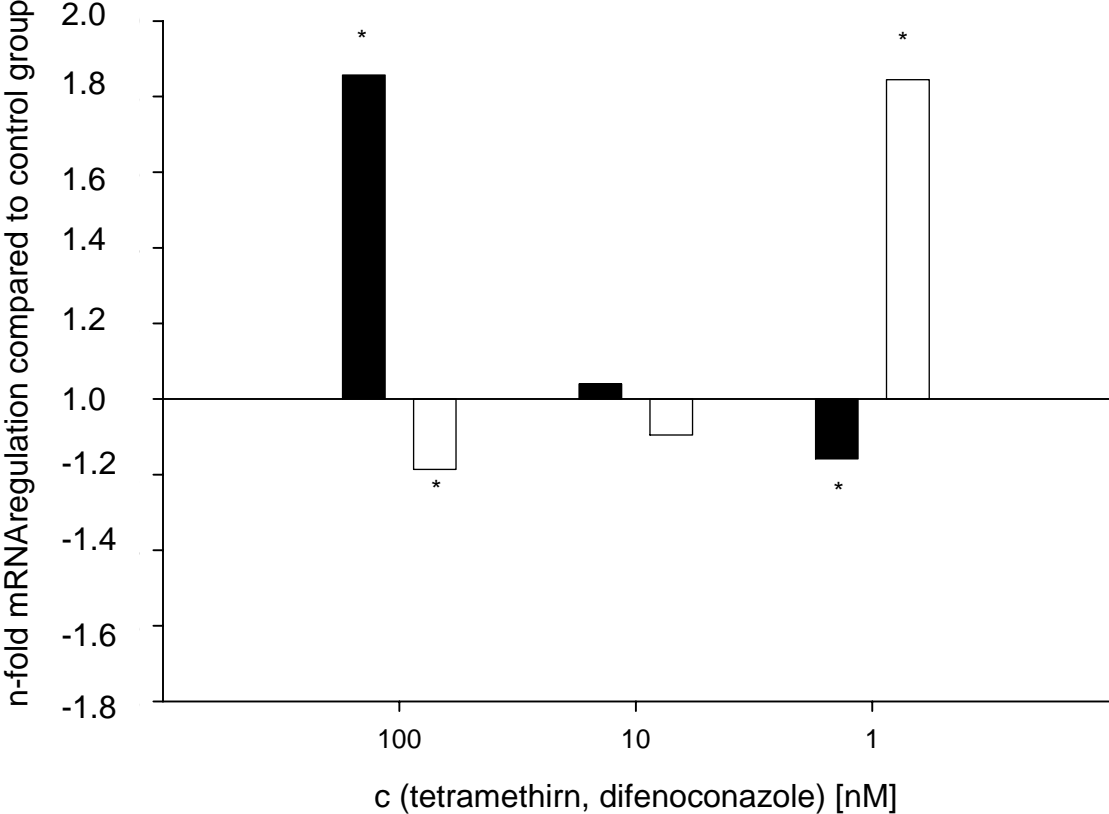
b)

5 alpha reductase

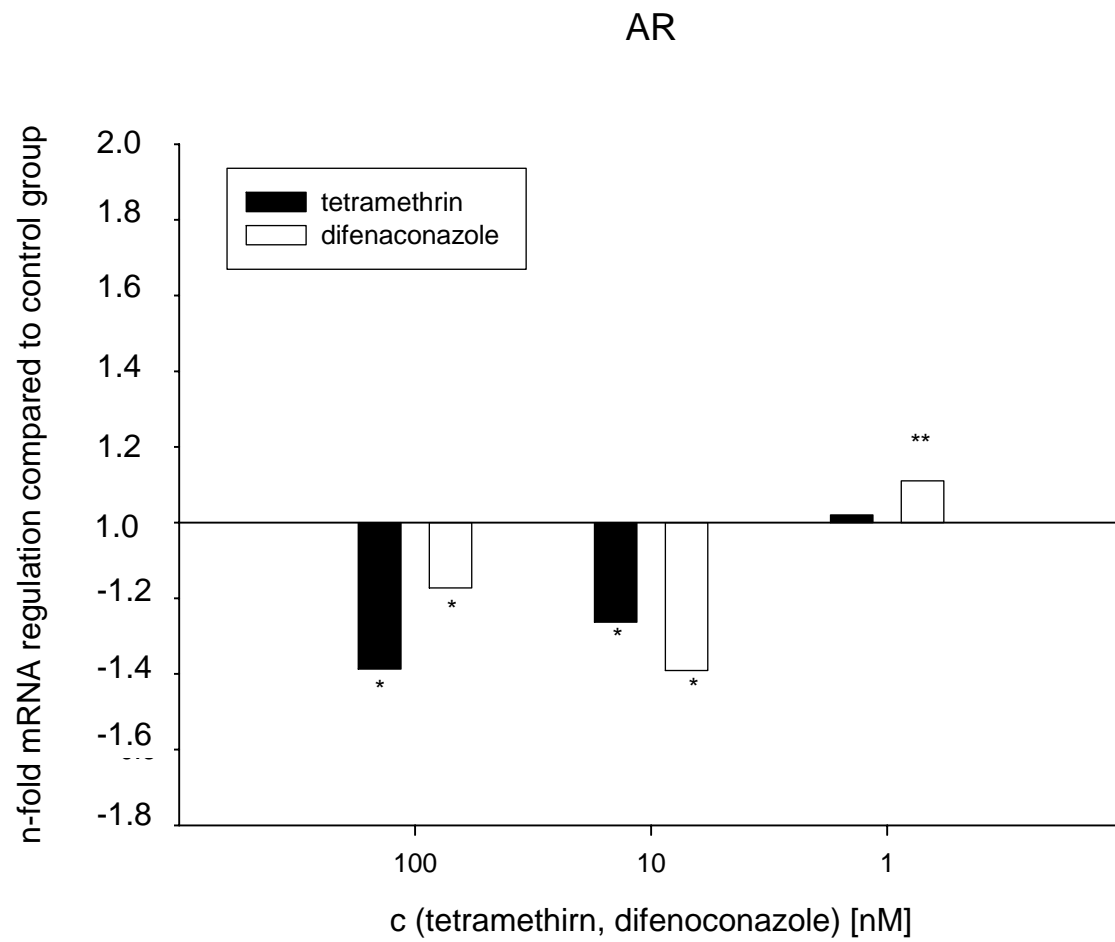


c)

cycline D₁



d)



Legend of Figures

Figure 1. Culture of primary porcine prostate epithelial cells (a) and stromal cells (b) after 3 days in culture (both 40 x magnification).

Figure 2. Differentiation of epithelial and stromal cells with cytokeratin via Mayer Haemalaun nuclei counterstain. (a) Positive immunohistochemical reaction for cytokeratin on primary porcine prostate epithelial cells (20 x magnification). (b) Negative immunohistochemical reaction for cytokeratin on NPE stromal cells (20 x magnification).

Figure 3. Effect of treatment with fentinacetate on AR and drg1 genes mRNA expression level in NPE and 22RV1 cells (n=6) in comparison with untreated controls (n=6). Both cell types were cultured in the absence or presence of fentinacetate (100 nM, 10 nM and 1 nM). Expression changes were shown as n-fold up- or down-regulation (mean±SD). Tissue mean expression level (n-fold) = $E^{\Delta\Delta CP}$. * P < 0.05, **P < 0.01 indicate significant differences between treatment groups.

Figure 4. Effect of treatment with testosterone on AR and drg1 genes mRNA expression level in NPE and 22RV1 cells (n=6) in comparison with untreated controls (n=6). Both cell types were cultured in the absence or presence of testosterone (100 nM, 10 nM and 1 nM). Expression changes were shown as n-fold up- or down-regulation (mean±SD). Tissue mean expression level (n-fold) = $E^{\Delta\Delta CP}$. * P < 0.05, **P < 0.01 indicate significant differences between treatment groups.

Figure 5. Effect of treatment with difenoconazole and tetramethrin on AR, drg1, 5 α -reductase and cycline D₁ genes mRNA expression level in 22RV1 (n=6). 22RV1 cells was cultured in the absence or presence of difenoconazole and tetramethrin (100 nM, 10 nM and 1 nM). Expression changes were shown as n-fold up- or down-regulation (mean±SD). Tissue mean expression level (n-fold) = $E^{\Delta\Delta CP}$. * P < 0.05, **P < 0.01 indicate significant differences between treatment groups.