

**Prostatakarzinom, benignes  
Prostatasyndrom und Morbus Alzheimer:  
Beeinflussung der Steroidbiosynthese als  
Schlüssel zu neuen und verbesserten  
Therapeutika**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von

**Sebastian Johannes Krug**

Saarbrücken

2017

Tag des Kolloquiums: 01. September 2017  
Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick  
Berichterstatter: Prof. Dr. R.W. Hartmann  
Prof. Dr. Dr. h.c. H.H. Maurer  
Vorsitz: Prof. Dr. C. Jacob  
Akad. Mitarbeiter: Dr. S. Boettcher

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2009 bis September 2013 unter Anleitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Rolf W. Hartmann in der damaligen Fachrichtung 8.2 Pharmazie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes angefertigt.

**„POKING A DEAD RACCOON IS NOT RESEARCH”**

- Bartholomew J. Simpson  
The Simpsons Episode 339

Für Luca

# Inhalt

A	Einleitung .....	1
A.1	Steroidhormone .....	1
A.1.1	Androgene .....	2
A.1.2	Estrogene .....	3
A.1.3	Mineralo- und Glucocorticoide .....	3
A.1.4	Neurosteroide und neuroaktive Steroide .....	4
A.2	Steroidogenese .....	5
A.2.1	Cytochrom P450 Superfamilie .....	5
A.2.1.1	Cytochrom P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C <sub>17,20</sub> -Lyase (CYP17A1).....	9
A.2.2	Weitere Oxidoreduktasen .....	12
A.2.2.1	5 $\alpha$ -Reduktase (5 $\alpha$ R) .....	13
A.3	Physiologie und Pathophysiologie der Androgene .....	14
A.3.1	Physiologie von Testosteron und Dihydrotestosteron.....	14
A.3.2	Androgenabhängige Erkrankungen und deren Therapie.....	15
A.3.2.1	Benigne Prostatahyperplasie und benignes Prostatasyndrom .....	15
A.3.2.2	Prostatakrebs .....	17
A.4	Hemmstoffe steroidogener Enzyme .....	20
A.4.1	5 $\alpha$ -Reduktase Hemmstoffe .....	20
A.4.2	CYP17A1 Hemmstoffe .....	21
A.4.2.1	Steroidale CYP17A1 Hemmstoffe .....	21
A.4.2.2	Nicht-steroidale CYP17A1 Hemmstoffe .....	22
A.5	Morbus Alzheimer.....	24
A.5.1	$\beta$ -Amyloid Peptide .....	25
A.5.2	Mitochondriale Schäden und oxidativer Stress .....	25
A.5.3	Neuroprotektive Wirkung von neuroaktiven Steroiden .....	25
B	Ziele der Arbeit .....	26
C	Biologische Evaluation neuartiger Inhibitoren der humanen 5 $\alpha$ -Reduktase	
	Typ I und II .....	28
C.1.1	Einführung und Beitragsbericht .....	28
C.1.2	Verbindungsklassen und Designrationale .....	28
C.1.3	Zusammenfassung der Vorgängerstudie .....	31
C.2	Ergebnisse zu neuen Hemmstoffen der humanen 5 $\alpha$ R .....	33
C.2.1	17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androstene .....	33

C.2.1.1	Modifikation in 3- und 6-Position .....	33
C.2.1.2	3-Cyanoverbindungen .....	34
C.2.1.3	3-Carboxyverbindungen .....	35
C.2.2	17-Aza-17a-homo-androsten-16,17a-dione .....	37
C.2.2.1	Modifikation in 3- und 6-Position .....	37
C.2.2.2	3-Cyanoverbindungen .....	38
C.2.2.3	3-Carboxyverbindungen .....	39
C.2.3	5-Aza-des-A-7a-homo-androstane .....	40
C.3	Vergleich und Bewertung der Verbindungsklassen .....	41
C.3.1	Vergleich der 17a-Aza-17a-homo-androst-3,5-dien-17-one mit den 17a-Aza-17a-homoandrostenen .....	42
C.3.2	Vergleich der 17a-Aza-17a-homo-androst-3,5-dien-17-one mit den 17-Aza-17a-homo-androsten-16,17a-dionen .....	44
C.3.3	Vergleich der 17a-Aza-17a-homo-androst-3,5-dien-17-one mit den 5-Aza-des-A-7a-homo-androstanen .....	44
C.4	Weiterentwicklung der Substanzklassen .....	44
D	Entwicklung eines CYP17A1 C <sub>17,20</sub> -Lyase-Assays und biologische Evaluierung einer Substanzbibliothek .....	46
E	Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn: Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen .....	53
E.1	Einführung .....	53
E.2	Untersuchungen zum Steroidmetabolismus unter Einbeziehung von GHB .....	54
E.2.1	HPLC Methode .....	54
E.2.2	Inkubation mit Steroid gleichzeitige GHB Behandlung .....	55
E.2.3	Inkubation mit Steroid gleichzeitige GHB Behandlung und Vorbehandlung mit GHB .....	56
E.2.4	Auswertung der Ergebnisse .....	56
E.2.5	Ergebnisse der Inkubationen mit Steroid gleichzeitige GHB Behandlung .....	56
E.2.5.1	Ergebnisse mit P <sub>5</sub> .....	56
E.2.5.2	Ergebnisse mit P <sub>4</sub> .....	57
E.2.5.3	Ergebnisse für AD .....	58
E.2.5.4	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse .....	60
E.2.6	Ergebnisse der Inkubationen mit Steroid gleichzeitige GHB Behandlung und Vorinkubation mit GHB .....	60

E.2.6.1	Ergebnisse mit P <sub>4</sub> .....	60
E.2.6.2	Ergebnisse mit AD .....	62
E.2.6.3	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse .....	63
E.2.7	Weitere Vergleiche der erhaltenen Daten .....	63
E.2.8	Identifikation der gebildeten Produkte .....	64
E.2.8.1	Vergleich mit Steroidstandards .....	64
E.2.8.2	Untersuchung einer möglichen Steroidsulfatbildung .....	65
E.2.8.3	Zusammenfassung der Identifikation der erhaltenen Peaks .....	70
E.2.9	Aufklärung der Steroidbiosynthese in SH-SY5Y Zellen .....	70
E.2.9.1	3 $\beta$ -HSD/ $\Delta$ 5L .....	70
E.2.9.2	CYP17A1 .....	71
E.2.9.3	CYP19 (Aromatase) .....	71
E.2.9.4	17 $\beta$ -HSD1 (oder eine andere reduzierende 17 $\beta$ -HSD) .....	71
E.2.9.5	5 $\alpha$ R .....	71
E.2.9.6	Steroidsulfotransferase .....	71
E.3	Bewertung und Vergleich mit der Literatur .....	71
F	Diskussion .....	74
F.1	Biologische Evaluation neuartiger Inhibitoren der humanen 5 $\alpha$ -Reduktase Typ I und II .....	74
F.2	Entwicklung eines CYP17A1 C <sub>17,20</sub> -Lyase-Assays und biologische Evaluierung einer Substanzbibliothek .....	77
F.3	Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn: Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen .....	81
G	Fazit .....	83
H	Ausblick .....	84
I	Zusammenfassung .....	88
J	Summary .....	89
Material und Methoden	.....	90
J.1	Material .....	90
J.1.1	Chemikalien und Medien .....	90
J.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	91
J.1.3	Medien und Lösungen für die Zellkultur .....	92
J.1.3.1	Medium für SH-SY5Y Zellen .....	92
J.1.3.2	Medium für HEK I und HEK II Zellen .....	92

J.1.3.3	Trypsin-EDTA Lösung .....	92
J.1.3.4	Lösungen und Puffer zur Herstellung von HEK-I und HEK-II Homogenat	92
J.1.3.5	Puffer und Lösungen zur Durchführung der CYP17A1 Assays .....	93
J.1.3.6	Puffer für Inkubationen mit S9 Fraktion .....	93
J.1.4	Zelllinien .....	94
J.1.4.1	SH-SY5Y .....	94
J.1.4.2	HEK-I.....	94
J.1.4.3	HEK-II.....	94
J.1.5	Geräte .....	94
J.2	Methoden.....	96
J.2.1	HPLC Methoden .....	96
J.2.1.1	HPLC Methoden für die CYP17A1 Assays.....	96
J.2.1.2	HPLC Methode für SH-SY5Y Experimente.....	98
J.2.1.3	HPLC Methode für 5 $\alpha$ RI und 5 $\alpha$ RII („5ALPHA_SK.M“).....	98
J.2.1.4	Elektronische Zellzahlbestimmung mittels CASY <sup>®</sup> Modell TT .....	98
J.2.2	Arbeitstechniken mit Zellkulturen .....	99
J.2.2.1	Kryokonservierung.....	99
J.2.2.2	Kultivierung der Zelllinien.....	100
J.2.2.3	Passagieren der Zelllinien .....	101
J.2.2.4	Herstellung von HEK-I und HEK-I Homogenat.....	102
J.2.3	Biologische Assays .....	102
J.2.3.1	Test auf Hemmung von 5 $\alpha$ RI und 5 $\alpha$ RII.....	102
J.2.3.2	Tests auf Hemmung von CYP17A1 .....	104
J.2.3.3	Inkubation mit S9 Fraktion aus humaner Leber.....	106
K	Referenzen.....	108
L	Danksagung.....	120

## Abkürzungsverzeichnis

17 $\beta$ -HSD1	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1
17 $\beta$ -HSD2	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
17OH-P <sub>4</sub>	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron
17OH-P <sub>5</sub>	17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon
3 $\alpha$ -HSD	3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
3 $\beta$ -HSD/ $\Delta$ <sub>5</sub> I	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta$ <sub>5-4</sub> -Isomerase
5 $\alpha$ AD	Androstandion
5 $\alpha$ R	5 $\alpha$ -Reduktase
5 $\alpha$ RI	5 $\alpha$ -Reduktase Typ I
5 $\alpha$ RII	5 $\alpha$ -Reduktase Typ II
5 $\alpha$ RIII	5 $\alpha$ -Reduktase Typ III
ABT	Abirateron
A $\beta$	$\beta$ -Amyloid-Peptid
AD	Androstendion
AP	Allopregnanolon
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AR	Androgenrezeptor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BPS	benignes Prostatasyndrom
CAB	<i>combined androgen blockade</i>
CBG	Corticosteroid-bindendes Globulin
CRPC	kastrationsresistentes Prostatakarzinom ( <i>castration resistant prostate cancer</i> )
CYP	Cytochrom P450
CYP11A1	Cholesterol-C <sub>20,22</sub> -Desmolase
CYP17A1	Cytochrom P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C <sub>17,20</sub> -Lyase
CYP19	Aromatase
CYP21A2	Steroid-21-Hydroxylase
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DOC	11-Deoxycorticosteron
E1	Estron

E2	Estradiol
E3	Estriol
ER	Estrogenrezeptor
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor $\alpha$
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FMN	Flavin-mono-nucleotid
GHB	Gammahydroxybuttersäure
GR	Glucocorticoidrezeptor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSDs	Hydroxysteroid-Dehydrogenasen
KP-Puffer	Kaliumhydrogenphosphatpuffer
KTZ	Ketoconazol
LH	luteinisierendes Hormon
LUTS	Symptome des unteren Harntrakts ( <i>lower urinary tract symptoms</i> )
MR	Mineralocorticoidrezeptor
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
P <sub>4</sub>	Progesteron
P <sub>5</sub>	Pregnenolon
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PCa	Prostatakarzinom ( <i>prostate cancer</i> )
PR	Progesteronrezeptor
PSA	prostataspezifisches Antigen
RECIST	Kriterien zur Bewertung des Ansprechens bei soliden Tumoren ( <i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i> )
RT	Raumtemperatur
S.E.M.	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SF	Selektivitätsfaktor
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
T	Testosteron
TFA	Trifluoressigsäure
THDOC	Allotetrahydrodeoxycorticosteron
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
ZF	<i>Zona fasciculata</i>

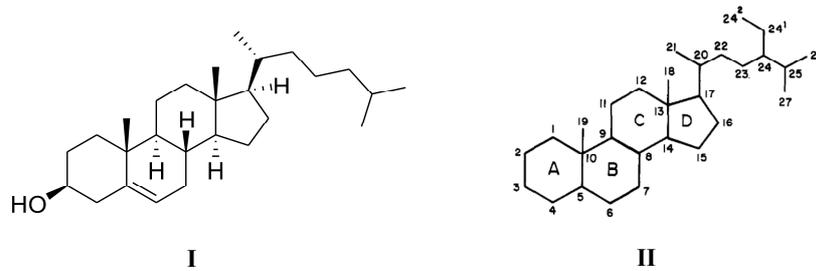
ZG	<i>Zona glomerulosa</i>
ZNS	Zentralnervensystem
ZR	<i>Zona reticularis</i>

## A Einleitung

Steroidhormone spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation mannigfaltiger Mechanismen im Organismus. So hängen beispielsweise Elektrolythaushalt, Gluconeogenese, Knochenaufbau und Ausbildung sekundärer Geschlechtsorgane von Steroiden aus verschiedenen Klassen ab. Ihre Bildung erfolgt über eine Vielzahl von steroidogenen Enzymen und erstreckt sich über verschiedene Zellorganellen, Organkompartimente und auch über gänzlich unterschiedliche Organe. Im Gegensatz zu Peptidhormonen bauen die Biosyntheseschritte der einzelnen Steroidhormongruppen aufeinander auf, sodass ein komplexes Geflecht aus Synthesewegen entsteht. Defekt oder Überexpression eines einzelnen steroidogenen Enzyms betrifft daher nicht nur das jeweilige Enzymprodukt, sondern auch nachgeschaltete Biosyntheseprodukte. Eine solche Störung der Homöostase begründet die Pathophysiologie vieler unterschiedlicher Krankheiten. Oft stehen für solche Leiden Therapieoptionen zur Verfügung, sei es durch Supplementierung eines durch Enzymdefekt nichtgebildeten Steroids (z.B. Cortisol- und Fludrocortisongabe bei Adrenogenitalem Syndrom) oder durch Hemmung eines einzelnen Enzyms der Steroidogenese (z.B. Aromataseinhibitor bei hormonabhängigem Brustkrebs). Viele dieser Therapieoptionen sind allerdings mit Nachteilen behaftet. Ebenso sind noch nicht alle Möglichkeiten des Eingreifens ausgeschöpft. Daher ist es notwendig und lohnenswert weiter auf dem Gebiet der Steroidhormone zu forschen und verbesserte Wirkstoffe mit optimiertem Wirk- und Nebenwirkungsprofil oder gar gänzlich neue Medikamentenklassen zu entwickeln.

### A.1 Steroidhormone

Steroidhormone werden im menschlichen und tierischen Organismus aus Cholesterol gebildet (siehe Abbildung A-1). Ein verzweigtes Geflecht aus enzymatischen Reaktionen führt zu verschiedenen Steroidhormongruppen. Man teilt sie anhand der Kohlenstoffanzahl des Steroidgerüsts in C<sub>27</sub>-Steroide (Calcitriol), C<sub>21</sub>-Steroide (Progestagene, Glucocorticoide, Mineralocorticoide), C<sub>19</sub>-Steroide (Androgene), C<sub>18</sub>-Steroide (Estrogene) ein. Auf die Biosynthesewege und -orte wird im Kapitel A.2 näher eingegangen.



**Abbildung A-1**            **I Strukturformel von Cholesterol**  
**II Nummerierung und Bezeichnung der Kohlenstoffatome bzw. Ringe im Steroidgerüst, aus [1]**

Nach ihrer Bildung werden Steroidhormone, im Gegensatz zu vielen Peptidhormonen, nicht in den Hormondrüsen gespeichert, sondern unmittelbar nach der Biosynthese ausgeschüttet. Im Blutkreislauf liegen sie dabei nicht frei vor, sondern sind zu einem sehr hohen Anteil an verschiedene Plasmaproteine (z.B. Albumin, das Sexualhormon-bindende Globulin (SHBG) oder das Corticosteroid-bindende Globulin (CBG)) gebunden [2]. Auf diese Weise wird ein Reservoir an nicht aktiven, da reversibel gebundenen, Steroidhormonen geschaffen. Manche Steroide können an ihrem Syntheseort durch eine Sulfotransferase sulfatiert [3, 4] und somit wasserlöslich gemacht werden. Als Beispiele seien hier Estron (E1) und Dehydroepiandrosteron (DHEA) genannt. Das freie Steroid kann in der Zielzelle durch enzymatische Spaltung des Sulfatesters durch eine Sulfatase wieder freigesetzt werden.

Steroidhormone entfalten Ihre Wirkung am Zielorgan durch Bindung an einen für sie spezifischen, nukleären Rezeptor. Nach Ligandenbindung erfolgen eine Homodimerisierung des Rezeptormonomers sowie die anschließende Translokalisierung in den Zellkern. Bindung an ein sogenanntes *hormone response element* der DNA lässt den Rezeptor als Transkriptionsfaktor wirken und leitet die Expression hormonabhängiger Gene ein. Wichtige Vertreter solcher nukleärer Steroidrezeptoren sind der Progesteronrezeptor (PR), der Androgenrezeptor (AR), der Estrogenrezeptor (ER), der Glucocorticoidrezeptor (GR) und der Mineralocorticoidrezeptor (MR). [5]

Abgebaut werden Steroidhormone hauptsächlich in der Leber, wo sie durch Reduktions-, Hydroxylierungs- und Spaltungsreaktionen inaktiviert werden. Weiter können sie durch Konjugation mit beispielsweise Glucuron- oder Schwefelsäure in eine deutlich besser wasserlösliche Form gebracht und mit dem Harn ausgeschieden werden. [6]

### A.1.1 Androgene

Androgene sind die „männlichen“ Sexualhormone. Sie zeichnen sich chemisch durch ein Steroidgrundgerüst mit 19 Kohlenstoffatomen, das Androstangerüst, aus. Zu dieser Gruppe

zählen sowohl die Hauptandrogene Testosteron (T) und Dihydrotestosteron (DHT) als auch deren Vorstufen, Androstendion (AD) und Dehydroepiandrosteron (DHEA) (siehe Abbildung A-2). Wichtige Wirkungen von Androgenen sind die sexuelle Differenzierung des männlichen Fetus im Mutterleib, sowie die weitere Reifung des männlichen Körpers in der Pubertät. Des Weiteren bedingen Androgene sowohl anabole Prozesse als auch männliche Verhaltensweisen. Ein Überschuss an Androgenen kann allerdings unter anderem zu Alopezie und krankhaftem Prostatawachstum führen. Eine tiefer gehende Ausführung zur Physiologie und Pathophysiologie der Androgene findet sich in Abschnitt A.3

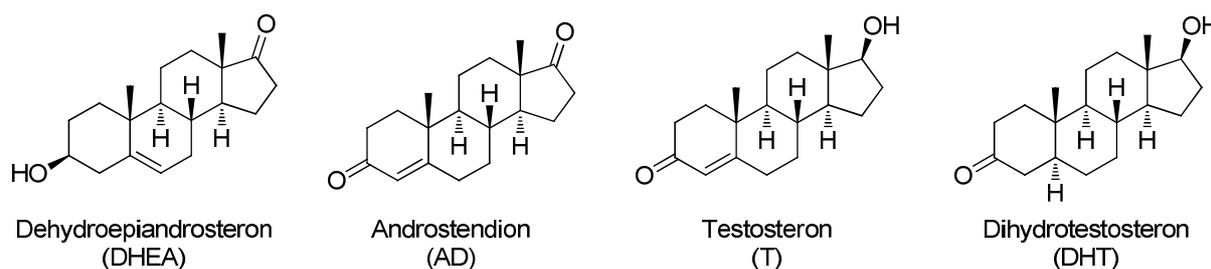


Abbildung A-2      Strukturformeln der Androgene DHEA, AD, T und DHT

### A.1.2 Estrogene

Die „weiblichen“ Sexualhormone haben im Vergleich zu den Androgenen ein Kohlenstoffatom verloren und weisen sich durch einen aromatischen A-Ring aus. Die Gruppe der Estrogene umfasst das am ER stark wirksame Estradiol (E2), dessen Speicherform Estron (E1) bzw. Estronsulfat und das, in größeren Mengen nur während der Schwangerschaft gebildete, Estriol (E3) (siehe Abbildung A-3). Im weiblichen Organismus sind Estrogene vor allem für die sexuelle Reifung der Frau, die Proliferation des Endometriums und die Förderung des Knochenaufbaus verantwortlich. Nicht geschlechtsspezifische Wirkungen übt E2 im Gehirn von Männern und Frauen aus (s. A.1.4 Neurosteroid).

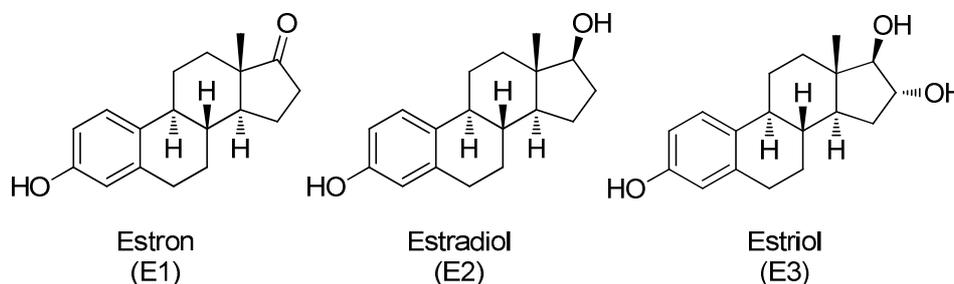
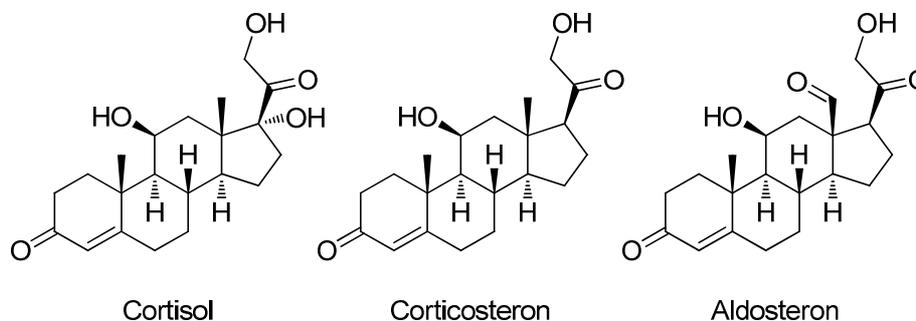


Abbildung A-3      Strukturformeln der Estrogene E1, E2 und E3

### A.1.3 Mineralo- und Glucocorticoide

Obwohl Mineralo- und Glucocorticoide (Cortisol, Corticosteron und Aldosteron, siehe Abbildung A-4) zwei Klassen von Steroidhormonen darstellen, teilen sie sich auch einige Eigenschaften. Beide sind beispielsweise chemisch aus einem C<sub>21</sub>-Grundgerüst aufgebaut.

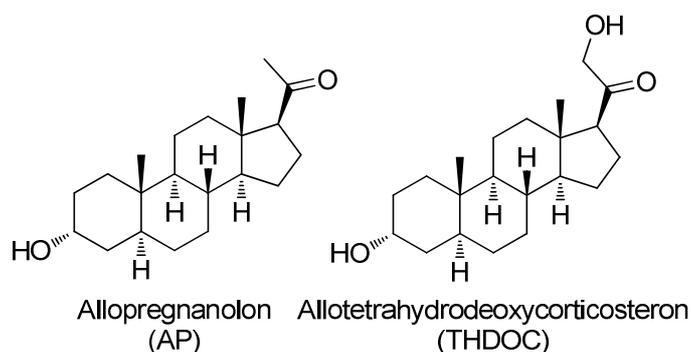
Diese chemische Ähnlichkeit führt dazu, dass das Hauptglucocorticoid beim Menschen, das Cortisol, auch am MR binden und dort mineralocorticoide Wirkung ausüben kann. Weiterhin kann das eigentlich zu den Glucocorticoiden gezählte Corticosteron auch als Mineralocorticoid wirken.



**Abbildung A-4**      **Strukturformeln der Mineralo- bzw. Glucocorticoide Cortisol, Corticosteron und Aldosteron**

#### A.1.4 Neurosteroide und neuroaktive Steroide

Die Klasse der Neurosteroide hebt sich von den anderen, bisher beschriebenen, Steroidklassen ab. Sie zeichnet sich nicht durch eine bestimmte Anzahl von Kohlenstoffatomen aus, sondern umfasst sowohl einige der bereits beschriebenen systemischen Steroide als auch speziell im Gehirn gebildete und wirksame Steroide. In der Terminologie dieser Steroide unterscheidet man die Neurosteroide, die *de novo* im Gehirn gebildet werden, und die neuroaktiven Steroide. Unter letzteren Begriff fallen alle Steroide, die eine Wirkung im Gehirn entfalten, unabhängig davon, ob sie im Gehirn oder in peripheren Geweben gebildet wurden. Das Gehirn kann somit sowohl Synthese- als auch Wirkort der entsprechenden Steroide sein. Vornehmlich als Neurosteroide bekannte Substanzen sind Allotetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC) und Allopregnanolon (AP) (siehe Abbildung A-5). Da beispielsweise das bereits vorgestellte Estrogen Estradiol (E2) Estrogenrezeptor-vermittelt eine neuroprotektive Wirkung entfalten kann [7], kann dieses Steroid – wenn im Gehirn gebildet – ebenfalls als Neurosteroid bezeichnet werden.



**Abbildung A-5**      **Strukturformeln der Neurosteroide AP und THDOC**

## A.2 Steroidogenese

Ausgehend vom Cholesterol werden die im menschlichen Körper biologisch aktiven Steroide von zwei Gruppen von Enzymen gebildet: den Monooxygenasen aus der Cytochrom-P450-Familie und anderen Oxidoreduktasen, die nicht der Cytochrom P450 Familie angehören. Abbildung A-6 gibt einen Überblick über wichtige Steroidbiosynthesewege und die beteiligten Enzyme.

Im Folgenden sollen die Eigenschaften und Funktionalitäten der Enzymgruppen und deren für die vorliegende Arbeit relevanten Vertreter näher beleuchtet werden.

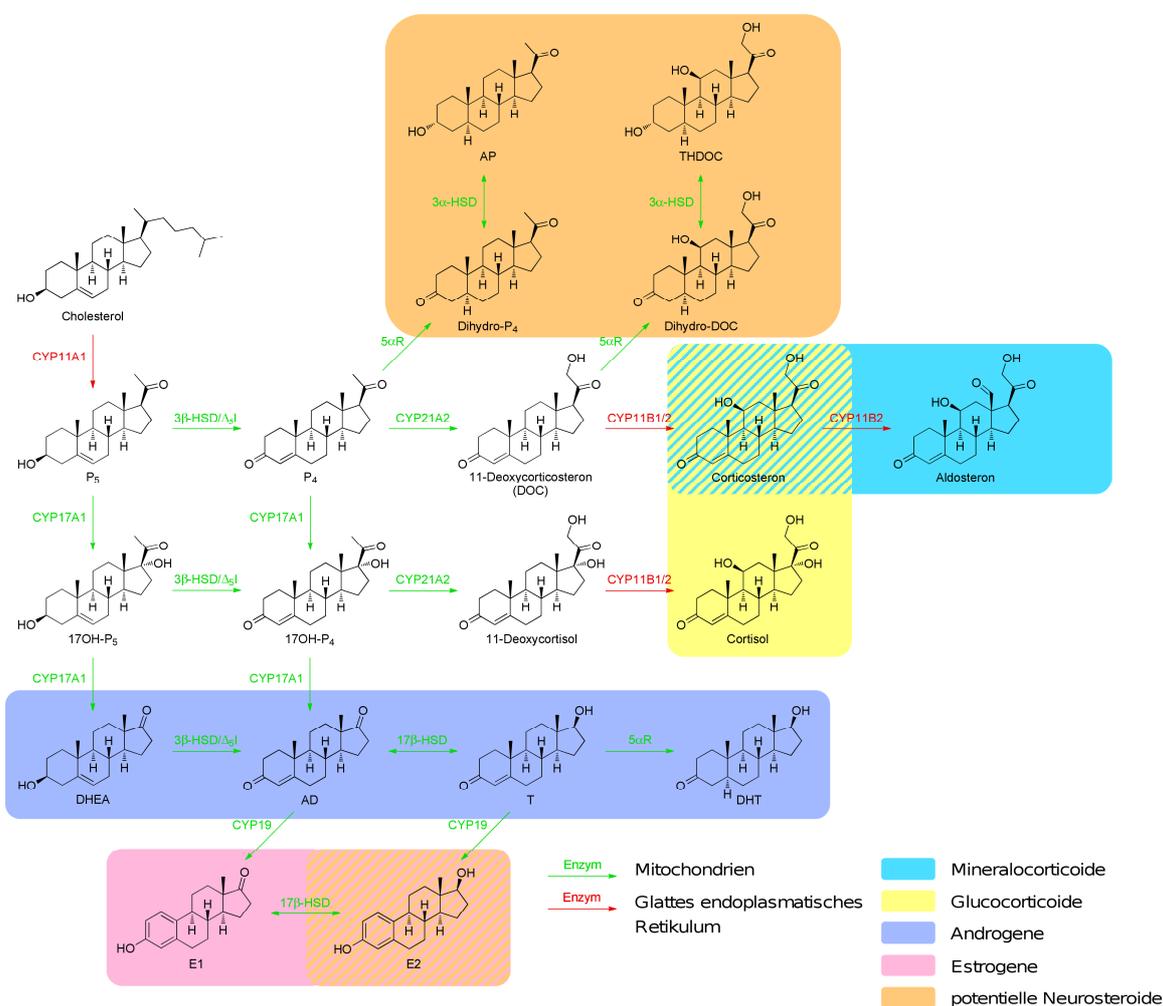


Abbildung A-6 Übersicht über die Steroidbiosynthese im Menschen

### A.2.1 Cytochrom P450 Superfamilie

Cytochrom P450 (CYP) Enzyme kommen in fast allen Lebewesen der Erde vor und katalysieren eine Reihe unterschiedlichster Reaktionen, die auf der Übertragung eines

Sauerstoffatoms auf ein Substratmolekül beruhen. Dabei besitzt die Enzymfamilie ein sehr weitgefasstes Substratspektrum, wobei einzelne Vertreter eine sehr enge, andere wiederum eine sehr breite Substratspezifität aufweisen. Infolgedessen haben CYP Enzyme sowohl große Bedeutung bei der Biosynthese endogener Stoffe wie den Steroiden als auch bei der Verstoffwechslung körpereigener sowie körperfremder Substanzen (Xenobiotika).

CYP Enzyme sind mischfunktionelle Monooxygenasen. Mit Ausnahme von bakteriellen Vertretern liegen sie meist membrangebunden vor. Das heißt, sie sind entweder in der inneren mitochondrialen Membran oder der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert. Durch die von Enzym und Membran geschaffene hydrophobe Umgebung wird das in den meisten Fällen lipophile Substrat angezogen.

Die katalytische Aktivität der CYP Enzyme wird durch die im aktiven Zentrum vorhandene Häm *b* Gruppe vermittelt. Diese prosthetische Gruppe stellt eine Komplexverbindung aus einem Porphyrin-Ring und einem Eisenion als Zentralatom dar. Im inaktiven Zustand liegt dieses als Eisen(III) vor. Vier der sechs Koordinationsstellen des Eisens werden von den Stickstoffatomen des Porphyrin-Rings besetzt, eine weitere koordiniert an die Thiolgruppe eines Cysteinrests des Enzyms und fixiert so die Hämgruppe im aktiven Zentrum. Die letzte Koordinationsstelle wird, solange kein Substrat oder Inhibitor gebunden ist, durch ein Wassermolekül besetzt (s. Abbildung A-7, linkes Enzymschema).

Die Katalyse einer Sauerstoffübertragung durch CYP Enzyme hängt von der Übertragung zweier Elektronen ab. Als Elektronendonator dient hierbei NADPH. Damit diese Moleküle Elektronen bereitstellen können, ist allerdings die Anwesenheit eines oder mehrerer Coenzyme Voraussetzung. Mikrosomale CYP Enzyme von Eukaryoten nutzen hierbei ein einzelnes Flavoprotein, die NADPH-P450-Reduktase, das sowohl FAD (Flavin-adenin-dinucleotid) als auch FMN (Flavin-mono-nucleotid) enthält. Bakterielle CYP Enzyme sowie mitochondriale Familienvertreter nutzen ein Flavoprotein, das nur FAD enthält, im Zusammenspiel mit einem Eisen-Schwefel-Protein. CYP Enzyme und die entsprechenden Reduktasen tragen entgegengesetzte Ladungen auf der Proteinoberfläche, sodass sie sich auf der Membran leicht zu einem effektiven Enzymkomplex zusammenfinden [8].

Ein allgemein gefasster Katalysemechanismus ist in Abbildung A-7 gezeigt. Anhand dieser sollen im nachfolgenden Text die einzelnen Katalyseschritte näher erklärt werden.

Der Kreislauf beginnt mit der Bindung des Substrats und der Verdrängung des Häm-gebundenen Wassers (1). Das Eisen(III) kann nun ein Elektron vom Elektronendonator NADPH aufnehmen und wird zum Eisen(II) reduziert (2), welches im nächsten Schritt ein Sauerstoffmolekül aufnehmen kann (3). Ein weiteres Elektron wird auf den Komplex

übertragen, das Sauerstoffmolekül erhält eine negative Ladung (4). Die Aufnahme zweier Protonen führt zur Entstehung eines Wassermoleküls und einer hochreaktiven Eisen(IV)-Oxo Spezies (5). Das so aktivierte Sauerstoffatom wird nun auf das Substrat übertragen, sodass, wie in der Abbildung schematisch dargestellt, ein hydroxyliertes Produkt entstehen kann. Dieses verlässt das aktive Zentrum, das nun wieder dreiwertige Eisen nimmt ein Wassermolekül als sechsten Liganden auf und der Kreislauf kann von Neuem durchlaufen werden (6).

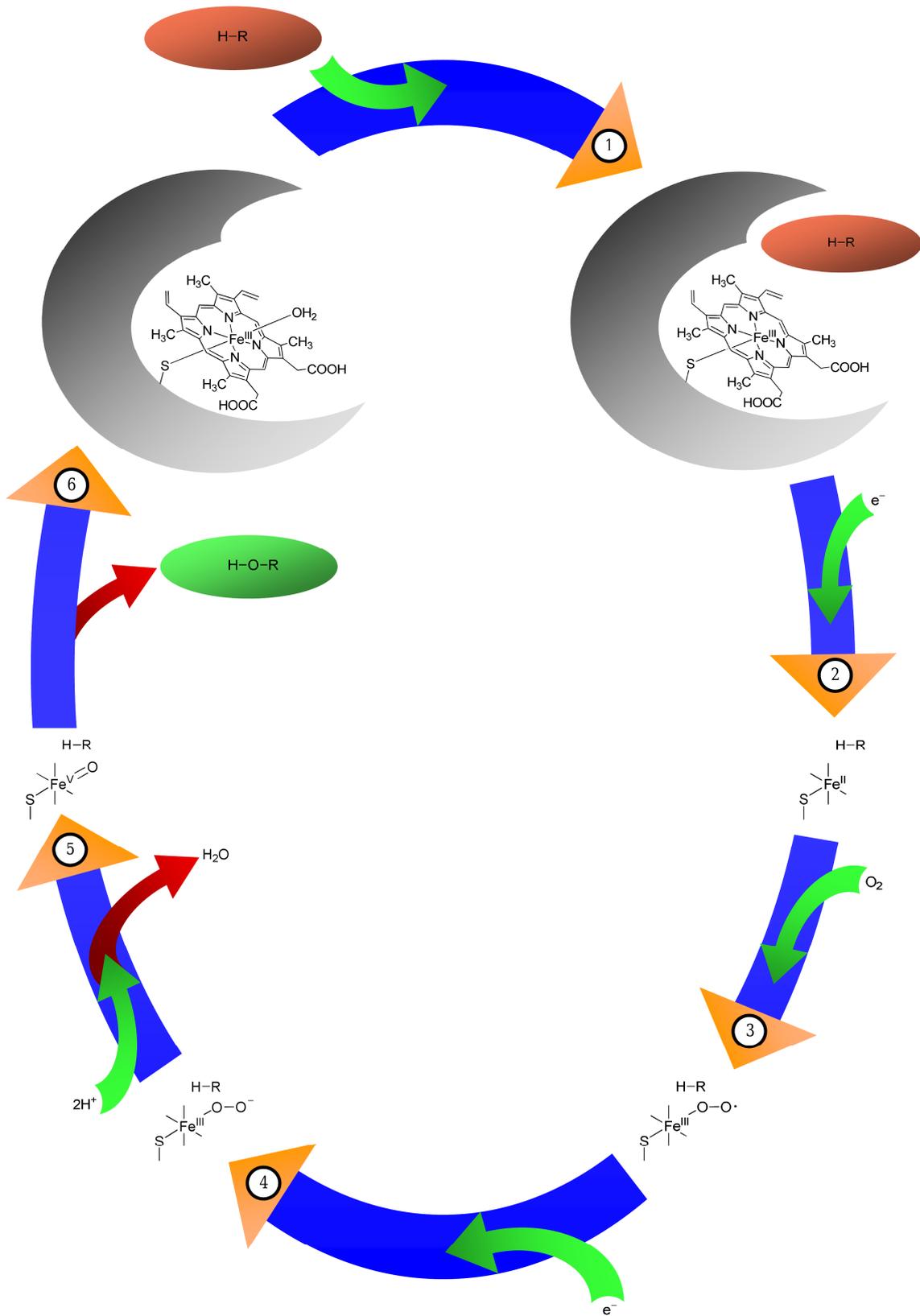


Abbildung A-7

CYP-Katalysekreislauf (Erläuterungen im Text) nach [9]

### A.2.1.1 Cytochrom P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase (CYP17A1)

#### A.2.1.1.1 CYP17A1 - katalysierte Reaktionen und Substrate

CYP17A1 ist ein sehr wichtiges Enzym für die Biosynthese von Steroidhormonen und katalysiert zwei unterschiedliche Hauptreaktionen (siehe Abbildung A-8). Die Substrate Pregnenolon (P<sub>5</sub>) und Progesteron (P<sub>4</sub>) können in einem ersten Katalyseschritt in ihre 17 $\alpha$ -Hydroxyderivate 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon (17OH-P<sub>5</sub>) bzw. 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17OH-P<sub>4</sub>) umgewandelt werden (17 $\alpha$ -Hydroxylase Aktivität). Ausgehend von diesen Steroiden kann das Enzym in einer zweiten Reaktion die C<sub>19</sub>-Steroide DHEA bzw. AD synthetisieren (C<sub>17,20</sub>-Lyase Aktivität). Hierbei ist hervorzuheben, dass humanes CYP17A1 17OH-P<sub>5</sub> gegenüber 17OH-P<sub>4</sub> als Substrat bevorzugt. Dies begründet sich unter anderem auf die Tatsache, dass der apparente K<sub>m</sub>-Wert von 17OH-P<sub>5</sub> zum CYP17A1-NADPH-P450-Reduktase-Komplex etwa 16-fach höher ist als der von 17OH-P<sub>4</sub> [10]. Im Menschen kann DHEA daher als Ausgangspunkt zur Androgensynthese, und folglich auch der Estrogensynthese, gesehen werden.

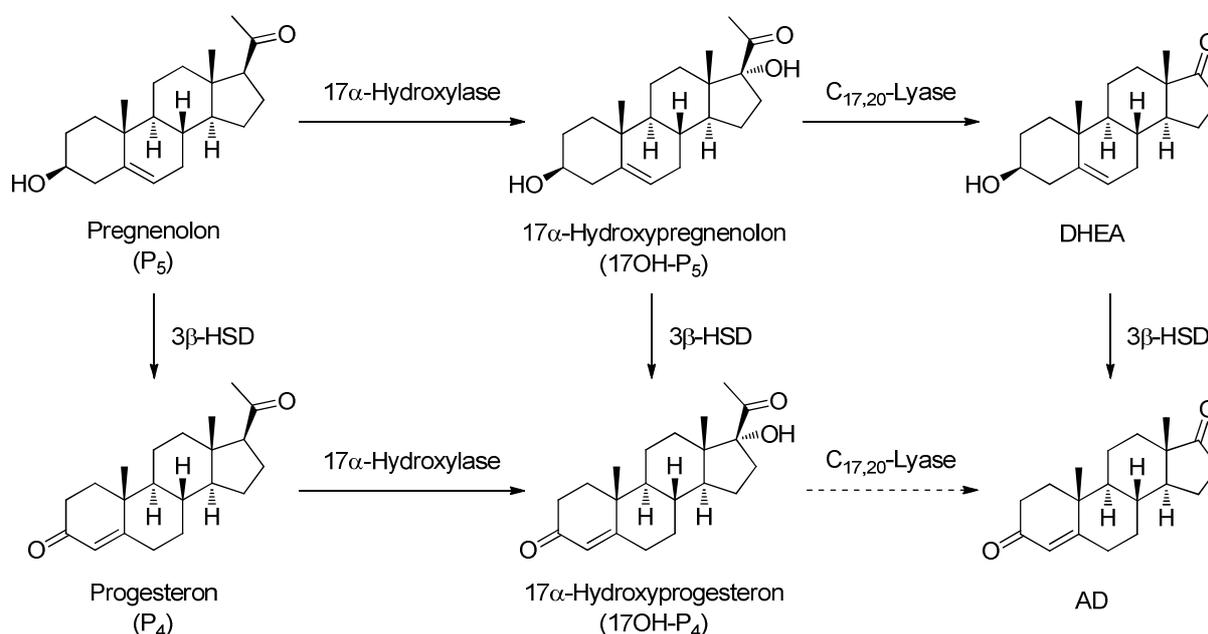


Abbildung A-8 CYP17A1 und seine Rolle bei der humanen Steroidogenese

Betrachtet man die Rolle der Substrate, Produkte und Zwischenprodukte von CYP17A1 in einem weiter gefassten Kontext der Steroidogenese, so wird deutlich, dass auch andere Steroidhormone neben den Androgenen/Estrogenen von ihnen abhängen (siehe Abbildung A-6). Aus P<sub>4</sub> können auch Corticosteron und Aldosteron und aus 17-OHP<sub>4</sub> auch Cortisol

gebildet werden. CYP17A1 ist daher nicht einfach ein Androgensynthesenzym, sondern liegt im Zusammenhang mit der Bildung von Steroidhormonen an einem Scheideweg zwischen Mineralocorticoiden, Glucocorticoiden und Androgenen/Estrogenen. Dies kann an Patienten gezeigt werden, die durch eine Genmutation unter einer CYP17A1 Enzymdefizienz leiden. Eine solche Mutation kann ein komplett inaktives Enzym zur Folge haben [11] oder sich in einer isolierten C<sub>17,20</sub>-Lyasedefizienz [12] ausdrücken. Im Falle eines vollständigen Enzymausfalls kann, aufgrund der fehlenden Sexualhormone, weder die Pubertät einsetzen noch Cortisol gebildet werden. In der Folge wird übermäßig Corticosteron gebildet, das durch seine schwache Glucocorticoidwirkung die Abwesenheit von Cortisol ausgleichen kann. Die ebenfalls vorhandene mineralocorticoide Wirkung des Corticosterons führt allerdings zu einem erhöhten Blutdruck und Hypokaliämie. Dagegen ist bei isolierter Lyasedefizienz lediglich die sexuelle Reifung beeinträchtigt.

#### **A.2.1.1.2 Vorkommen**

CYP17A1 wird im Menschen besonders stark in steroidogenen, Androgen produzierenden Geweben wie den Hoden und den Nebennieren exprimiert. CYP17A1 mRNA wurde unter anderem auch in den Eierstöcken, dem Gehirn und der Prostata nachgewiesen, wenn auch in geringeren Mengen als in den vorher genannten Geweben [13, 14]. Besondere Beachtung soll an dieser Stelle auf die Nebennieren oder genauer auf die Nebennierenrinde gelegt werden, da an deren Beispiel sehr anschaulich gezeigt werden kann, wie unterschiedlich die Steroidsynthese je nach Organkompartiment sein kann. Die Nebennierenrinde lässt sich unterteilen in die *Zona glomerulosa* (ZG), die *Zona fasciculata* (ZF) und die *Zona reticularis* (ZR) (s. Abbildung A-9). Dort findet auch die Biosynthese bedeutender Steroide statt [15]. CYP17A1 wird im Menschen nur in der ZF und der ZR exprimiert, wie durch Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte [16]. Das heißt, nur dort können von CYP17A1 abhängige Steroidsynthesen stattfinden und Cortisol (ZF) und DHEA (ZR) gebildet werden. In der ZG gehen aus P<sub>5</sub> also nur Mineralocorticoide hervor, wofür kein CYP17A1 benötigt wird.

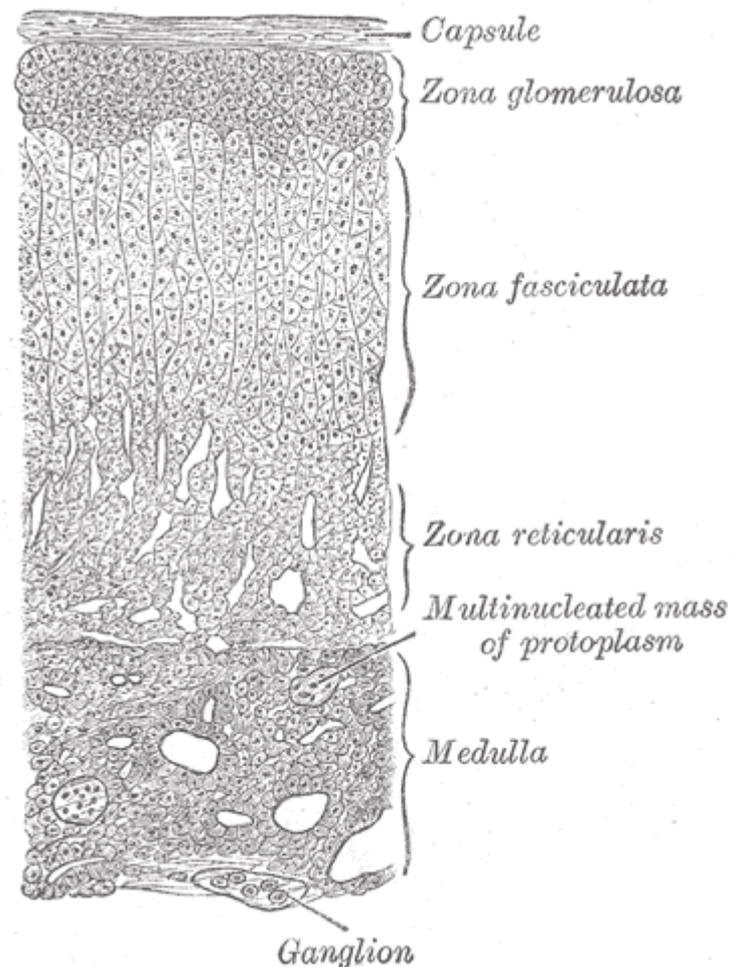


Abbildung A-9 Histologie der Nebennierenrinde aus [17] (Abbildung 1185)

### A.2.1.1.3 Regulation von $17\alpha$ -Hydroxylase und $C_{17,20}$ -Lyase

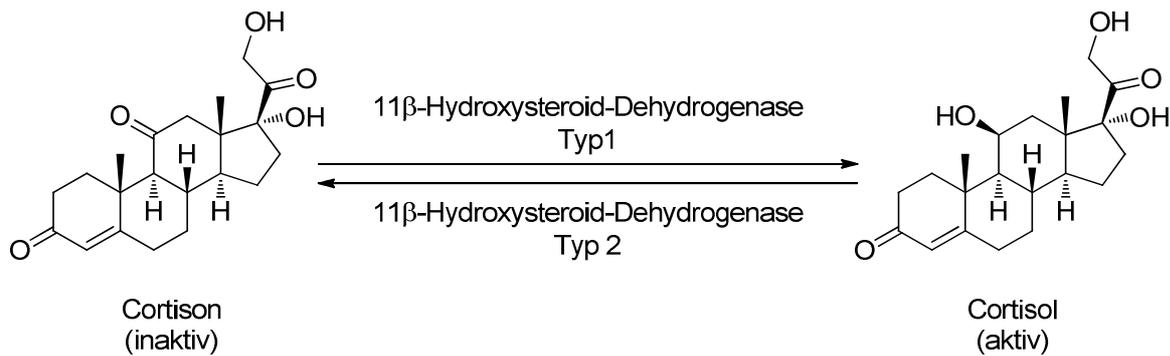
Betrachtet man die Verteilung und die Aktivität von CYP17A1 näher, so wird deutlich, dass das Enzym keineswegs in allen Geweben, in denen es gefunden wird, seine beiden Katalyseaktivitäten im gleichen Ausmaß ausübt. Aus  $P_5$  wird beispielsweise nicht in allen Zellen, die CYP17A1 exprimieren, auch DHEA gebildet. Die Ursache dafür ist ein komplexeres System, mit dessen Hilfe eine Zelle vor allem die  $C_{17,20}$ -Lyaseaktivität des Enzyms regulieren kann. Im Hinblick auf die in Abschnitt A.2.1.1.1 angesprochene Positionierung des Enzyms am Scheideweg zwischen Mineralocorticoiden, Glucocorticoiden und Androgenen/Estrogenen wird die Wichtigkeit dieses Systems deutlich. Soll eine Zelle der ZF aus  $P_5$  Cortisol bilden, so wäre es diesem Zweck abträglich, wenn eine hohe  $C_{17,20}$ -Lyaseaktivität das für die Cortisolbiosynthese nötige  $17OH-P_5$  in großem Maße zu DHEA umsetzt (s.a. Abbildung A-6 Übersicht über die Steroidbiosynthese im Menschen). Die Frage, wie eine Zelle die  $C_{17,20}$ -Lyaseaktivität des bifunktionalen Enzyms CYP17A1 herunterreguliert ohne die andere benötigte Aktivität, nämlich die  $17\alpha$ -Hydroxylase, zu

beeinträchtigen, beantworten Abbott und Bird [18] durch einen Blick auf die weiteren Gegebenheiten in der Zelle: Im erwachsenen Menschen findet sich in der ZF deutlich mehr  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta_{5,4}$ -Isomerase ( $3\beta$ -HSD/ $\Delta_5$ I) als in der ZR [19]. Dieses Enzym wandelt die  $\Delta_5$ -Steroide  $P_5$  und  $17\text{OH-}P_5$  irreversibel in die  $\Delta_4$ -Steroide  $P_4$  und  $17\text{OH-}P_4$  um. CYP17A1 kann, wie in Abschnitt A.2.1.1.1 beschrieben,  $17\text{OH-}P_4$  praktisch nicht weiter umsetzen. Das Steroids substrat steht also allein der Steroid-21-Hydroxylase (CYP21A2), dem nächsten Enzym auf dem Weg zur Glucocorticoidsynthese, zur Verfügung und wird letztendlich zu Cortisol umgesetzt. In der ZR hingegen finden sich neben einer geringeren  $3\beta$ -HSD/ $\Delta_5$ I Expression auch weitere die  $C_{17,20}$ -Lyaseaktivität fördernde Bedingungen, wie beispielsweise die Anwesenheit von Cytochrom  $b_5$  [10, 20]. Aus diesem Grund werden in der ZR große Mengen an DHEA produziert.

### A.2.2 Weitere Oxidoreduktasen

Wichtige Enzyme der Steroidbiosynthese, die nicht der CYP Superfamilie angehören sind Oxidoreduktasen, die mit  $\text{NAD(P)}^+$  oder  $\text{NAD(P)H}$  als Cofaktor Hydroxy- oder Ketogruppen an Steroiden oxidieren bzw. reduzieren oder ungesättigte Kohlenstoffbindungen reduzieren können. Dazu gehören die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) und die  $5\alpha$ -Reduktase ( $5\alpha$ R).

Die von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen können reversibel oder irreversibel sein. Beispiele für letztere sind die  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta_{5,4}$ -Isomerase ( $3\beta$ -HSD/ $\Delta_5$ I) (siehe auch Abbildung A-8) und die  $5\alpha$ R (siehe Abschnitt A.2.2.1). Die  $3\beta$ -HSD/ $\Delta_5$ I überführt 3-Hydroxy- $\Delta_5$ -Steroide wie  $P_5$  in 3-Keto- $\Delta_4$ -Steroide wie  $P_4$  und ist damit ein wichtiges Enzym für die Biosynthese von Mineralocorticoiden, Glucocorticoiden und Androgenen. HSDs, die reversible Reaktionen katalysieren, überführen wenig aktive Speicherformen von Steroiden in ihre hochaktiven Verwandten und zurück. Als Beispiel seien hier die  $11\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen Typ 1 und Typ 2 genannt (siehe Abbildung A-10).



**Abbildung A-10** Die 11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen Typ 1 und 2 und ihre Rolle bei der Aktivierung bzw. Deaktivierung des Glucocorticoidpaars Cortison/Cortisol

### A.2.2.1 5α-Reduktase (5αR)

Die 5α-Reduktase (3-Keto-Δ<sup>4</sup>-steroid-5α-reduktase; 5αR) ist ein weiteres wichtiges, steroidogenes Enzym. Die prominenteste durch die 5αR katalysierte Reaktion ist die irreversible Reduktion von Testosteron zum potentesten Androgen Dihydrotestosteron unter Verbrauch von NADPH. Aber auch andere 3-Keto-Δ<sup>4</sup>-steroidoide, wie beispielsweise Progesteron, können der 5αR als Substrat dienen (s. auch Abbildung A-6). Seit längerer Zeit sind die beiden Isoenzyme 5α-Reduktase Typ I (5αRI) und 5α-Reduktase Typ II (5αRII) bekannt. Beide sind membranständig und bestehen aus 259 bzw. 254 Aminosäuren [21, 22]. Stärkere Expression von Typ I wird vor allem in Haut und Kopfhaut beobachtet. Dagegen ist Typ II die vorherrschende Isoform in der Prostata, den Nebenhoden und der Samenblase. In der Leber und dem Gehirn kommen beide Isoformen vor [23].

Erst Anfang dieses Jahrtausends wurde ein weiteres Isoenzym (Typ III), bestehend aus 318 Aminosäuren [24], in Zellen, die aus einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom gewonnen wurden, entdeckt. In verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien wurde eine stark erhöhte Expression dieses 5αR Typs festgestellt [25].

#### A.2.2.1.1 Katalysemechanismus

Abbildung A-11 zeigt schematisch die Umsetzung von Testosteron zu Dihydrotestosteron durch die 5αR. Nach Aktivierung der Enon-Struktur des Substrats durch eine elektrophile Einheit des Enzyms, entsteht eine delokalisierte positive Ladung, die die Aufnahme eines Hydridions an C<sub>5</sub>-Position ermöglicht.

In Experimenten mit Homogenat aus Rattenleber konnte gezeigt werden, dass die Übertragung des vom Co-Faktor NADPH gelieferten Hydrids dabei stereospezifisch erfolgt. So wurde nur in den Fällen Tritium im Katalyseprodukt DHT aufgenommen, in denen [4-<sup>3</sup>H<sub>5</sub>]-NADPH als Co-Faktor zugegeben wurde. Ein Folgeexperiment mit, durch die 5αR tritiiertem, 5α-Steroid zeigte, dass das inkorporierte Tritium durch eine Behandlung mit Base

nicht wieder entfernt werden kann. Dies deutet darauf hin, dass das Tritium nicht auf den Kohlenstoff in Position 4 übertragen wurde [26].

Nach Aufnahme eines Protons zerfällt schließlich der ternäre Komplex aus Enzym, Co-Faktor und DHT, indem zunächst DHT und anschließend  $\text{NADP}^+$  freigesetzt wird [27].

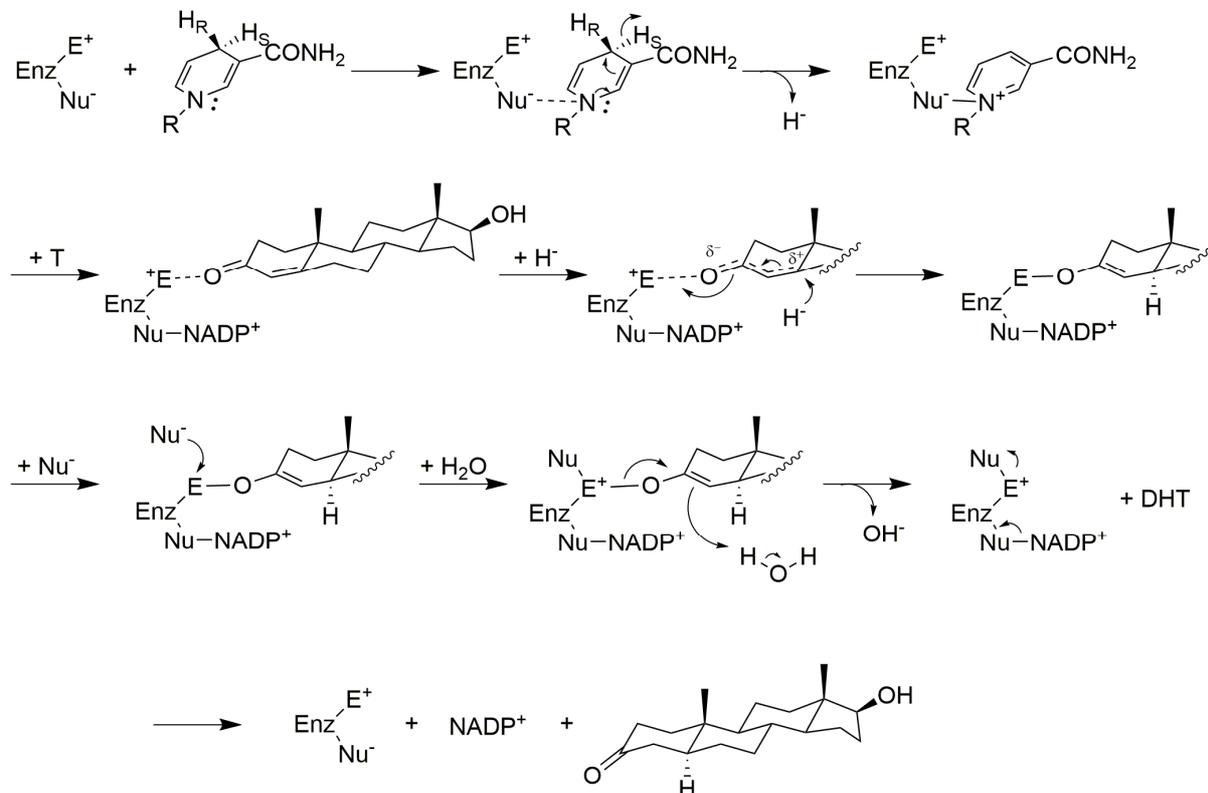


Abbildung A-11

Schema des Katalysemechanismus der 5 $\alpha$ -Reduktase nach [28]

Enz: Enzym / E<sup>+</sup>: elektrophiles Zentrum / Nu<sup>-</sup>: nukleophiles Zentrum /

R: Adenindinukleotidphosphat

### A.3 Physiologie und Pathophysiologie der Androgene

#### A.3.1 Physiologie von Testosteron und Dihydrotestosteron

Der Großteil (ca. 90 %) der Androgene wird beim Mann unter hypophysärer Kontrolle durch das Luteinisierende Hormon (LH) in den Leydig Zellen der Hoden gebildet. Etwa weitere 10 % der Androgene haben ihren Ursprung in der Nebennierenrinde. Das potenteste Androgen ist das DHT. Neben einem geringen Anteil an zirkulierendem DHT wird es meist in den Zielzellen seiner Wirkung aus T gebildet und bindet dort an den AR. Obwohl T und DHT beide an den AR binden und diesen aktivieren können, zeigt DHT eine höhere Wirkstärke. Dies ist mit der höheren Bindeaffinität von DHT an den Rezeptor begründet. Der DHT-AR Komplex ist des Weiteren stärker als der schneller wieder dissoziierende T-AR Komplex [29]. Die Aktivierung und die Translokation des AR in den Zellkern ziehen, nach Dimerisierung zweier Androgen-AR Komplexe und Bindung an das *androgen response element* der DNA,

die Transkription verschiedener Gene nach sich. Diese beinhalten Regulationsfaktoren für das Zellwachstum und unter anderem auch das nur im Prostatagewebe gebildete prostataspezifische Antigen (PSA). Letzteres stellt einen in der Urologie oft verwendeten, wenn auch nicht uneingeschränkt nutzbaren, Marker [30] für die Diagnose pathologischer Zustände der Prostata dar.

Die physiologischen Effekte der Androgene können in geschlechtsspezifische und geschlechtsunspezifische Wirkungen eingeteilt werden. Nur beim Mann kommen die geschlechtsspezifischen Wirkungen wie die Beeinflussung der Prostata und Samenbläschen, die Reifung der Samenzellen und die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale wie Bartwuchs und Stimmbruch zum Tragen. Die geschlechtsunspezifischen Wirkungen umfassen beispielsweise die anabole Wirkung der Androgene auf Muskel- und Knochenwachstum und die Funktion der Talgdrüsen. [31]

Eine Überproduktion von Androgenen kann bei Männern wie bei Frauen zu verschiedenen pathologischen Zuständen führen, auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

### **A.3.2 Androgenabhängige Erkrankungen und deren Therapie**

Eine unphysiologisch starke Androgenwirkung, die durch einen Überschuss an T und vor allem DHT hervorgerufen wird und eine Überaktivierung des AR zur Folge hat, zieht oft eine gesteigerte und in manchen Fällen unkontrollierte Zellproliferation nach sich. Klinisch kann sich dies in einer benignen Prostatahyperplasie, dem polycystischen Ovarialsyndrom oder einem Prostatakarzinom manifestieren. Die für diese Arbeit relevanten Krankheitsbilder und die aktuell zur Verfügung stehenden Therapieoptionen sollen in diesem Unterkapitel beschrieben werden.

#### **A.3.2.1 Benigne Prostatahyperplasie und benignes Prostatasyndrom**

Die benigne Prostatahyperplasie (BPH) bezeichnet eine gutartige Vergrößerung der Prostata, auch Vorsteherdrüse genannt, die anatomisch unter der Blase sitzt und die Harnröhre umschließt. Eine pathologisch vergrößerte Prostata kann zu einer Obstruktion der Harnröhre und damit zu einer Erhöhung des Blasenauflastwiderstands führen, was sich bei fortschreitender Erkrankung durch einen abgeschwächten Harnstrahl und weiteren Miktionsstörungen wie häufigem nächtlichem Wasserlassen, plötzlichem und starkem Harndrang und unvollständiger Blasenentleerung äußert. Diese Symptome werden unter dem Sammelbegriff „lower urinary tract symptoms“ (LUTS) zusammengefasst.

Bei Patienten mit oben beschriebener Symptomatik, einem erhöhten Prostatavolumen und einer Blasenauflastungsobstruktion spricht man heute von dem „benignen Prostatasyndrom (BPS)“. Die BPH wird nicht mehr als Krankheit bezeichnet, da sie vorrangig eine histologische Diagnose darstellt.

Die BPH kommt bei Männern in jungen Jahren praktisch nicht vor, wogegen im sechsten Lebensjahrzehnt etwa die Hälfte der Männer und im neunten Lebensjahrzehnt sogar nahezu 90 % der Männer betroffen sind [32].

#### **A.3.2.1.1 Behandlung**

Das BPS ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden Medikamenten gut behandelbar. Die im November 2014 aktualisierte Leitlinie zur Therapie des Benignen Prostatasyndroms bietet einen evidenzbasierten Überblick über die verschiedenen medikamentösen Therapieoptionen [33]. Dabei werden üblicherweise  $\alpha_1$ -Antagonisten,  $5\alpha$ -Reduktaseinhibitoren, Muskarinrezeptorantagonisten, Phosphodiesterase-Inhibitoren oder Phytotherapeutika als Monotherapie oder eine Kombination aus  $\alpha_1$ -Antagonisten mit  $5\alpha$ -Reduktaseinhibitoren, Muskarinrezeptorantagonisten oder Phosphodiesterase-Inhibitoren eingesetzt. Ziel der Behandlung ist es primär den Leidensdruck des Patienten durch Verbesserung der Symptomatik zu verringern.

Die in Deutschland zugelassenen  $\alpha_1$ -Antagonisten Alfuzosin, Doxazosin, Silodosin, Tamsulosin und Terazosin gelten bei geeigneter Dosierung als gleichwertig in Bezug auf ihre Effektivität und können eine schnelle Symptomreduktion herbeiführen. Die Blockade der  $\alpha_{1A}$ -Adrenorezeptoren des Urogenitaltrakts führt zu Erschlaffung der glatten Muskulatur des Blasenhalbes und der Harnröhre [34] und erleichtert so den Harnabfluss [35].

Da die Klasse der  $\alpha_1$ -Antagonisten mit ihrer Wirkweise allerdings nicht das androgengetriebene Prostatawachstum erfasst, sind bei Patienten mit stärker vergrößerter Prostata ab 30 - 40 ml zur Progressionshemmung  $5\alpha$ -Reduktaseinhibitoren, allein oder in Kombination, angezeigt. Als potente  $5\alpha$ -Reduktaseinhibitoren stehen die Wirkstoffe Finasterid und Dutasterid zur Verfügung. Finasterid ist dabei ein selektiverer Hemmstoff der  $5\alpha$ R Typ II, Dutasterid hingegen ist auch ein potenter Hemmstoff der  $5\alpha$ R Typ I. Beide Wirkstoffe können das Prostatavolumen durch Reduktion des DHT Spiegels deutlich verringern (Dutasterid 25,7 % [36]; Finasterid 21 % [37]). Bei Anwendung von Finasterid und Dutasterid kommt es allerdings relativ häufig zu Nebenwirkungen wie Impotenz, verringerter Libido und Ejakulationsstörungen sowie Spannungsgefühl in der Brust und Vergrößerung der Brust [38, 39]. Die drei erstgenannten, sexuellen Nebenwirkungen können auch nach Beendigung der Behandlung andauern [38] („Post-Finasterid-Syndrom“).

### **A.3.2.2 Prostatakrebs**

Das Prostatakarzinom (PCa) war mit einer geschätzten Zahl an Neuerkrankungen von 63.440 im Jahr 2008, bei Nichtberücksichtigung des nicht melatonischen Hautkrebses, die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern in Deutschland. Es stellt diesbezüglich, als hormonabhängiger Krebs, das Pendant zu Brustkrebs bei Frauen dar [40]. PCa wird oft in hohem Alter diagnostiziert und viele Patienten sterben „mit dem Krebs“ anstatt „am Krebs“. Dies führt trotz der hohen Prävalenz von PCa dazu, dass diese Erkrankung mit 13.324 Todesopfern im Jahr 2011 in Deutschland nur an dritter Stelle bei den auf Krebs begründeten Todesursachen steht [41]. Früherkennungsprogramme haben eine Vorverlagerung der Diagnose möglich gemacht, sodass über 90 % der Erkrankungsfälle in einem frühen Stadium, in dem der Krebs noch lokal begrenzt ist, erkannt werden. Dies ermöglicht es, dass sich die relative 5-Jahres-Überlebensrate an 100 % annähert [42].

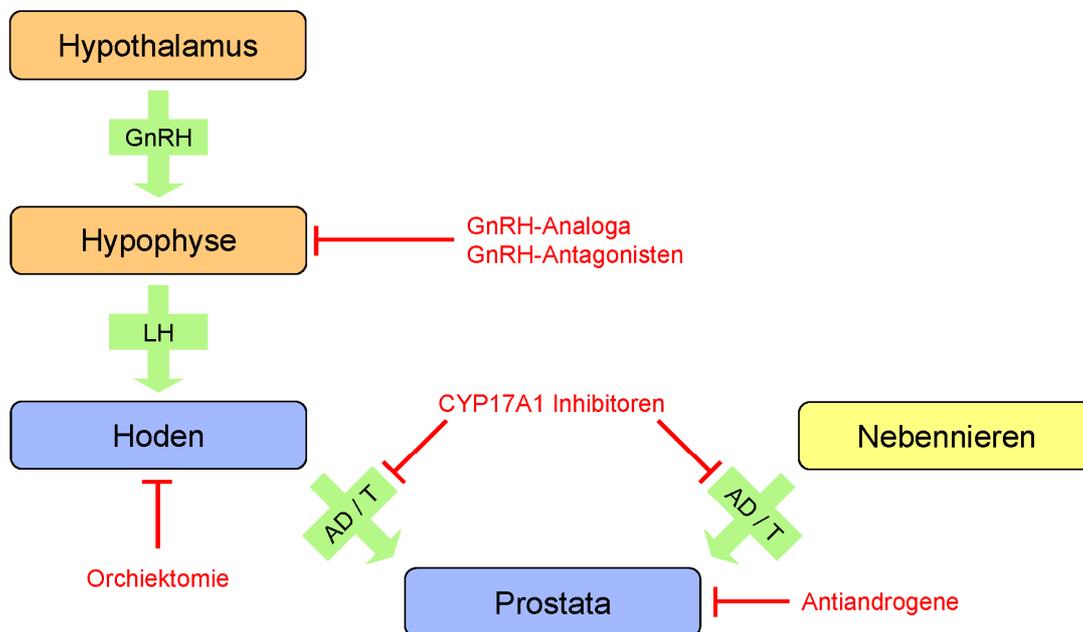
Als gesicherte Risikofaktoren für PCa gelten genetische Prädisposition und ein hohes Alter. Weiter bringt ein afrikanischer Ursprung eine etwa 70 % höhere Inzidenzrate mit sich [42]. Ein geringeres Erkrankungsrisiko scheint für Asiaten zu bestehen, was allerdings nur zum Teil eine genetische Ursache zu haben scheint. So ist die PCa-Inzidenzrate japanischer Einwanderer im Los Angeles County bis zu vierfach höher als in ihrem Heimatland Japan. Als Grund für dieses erhöhte Risiko wird der Unterschied in der Ernährung und in anderen Lebensumständen diskutiert [43].

#### **A.3.2.2.1 Behandlung**

Zur Therapie des PCa stehen vielfältige Optionen zur Verfügung, aus denen die erfolgversprechendste je nach Krankheitsstadium und Lebensumständen des Patienten ausgewählt werden sollte. Zur Messung des Therapieerfolges und zur Vorhersage der Überlebensrate bei fortgeschrittenem Prostatakrebs zieht man Surrogatmarker, wie das bereits unter Abschnitt A.3.1 erwähnte prostataspezifische Antigen (PSA) und die Zahl der zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells, CTC*) [44], heran. Hierbei wird der CTC-Wert inzwischen als aussagekräftiger bewertet als der PSA-Wert.

Da viele Patienten sterben, ehe das PCa ein kritisches Stadium erreicht, sollten vor allem ältere Patienten über 75 Jahre keiner radikalen Therapie unterzogen werden solange nur ein auf die Prostata beschränktes, nicht metastasierendes PCa vorhanden ist. Hier ist der Einschluss in ein „Watchful Waiting“ bzw. „Active Surveillance“ Programm angezeigt. Erst nach Erreichen eines bestimmten Krankheitsstadiums wird eine kurative bzw. palliative Therapie eingeleitet.

Neben der Cytostatika- und Strahlentherapie werden auch gezielt auf die Hormonabhängigkeit der Krankheit abgestimmte Therapieformen angeboten (s. Abbildung A-12).



**Abbildung A-12 Androgenspezifische therapeutische Optionen zur Behandlung des PCa**

Die Androgenproduktion in den Hoden kann durch chirurgische Kastration oder durch ihr chemisches Pendant mit GnRH-Analoga (z.B. Buserelin, Goserelin) oder -Antagonisten (z.B. Abarelix, Cetorelix) unterbunden werden. Den nach dieser Behandlung weiterhin in den Nebennieren produzierten Androgenen wird mit der Gabe von Antiandrogenen (z.B. Bicalutamid, Enzalutamid) entgegengewirkt. Die Kombination von chirurgischer oder chemischer Kastration und Antiandrogenen wird unter dem Begriff CAB (*combined androgen blockade*) zusammengefasst.

Obwohl die CAB bei vielen Patienten einen Rückgang des Tumorwachstums bewirken kann, kehrt der Krebs oft zurück. Man spricht dann von einer kastrationsresistenten Form (CRPC - *castration resistant prostate cancer*). Die früher gebräuchliche Bezeichnung „androgenunabhängiges Prostatakarzinom“ sollte nicht mehr verwendet werden, da neuere Studien zeigen, dass auch ein CRPC immer noch von der Aktivierung des AR abhängig und damit „hormongetrieben“ ist [45]. So ist auch in Tumorgewebe Androgenproduktion möglich [46, 47]. Des Weiteren können durch Mutation des AR auch andere natürliche Steroide, wie beispielsweise Progesteron und Estradiol [48], und manche Antiandrogene als Agonisten [49] wirken und so den Tumorprogress fördern.

Ein neuartiges Konzept für Patienten mit CRPC stellt die Therapie mit Hemmstoffen des Enzyms CYP17A1 dar. Auf diesem Ansatz begründete sich der Einsatz des, ursprünglich als Antimykotikum entwickelten, Arzneistoffs Ketoconazol (KTZ) zur Therapie des PCas. Obwohl die Gabe von KTZ bei bestimmten Gruppen von PCa Patienten einen therapeutischen Nutzen bringen kann [50], bringt KTZ als relativ unselektiver CYP Inhibitor auch massive Nebenwirkungen mit sich. So beschränkt beispielsweise die Lebertoxizität von KTZ die Behandlungsdauer bei PCa und allen anderen Anwendungsgebieten. Die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) empfiehlt aus diesem Grund die Aufhebung der Marktzulassungen oraler KTZ Zubereitungen [51].

Um die durch unselektive CYP Hemmung hervorgerufenen Nebenwirkungen zu vermeiden, wurde ein selektiver CYP17A1 Inhibitor entwickelt und zur Marktzulassung geführt: das steroidale Abirateron (ABT), das als Prodrug Abirateronacetat (Zytiga<sup>®</sup>) verabreicht wird. Die klinische Wirksamkeit von ABT bei der Behandlung von Chemotherapie naiven und bereits mit Docetaxel behandelten Patienten konnte sowohl durch den positiven Effekt auf Surrogatmarker wie PSA- und CTC-Werte als auch durch positive Bewertung nach RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) belegt werden [52, 53]. In placebokontrollierten, doppelblinden, randomisierten Phase 3 Studien wurde weiter eine Verlängerung der Gesamtüberlebensdauer durch Behandlung mit Abirateronacetat plus Prednison gegenüber Placebo mit Prednison nachgewiesen. Der Median der Gesamtüberlebensdauer betrug dabei in der Verum-Gruppe 34,7 Monate vs. 30,3 Monate in der Placebo-Gruppe bei Chemotherapie naiven CRPC Patienten [54] und 15,8 Monate vs. 11,2 Monate bei CRPC Patienten, die sich bereits einer Behandlung mit Docetaxel unterzogen hatten [55].

Trotz des beachtlichen Erfolges von Abirateron muss bedacht werden, dass auch die Therapie mit diesem Wirkstoff Nachteile aufweist. Obgleich die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Abirateron gegenüber vielen anderen Krebstherapeutika vergleichsweise milde Nebenwirkungen wie Ermüdungserscheinungen, Kopfschmerzen, Übelkeit und Durchfall [53, 56, 57] umfassen, müssen direkt durch den Wirkmechanismus des Hemmstoffs vermittelte Nebenwirkungen besonders hervorgehoben werden. Durch vollständige CYP17A1 Hemmung wird auch die Synthese von Glucocorticoiden unterbunden (s. Abbildung A-13), was zu einem Mineralocorticoidüberschuss, und letztlich zu Hypokaliämie, Ödemen, Bluthochdruck [53, 56, 57] und kardialen Störungen [54, 55] führt.

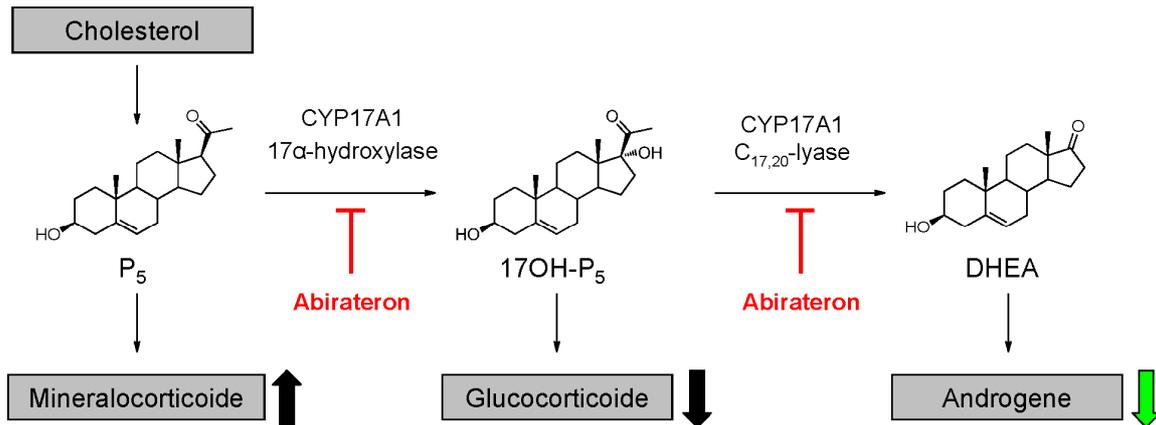


Abbildung A-13 Behandlung mit Abirateron: Auswirkungen auf die Steroidhomöostase

Diese Nebenwirkungen können durch Substitution mit einem synthetischen Glucocorticoid wie beispielsweise Prednison [54, 55] oder durch Co-Medikation mit einem Mineralocorticoidrezeptor Antagonist wie beispielsweise Eplerenon [53, 57] behandelt, jedoch nicht vollständig verhindert werden.

#### A.4 Hemmstoffe steroidgener Enzyme

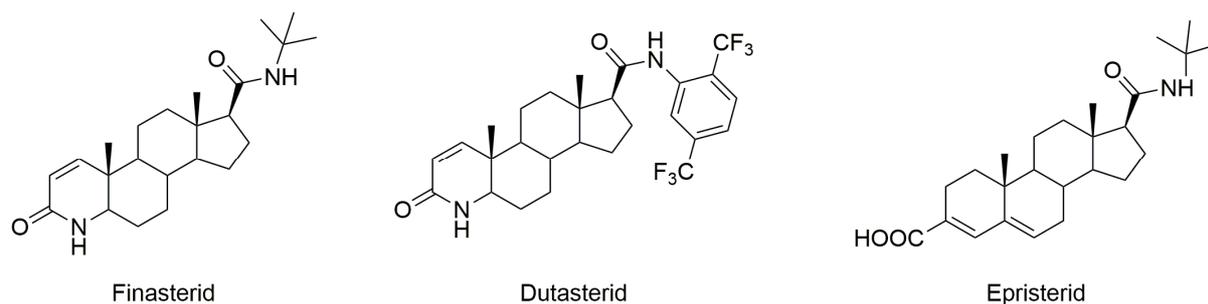
Steroidogene Enzyme stellen schon seit mehreren Jahrzehnten interessante Ziele für Arzneistoffe dar und bieten kreativen Medizinischen Chemikern zahlreiche Möglichkeiten zur Hemmstoffentwicklung und -weiterentwicklung. So können beispielsweise leicht Inhibitoren von CYP Enzymen durch Kombination eines Steroidgrundgerüsts mit einem sp<sup>2</sup>-hybridisierten Stickstoff tragenden Heterozyklus, der das im Enzym enthaltene Häm-Eisen komplexieren kann, erhalten werden. Die Kunst der Medizinischen Chemie besteht dann darin, durch geschickte Modifikation der beiden Komponenten hochaktive und selektive Hemmstoffe mit günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften zu kreieren oder gar alternative Hemmmechanismen zu erschließen.

In den folgenden Abschnitten soll auf Hemmstoffe von CYP17A1, stellvertretend für CYP Enzyme, und auf Hemmstoffe der 5αR eingegangen werden.

##### A.4.1 5α-Reduktase Hemmstoffe

Die zurzeit bedeutendsten 5αR Inhibitoren sind die beiden, bereits im Abschnitt A.3.2.1.1 zur Therapie des BPS vorgestellten, Arzneistoffe Finasterid und Dutasterid. Bei beiden handelt es sich um kompetitive Hemmstoffe aus der Klasse der 3-Keto-4-aza-steroidale. Ein weiterer interessanter, wenn auch nicht klinisch eingesetzter, steroidal Hemmstoff ist das 3-

Carboxysteroid Epristerid. Bei diesem handelt es sich, im Gegensatz zu den beiden erstgenannten, um einen unkompetitiven Inhibitor [58].



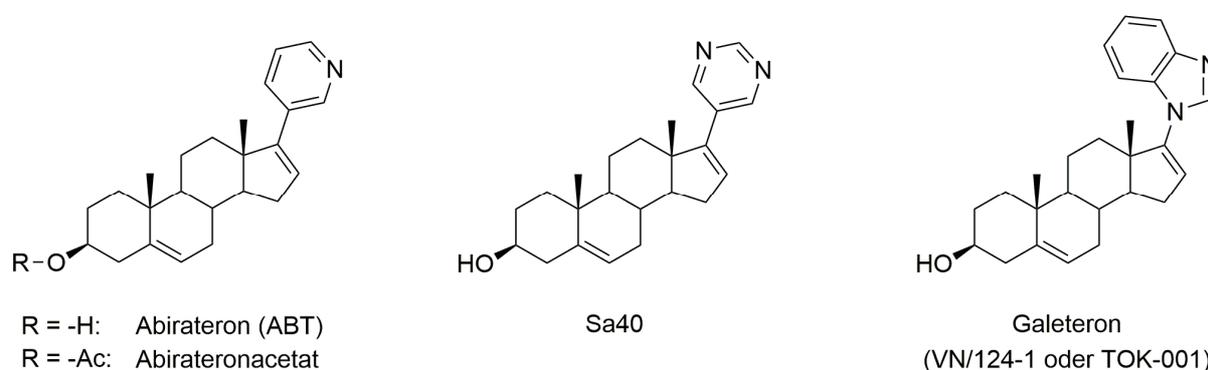
**Abbildung A-14 wichtige 5 $\alpha$ R Hemmstoffe**

Die Bedeutung dieser drei prominenten Vertreter für das Design der in dieser Arbeit diskutierten, neuen Hemmstoffe wird in Kapitel C.1.2 näher beschrieben. Ebenso wird in Kapitel C.1.3 ausführlich auf die Studie, auf der die neuen Verbindungen aufbauen, eingegangen. Auf die Vorstellung weiterer 5 $\alpha$ R Inhibitoren soll aus diesem Grund an dieser Stelle verzichtet werden.

## A.4.2 CYP17A1 Hemmstoffe

### A.4.2.1 Steroidale CYP17A1 Hemmstoffe

Die ersten CYP17A1 Hemmstoffe waren einfach aufgebaut. Durch Verbindung eines Steroidgrundgerüsts, wie zum Beispiel Progesteron oder Pregnenolon, mit einem stickstoffhaltigen Heterozyklus wurde bereits eine große Anzahl an *in vitro* potenten Hemmstoffen synthetisiert. Auf diesem Wege konnten auch die potentesten steroidalen CYP17A1 Hemmstoffe erhalten werden: Abirateron (ABT) [59], Sa40 [60] und Galeteron (VN/124-1 oder TOK-001) [61] (Abbildung A-15).



**Abbildung A-15 wichtige steroidale CYP17A1 Inhibitoren**

Mit Abirateron bzw. seinem Prodrug Abirateronacetat steht nach der FDA und EMEA Zulassung im Jahr 2011 der erste CYP17A1 Inhibitor unter dem Markennamen Zytiga<sup>®</sup> zur Behandlung von CRPC nach Versagen einer Androgenentzugstherapie zur Verfügung

(s. Abschnitt A.3.2.2.1). Galeteron durchläuft zurzeit Phase 2 der klinischen Prüfung (Stand: 08.12.2016). In der Präklinik konnte mit diesem Hemmstoff, neben potenter Hemmung von CYP17A1, auch eine Herabregulierung der AR Expression [62], und ein Zellzyklus-Arrest durch eine Stressreaktionsinduktion im endoplasmatischen Retikulum von PC-3 Zellen [63], erreicht werden. Durch diese zusätzlichen Mechanismen erhofft man sich für eine spätere Anwendung an CRPC Patienten einen Vorteil gegenüber Abirateron.

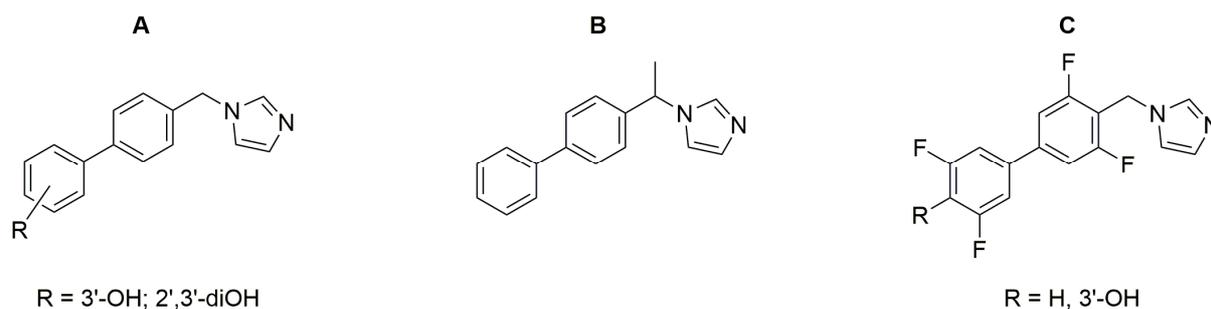
Dennoch tragen die vorgestellten Hemmstoffe auch potentielle Nachteile in sich. Bedingt durch ihre steroidale Struktur können sie einem hohen First-Pass-Effekt unterliegen und anfällig für schnelle Biotransformation durch beispielsweise Sulfatierung (s.a. unter A.1 ) sein, was am Beispiel von Abirateronacetat eine relativ hohe Dosierung [64] des Wirkstoffs erforderlich macht. Die Verbindung von steroidaler Struktur und hoher täglicher Dosis erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit ungewollter Aktivierung von Steroidhormon-vermittelten Signalwegen durch Stimulation der entsprechenden Rezeptoren.

#### **A.4.2.2 Nicht-steroidale CYP17A1 Hemmstoffe**

Die kennzeichnenden Nachteile steroidaler CYP17A1 Hemmstoffe und der relative Erfolg des nicht-selektiven CYP Inhibitors Ketoconazol (KTZ) motivierte zahlreiche Arbeitsgruppen zur Synthese und medizinisch-chemischen Weiterentwicklung von nicht-steroidalen CYP17A1 Hemmstoffen. Auch im Arbeitskreis Hartmann widmete man sich in der Vergangenheit intensiv der Erschließung und Optimierung neuer CYP17A1 Hemmstoffklassen. Ziel der Bemühungen war die Synthese von Inhibitoren, die die steroidale Grundstruktur von ABT oder Sa40 optimal durch steroidomimetische Core-Strukturen ersetzen, die Potenz zur CYP17A1 Hemmung von ABT besitzen oder gar übertreffen und gleichzeitig weitaus selektiver gegenüber anderen CYP Enzymen sind als beispielsweise Ketoconazol. Zur Bewertung der Hemmpotenz gegenüber CYP17A1 wurde der im Arbeitskreis Hartmann entwickelte und routinemäßig eingesetzte Assay auf  $17\alpha$ -Hydroxylase Hemmaktivität herangezogen. Dieser verwendet eine Membranfraktion [65] von humanem CYP17A1, das in *Escherichia coli* mit NADPH-P450 Reduktase aus der Ratte co-exprimiert wird [66].

Anhand der folgenden Abbildungen soll die erfolgreiche Entwicklung an einigen herausragenden Beispielen näher dargestellt werden.

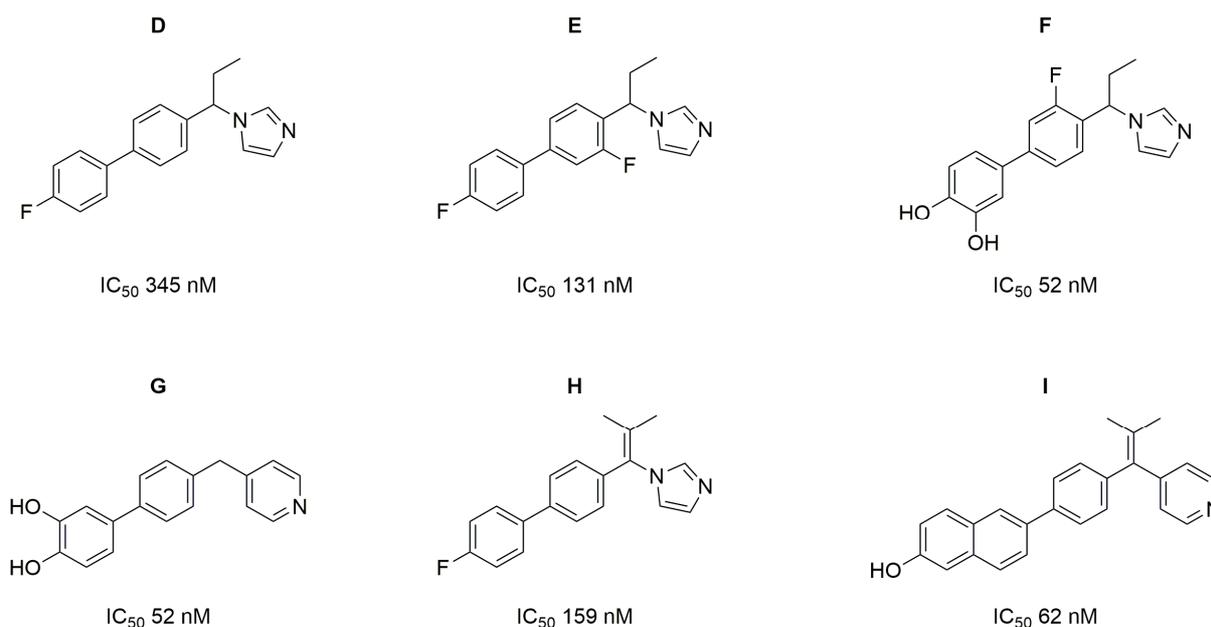
Durch Imitation des A- und C-Rings des Steroidgrundgerüsts mittels einer Biphenylstruktur wurde die vielversprechende Klasse der *N*-(4-Biphenylmethyl)imidazole geschaffen, deren erste Vertreter in Abbildung A-16 gezeigt sind. Obwohl ein direkter Vergleich mit ABT nicht publiziert ist, konnte ein erster Erfolg der Bemühungen daran festgemacht werden, dass die aufgeführten Verbindungen 2- bis 8-fach potenter als KTZ sind [67-69].



**Abbildung A-16** *N*-(4-Biphenylmethyl)imidazole als frühe nicht-steroidale CYP17A1 Inhibitoren: A aus [67], B aus [68], C aus [69]

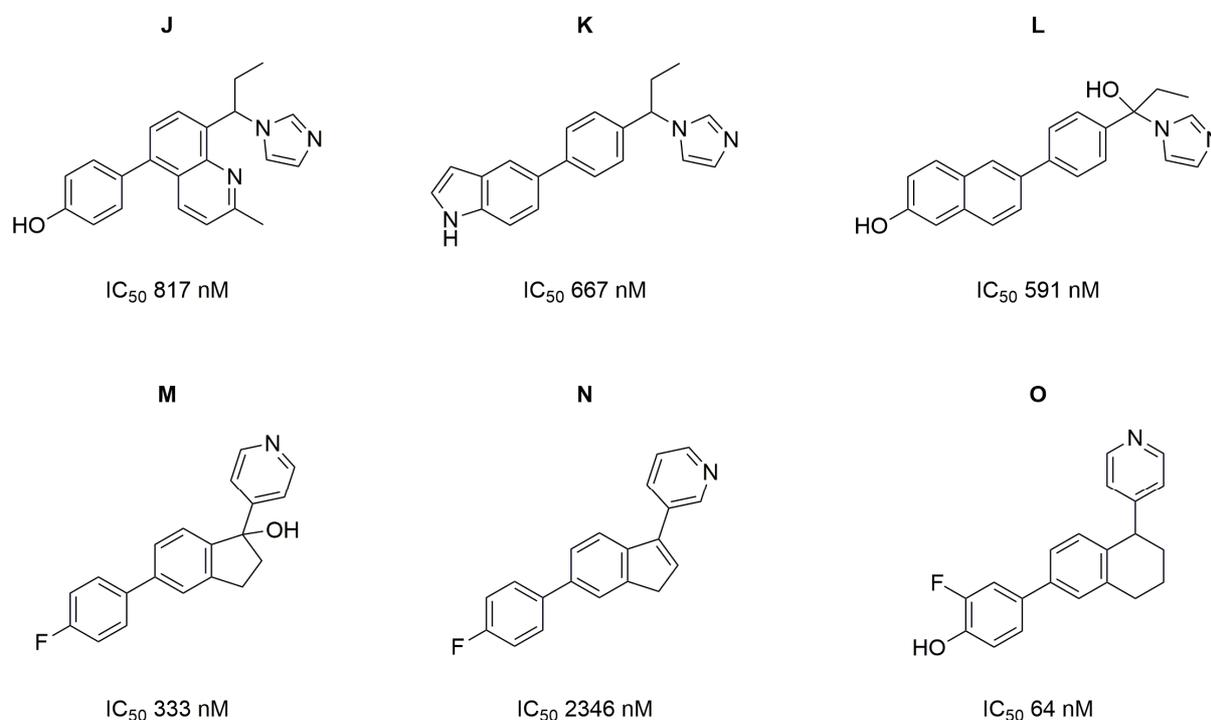
Weitere Verbindungen konnten durch Variation der Substituenten am Aromaten, Erweiterung oder Rigidisierung des Grundgerüsts und Austausch des Heterocyclus erhalten werden. Überraschend großen Einfluss besitzt auch die Substitution an der Methylenbrücke. Einige aus diesen Vorgehensweisen hervorgegangene Verbindungen sollen kurz vorgestellt werden.

Die Ethylengruppe stellte sich als sehr vorteilhafter, nahezu optimaler Substituent für die Methylenbrücke dar. Die entsprechenden Verbindungen **D**, **E** und **F** weisen sich alle durch eine bessere Hemmpotenz als KTZ aus, Verbindung **F** erreicht gar einen leicht niedrigeren  $IC_{50}$ -Wert als ABT. Die Selektivität gegenüber anderen CYP Enzymen ist bei den Verbindungen **E** und **F** im Vergleich zu KTZ weiter deutlich verbessert [70, 71]. Verbindung **D** zeigte in der Ratte eine deutlich bessere Pharmakokinetik als ABT [72]. Diesbezüglich erzielte Verbindung **H** mit ihrer Isopropylidensubstitution ein ebenso gutes Ergebnis [70]. Die 4-Pyridine **G** und **I** zeigen weiter, dass auch mit diesem Heterocyclus Verbindungen erhalten werden können, die in Aktivität und Selektivität vergleichbar oder besser als ABT sind.



**Abbildung A-17** Substitutionen an der Methylenbrücke und Austausch des Heterocyclus: D aus [72], E aus [70], F aus [71], G aus [73], H aus [70], I aus [74]  $IC_{50}$  KTZ = 2780 nM,  $IC_{50}$  ABT = 72 nM

Ringerweiterungen wie in den Verbindungen **J** - **L** führten, obgleich die Potenz von KTZ übertreffend, leider nur zu moderaten CYP17A1 Hemmstoffen. Auch die Rigidisierung der Methylenbrücke der Pyrimidinverbindungen **M** und **N** führte nicht zum gewünschten Erfolg. Die ähnliche Verbindung **O** konnte allerdings als ebenso potenter und vergleichbar selektiver Hemmstoff wie ABT publiziert werden [75].



**Abbildung A-18** Ringerweiterungen und Rigidisierungen: **J-L** aus [76], **M-O** aus [75]  
 $IC_{50}$  KTZ = 2780 nM,  $IC_{50}$  ABT = 72 nM

## A.5 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer'sche Krankheit (Morbus Alzheimer) ist die häufigste Form der Demenzerkrankungen und wurde 1907 erstmals vom deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben [77]. Kurz nach der Jahrtausendwende litten Schätzungen zufolge etwa 24,3 Millionen Menschen an Alzheimer-Demenz [78].

Der größte Risikofaktor an Morbus Alzheimer zu erkranken ist ein fortgeschrittenes Alter. So sind etwa 96 % der Erkrankten in den USA über 65 Jahre alt [79]. Es ist allerdings wichtig anzumerken, dass ein fortgeschrittenes Alter nicht unbedingt die Ausbildung einer Demenz mit sich bringt. So wurde von einer 115-Jährigen berichtet, die in prä- und postmortalen Untersuchungen neuropsychologisch bzw. histologisch auf dem Niveau von gesunden Menschen im Alter von 60 - 80 Jahren lag [80].

Obwohl die Forschung das Wissen über die Alzheimer'sche Krankheit in den letzten 30 Jahren stark erweitert hat, bleiben die genauen biologischen Vorgänge der Pathogenese noch

unbekannt [79]. Der aktuelle Wissensstand kann an dieser Stelle nicht in Gänze wiedergegeben werden, sodass sich im Folgenden auf das für die vorliegende Arbeit Wesentliche beschränkt wird.

### **A.5.1 $\beta$ -Amyloid Peptide**

Als Auslöser der Alzheimer'schen Krankheit wird, neben anderen Ansätzen und Theorien, eine vermehrte Bildung von bestimmten Peptiden aus 30 bis 51 Aminosäuren [81], den sogenannten  $\beta$ -Amyloid Peptiden ( $A\beta$ ), diskutiert. Diese entstehen aus einem natürlich im Gehirn vorkommenden Transmembranprotein, dem Amyloid-Precursor-Protein (APP). Neben der im gesunden Menschen vorherrschenden, nicht-amyloidogenen Spaltung des APP durch die  $\alpha$ -Sekretase, kann das Protein auch durch die  $\beta$ -Sekretase und anschließend die  $\gamma$ -Sekretase gespalten werden, woraus  $A\beta$  entsteht [82]. Diese hydrophoben Peptide können sich zu Agglomeraten zusammenschließen. In Hirngewebepräparaten von an Alzheimer-Demenz Erkrankten finden sich dann sogenannte Amyloid-Plaques, die aus  $A\beta$ -Zusammenschlüssen bestehen [83] und von denen vermutet wird, dass sie neuronale Schäden verursachen [84].

### **A.5.2 Mitochondriale Schäden und oxidativer Stress**

Ein toxischer Effekt von  $A\beta$  auf Mitochondrien ist eine weitere Theorie zur hirnschädigenden Wirkung der Peptide [85]. Hierbei wird vermutet, dass  $A\beta$  in Mitochondrien Elektronentransport, ATP-Bildung, Sauerstoffverbrauch sowie das Mitochondrienmembranpotential beeinträchtigt und somit zu oxidativem Stress und letztlich zur Apoptose führt [86]. Zudem wurde gezeigt, dass  $A\beta$  *in vitro* die Bildung freier Radikale verursacht [87], was ebenso für den Zusammenhang zwischen fortschreitender Alzheimer-Demenz und oxidativem Stress spricht.

### **A.5.3 Neuroprotektive Wirkung von neuroaktiven Steroiden**

Neuroprotektive Agenzien, die den neurotoxischen Effekten von  $A\beta$  entgegen wirken können, sind in der Alzheimer Forschung von besonderem Interesse. Neuroaktive Steroide stellen solche Agenzien dar. So konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass neuroaktive Steroide auf verschiedenste Weise die neurotoxische Wirkung von  $A\beta$  abmildern können.

DHEA kann beispielsweise dosisabhängig dem  $A\beta$ -induzierten Zelltod entgegenwirken [88]. Für E2 konnte gezeigt werden, dass es zerebelläre Zellen vor einer  $A\beta$ -vermittelten Apoptose schützen kann. Dies geschieht durch Erniedrigung der Expression des pro-apoptischen Faktors Bax und des wichtigen apoptotischen Enzyms Caspase-3 [89]. Weiter scheint E2 auch

einen positiven Einfluss auf den Abbau von A $\beta$  nehmen zu können, indem es die Expression A $\beta$ -abbauender Proteasen begünstigt und somit A $\beta$ -vermittelte Zellschäden verhindern könnte [90].

Eine Steigerung der Neurosteroidsynthese im Gehirn wäre also ein interessanter Ansatz zur Therapie von Morbus Alzheimer. Die neuroaktive Substanz Gammahydroxybuttersäure (GHB) könnte dazu Möglichkeiten bieten. Auf diesen Ansatz und die neuroprotektiven Eigenschaften von GHB wird in der Einführung zu Teil C dieser Arbeit näher eingegangen.

## **B Ziele der Arbeit**

In den einleitenden Kapiteln dieser Dissertationsschrift wurde gezeigt, wie komplex und weitreichend die Steroidbiochemie ist und welche mannigfaltigen pathophysiologischen Auswirkungen Störungen in der Homöostase der Steroide im menschlichen Körper haben können. Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, den Kenntnisstand hinsichtlich der Behandlung der drei vorgestellten, mit endogenen Steroiden in Zusammenhang stehenden, Krankheitsbilder PCa, BPS und Morbus Alzheimer zu erweitern. So sollen sowohl die Möglichkeit bekannte Therapieoptionen weiter zu verbessern als auch potentielle, neue Ansätze zur Behandlung aufgezeigt und diskutiert werden.

1. Das benigne Prostatasyndrom betrifft eine Vielzahl von Männern im dritten Lebensdrittel. Eine wichtige Säule der Behandlung des BPS sind die 5 $\alpha$ R Inhibitoren Finasterid und Dutasterid. Durch die Gabe dieser Arzneistoffe können die Beschwerden vieler Männer gelindert werden. Eine Weiterentwicklung dieser Hemmstoffe ist dennoch lohnenswert. Die Entwicklung nicht-steroidaler Hemmstoffe birgt das Potential off-Target Nebenwirkungen zu vermeiden. Weiter können durch die Entwicklung potenterer Inhibitoren Tagesdosen verringert werden. In Teil C dieser Arbeit „Biologische Evaluation neuartiger Inhibitoren der humanen 5 $\alpha$ -Reduktase Typ I und II“ werden beide Ansätze verfolgt. Eine bereits bekannte Hemmstoffklasse wurde um weitere Vertreter erweitert und ein neues Grundgerüst für 5 $\alpha$ R Inhibitoren wurde entwickelt. Diese neuen Verbindungen sollen auf ihre biologische Aktivität hin evaluiert und diskutiert werden.
2. Das Prostatakarzinom tritt wie auch das BPS vor allem bei älteren Männern auf und hat eine hohe Prävalenz. Wie für viele andere Krebsarten stehen bereits Therapieoptionen zur Verfügung, die als durchaus erfolgversprechend bezeichnet

werden können. Um auch Karzinome, die resistent gegen die bisherigen Behandlungsmethoden sind, therapierbar zu machen, bietet CYP17A1 ein vielversprechendes Target. Der 2011 in Deutschland zugelassene CYP17A1 Hemmstoff Abirateron zeigt jedoch Nebenwirkungen, die durch einen noch zielgerichteteren Ansatz, nämlich der Hemmung nur des zweiten Katalyseschritts des bifunktionalen Enzyms CYP17A1, der C<sub>17,20</sub>-Lyase, vermieden werden könnten. Somit wäre eine sicherere und den Patienten weniger belastende Therapie möglich. Um dieses Ziel zu erreichen, soll der im Arbeitskreis Hartmann in der Routine durchgeführte CYP17A1 Hydroxylase Assay abgewandelt werden. Ein neuer Lyase Assay soll etabliert werden. Mit diesen beiden Werkzeugen soll auf die erfolgreiche Entwicklung von nicht-steroidalen CYP17A1 Inhibitoren aufgebaut und die bestehenden Substanzbibliotheken des Arbeitskreises auf selektive C<sub>17,20</sub>-Lyase Hemmstoffe untersucht werden. Diese könnten Startpunkte für eine weitere Optimierung sein. Die erhaltenen Ergebnisse werden in Teil D in Form einer Publikation vorgestellt und diskutiert.

3. Die Alzheimer'sche Krankheit betrifft in einer alternden Gesellschaft immer mehr Frauen und Männer. Obwohl es dank intensiver Forschung viele wissenschaftlich fundierte Theorien zu den Ursachen der Krankheit gibt, muss die Ätiologie von Morbus Alzheimer noch immer als ungeklärt bezeichnet werden. Mit steigendem Wissensschatz über die pathogenen Vorgänge im Gehirn von Erkrankten bieten sich neue Ansätze zur Therapie. Ein solcher Ansatz könnte neuroprotektive Effekte von Neurosteroiden und eine gezielte Steigerung ihrer Synthese im Gehirn ausnützen. Die neuroprotektive Wirkung von Gammahydroxybuttersäure (GHB) könnte zumindest zum Teil mit Neurosteroiden und der Steigerung ihrer Konzentration in Verbindung stehen. In Teil E dieser Arbeit soll daher der Einfluss von GHB auf die Synthese von Neurosteroiden in einem *in vitro* Modell untersucht und bewertet werden.

Die einzelnen Teile der Arbeit werden jeweils durch eine kurze Einführung eingeleitet. Die Ergebnisse werden am Ende eines jeden Teils kritisch bewertet. Eine abschließende Diskussion fasst die Ergebnisse dieser Dissertation zusammen und bewertet sie in ihrem Gesamtumfang.

## **C Biologische Evaluation neuartiger Inhibitoren der humanen 5 $\alpha$ -Reduktase Typ I und II**

Die in diesem Kapitel diskutierten Verbindungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Manoj Kumar, Panjab Universität, Indien, synthetisiert und chemisch charakterisiert.

### **C.1.1 Einführung und Beitragsbericht**

Ziel dieses Kapitels ist die biologische Bewertung neuer Verbindungen als 5 $\alpha$ -Reduktase (5 $\alpha$ R) Inhibitoren. Somit soll der durch einen Inhibitor besetzbare Raum in den beiden Isoformen des Targetenzym weiter erforscht werden, um neue und potentere Hemmstoffe zu erhalten. Es ist geplant, die in diesem Kapitel diskutierten Verbindungen und die entsprechenden biologischen Daten zu patentieren und in eine Publikation einfließen zu lassen.

### **C.1.2 Verbindungsklassen und Designrationale**

Die vorliegende Studie umfasst Verbindungen dreier Klassen mit unterschiedlichen Grundgerüsten. Sie ergänzt und erweitert eine vorhergehende Studie von Aggarwal *et al.* über die Hemmaktivität von 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-Steroiden gegenüber der 5 $\alpha$ R [91].

Die grundlegende Rationale zum Design der dort beschriebenen Verbindungen kombiniert zwei literaturbekannte Ansätze:

- 1.) Den kompetitiven Inhibitoren Finasterid und Dutasterid ähnliche Verbindungen können durch das „Umdrehen“ des Steroidhemmstoffes erhalten werden („inverted inhibitor“). Diese Herangehensweise bezeichnet das Design von steroidal Inhibitoren, deren D-Ring und A-Ring den A-Ring bzw. den D-Ring des natürlichen Steroids substrats imitieren. Dies kann durch Erweiterung des D-Fünfrings des Steroids durch Einführung einer 17 $\alpha$ -Aza-Gruppe geschehen [92] (s. Abbildung C-1). Somit entsteht eine neue Verbindung mit den 4-Azasteroidhemmstoffen ähnlichen Eigenschaften.

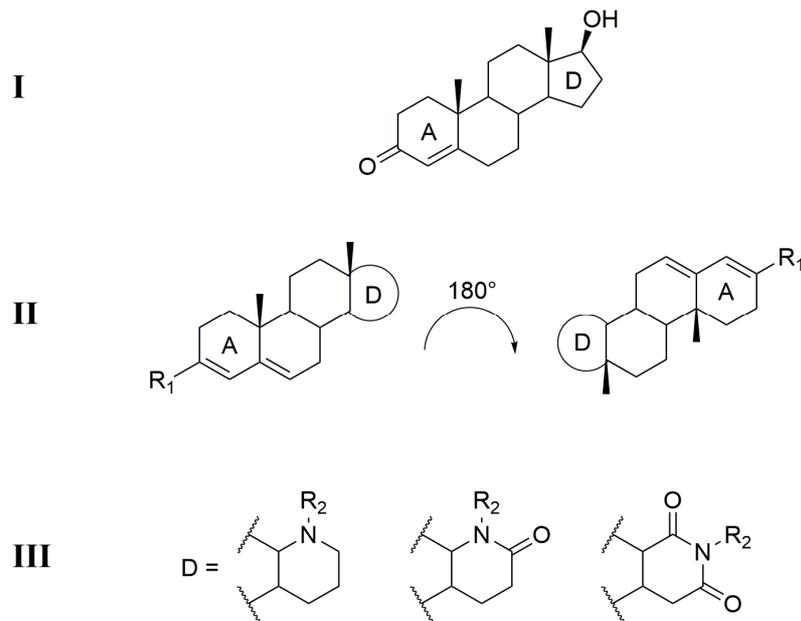


Abbildung C-1

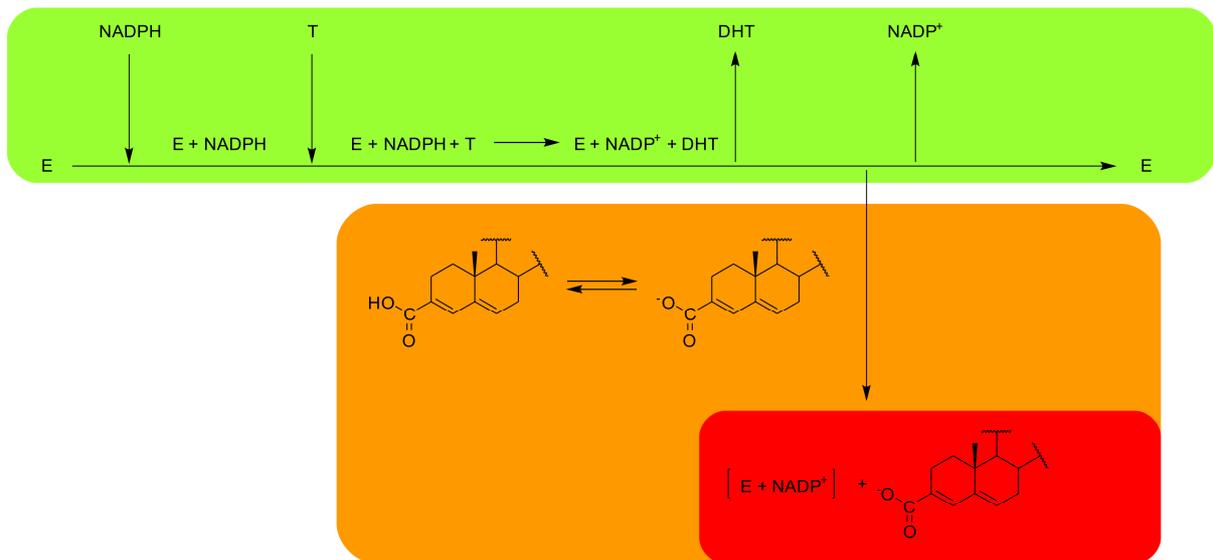
Ansatz 1.) zum Hemmstoffdesign

I: Testosteron als natürliches Substrat

II: allgemeine Struktur eines „inverted inhibitor“

III: Beispiele für mögliche Homo-D-Ringe

2.) 3-Caroxysteroide wie der unkompetitive Hemmstoff Epristerid entfalten Ihre Hemmwirkung vermutlich durch Ausbildung eines ternären Komplexes des Carboxylats mit dem enzymgebundenen NADP<sup>+</sup> (s. Abbildung C-2). Wichtig ist weiter eine  $\Delta^3$ -Doppelbindung. Eine  $\Delta^5$ -Doppelbindung kann die Hemmwirkung weiter verstärken. [93, 94]



**Abbildung C-2** vorgeschlagener Mechanismus der 5 $\alpha$ R Hemmung durch steroidale Acrylate nach Levy *et al.* [93]

**E: Enzym**

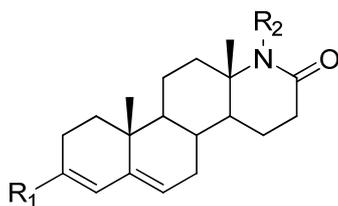
**grün: Enzymreaktion ohne Inhibitor**

**orange: Inhibitorzugabe**

**rot: ternärer Enzym-NADP<sup>+</sup>-Inhibitor Komplex**

Durch Kombination dieser beiden Ansätze konnten neuartige 5 $\alpha$ R Hemmstoffe entstehen, die die 3-Carboxygruppe enthalten und die ebenso durch Substitution des Wasserstoffs an der 17a-Azagruppe vielfältig variiert werden können. Weiter stellen auf dem Syntheseweg erhaltene Intermediate wie 3-Cyano- oder 3-Bromosteroide ebenfalls potentielle Hemmstoffe nach 1.) dar.

Die nun vorgestellten neuen Klassen umfassen 17a-Aza-17a-homo-androstene, 17-Aza-17a-homo-androsten-16,17a-dione und 5-Aza-des-A-7a-homo-androstane. Letztere Klasse folgt nicht der oben beschriebenen Designrationale und unterscheidet sich strukturell stark von im menschlichen Organismus vorkommenden Steroiden.

**C.1.3 Zusammenfassung der Vorgängerstudie**


Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Hemmung 5 $\alpha$ RI		Hemmung 5 $\alpha$ RII	
			bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub>	bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub>
V11	-Br	-H	34,5 $\pm$ 1,7	-	45,6 $\pm$ 5,2	-
V12	-CN	-H	27,6 $\pm$ 9,3	-	9,9 $\pm$ 5,9	-
V13	-CN	Methyl	93,0 $\pm$ 3,1	-	13,5 $\pm$ 7,1	-
V14	-CN	Ethyl	56,1 $\pm$ 3,7	-	48,9 $\pm$ 2,7	-
V15	-CN	Allyl	20,8 $\pm$ 3,9	-	3,3 $\pm$ 5,7	-
V16	-CN	Benzyl	0	-	34,7 $\pm$ 8,6	-
V20	-COOH	-H	0	-	62,9 $\pm$ 2,2	-
V21	-COOH	Methyl	18,9 $\pm$ 1,1	-	100	54,1 $\pm$ 9,5 nM
V22	-COOH	Ethyl	32,3 $\pm$ 1,5	-	100	22,1 $\pm$ 2,4 nM
V23	-COOH	Allyl	0,4 $\pm$ 0,5	-	100	72,8 $\pm$ 2,3 nM

**Tabelle C-1** 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androst-3,5-dien-17-one und Hemmwerte aus vorhergehender Studie [91]. Zur besseren Orientierung wurde die Nummerierung aus der Publikation übernommen und die entsprechenden Verbindungen mit dem Präfix V versehen (=Vorgängerstudie)

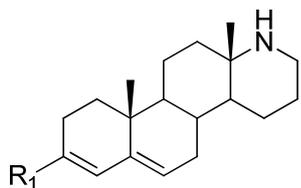
Tabelle C-1 führt die zum späteren Vergleich wichtigen Verbindungen der Vorgängerstudie von Aggarwal *et al* auf. Unter den *N*-unsubstituierten Verbindungen sind Verbindung **V11** (3-Bromo) und **V12** (3-Cyano) als schwach bis moderat aktive, relativ unselektive 5 $\alpha$ R Hemmstoffe zu betrachten. Im Gegensatz dazu ist Verbindung **V20** (3-Carboxy), die die oben beschriebenen Designansätze kombiniert, ein sehr potenter und auch selektiver 5 $\alpha$ RII Hemmstoff.

Weiter zeigt sich, dass *N*-substituierte 3-Cyanoverbindungen bessere 5 $\alpha$ RI Hemmstoffe sind, wobei der Methylrest die optimale Größe aufzuweisen scheint und Reste mit steigender Größe immer weniger vom Enzym akzeptiert werden. Im Hinblick auf 5 $\alpha$ RII Hemmung bringt Ethylsubstitution die aktivste Verbindung dieser Gruppe hervor. Letzteres trifft auch auf die Gruppe der 3-Carboxysteroide zu. Die ethylsubstituierte Verbindung stellt den aktivsten 5 $\alpha$ RII Hemmstoff der Publikation dar. Die Designrationale heterozyklischer D-Ring plus 3-Carboxygruppe kann somit zu potenten 5 $\alpha$ RII Hemmstoffen führen.

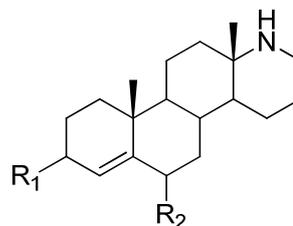
## C.2 Ergebnisse zu neuen Hemmstoffen der humanen 5 $\alpha$ R

### C.2.1 17a-Aza-17a-homo-androstene

#### C.2.1.1 Modifikation in 3- und 6-Position



**K21, K22, K24**



**K1-3**

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Hemmung 5 $\alpha$ RI		Hemmung 5 $\alpha$ RII	
			bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>K21</b>	-Br	-	17,0 $\pm$ 5,4	-	0	-
<b>K22</b>	-CN	-	53,7 $\pm$ 8,8	12,6 $\pm$ 0,54	38,6 $\pm$ 2,8	16,3 $\pm$ 1,3
<b>K24</b>	-COOH	-	0	-	0	-
<b>K1</b>	=O	=O	1,3 $\pm$ 4,2	-	80,3 $\pm$ 5,9	3,8 $\pm$ 0,3
<b>K2</b>	=NOH	=NOH	0	-	34,2 $\pm$ 1,2	-
<b>K3</b>	=NNHCSNH <sub>2</sub>	=NNHCSNH <sub>2</sub>	2,3 $\pm$ 1,3	-	0	-

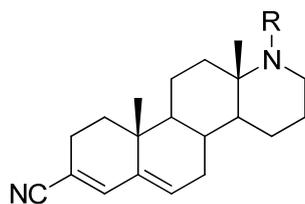
**Tabelle C-2 Hemmwerte der 17a-Aza-17a-homo-androstene und deren Modifikation in 3- und 6-Position**

Tabelle C-2 zeigt Verbindungen der 17a-Aza-17a-homo-androstenklasse, die in 3- und 6-Position substituiert sind, und deren Hemmwerte. Das 3-Cyanosteroid **K22** weist als einziges moderate Aktivität (IC<sub>50</sub> = 13  $\mu$ M) gegenüber der 5 $\alpha$ RI auf. Verbindung **K22** hemmt ebenfalls die 5 $\alpha$ RII (IC<sub>50</sub> = 16  $\mu$ M), ist somit aber ein leicht potenterer Hemmstoff der 5 $\alpha$ RI als der 5 $\alpha$ RII mit einem Selektivitätsfaktor IC<sub>50</sub>(5 $\alpha$ RII/5 $\alpha$ RI) von 1,3. Verglichen mit dieser

Verbindung ist das entsprechende 3-Bromoderivat **K21** deutlich schwächer potent. Die Aktivität gegenüber der 5 $\alpha$ RII verschwindet völlig im Fall von **K21** und auch die 5 $\alpha$ RI Hemmaktivität ist mit 17,0 % bei 10  $\mu$ M nur noch schwach ausgeprägt.

Auch die 3,5-Diketoverbindung **K1** zeigt eine hohe Selektivität und hemmt mit einem IC<sub>50</sub> von etwa 4  $\mu$ M vor allem die 5 $\alpha$ RII. Vergrößerung der Substituenten an C<sub>3</sub> und C<sub>6</sub> führt allerdings schrittweise wieder zu inaktiven Verbindungen, wobei Verbindung **K2** als 3,6-Dioxim noch eine moderate Hemmaktivität gegenüber der 5 $\alpha$ RII aufweist.

### C.2.1.2 3-Cyanoverbindungen

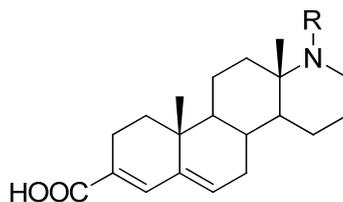


Verb.	R	Hemmung 5 $\alpha$ RI		Hemmung 5 $\alpha$ RII	
		bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>K22</b>	-H	53,7 $\pm$ 8,8	12,6 $\pm$ 0,54	38,6 $\pm$ 2,8	16,3 $\pm$ 1,3
<b>K23</b>	Methyl	0	-	7,6 $\pm$ 1,9	-
<b>K25</b>	Ethyl	10,0 $\pm$ 0,1	-	16,6 $\pm$ 5,5	-
<b>K29</b>	<i>i</i> -Propyl	0	-	91,8 $\pm$ 1,5	0,86 $\pm$ 0,02
<b>K26</b>	Allyl	0	-	0	-
<b>K28</b>	Butyl	0,6 $\pm$ 0,1	-	0	-
<b>K27</b>	Phenyl	7,7 $\pm$ 1,4	-	88,7 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,07

Tabelle C-3 Hemmwerte der 17a-Aza-17a-homo-androst-3,5-en-3-carbonitrile

Durch Einführung verschiedener hydrophober Substituenten am Stickstoff kommt es zu einem nahezu vollständigen Verlust der 5 $\alpha$ RI Hemmaktivität (siehe Tabelle C-3). Im Falle der 5 $\alpha$ RII kommt es im Gegensatz dazu zur deutlichen Steigerung der Hemmaktivität durch Einführung eines *N*-*i*-Propyl- (**K29**, IC<sub>50</sub>= 0,86  $\mu$ M) bzw. *N*-Phenylrests (**K27**, IC<sub>50</sub>= 1,9  $\mu$ M). Die Allyl- und Butyl-substituierten Verbindungen **K26** bzw. **K28** hingegen sind bei 10  $\mu$ M vollständig inaktiv gegenüber den beiden 5 $\alpha$ R Subtypen. **K23** und **K25** (*N*-Methyl bzw. *N*-Ethyl) zeigen lediglich eine sehr schwache Hemmaktivität. Die Größe des am Stickstoff eingeführten Substituenten hat also einen deutlichen Einfluss auf die Hemmaktivität gegen die 5 $\alpha$ RII. Die Steigerung von *N*-Methyl- zur *N*-*i*-Propyl führt von einem schwachen Hemmstoff (**K23**) zu einem der potentesten Verbindungen der Studie (**K29**). Die weiter erhöhte Sperrigkeit des Butylsubstituenten führt zu völligem Wirkverlust. Trotz höherem räumlichen Anspruchs konnte durch die Einführung des Phenylrestes eine relativ potente Verbindung erhalten werden. Die Ausbildung einer  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung ist eine denkbare Erklärung.

### C.2.1.3 3-Carboxyverbindungen

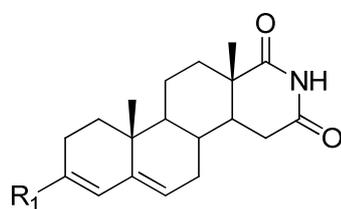
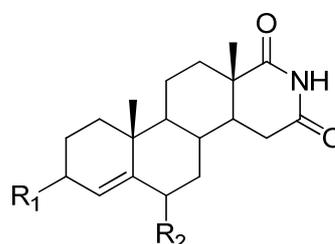


Verb.	R	Hemmung 5 $\alpha$ RI		Hemmung 5 $\alpha$ RII	
		bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>K24</b>	-H	0	-	0	-
<b>K30</b>	Ethyl	0	-	0,4 $\pm$ 1,4	-
<b>K34</b>	<i>i</i> -Propyl	0	-	33,4 $\pm$ 1,4	52,6 $\pm$ 1,9
<b>K31</b>	Allyl	0	-	45,7 $\pm$ 5,1	-
<b>K33</b>	Butyl	0,4 $\pm$ 4,7	-	6,7 $\pm$ 3,4	-
<b>K32</b>	Phenyl	0	-	21,9 $\pm$ 1,6	39,3 $\pm$ 4,3

Tabelle C-4 Hemmwerte der 17a-Aza-17a-homo-androst-3,5-en-3-carbonsäuren

Im Falle der 3-Carboxyverbindungen weisen sowohl die unsubstituierte als auch die *N*-substituierten Verbindungen keine Hemmaktivitäten gegenüber der 5 $\alpha$ RI auf. Die Verbindungen mit Allyl-, Phenyl- und *i*-Propyl-Substituenten am Stickstoff, **K31**, **K32** bzw. **K34** (22-46 % bei 10  $\mu$ M), hingegen zeigen eine schwache bis moderate Hemmung der 5 $\alpha$ RII. Die Säuregruppe ist also in der Klasse der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androstene ein wichtiger Faktor zum Erreichen der 5 $\alpha$ RII Selektivität.

Weiter lässt sich ein ähnlicher Trend wie schon bei den 3-Cyanoverbindungen beschrieben beobachten. Vergrößerung des Substituenten geht mit Verstärkung der Hemmaktivität gegen die 5 $\alpha$ RII einher. In dieser Serie scheint allerdings die Allylsubstitution die beste räumliche Ausfüllung der Bindetasche mit sich zu bringen. Die Phenylverbindung ist hingegen deutlich schwächer aktiv und scheint somit keine starke Wechselwirkung mit dem Enzym ausbilden zu können.

**C.2.2 17-Aza-17a-homo-androsten-16,17a-dione**
**C.2.2.1 Modifikation in 3- und 6-Position**

**K7, K8, K10**

**K4-6**

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Hemmung 5 $\alpha$ RI		Hemmung 5 $\alpha$ RII	
			bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>K7</b>	-Br		2,3 $\pm$ 1,3	-	32,4 $\pm$ 2,9	-
<b>K8</b>	-CN		3,2 $\pm$ 1,2	-	14,9 $\pm$ 2,0	-
<b>K10</b>	-COOH		6,3 $\pm$ 0,9	-	0	-
<b>K4</b>	=O	=O	0	-	0	-
<b>K5</b>	=NOH	=NOH	1,3 $\pm$ 2,3	-	35,3 $\pm$ 5,7	-
<b>K6</b>	=NNHCSNH <sub>2</sub>	=NNHCSNH <sub>2</sub>	2,1 $\pm$ 1,3	-	0	-

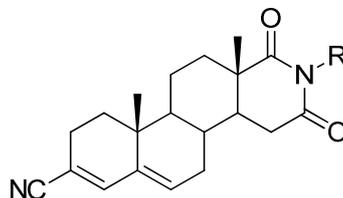
**Tabelle C-5 Hemmwerte der 17-Aza-17a-homo-androsten-16,17a-dione und deren Modifikation in 3- und 6-Position**

Tabelle C-5 zeigt das 3-Bromoderivat **K7** im Vergleich mit den Verbindungen **K8** (3-Cyano) und **K10** (3-Carboxy). Die Bromverbindung ist dabei aktiver gegenüber der 5 $\alpha$ RII (32 % bei 10  $\mu$ M) und die praktische Inaktivität gegenüber der 5 $\alpha$ RI bringt eine Selektivität gegen diese Isoform mit sich. **K8** hingegen ist im Vergleich schwächer aktiv, **K10** inaktiv.

Die 3,6-Diketoverbindung **K4** ist ebenso inaktiv wie die 3,6-Dihydrazincarbothioamidverbindung **K6**. Interessanterweise ist die 3,6-Dioximverbindung

**K5**, die von der Substituentengröße her betrachtet zwischen **K4** und **K6** liegt, ein moderat potenter 5 $\alpha$ RII Hemmstoff.

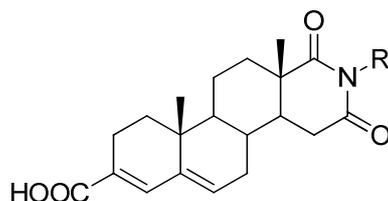
### C.2.2.2 3-Cyanoverbindungen



Verb.	R	Hemmung 5 $\alpha$ RI		Hemmung 5 $\alpha$ RII	
		bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>K8</b>	-H	3,2 $\pm$ 1,2	-	14,9 $\pm$ 2,0	-
<b>K9</b>	Methyl	1,0 $\pm$ 0,6	-	0	-
<b>K11</b>	Ethyl	0	-	38,3 $\pm$ 3,6	15,4 $\pm$ 1,2
<b>K15</b>	<i>i</i> -Propyl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>K12</b>	Allyl	0,8 $\pm$ 2,4	-	0	-
<b>K14</b>	Butyl	8,6 $\pm$ 0,1	-	8,9 $\pm$ 2,1	-
<b>K13</b>	Phenyl	6,1 $\pm$ 1,6	-	26,2 $\pm$ 2,5	-

**Tabelle C-6** Hemmwerte der 17-Aza-17a-homo-androst-3,5-en-16,17a-dion-3-carbonitrile  
 n.d.: nicht bestimmt; Bestimmung des Hemmwertes unmöglich. Wahrscheinlich begründet in einer Interferenz der Verbindung mit dem Szintillationsdetektionssystem

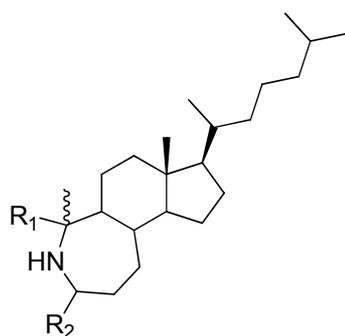
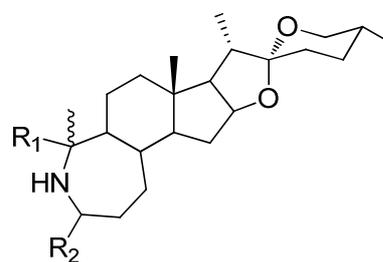
In der Gruppe der 17-Aza-16,17a-oxo-17a-homo-androsten-3-carbonitrile finden sich wenige aktive Verbindungen. Der aktivste Vertreter ist Verbindung **K11**, die einen Ethylrest am Stickstoff trägt und mit einem IC<sub>50</sub> von etwa 15  $\mu$ M selektiv die 5 $\alpha$ RII hemmt. Verbindung **K13** ist mit ihrem sperrigen Phenylrest ebenso schwach aktiv wie die unsubstituierte Verbindung **K8**. Die *N*-Butylverbindung **K14** stellt einen schwach aktiven und unselektiven 5 $\alpha$ R Inhibitor dar. Methyl- und Allylsubstitution lassen jegliche Hemmaktivität verschwinden. Keine der Verbindungen zeigt erwähnenswerte Aktivität gegenüber der 5 $\alpha$ RI.

**C.2.2.3 3-Carboxyverbindungen**


Verb.	R	Hemmung 5 $\alpha$ RI		Hemmung 5 $\alpha$ RII	
		bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>K10</b>	-H	6,3 $\pm$ 0,9	-	0	-
<b>K16</b>	Ethyl	11,4 $\pm$ 2,0	-	59,9 $\pm$ 4,9	9,7 $\pm$ 0,68
<b>K20</b>	<i>i</i> -Propyl	0	-	0	-
<b>K17</b>	Allyl	1,7 $\pm$ 2,3	-	0	-
<b>K19</b>	Butyl	0,6 $\pm$ 2,3	-	2,6 $\pm$ 1,1	-
<b>K18</b>	Phenyl	0	-	24,9 $\pm$ 0,5	-

**Tabelle C-7 Hemmwerte der 17-Aza-17a-homo-androst-3,5-en-16,17a-dion-3-carbonsäuren**

Die Carbonsäureserie der 17-Aza-17a-homo-androsten-16,17a-dione bringt lediglich zwei Hemmstoffe von nennenswerter Aktivität hervor. Die Phenylverbindung **K18** ist ein schwacher, aber relativ selektiver Hemmstoff der 5 $\alpha$ RII. Die Hemmstärke bei 10  $\mu$ M beträgt 25 %. Stärker aktiv ist das Ethylderivat **K16**, das die 5 $\alpha$ RII mit einem IC<sub>50</sub> von knapp 10  $\mu$ M hemmt. Gleichzeitig hemmt **K16** bei dieser Konzentration die 5 $\alpha$ RI zu 11,4 %. Die übrigen Verbindungen **K10**, **K17**, **K19** und **K20** sind als inaktiv anzusehen. Der Einfluss der Substituenten auf die Hemmaktivität ist somit vergleichbar mit der Klasse der oben beschriebenen 3-Cyanoverbindungen (s. Abschnitt C.2.2.2).

**C.2.3 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstane**

**K35, K36, K41, K42**

**K37-40**

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Hemmung 5 $\alpha$ RI		Hemmung 5 $\alpha$ RII	
			bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	bei 10 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>K35</b>		=O	4,8 $\pm$ 0,1	-	0	-
<b>K36</b>		-H	0	-	35,1 $\pm$ 6,0	-
<b>K41</b>		=O	8,2 $\pm$ 0,5	-	0	-
<b>K42</b>		=O	4,7 $\pm$ 2,3	-	0	-
<b>K37</b>		=O	12,2 $\pm$ 2,0	-	78,3 $\pm$ 4,6	4,8 $\pm$ 0,09
<b>K38</b>		-H	5,8 $\pm$ 1,5	-	94,3 $\pm$ 0,1	0,47 $\pm$ 0,042
<b>K39</b>		=O	0,90 $\pm$ 5,1	-	53,8 $\pm$ 6,9	9,2 $\pm$ 0,8
<b>K40</b>		=O	1,1 $\pm$ 3,3	-	45,3 $\pm$ 3,2	13,1 $\pm$ 0,38

**Tabelle C-8 Hemmwerte der 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstane**

Die Derivate aus der Klasse der 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstane sind strukturell am weitesten von den natürlich im Menschen vorkommenden Steroiden entfernt. Dennoch stellt diese Klasse fünf potente 5 $\alpha$ RII Hemmstoffe. Die Verbindungen mit der 6-Methylheptan-2-yl-Seitenkette (**K35**, **K36**, **K41** und **K42**) sind bis auf **K36**, die als einzige Verbindung dieser Untergruppe kein Lactam ist und eine 3-Hydroxypropyl-Seitenkette trägt, inaktiv gegenüber der 5 $\alpha$ RI und 5 $\alpha$ RII. **K36** besitzt eine zumindest moderate 5 $\alpha$ RII Hemmaktivität von 35 % bei 10  $\mu$ M, wohingegen die vom Spirostan abgeleiteten, rigideren Verbindungen **K37-40** alle moderat bis stark aktiv sind ( $IC_{50}$  = 0,5-13  $\mu$ M) und gleichzeitig eine deutlich ausgeprägte Selektivität gegenüber der 5 $\alpha$ RI aufweisen.

Unter den 6-Oxo-Verbindungen besitzt **K37** mit ihrer Propionsäureseitenkette und einem  $IC_{50}$ -Wert von etwa 5  $\mu$ M die höchste Aktivität. Veresterung der Seitenkette führt zu leichten Einbußen in der Hemmaktivität (**K39**,  $IC_{50}$  = 9,2  $\mu$ M und **K40**,  $IC_{50}$  = 13  $\mu$ M). Dies ist wahrscheinlich nicht durch Verlust der Möglichkeit eine Salzbrücke auszubilden begründet, da der Aktivitätsverlust in diesem Falle deutlich stärker wäre. Der räumlich kleinere Ethylester **K39** ist aktiver als der *i*-Propylester **K40**. **K38**, der die 6-Oxogruppe fehlt und an C<sub>10</sub> eine 3-Hydroxypropyl-Seitenkette trägt, stellt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0,47  $\mu$ M die aktivste Verbindung unter allen in dieser Studie vorgestellten neuen Verbindungen dar.

Da die Verbindung – wie alle hier aufgeführten 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstane – als Racemat vorliegt, ist die Möglichkeit gegeben, durch eine Enantiomerentrennung eine Verbindung mit noch besserer Aktivität und Selektivität zu erhalten. Vollständige Inaktivität des Distomers vorausgesetzt, kann so eine bis zu zweifache Steigerung der Hemmaktivität erreicht werden.

### C.3 Vergleich und Bewertung der Verbindungsklassen

In den vorangegangenen Abschnitten wurden etwa 40 neue Verbindungen vorgestellt und im Hinblick auf ihre 5 $\alpha$ R Hemmaktivität evaluiert. Das Ziel, die Potenz der Hemmstoffe weiter zu steigern, konnte leider nicht erreicht werden. Dennoch können die Ergebnisse dieser Studie und der Vergleich mit den Inhibitoren aus der Publikation von Aggarwal *et al.* [91] sowohl einen wertvollen Beitrag zur Erweiterung der Kenntnisse über durch das Enzym akzeptierte Strukturmerkmale leisten als auch Möglichkeiten der weiteren Optimierung der Inhibitoren aufzeigen.

### C.3.1 Vergleich der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androst-3,5-dien-17-one mit den 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homoandrostenen

Die in der Tabelle C-1 aufgeführten Verbindungen lassen sich gut mit den neu vorgestellten 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homoandrostenen vergleichen, da die Grundstruktur der alten Verbindungen sich lediglich durch eine zusätzlich vorhandene Oxogruppe an C<sub>17</sub> unterscheidet.

Die Anwesenheit der 17-Oxogruppe bewirkt einen deutlichen Unterschied in der Hemmaktivität. Die 17-Oxo-Verbindungen **V11** und **V20** zeigen eine deutlich höhere 5 $\alpha$ R Hemmaktivität als ihre Pendants **K21** und **K24**. Dies scheint auch für die meisten anderen Verbindungen zu gelten, und die 17-Oxoverbindungen **V13-15** und **V22-23** sind aktiver als die neue Derivate **K23**, **K25-26** und **K30-31**.

Einziges Ausnahmepaar sind die Verbindungen **V12** und **K22** (3-Cyanoverbindungen). Von diesen beiden, am Stickstoff unsubstituierten, Verbindungen zeigt die Verbindung **K22** (ohne 17-Oxogruppe) eine leicht höhere Potenz gegen 5 $\alpha$ RI bzw. 5 $\alpha$ RII (54 % und 39 % bei 10  $\mu$ M) im Vergleich zu **V12** (28 % und 10 %).

Vergleicht man die besten Verbindungen beider Substanzgruppen untereinander, wird schnell deutlich, dass die Oxogruppe allerdings einen überwiegend positiven Effekt hat. So finden sich in der vorhergehenden Studie drei Verbindungen (**V21**, **V22** und **V23**) mit IC<sub>50</sub>-Werten gegen die 5 $\alpha$ RII im zweistelligen nanomolaren Bereich. Die Gruppe der neuen Aza-17 $\alpha$ -homoandrostene bringt lediglich eine Verbindung mit einem IC<sub>50</sub>-Wert im hohen dreistelligen nanomolaren Bereich hervor (**K29**). Alle anderen Verbindungen dieser Klasse sind, teils deutlich, schwächer aktiv. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit der Oxogruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor deutlich verstärkt werden kann und somit aktivere Verbindungen erhalten werden können. Ebenso könnte die mit der sp<sup>2</sup>-Hybridisierung des C<sub>17</sub>-Atoms einhergehende Planarität eine Rolle spielen.

Es ist weiter interessant, dass die 3-Carboxy- und die 3-Cyanoverbindungen innerhalb der alten und der neuen Studie gänzlich andere Qualitäten in Bezug auf die 5 $\alpha$ RII-Hemmaktivität haben. So zeigen sich die 3-Cyanoverbindungen der alten Studie deutlich schwächer aktiv als die analogen 3-Carboxyverbindungen. Im Gegensatz dazu sind die 3-Cyanoverbindungen der neuen Studie meist deutlich aktiver als die entsprechenden 3-Carboxyverbindungen. Besonders deutlich ist dies am Vergleich zwischen den *N*-Isopropylderivaten **K29** (3-Cyano) und **K34** (3-Carboxy) (IC<sub>50</sub>5 $\alpha$ RII 0,86  $\mu$ M vs. 53  $\mu$ M) oder zwischen den *N*-Phenylverbindungen **K27** (3-Cyano) und **K32** (3-Carboxy) (IC<sub>50</sub>5 $\alpha$ RII 1,9  $\mu$ M vs. 39  $\mu$ M) zu sehen. Eine Ausnahme stellt nur das Allylderivat **K31** (3-Carboxy) dar, das mit einer

Hemmung von 46 % bei 10  $\mu$ M der inaktiven, korrespondierenden 3-Cyanoverbindung **K26** deutlich überlegen ist.

Eine Möglichkeit zur Erklärung dieses Phänomens könnte in der Designrationale, die in der Einführung beschrieben wurde, zu finden sein. Da die Acrylatgruppe mutmaßlich den Enolatübergangszustand (vgl. Abbildung A-11 und Abbildung C-2) imitiert, ist gegeben, dass der A-Ring des Inhibitors die Position des A-Ring des natürlichen Steroidssubstrats in der Bindetasche einnimmt. Somit ist offensichtlich, dass bei diesen Verbindungen der erweiterte D-Ring nicht die Position des A-Ring imitieren kann. Dennoch konnten durch diesen Ansatz potente 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homoandrostencarbonsäuren erhalten werden, was belegt, dass der 17 $\alpha$ -Aza-homo-D-Ring auch die Position des D-Rings des Enzymsubstrats einnehmen kann und weiter eine Erhöhung der 5 $\alpha$ RII Hemmstärke durch das Einführen von Substituenten erzielbar ist.

Obwohl denkbar wäre, dass auch die Nitrilgruppe die von der Acrylatgruppe eingegangene Interaktion mit dem enzymgebundenen NADP<sup>+</sup> eingehen kann, ist die Stärke der Wechselwirkung wahrscheinlich geringer. Dass die Säuregruppe nicht durch andere polare Substituenten ersetzt werden kann, zeigt der bis zu 100-fache Aktivitätsverlust nach Einführung eines Alkohol-, Aldehyd- und Amidrestes in 3-Position [93]. Somit ist wahrscheinlich, dass die 3-Cyanosterioide eine gänzlich andere Bindestelle des Enzyms besetzen bzw. in einem anderen Bindungsmodus binden. An dieser könnten die Verbindungen dann als „umgekehrte Binder“ fungieren, wobei der Homo-D-Ring die Position des A-Rings des Substrats einnehme. Es ist offensichtlich, dass in dieser Ausrichtung im Enzym, im Vergleich zu den 3-Carboxyverbindungen, andere D-Ringmodifikationen akzeptiert werden können.

Bezüglich der Hemmung der 5 $\alpha$ RI lassen sich nur schwer Vergleiche zwischen den neuen und den alten Verbindungen ziehen. Eine in der Vorgängerpublikation festgestellte, interessante Strukturwirkungsbeziehung kann in der Gruppe der neuen Verbindungen nicht wiedergefunden werden. Aggarwal *et al.* beobachteten, dass, wenn die 3-Cyanoverbindung **V11** am Stickstoff methylsubstituiert wird, die Hemmaktivität gegen die 5 $\alpha$ RI stark ansteigt (von 28 % auf 93 % bei 10  $\mu$ M). Eine Vergrößerung der Kettenlänge des Substituenten führt sukzessive wieder zu schlechteren Verbindungen. Mit der Methylgruppe wird also die optimale Größe der Seitenkette erreicht. Ein Blick auf die neuen Verbindungen lässt leider keine solche Korrelation erkennen. Hier ist, wie oben schon erwähnt, die unsubstituierte Verbindung die einzige, zumindest moderat, aktive gegen die 5 $\alpha$ RI.

### **C.3.2 Vergleich der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androst-3,5-dien-17-one mit den 17-Aza-17 $\alpha$ -homo-androsten-16,17 $\alpha$ -dionen**

Die neuen 17-Aza-17 $\alpha$ -homo-androsten-16,17 $\alpha$ -dione unterscheiden sich stärker von den Verbindungen der alten Studie als die neuen 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homoandrostene. Ein direkter Vergleich fällt damit etwas schwerer. Es lässt sich aber schnell feststellen, dass auch erstere schwächere Hemmpotenzen vorweisen als die älteren Vergleichsverbindungen. Moderat aktiv gegen eines der beiden betrachteten Isoenzyme der 5 $\alpha$ R sind lediglich **K7**, **K11**, **K13**, **K16**, **K18** und das 3,6-Dioximderivat **K5**. Ein näherer Blick auf die Hemmeigenschaften zeigt, dass der in Abschnitt C.3.1 erläuterte Unterschied zwischen den 3-Carboxy- und den 3-Cyanoverbindungen deutlich schwächer, wenn überhaupt festzustellen ist. Der IC<sub>50</sub>-Wert gegen die 5 $\alpha$ R<sub>II</sub> unterscheidet sich bei den *N*-Ethylderivaten **K11** (3-Cyano) und **K16** (3-Carboxy) nur um den Faktor 1,6. Bei den *N*-Phenylderivaten **K13** (3-Cyano) und **K18** (3-Carboxy) ist bei der prozentualen Hemmung bei 10  $\mu$ M kein Unterschied feststellbar. Die von dem Hemmstoff eingenommene Bindestelle akzeptiert offensichtlich beide Modifikationen an der 3-Position des Steroids. Da die Anzahl der aktiven Verbindungen in der hier betrachteten Gruppe deutlich geringer ist, lässt sich nur schwer über funktionelle Gruppen, die die Hemmstärke erhöhen, diskutieren.

Interessant ist allerdings der Vergleich der nahe verwandten *N*-Ethylverbindungen **K11** und **V14**. Bei ähnlicher Hemmstärke gegen die 5 $\alpha$ R<sub>II</sub> zeichnet sich das neue 17-Aza-17 $\alpha$ -homo-androsten-16,17 $\alpha$ -dion durch eine deutlich ausgeprägte Selektivität gegenüber der 5 $\alpha$ R<sub>I</sub> aus (0,0 % vs. 56 % 5 $\alpha$ R<sub>I</sub>-Hemmung bei 10  $\mu$ M von **K11** bzw. **V14**).

### **C.3.3 Vergleich der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androst-3,5-dien-17-one mit den 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstanen**

Der Vergleich dieser beiden Verbindungsklassen ist in Anbetracht der großen strukturellen Unterschiede schwer möglich. Es lässt sich ohne computergestützte Untersuchungen kaum eine Aussage treffen, ob strukturelle Features wie der Stickstoff oder die Säuregruppe überhaupt die gleiche Position in der Bindetasche einnehmen. Feststellen lässt sich dennoch, dass die 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstanen von allen neu vorgestellten Klassen am ehesten an die Potenz der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androst-3,5-dien-17-one heranreichen.

## **C.4 Weiterentwicklung der Substanzklassen**

Die vorliegende Studie zu 5 $\alpha$ R<sub>I</sub> und 5 $\alpha$ R<sub>II</sub> Hemmstoffen stellt eine interessante Ergänzung zu den Ergebnissen aus vorangegangenen Hemmstoffstudien dar. Zwar brachte die hier durchgeführte Studie deutlich weniger potente Verbindungen hervor (in der vorhergehenden

Veröffentlichung [91] konnten Inhibitoren mit IC<sub>50</sub> Werten im zweistelligen nanomolaren Bereich erhalten werden), dennoch erweitert sie das Wissen über die Akzeptanz des aktiven Zentrums der 5 $\alpha$ R-Isoformen I und II gegenüber Hemmstoffen um wertvolle Erkenntnisse und zeigt neue Möglichkeiten zur Weiterentwicklung der Substanzklassen auf.

Ausgangspunkte für neue Serien von selektiven 5 $\alpha$ RII-Hemmstoffen könnten beispielsweise die *N*-unsubstituierten Verbindungen **K1**, **K2**, **K5** und **K7** sein. Vor allem **K1** (3,6-Dioxo) scheint vielversprechend zu sein. Diese Verbindung hemmt die 5 $\alpha$ RII mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von etwa 4  $\mu$ M und ist dabei als vollkommen selektiv gegenüber 5 $\alpha$ RI anzusehen. Die Einführung verschiedener Substituenten am Stickstoff wird höchstwahrscheinlich interessante Verbindungen hervorbringen.

Um zu bestätigen oder zu widerlegen, ob die verschiedenen Verbindungsgruppen tatsächlich unterschiedliche Bindestellen einnehmen, wie in Abschnitt C.3.1 vermutet, sind enzymkinetische Untersuchungen lohnenswert. Es könnte so eine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob die Verbindungen unterschiedlichen Bindungskinetiken folgen und somit einige kompetitive und andere unkompetitive Inhibitoren darstellen. Sollte dies der Fall sein, ist es sicherlich sinnvoll dies bei der Weiterentwicklung der Verbindungen zu berücksichtigen und eventuell nur einen Weg zu verfolgen.

Weiter wurde mit den neuen 5-Aza-des-A-7a-homo-androstanen eine sehr interessante und auch vielversprechende Verbindungsklasse vorgestellt. Eine vergleichende Bewertung dieser Klasse gestaltet sich noch als schwierig, da zunächst nur wenige Vertreter auf Aktivität getestet werden konnten. Die Möglichkeiten der Variation dieser Verbindungen sind noch nicht ausgeschöpft. Optionen zur Modifikation der aktivsten Verbindung **K38** wären beispielsweise die Einführung von Alkoholresten verschiedener Länge an R<sub>1</sub> (vgl. Tabelle C-8), die Veresterung dieser mit Säuren verschiedener Größen und die bisher ungenutzte Möglichkeit der Einführung diverser Substituenten am Stickstoff, ähnlich dieser Studie. Weitere Vorteile der Substanzklasse sind die 5 $\alpha$ RII-Selektivität und die Möglichkeit durch Enantiomerentrennung oder enantiomerenselektive Synthese aktivere Verbindungen zu erhalten. Die Klasse der 5-Aza-des-A-7a-homo-androstanen ist außerdem strukturell deutlich weiter von natürlich vorkommenden Steroiden entfernt als die übrigen in dieser Arbeit betrachteten Substanzklassen, was das Auftreten von steroidbezogenen Nebenwirkungen bei einer möglichen klinischen Studie am Menschen weniger wahrscheinlich macht.

## **D Entwicklung eines CYP17A1 C<sub>17,20</sub>-Lyase-Assays und biologische Evaluierung einer Substanzbibliothek**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein biologischer Assay zur Bestimmung der Hemmpotenz von Substanzen gegenüber der C<sub>17,20</sub>-Lyase-Aktivität des Enzyms CYP17A1 entwickelt. Zur Bestimmung der Selektivität gegenüber der 17 $\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität von CYP17A1 wurde der bereits im Arbeitskreis Hartmann etablierte Assay modifiziert. Eine Substanzbibliothek, bestehend aus bereits publizierten CYP-Hemmstoffen, wurde auf Aktivität und Selektivität bezüglich der genannten Enzymreaktionen untersucht. Die Assays und die erhaltenen Ergebnisse wurden in einem Artikel zusammengefasst und veröffentlicht. Die Publikation trägt den Titel:

### **Hits identified in library screening demonstrate selective CYP17A1 lyase inhibition**

Sebastian J. Krug, Qingzhong Hu, Rolf W. Hartmann

Abdruck mit freundlicher Genehmigung aus *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 134 (2013) 75– 79

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jsbmb](http://www.elsevier.com/locate/jsbmb)

Short communication

## Hits identified in library screening demonstrate selective CYP17A1 lyase inhibition

Sebastian J. Krug<sup>a</sup>, Qingzhong Hu<sup>a</sup>, Rolf W. Hartmann<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Saarland University, Campus C2.3, 66123 Saarbrücken, Germany<sup>b</sup> Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland (HIPS), Campus C2.3, 66123 Saarbrücken, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 August 2012

Received in revised form

25 September 2012

Accepted 28 October 2012

Dedicated to Prof. Dr. Dr. h.c. Theophil Eicher on the occasion of his 80th birthday.

## Keywords:

CYP17A1

Selectivity screening

Prostate cancer

Androgens

Hydroxylase assay

Lyase assay

## ABSTRACT

A screening of structurally different steroid hormone synthesis inhibitors was performed in order to find a starting point for the development of a new inhibitor of the bifunctional steroidogenic enzyme CYP17A1. Emphasis was placed on determination of selectivity between the two catalytic steps, namely 17 $\alpha$ -hydroxylase and C<sub>17,20</sub>-lyase. For that purpose a new inhibition assay has been developed. Hits identified within this novel assay demonstrated selective inhibition of CYP17A1 lyase activity, and thus mark the basis for the development of selective C<sub>17,20</sub>-lyase inhibitors for the treatment of prostate cancer.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Seventy years after the elucidation of the dependence of prostate cancer (PCa) on androgens [1], this disease still is amongst the five leading causes of cancer death in men in the U.S. and Western countries. Although established treatment methods, namely surgical or medical castration (with GnRH analogs) often in combination with antiandrogens, exist, they failed in advanced disease states, the so-called castration resistant prostate cancer (CRPC). However, patients suffering from CRPC can clearly benefit from the newly approved drug abiraterone acetate [2]. This pregnenolone derivative was designed as an inhibitor of the enzyme 17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-lyase (CYP17A1) [3] which catalyzes two key reactions in steroid hormone biosynthesis. In a

first step the substrates progesterone (P<sub>4</sub>) and pregnenolone (P<sub>5</sub>) are hydroxylated in 17 $\alpha$  position of the steroid to yield 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17OH-P<sub>4</sub>) and 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone (17OH-P<sub>5</sub>), respectively. At this node of glucocorticoid and androgen biosynthesis the C<sub>17,20</sub>-lyase (lyase) activity of CYP17A1 cleaves the C<sub>17</sub>–C<sub>20</sub> bond of 17OH-P<sub>5</sub> to produce the C<sub>19</sub>-steroid dehydroepiandrosterone (DHEA) (Fig. 1). In healthy men androgens are only produced in the testes (ca. 90%) and the adrenals, whereas in PCa patients there is notable production of androgens also in the tumor tissue. This is considered as one of the possible mechanisms of disease progression under conventional therapy, which only affects testicular androgen production. Although abiraterone acetate is successful in prolonging patients' lives, its steroidal structure in conjunction with the high daily dose could possibly result in unwanted activation of steroid hormone signaling via wild type or mutant steroid hormone receptor stimulation, although this has not yet been reported in clinical studies. Therefore contemporary research focus lies on non-steroidal inhibitors [4–11]. Furthermore abiraterone evidently blocks glucocorticoid biosynthesis by inhibition of both, hydroxylase and lyase, activities of CYP17A1 leading to a secondary mineralocorticoid excess that makes substitution with a synthetic glucocorticoid (e.g. prednisone) or co-medication with a mineralocorticoid receptor antagonist (e.g. eplerenone) necessary [12]. The missing selectivity between hydroxylase and lyase is often considered as inevitable because both CYP17A1 reactions

**Abbreviations:** 17OH-P<sub>4</sub>, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone; 17OH-P<sub>5</sub>, 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone; CRPC, castration resistant prostate cancer; CYP17A1, 17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-lyase; DHEA, dehydroepiandrosterone; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; hydroxylase, 17 $\alpha$ -hydroxylase; lyase, C<sub>17,20</sub>-lyase; P<sub>4</sub>, progesterone; P<sub>5</sub>, pregnenolone; PCa, prostate cancer.

\* Corresponding author at: Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Saarland University, Campus C2.3, 66123 Saarbrücken, Germany. Tel.: +49 681 302 70300; fax: +49 681 302 70314.

E-mail addresses: [rolf.hartmann@helmholtz-hzi.de](mailto:rolf.hartmann@helmholtz-hzi.de), [rw@mx.uni-saarland.de](mailto:rw@mx.uni-saarland.de) (R.W. Hartmann).

0960-0760/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.10.019>

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/09600760?sdc=1>

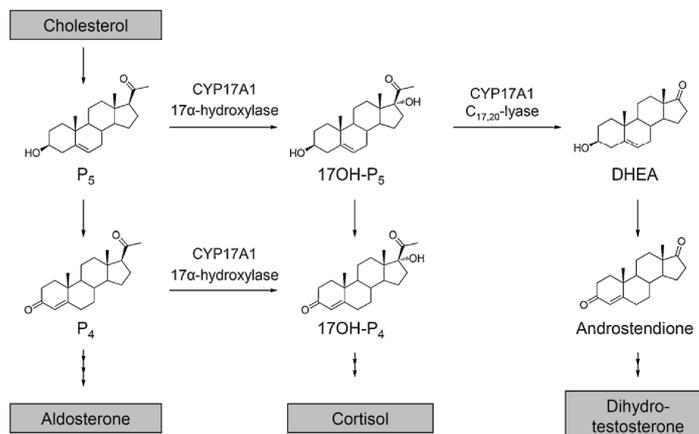


Fig. 1. The role of CYP17A1 in mineralocorticoid, glucocorticoid and androgen biosynthesis.

occur in the same catalytic site. We [13,14] and other researchers [15,16] in the field of CYP17A1 inhibitor development consequently established inhibition assays which do not differentiate between the two reactions. Others considered this issue only late in their drug development process [8]. Aiming at the discovery of non-steroidal, selective lyase inhibitors as potential clinical candidates, a screening system capable of identifying suitable compounds in an early stage of development is required. In the present work we describe a new assay procedure which allows quick and easy to perform determination of lyase inhibition and demonstrate its usefulness by investigating selected structurally diverse compounds of our in-house steroidogenic CYP enzyme inhibitor library [17–20].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

[7-<sup>3</sup>H(N)]-pregnenolone (1 mCi/mL, 21.1 Ci/mmol) was obtained from PerkinElmer LAS (Rodgau, Germany).

### 2.2. CYP17A1 enzyme preparation

The coexpression of human CYP17A1 and rat NADPH-P450-reductase in *Escherichia coli* and the isolation of the membrane fractions were performed as previously described [14]. Membrane fractions were diluted to a concentration that gives a 15–25% conversion in the controls for the different assays.

### 2.3. C<sub>17,20</sub>-lyase assay

The lyase activity of CYP17A1 was determined by measurement of the conversion of 17OH-P<sub>5</sub> to DHEA. In a first incubation step 17OH-P<sub>5</sub> was generated from P<sub>5</sub> by CYP17A1 itself. The assay procedure was as follows: An assay mixture consisting of 140 μL phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM dithiothreitol), 50 μL NADPH generating system (in phosphate buffer with 50 mM glucose-6-phosphate, 5.75 mM NADP<sup>+</sup> and 27.5 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase) and 5 μL substrate solution (25 μM [<sup>3</sup>H]-P<sub>5</sub>) was preincubated at 37 °C for 5 min. The reaction was started by addition of 50 μL enzyme preparation. After a 10 min incubation 98 μL of the reaction mixture were mixed with 25 μL 1 N HCl to stop the enzymatic reaction. Another 98 μL

of the reaction mixture were mixed with 2 μL of a DMSO solution of the inhibitor (controls contained only DMSO). This mixture was incubated for additional 30 min at 37 °C. Subsequently the reaction was stopped by addition of 25 μL 1 N HCl. Extraction of the steroids was performed by addition of 500 μL ethylacetate and vigorous shaking for 10 min. After a centrifugation step (5 min, 15,000 × g), 470 μL of the organic phase were removed and transferred into a fresh tube containing 125 μL phosphate buffer and 25 μL 1 N HCl. Shaking and centrifugation was repeated as described above. 400 μL ethylacetate solution was evaporated to dryness in a fresh tube and redissolved in 40 μL acetonitrile/water (3/2) for HPLC analysis.

### 2.4. 17α-Hydroxylase assay

Determination of the hydroxylase activity of CYP17A1 was performed by measurement of the conversion of P<sub>5</sub> to 17OH-P<sub>5</sub>. An assay mixture consisting of 140 μL phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM dithiothreitol), 50 μL NADPH generating system (in phosphate buffer with 50 mM glucose-6-phosphate, 5.75 mM NADP<sup>+</sup> and 27.5 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase) and 5 μL substrate solution (25 μM [<sup>3</sup>H]-P<sub>5</sub>) was preincubated at 37 °C for 5 min. The reaction was started by addition of 50 μL enzyme preparation. Compared to the lyase assay, however, enzyme concentration had to be reduced to keep control conversion in the favorable range of 15–25% and to prevent DHEA formation. After a 30 min incubation at 37 °C the enzyme reaction was stopped by addition of 50 μL 1 N HCl. Extraction of the steroids was performed by addition of 1000 μL ethylacetate and vigorous shaking for 10 min. After a centrifugation step (5 min, 15,000 × g), 900 μL of the organic phase were removed and transferred into a fresh tube containing 250 μL phosphate buffer and 50 μL 1 N HCl. Shaking and centrifugation was repeated as described above. 800 μL ethylacetate solution was evaporated to dryness in a fresh tube and redissolved in 40 μL acetonitrile/water (1/1) for HPLC analysis.

### 2.5. HPLC methods

HPLC separation of the steroids was performed using an Agilent 1100 HPLC system with PDA detector (Böblingen, Germany), a CC 125/3 Nucleodur 100–3 C-18 ec column (Macherey-Nagel,

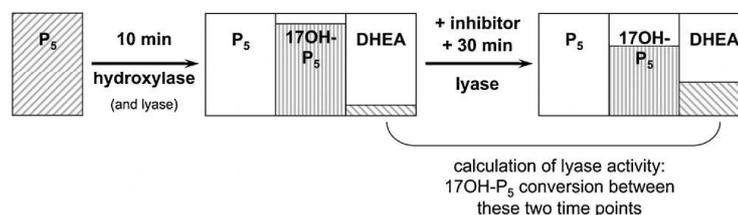


Fig. 2. Schematic representation of the lyase assay procedure.

Düren, Germany) and a Berthold Radioflow Detector LB509 with Scintillator Pump (Bad Wildbad, Germany). Quicksint Flow 302 LSC Cocktail (Zinsser Analytic, Frankfurt/Main, Germany) was used as scintillator fluid.

HPLC conditions for the analysis of the lyase reaction were as follows: eluent A was 0.1% trifluoroacetic acid in water, eluent B was 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile. An eluent gradient of 60–75% eluent B in the first 30 s was followed by a 3.5 min isocratic phase with 75% eluent B. From 4.0 to 4.5 min the eluent was changed to 100% eluent B. After a 2.5 min phase with 100% eluent B the eluent system was set back to the original composition of 60% eluent B till the end of the run at 10.0 min. Solvent and scintillator flow was set to 0.5 mL/min.

For the analysis of the hydroxylase assay an isocratic method was used. A 1 + 1 mixture of water and acetonitrile with 0.1% trifluoroacetic acid was used as eluent. Solvent and scintillator flow was set to 0.9 mL/min.

### 3. Results and discussion

For the discovery of selective lyase inhibitors a new assay was developed. Like other CYP17A1 assays used in literature the CYP17A1 assay performed and described by our group [14] is a hydroxylase assay that uses a high concentration of unlabeled  $P_4$  as substrate. Due to the preference of human lyase for  $\Delta_5$ -unsaturated steroids the reaction with the  $\Delta_4$ -unsaturated steroid  $P_4$  is at a dead end at the 17 $\alpha$ -hydroxysteroid level and only 17OH- $P_4$  and the side product 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone are yielded (data not shown). While others use 17OH- $P_5$  as a substrate for lyase inhibition assays we decided to establish a new assay closer to the natural conditions. As two substrates usually are available for the enzyme, 17 $\alpha$ -unhydroxylated steroid and 17OH- $P_5$ , this situation should be simulated by the use of tritium labeled  $P_5$ . The assay principle is illustrated in Fig. 2. The lyase substrate 17OH- $P_5$  is formed in situ by the CYP17A1 enzyme during a 10 min preincubation. At this timepoint almost all  $P_5$  substrate has been transformed into 17OH- $P_5$  (>90%) and DHEA (<10%). The incubation of an aliquot is stopped using HCl and the concentration of DHEA is determined to be used as baseline value. At this timepoint the lyase assay is initiated by addition of test compound in different concentrations dissolved in DMSO (final concentration usually between 0 and 10  $\mu$ M). After another 30 min of incubation and subsequent termination, lyase inhibition is calculated using the difference between the final DHEA concentration and the baseline value. These preincubation and incubation times were the results of a time course experiment aiming at the optimization of this process (see Supporting information).

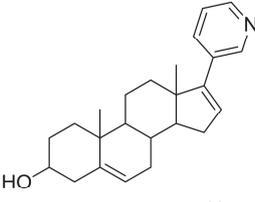
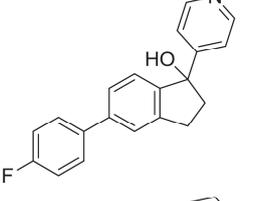
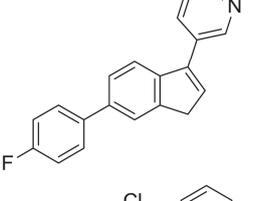
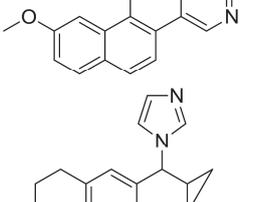
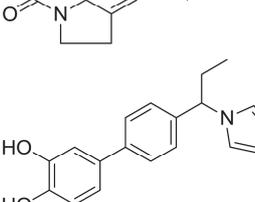
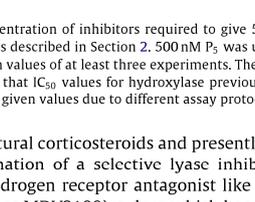
Although the lyase assay with labeled  $P_5$  is associated with a slightly more laborious procedure, it has clear advantages. The substrate is less expensive than [ $^3$ H]-17OH- $P_5$  and readily available. As the assay is based on bacterially expressed human CYP17A1 in combination with a NADPH reductase [13] availability of enzyme is not a

problem in contrast to protocols that use human testes homogenate [3]. Furthermore, side reactions catalyzed by other steroidogenic enzymes can be excluded using human CYP17A1 from bacterial source. Although bacterial and eukaryotic protein expression are known to differ with regard to posttranslational modifications, an impact of the latter on the assay result is unlikely. Phosphorylation, the only described posttranslational modification for human CYP17A1 known to the authors, increases lyase activity [21], presumably by enhancing the interaction between CYP17A1 and the NADPH reductase. It is probable that this does not affect ligand accommodation and inhibitor potency. Influence on the results due to other possible, but yet undescribed posttranslational modifications remains to be elucidated. Addition of cytochrome  $b_5$ , a cofactor reported to facilitate the lyase reaction [8,22], was found to be not required.

With the new tool in hands twenty selected steroidogenic enzyme inhibitors were tested for hydroxylase and lyase inhibition. All compounds were non-steroidal and taken from our in-house library, which was build over the past decade as a result of our group's research on CYP enzyme inhibitors and thus represents a wide-ranged collection of compounds. A feature they all have in common is a nitrogen atom able to interact with the heme iron located in the active center of CYP enzymes. The compounds were carefully selected with regard to diversity of the scaffold, different nitrogen containing heterocycles, varying nitrogen positions in the heterocycle and a different hydroxylase inhibition profile. The steroidal CYP17A1 inhibitor abiraterone was used as reference compound. The results of the most interesting compounds regarding chemical diversity and lyase selectivity are shown in Table 1. Abiraterone is a more potent inhibitor of the hydroxylase reaction ( $IC_{50;hydroxylase} = 1.7$  nM) which is in consistency with the observation of secondary mineralocorticoid excess reported in clinical trials (e.g. [23,24]). By comparison compounds **1**, **3**, **4** and **5** are potent lyase inhibitors and show  $IC_{50}$  values less than 40 nM, while compound **2** is less potent ( $IC_{50} = 2936$  nM). Although none of the test compounds is more active than abiraterone, compounds **1**, **4** and **5** show a better selectivity profile. Especially **4**, which had been developed in our group as a CYP11B1 inhibitor, is an interesting candidate for further investigation having a 15-fold greater potency for lyase than for hydroxylase inhibition. A compound with these properties should be able to prevent androgen formation while retaining glucocorticoid synthesis. In consequence, the secondary mineralocorticoid excess resulting from low glucocorticoid levels should be prevented and thus co-medication be avoided, which is needed to manage the side effects of unselective CYP17A1 inhibition.

Even though a selective lyase inhibitor would be a safer drug for PCa patients, it should only be administered to patients with clearly defined state of the androgen receptor. Described mutations like L701H and H877A result in a broadened ligand spectrum activating the receptor [25]. In consequence, the receptor is no longer exclusively activated by androgens, but also by some synthetic

**Table 1**  
In vitro CYP17A1 hydroxylase and lyase inhibition assay data.

Compound	IC <sub>50</sub> [nM] <sup>a</sup>	
	Hydroxylase <sup>b</sup>	Lyase
 ABT	1.7	15.3
 1	73.2	36.6
 2	23,595	2936
 3	3.0	21.5
 4	351	23.5
 5	46.1	25.8

<sup>a</sup> Concentration of inhibitors required to give 50% inhibition. Assays were performed as described in Section 2. 500 nM P<sub>2</sub> was used as substrate. Data represent the mean values of at least three experiments. The deviations were within ±25%.

<sup>b</sup> Note that IC<sub>50</sub> values for hydroxylase previously reported by our group differ from the given values due to different assay protocols.

and natural corticosteroids and presently available antiandrogens. Combination of a selective lyase inhibitor with a next generation androgen receptor antagonist like Enzalutamide (previously known as MDV3100), a drug which has proven to be safe and efficient in the AFFIRM phase III clinical trial [26,27], or administration

of a dual inhibitor of CYP17A1 and CYP11B1 [5] would in these cases be the treatment of first choice.

#### 4. Conclusion

As selective lyase inhibitors should be advantageous for the treatment of PCA as they do not decrease glucocorticoid levels a new lyase selectivity assay was developed. With this assay procedure selective lyase inhibition of recently described steroidogenic CYP inhibitors was discovered and led to the identification of compound **4** as a new lead structure for the development of an improved drug against PCA. Further optimization of compound **4** is necessary as it also inhibits CYP11B1. The application of different types of CYP17A1 inhibitors (selective lyase inhibitors and dual inhibitors of CYP17A1 and CYP11B1) according to different types of androgen receptors will maximize the benefits for the PCA patients with diverse disease states.

#### Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

#### Acknowledgements

Many thanks are due to Dr. Christina Zimmer and Dr. Ruth Werth-Brill for valuable discussions.

#### Appendix A. Supplementary data

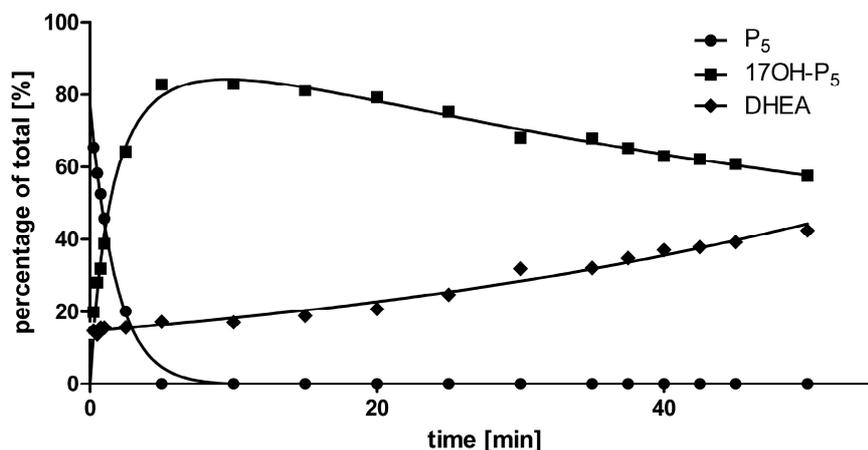
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2012.10.019>.

#### References

- [1] C. Huggins, R.E. Stevens Jr., C.V. Hodges, *Archives of Surgery* 43 (1941) 209–223.
- [2] J.S. de Bono, C.J. Logothetis, A. Molina, K. Fizazi, S. North, L. Chu, K.N. Chi, R.J. Jones, O.B. Goodman, F. Saad, J.N. Staffurth, P. Mainwaring, S. Harland, T.W. Flaig, T.E. Hutson, T. Cheng, H. Patterson, J.D. Hainsworth, C.J. Ryan, C.N. Sternberg, S.L. Ellard, A. Fléchon, M. Saleh, M. Scholz, E. Efstathiou, A. Zivi, D. Bianchini, Y. Loriot, N. Chieffo, T. Kheoh, C.M. Haqq, H.I. Scher, *New England Journal of Medicine* 364 (2011) 1995–2005.
- [3] G.A. Potter, S.E. Barrie, M. Jarman, M.G. Rowlands, *Journal of Medicinal Chemistry* 38 (1995) 2463–2471.
- [4] U.E. Hille, Q. Hu, M.A.E. Pinto-Bazurco Mendieta, M. Bartels, C.A. Vock, T. Lauterbach, R.W. Hartmann, *Comptes Rendus Chimie* 12 (2009) 1117–1126.
- [5] Q. Hu, C. Jagusch, U.E. Hille, J. Hauptenthal, R.W. Hartmann, *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (2010) 5749–5758.
- [6] Q. Hu, M. Negri, S. Olgen, R.W. Hartmann, *ChemMedChem* 5 (2010) 899–910.
- [7] Q. Hu, L. Yin, C. Jagusch, U.E. Hille, R.W. Hartmann, *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (2010) 5049–5053.
- [8] M. Yamaoka, T. Hara, T. Hitaka, T. Kaku, T. Takeuchi, J. Takahashi, S. Asahi, H. Miki, A. Tasaka, M. Kusaka, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 129 (2012) 115–128.
- [9] Q. Hu, M. Negri, K. Jahn-Hoffmann, Y. Zhuang, S. Olgen, M. Bartels, U. Müller-Vieira, T. Lauterbach, R.W. Hartmann, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16 (2008) 7715–7727.
- [10] M.A.E. Pinto-Bazurco Mendieta, M. Negri, Q. Hu, U.E. Hille, C. Jagusch, K. Jahn-Hoffmann, U. Müller-Vieira, D. Schmidt, T. Lauterbach, R.W. Hartmann, *Archiv der Pharmazie* 341 (2008) 597–609.
- [11] C. Jagusch, M. Negri, U.E. Hille, Q. Hu, M. Bartels, K. Jahn-Hoffmann, M.A.E.P.-B. Mendieta, B. Rodenwaldt, U. Müller-Vieira, D. Schmidt, T. Lauterbach, M. Recanatini, A. Cavalli, R.W. Hartmann, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16 (2008) 1992–2010.
- [12] D.C. Danila, M.J. Morris, J.S. de Bono, C.J. Ryan, S.R. Denmeade, M.R. Smith, M.E. Taplin, G.J. Bubley, T. Kheoh, C. Haqq, A. Molina, A. Anand, M. Kosciuszka, S.M. Larson, L.H. Schwartz, M. Fleisher, H.I. Scher, *Journal of Clinical Oncology* 28 (2010) 1496–1501.
- [13] P.B. Ehmer, J. Jose, R.W. Hartmann, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 75 (2000) 57–63.
- [14] T.U. Hutschenreuter, P.B. Ehmer, R.W. Hartmann, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 19 (2004) 17–32.
- [15] D.N. Grigoryev, K. Kato, V.C.O. Njar, B.J. Long, Y.-Z. Ling, X. Wang, J. Mohler, A.M.H. Brodie, *Analytical Biochemistry* 267 (1999) 319–330.

- [16] G.T. Klus, J. Nakamura, J.S. Li, Y.Z. Ling, C. Son, J.A. Kemppainen, E.M. Wilson, A.M. Brodie, *Cancer Research* 56 (1996) 4956–4964.
- [17] M.A.E. Pinto-Bazurco Mendieta, M. Negri, C. Jagusch, U. Müller-Vieira, T. Lauterbach, R.W. Hartmann, *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (2008) 5009–5018.
- [18] M. Voets, I. Antes, C. Scherer, U. Müller-Vieira, K. Biemel, C. Barassin, S. Marchais-Oberwinkler, R.W. Hartmann, *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (2005) 6632–6642.
- [19] U.E. Hille, Q. Hu, C. Vock, M. Negri, M. Bartels, U. Müller-Vieira, T. Lauterbach, R.W. Hartmann, *Eur. Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2009) 2765–2775.
- [20] L. Yin, S. Lucas, F. Maurer, U. Kazmaier, Q. Hu, R.W. Hartmann, *Journal of Medicinal Chemistry* 55 (2012) 6629–6633.
- [21] A.V. Pandey, W.L. Miller, *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005) 13265–13271.
- [22] R.J. Auchus, T.C. Lee, W.L. Miller, *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 3158–3165.
- [23] A.H. Reid, G. Attard, D.C. Danila, N.B. Oommen, D. Olmos, P.C. Fong, L.R. Molife, J. Hunt, C. Messiou, C. Parker, D. Dearnaley, J.F. Swennenhuis, L.W. Terstappen, G. Lee, T. Kheoh, A. Molina, C.J. Ryan, E. Small, H.I. Scher, J.S. de Bono, *Journal of Clinical Oncology* 28 (2010) 1489–1495.
- [24] G. Attard, A.H. Reid, R. A'Hern, C. Parker, N.B. Oommen, E. Folkard, C. Messiou, L.R. Molife, G. Maier, E. Thompson, D. Olmos, R. Sinha, G. Lee, M. Dowsett, S.B. Kaye, D. Dearnaley, T. Kheoh, A. Molina, J.S. de Bono, *Journal of Clinical Oncology* 27 (2009) 3742–3748.
- [25] A.V. Krishnan, X.-Y. Zhao, S. Swami, L. Brive, D.M. Peehl, K.R. Ely, D. Feldman, *Endocrinology* 143 (2002) 1889–1900.
- [26] C. Tian, S. Ouk, N.J. Clegg, Y. Chen, P.A. Watson, V. Arora, J. Wongvipat, P.M. Smith-Jones, D. Yoo, A. Kwon, T. Wasielewska, D. Welsbie, C.D. Chen, C.S. Higano, T.M. Beer, D.T. Hung, H.I. Scher, M.E. Jung, C.L. Sawyers, *Science* 324 (2009) 787–790.
- [27] H.I. Scher, K. Fizazi, F. Saad, M.-E. Taplin, C.N. Sternberg, M.D.K. Miller, R. de Wit, P. Mulders, K.N. Chi, N.D. Shore, A.J. Armstrong, T.W. Flaig, A. Fléchon, P. Mainwaring, M. Fleming, J.D. Hainsworth, M. Hirmand, B. Selby, L. Seely, J.S. de Bono, *New England Journal of Medicine* <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1207506>

**Supplemental Figure 1.** Incubation with  $P_5$  and time dependant production of the hydroxylase product 17OH- $P_5$  and the lyase product DHEA by CYP17A1. The curve represents the average of an experiment performed in triplicate.



The assay procedure of the new lyase assay includes a splitting of the test samples after complete conversion of  $P_5$  to 17OH- $P_5$ , a further incubation of one part of the sample whereas the other part is stopped and comparison of the DHEA amount formed in both sample parts. In order to find a suitable splitting and stopping time, the  $P_5$  conversion was monitored over time. The resulting curve is depicted in Supplemental Figure 1. Five minutes after starting the enzyme reaction the original substrate  $P_5$  is completely converted. Until then DHEA production is at a minimum level (note that the baseline DHEA level until minute 10' is due to an impurity of the substrate with the same retention time as DHEA). This indicates that the hydroxylase product 17OH- $P_5$  is released from the enzyme before further conversion by the lyase reaction and is consistent with the observation of Soucy and Luu-The [1]. Based on these results the time for splitting the samples was set to ten minutes after starting the incubation and the time for stopping all samples was set to forty minutes after the start. The DHEA production is linear with time in this frame.

[1] P. Soucy, V. Luu-The, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 3243-3247.

## **E Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn: Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen**

Zu den in diesem Kapitel vorgestellten, experimentellen Daten hat neben dem Autor niemand weiteres beigetragen.

### **E.1 Einführung**

Gammahydroxybuttersäure (GHB) ist als neuroaktive Substanz mit vielfältigem Wirkungsspektrum bekannt. Sie wird unter anderem zur Behandlung der Narkolepsie [95] eingesetzt und ist als Mittel gegen die exzessive Tagesschläfrigkeit bei der Parkinson'schen Krankheit im Gespräch [96]. Des Weiteren werden der Substanz neuroprotektive Effekte zugeschrieben. So kann GHB histologische und funktionale Schäden nach fokaler Ischämie oder exzitotoxischem Insult im Rattenmodell signifikant reduzieren [97].

Über mögliche Mechanismen dieser und anderer durch GHB vermittelter Effekte kann zurzeit nur spekuliert werden. Ein in der Diskussion stehender Aspekt ist die vermehrte Bildung von neuroaktiven Steroiden (Neurosteroiden) wie zum Beispiel Allopregnanolon (AP) oder Allotetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC) [98].

Bei mit SH-SY5Y Neuroblastomzellen durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass GHB einem durch oxidativen Stress (Behandlung mit  $H_2O_2$ ) induzierten Zelltod entgegenwirken kann. Unter anderem wurde nachgewiesen, dass durch die Behandlung mit GHB das Verhältnis der Expression des pro-apoptotischen Faktors Bax zur Expression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 verringert werden kann. Dies deutet auf eine anti-apoptotische Wirkung von GHB hin [99]. Wendt *et al.* konnten weiter zeigen, dass auch AP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen signifikanten positiven Effekt auf die Zellviabilität nach Behandlung mit  $H_2O_2$  hat. Dieser Effekt konnte durch simultane Behandlung mit AP und GHB noch verstärkt werden [100].

Auch das weibliche Sexualhormon Estradiol (E2) kann im Zellexperiment (SH-SY5Y Neuroblastomzellen) über eine Aktivierung des Estrogenrezeptors  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) eine  $\beta$ -Amyloid vermittelte Apoptose hemmen und so eine neuroprotektive Wirkung entfalten [101]. Da ein wahrscheinlich durch  $\beta$ -Amyloid hervorgerufener oxidativer Stress [87] ein Hauptmerkmal der Pathologie von Morbus Alzheimer darstellt, könnte die Steigerung der Verfügbarkeit der oben genannten Steroide E2, THDOC sowie AP und ihrer neuroprotektiven Wirkung einen möglichen Ansatz zu einer neuartigen Therapie der Alzheimer'schen Krankheit liefern.

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

Die vorliegende Arbeit soll daher beleuchten, ob die Behandlung mit GHB eine Veränderung des Steroidbiosynthesemusters in SH-SY5Y Zellen zur Folge hat und welche Enzyme bzw. Synthesewege durch die Behandlung beeinflusst werden.

## E.2 Untersuchungen zum Steroidmetabolismus unter Einbeziehung von GHB

### E.2.1 HPLC Methode

Zur Trennung und Analyse der Steroidbiosyntheseprodukte musste zunächst eine geeignete HPLC-Methode entwickelt werden. Diese wurde auf einem HPLC System, das mit einer C-18 Umkehrphasensäule und einem Flüssigszintillationsdetektorsystem ausgestattet ist, angewandt (HPLC System III: Details, siehe Abschnitt J.1.5 ). Da nicht genau vorhergesagt werden konnte, welche Produkte aus einem Vorläufersteroid wie Progesteron oder Pregnenolon entstehen würden, war eine, im Vergleich zu den üblichen im Arbeitskreis angewandten HPLC Methoden, relativ lange Methode mit einem flachen Gradienten der Ausgangspunkt zur Methodenentwicklung. Vier gut UV-detektierbare, recht nahe verwandte Steroide wurden zur Kontrolle der Trenngüte verwendet: Progesteron, 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17OH-P<sub>4</sub>), Androstendion (AD) und Testosteron (T). Die Parameter der Methode sind in Tabelle E-1 aufgeführt:

Zeit [min]	Wasser	Acetonitril
	mit 0,1% TFA [%]	mit 0,1% TFA [%]
0,0	65	35
30,0	0	100
35,0	65	35

Fluss 0,6 mL/min

Druck<sub>Start</sub> = 104 bar

Injektionsvolumen 25  $\mu$ L

**Tabelle E-1 Startbedingungen HPLC Methodenentwicklung**

Diese Methode ergab noch keine zufriedenstellende Trennung und wurde daher sukzessive verbessert. Um später die verwendeten Tritium-markierten Steroide detektieren zu können, wurde des Weiteren eine Szintillatorzumischung gewählt, die dem Zweieinhalbfachen des Lösungsmittelflusses entspricht. Als finale Methode wurde festgelegt:

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:  
 Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

Zeit [min]	Wasser	Acetonitril
	mit 0,1% TFA [%]	mit 0,1% TFA [%]
0,0	65	35
15,0	65	35
32,0	0	100
35,0	65	35

Stopp 38,0 min  
 Fluss 1,0 mL/min  
 Szintillatorfluss 2,5 mL/min  
 Druck<sub>Start</sub> = 173 bar  
 Injektionsvolumen 25 µL

Tabelle E-2 Finale HPLC Methode

### E.2.2 Inkubation mit Steroid gleichzeitige GHB Behandlung

Zunächst sollte untersucht werden, ob GHB einen schnell wirkenden Einfluss auf die Synthese von Neurosteroiden hat, der z.B. von einem allosterischen Effekt auf ein steroidogenes Enzym herrührt. Mit 500 µM wurde die gleiche GHB Konzentration gewählt, mit der in vorherigen Versuchen ein optimaler Effekt erzielt werden konnte [99]. 500 µM GHB reichten hier aus, um die Zellprotektion gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermitteltem oxidativen Stress über 48 Stunden aufrecht zu erhalten.

Das Experiment wurde mit SH-SY5Y Neuroblastomzellen im 24-well Format mit 475.000 Zellen pro Vertiefung durchgeführt. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 500 µL. Die Zellen wuchsen 48 h im Inkubationsschrank, wobei nach 24 h das Kulturmedium gegen frisches Medium ausgetauscht wurde. Nach dieser Zeit wurde ein konfluenten Zellrasen erhalten. Das Medium wurde abgesaugt und durch 450 µL frisches Medium ersetzt. Durch Zusatz von 50 µL [<sup>3</sup>H]-Steroid- und GHB-haltigem Medium wurde der Beobachtungszeitraum für den Steroid-Metabolismus gestartet. Die Endkonzentrationen im Ansatz waren 250 nM Steroid und 500 µM GHB. Kontrollen enthielten kein GHB. Das Experiment wurde mit den Steroiden P<sub>5</sub>, P<sub>4</sub> und AD durchgeführt. P<sub>5</sub> und P<sub>4</sub> wurden ausgewählt, um die Steroidogenese von einem möglichst frühen Punkt aus zu beobachten. Die Inkubation mit AD sollte die Effekte von GHB auf die letzten Biosyntheseschritte zum

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen neuroprotektiven E2 beleuchten. Die Reaktion wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Überführen des Zellüberstands in 700  $\mu$ L Ethylacetat abgestoppt. Die Mischung wurde nach 10-minütigem Schütteln 5 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde der Zellüberstand erneut mit 500  $\mu$ L Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden abgedampft, in 40  $\mu$ L Acetonitril aufgenommen und der HPLC Analyse unterzogen.

### **E.2.3 Inkubation mit Steroid**

#### **gleichzeitige GHB Behandlung und Vorbehandlung mit GHB**

In einem weiteren Ansatz sollten Langzeiteffekte einer GHB-Behandlung, wie z.B. eine erhöhte Expression und damit eine erhöhte Aktivität steroidogener Enzyme, betrachtet werden. Hierzu wurde eine Experimentreihe mit SH-SY5Y Zellen analog zu Kapitel E.2.2 durchgeführt. Nach der Zellaussaat und 24-stündigem Wachstum wurde das Kulturmedium durch GHB-haltiges Medium ersetzt (GHB Konzentration 500  $\mu$ M). Die Zellen wurden dann weitere 24 Stunden im Brutschrank gelagert. Der Teststart erfolgte wie in Kapitel E.2.2 durch Zugabe von Tritium-markiertem Steroid ( $P_4$  oder AD; 250 nM) und GHB (500  $\mu$ M). Kontrollinkubationen enthielten kein GHB. Teststopp, Extraktion und Analyse erfolgten ebenfalls analog zu Kapitel E.2.2 .

### **E.2.4 Auswertung der Ergebnisse**

Die manuell integrierten Flächen der einzelnen Peaks wurden in prozentuale Relation zur addierten Gesamtpeakfläche aller Peaks gesetzt. Die Diagrammbalken in den jeweiligen Abbildungen bilden die Mittelwerte aus mindestens 7 Werten, erhalten aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten, ab. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (S.E.M.) dar. Zur statistischen Analyse wurden der F-Test zum Vergleich zweier Streuungen und der t-Test zum Vergleich zweier Mittelwerte durchgeführt.

### **E.2.5 Ergebnisse der Inkubationen mit Steroid**

#### **gleichzeitige GHB Behandlung**

#### **E.2.5.1 Ergebnisse mit $P_5$**

In Vorversuchen zeigten die Zellen selbst nach 24-stündiger Inkubation mit  $P_5$  nur einen sehr geringen Substratumsatz (< 4 %). Als einziges Produkt wurde ein Peak bei  $t_R \sim 3,8$  min erhalten. Weiterführende Versuche mit  $P_5$  wurden daher nicht mehr durchgeführt.

### E.2.5.2 Ergebnisse mit P<sub>4</sub>

Abhängig von der Inkubationszeit wurden neben dem Substrat-Peak ( $t_R \sim 23,0$  min) 6 weitere Peaks detektiert (s. Tabelle E-3 und Abbildung E-1).

Peak	$t_R$
P I	4,14
P II	5,56
P III	21,93
P IV (P <sub>4</sub> )	23,01
P IV-A	23,38
P V	24,66
P VI	25,08
P VII	25,60

Tabelle E-3 Retentionszeiten der detektierten Peaks nach Inkubation mit P<sub>4</sub> in Minuten

#### E.2.5.2.1 6 Stunden Inkubation

Nach sechsständiger Inkubationszeit waren noch etwa 68 % des Substrats vorhanden. Produkte des P<sub>4</sub>-Abbaus waren Peak P I, Peak P III, Peak P IV, Peak P VI und Peak P VII (Retentionszeiten, s. Tabelle E-3), wobei die Peaks P I, P V und P VII mit einer Fläche von jeweils ca. 10 % der Gesamtpeakfläche die Hauptprodukte zu sein scheinen. Signifikante Unterschiede zwischen der GHB-behandelten Gruppe und den Kontrollen konnten keine festgestellt werden.

#### E.2.5.2.2 12 Stunden Inkubation

Nach zwölfständiger Inkubation waren fast 70 % des Substrats abgebaut. In den meisten Chromatogrammen konnte eine Schulter am Substratpeak erkannt werden. Diese wurde, wenn möglich, als diskreter Peak behandelt und integriert und als Peak P IV-A gekennzeichnet. Der Anteil an der Gesamtpeakfläche von Peak P V erhöhte sich im Vergleich zur sechsständigen Inkubation leicht (auf ca. 11 %), während der von Peak P VII sich leicht erniedrigte (auf ca. 6 %). Als Hauptprodukt der P<sub>4</sub>-Umsetzung konnte nun Peak P I mit 48 %igem Anteil an der Gesamtpeakfläche ausgemacht werden. Auch an diesem Zeitpunkt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der mit GHB behandelten und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

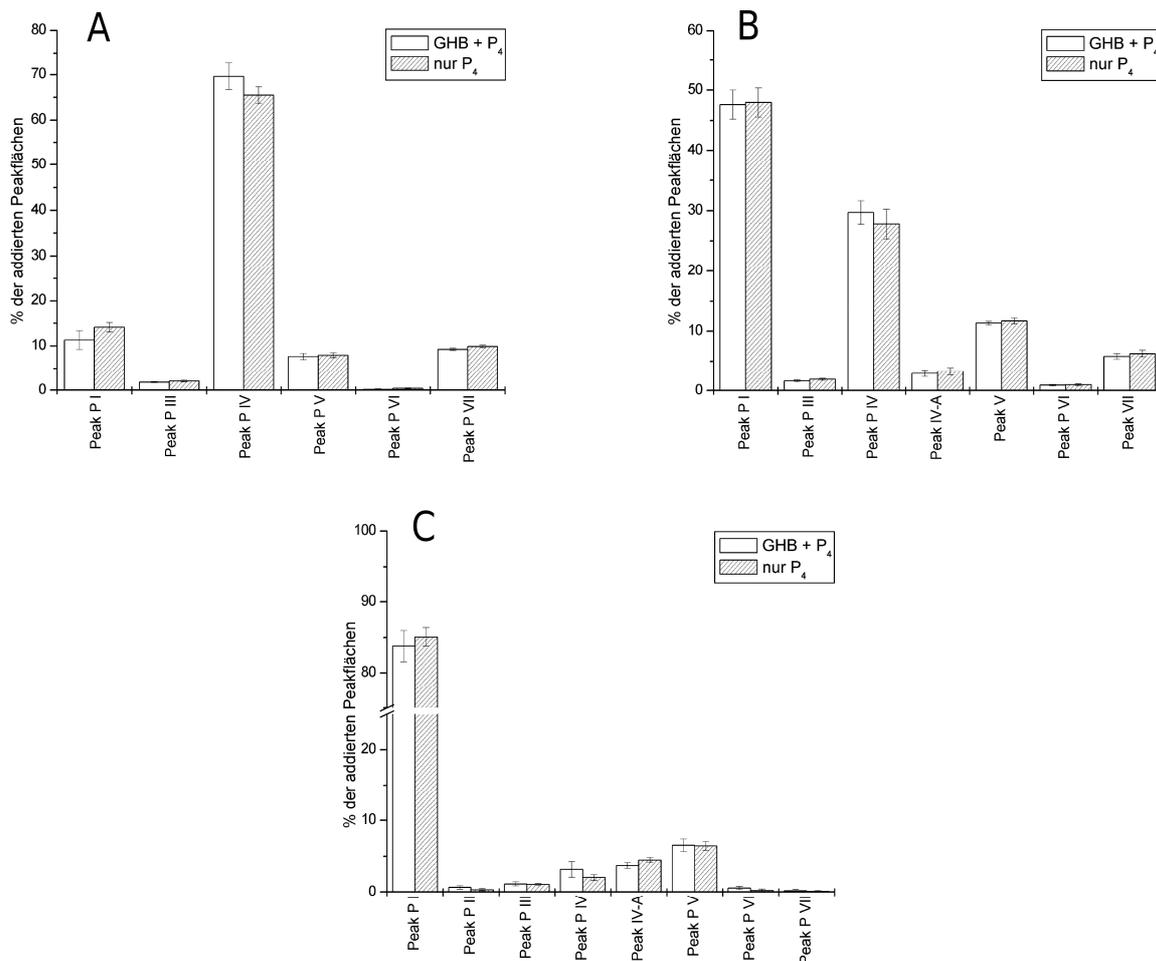
#### E.2.5.2.3 24 Stunden Inkubation

24 Stunden nach Start der Inkubation mit P<sub>4</sub> war das Substrat nahezu vollständig umgesetzt. Der Peak des Hauptproduktes (Peak P I) machte zu diesem Zeitpunkt ca. 85 % der

## Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

### Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

Gesamtpeakfläche aus. Peak P VII war in den meisten Proben nicht mehr detektierbar. Ein neues Produkt, Peak P II, konnte in etwa der Hälfte der Chromatogramme festgestellt werden. Signifikante Unterschiede zwischen GHB-behandelten und unbehandelten Proben konnten auch zu diesem Zeitpunkt nicht gezeigt werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Streuungen der Einzelwerte der Peakflächen von Peak P III und Peak P IV wahrscheinlich verschieden sind (95 % Sicherheit) und daher keine Aussage über die Unterschiede der Mittelwerte getroffen werden kann.



**Abbildung E-1** Ergebnisse der P<sub>4</sub>-Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit (weiße Balken) und ohne (schraffierte Balken) gleichzeitige GHB-Behandlung Ergebnisse nach 6 Stunden (A), 12 Stunden (B) und 24 Stunden (C)

### E.2.5.3 Ergebnisse für AD

Vorversuche zeigten einen geringeren Umsatz von AD verglichen mit P<sub>4</sub>, sodass die 6-stündige Inkubation durch eine 10-stündige ersetzt wurde. Eine 12 Stunden Inkubation wurde nicht durchgeführt. Je nach Inkubationszeit wurden bei der Inkubation mit AD neben dem

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

Substratpeak ( $t_R \sim 11,6$  min) zwei weitere Peaks erhalten. Die entsprechenden Retentionszeiten sind in Tabelle E-4 wiedergegeben.

Peak	$t_R$
Peak A I	2,02
Peak A II (AD)	11,6
Peak A III	20,3

**Tabelle E-4** Retentionszeiten der detektierten Peaks nach Inkubation mit AD in Minuten

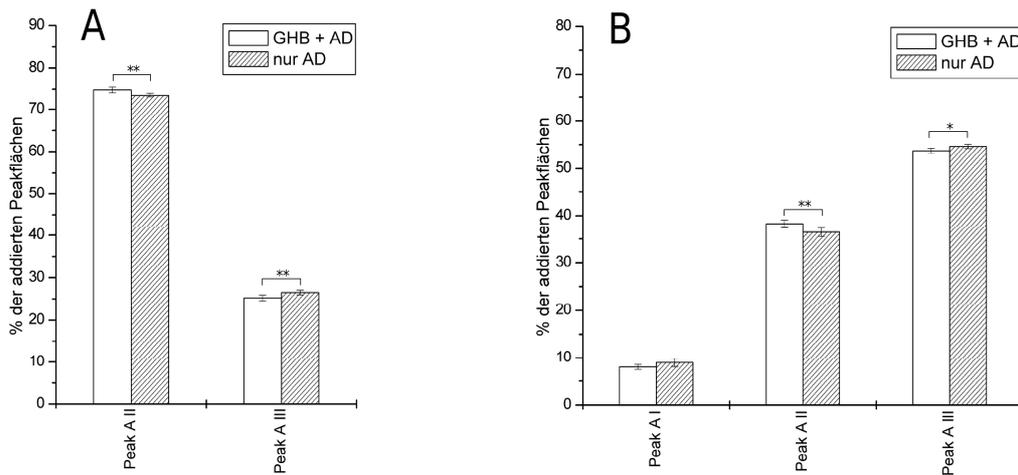
#### **E.2.5.3.1 10 Stunden Inkubation**

Während der 10-stündigen Inkubation wurden etwa 25 % des Substrates AD umgesetzt. Es entstand nur ein einziges Produkt bei einer Retentionszeit von 20,3 min (Peak A III). Die Mittelwerte der Peakflächen der beiden beobachteten Peaks unterscheiden sich signifikant (99 % Sicherheit). In den nicht mit GHB behandelten Proben wurde mehr AD umgesetzt.

#### **E.2.5.3.2 24 Stunden Inkubation**

Wie schon im  $P_4$ -Versuch beobachtet, bildete sich bei längerer Inkubationszeit ein Peak mit geringer Retentionszeit aus (Peak A I). Dieser machte nach 24 Stunden etwa 9 % der Gesamtpeakfläche aus. AD wurde zu diesem Zeitpunkt zu ca. 63 % umgesetzt. Etwa 54 % der Gesamtpeakfläche entfielen auf Peak A III. Die Mittelwerte von Peak A II unterscheiden sich dabei signifikant (99 % Sicherheit) zwischen der GHB behandelten und nicht behandelten Gruppe, während die Mittelwerte von Peak A III wahrscheinlich unterschiedlich sind (95 % Sicherheit). Für Peak A I ist kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar. Festzuhalten bleibt, wie auch nach 10-stündiger Inkubation, dass die mit GHB behandelten Zellen weniger Substratumsatz zeigten.

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:  
 Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen



**Abbildung E-2** Ergebnisse der AD-Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit (weiße Balken) und ohne (schraffierte Balken) gleichzeitige GHB-Behandlung  
 Ergebnisse nach 10 Stunden (A) und 24 Stunden (B)  
 \*: 95 % Sicherheit  
 \*\*: 99 % Sicherheit

#### E.2.5.4 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Als Ergebnis dieser Versuchsreihe lässt sich festhalten, dass es im Hinblick auf den P<sub>4</sub>-Metabolismus in SH-SY5Y Zellen keinen statistisch feststellbaren Unterschied macht, ob die Zellen während der Inkubation mit P<sub>4</sub> auch mit GHB behandelt wurden oder nicht.

Ein etwas anderes Bild ergibt sich aus der Versuchsreihe mit AD. Zu beiden beobachteten Zeitpunkten wurde in den nicht mit GHB behandelten Zellen mehr Substrat umgesetzt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind allerdings sehr gering (Fläche Peak A II: 74,8 % vs. 73,5 %; bzw. 38,3 % vs. 36,4 %).

#### E.2.6 Ergebnisse der Inkubationen mit Steroid gleichzeitige GHB Behandlung und Vorinkubation mit GHB

##### E.2.6.1 Ergebnisse mit P<sub>4</sub>

Die erhaltenen Chromatogramme dieser Experimentreihe beinhalten Peaks der gleichen Retentionszeiten wie in Tabelle E-3 angegeben.

##### E.2.6.1.1 6 Stunden Inkubation

Nach 6-stündiger Inkubation ergab sich, im Hinblick auf Substratumsatz und beobachtete Produkte, ein dem vorherigen Versuch sehr ähnliches Bild. Wichtiger Unterschied ist allerdings, dass die Mittelwerte der Fläche von Peak P III sich zwischen den beobachteten

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

Gruppen signifikant (99 % Sicherheit) unterscheiden. In Zellen, die mit GHB und P<sub>4</sub> gleichzeitig behandelt wurden, hatte Peak P III einen geringeren Anteil als in der Vergleichsgruppe.

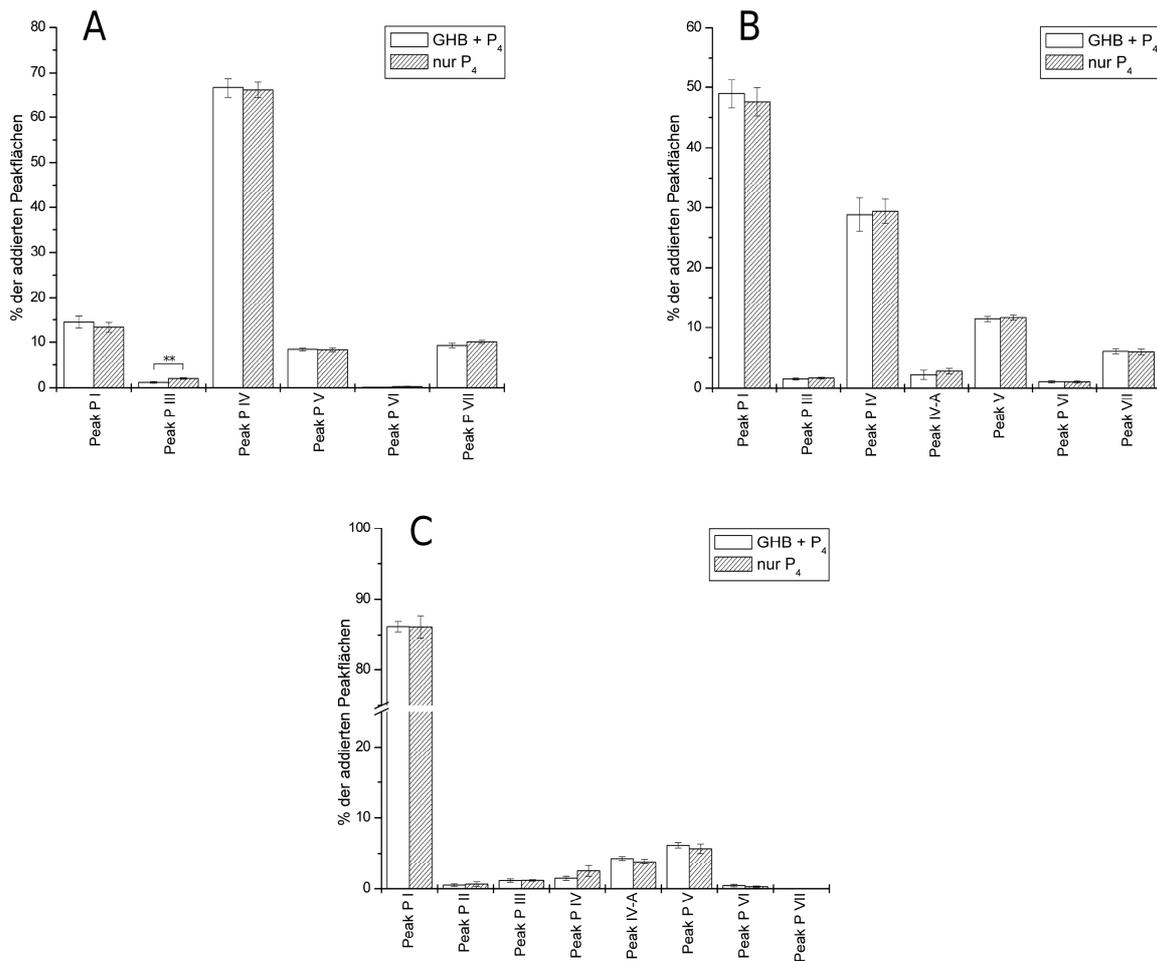
#### **E.2.6.1.2 12 Stunden Inkubation**

Auch nach 12 Stunden glich das Produktmuster der Inkubation dem des vorhergegangenen Versuchs sehr. Signifikante Unterschiede zwischen den GHB-behandelten und den nur mit P<sub>4</sub> inkubierten Proben sind nicht feststellbar. Dies gilt auch für Peak P III, für den nach 6 Stunden ein signifikanter Unterschied gezeigt werden konnte.

#### **E.2.6.1.3 24 Stunden Inkubation**

Ein dem vorhergehenden Versuch ähnliches Ergebnis wurde auch nach 24-stündiger Inkubation gefunden. Peak P VII, der im vorhergehenden Versuch nach 24 Stunden in den meisten Proben nicht mehr detektierbar war, trat allerdings in keiner Probe auf. Wie schon im vorherigen Experiment kann nicht für alle Produkte eine Aussage über die Signifikanz gemacht werden, da die Streuungen der Einzelwerte wahrscheinlich unterschiedlich sind (95 % Sicherheit). Im Einzelnen betrifft dies die Peaks P I, P III und P IV.

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:  
 Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen



**Abbildung E-3** Ergebnisse nach 24-stündiger GHB Vorbehandlung und P<sub>4</sub>-Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit (weiße Balken) und ohne (schraffierte Balken) gleichzeitige GHB-Behandlung  
 Ergebnisse nach 6 Stunden (A), 12 Stunden (B) und 24 Stunden (C)  
 \*\*: 99 % Sicherheit

**E.2.6.2 Ergebnisse mit AD**

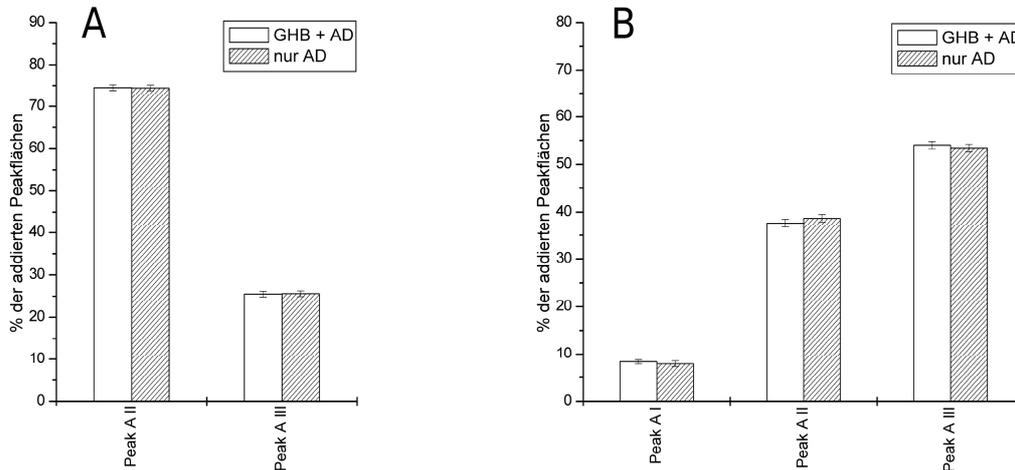
Die erhaltenen Chromatogramme dieser Experimentreihe beinhalten Peaks der gleichen Retentionszeiten wie in Tabelle E-4 angegeben.

**E.2.6.2.1 10 Stunden Inkubation**

Der AD-Umsatz war nahezu gleich wie im analogen Experiment (Kapitel E.2.5.3) beobachtet. Unterschiede zwischen den betrachteten Gruppen waren nicht zu beobachten.

### E.2.6.2.2 24 Stunden Inkubation

Auch nach 24 Stunden ähnelte der AD-Umsatz sehr dem vorherigen Versuch (E.2.5.3). Allerdings konnte bei Vorbehandlung mit GHB kein Unterschied zwischen den beiden beobachteten Gruppen gezeigt werden.



**Abbildung E-4** Ergebnisse nach 24-stündiger GHB Vorbehandlung und AD-Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit (weiße Balken) und ohne (schraffierte Balken) gleichzeitige GHB-Behandlung  
Ergebnisse nach 10 Stunden (A) und 24 Stunden (B)

### E.2.6.3 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Nach 24-stündiger Vorinkubation mit GHB waren signifikante Unterschiede zwischen beiden betrachteten Gruppen noch seltener zu beobachten als im vorherigen Versuch ohne GHB Vorinkubation. Im Falle der P<sub>4</sub>-Inkubationen ließ sich lediglich nach 6-stündiger Inkubation für Peak P III ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigen. Es wurde bei Inkubation mit P<sub>4</sub> allein geringfügig mehr dieses Produkts gebildet (1,2 % vs. 2,0 % der Gesamtpeakfläche). Dieser Unterschied verschwand allerdings bei 12- und 24-stündiger Inkubationszeit.

Bei der Versuchsreihe mit AD lässt sich, im Gegensatz zum analogen Experiment ohne Vorinkubation mit GHB (s. E.2.5.3), kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisen.

### E.2.7 Weitere Vergleiche der erhaltenen Daten

Die in den Kapiteln E.2.5 und E.2.6 gesammelten Daten wurden verwendet, um das Produktmuster von Zellen, die vom Versuchsbeginn bis zum Versuchsende mit GHB

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen behandelt wurden, und von Zellen, die während des gesamten Versuchs nicht mit GHB in Kontakt kamen, zu vergleichen.

Im Falle von P<sub>4</sub> konnten auch so keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Eine Ausnahme stellt Peak P III nach 6-stündiger Inkubation dar (s. auch E.2.6.1.1).

Aus der Analyse der aus den AD Experimenten gewonnenen Daten geht indes hervor, dass die nie mit GHB in Berührung gekommenen Zellen nach 10 Stunden einen leicht erhöhten Umsatz zeigten (26,5 % vs. 25,5 %; 95 % Sicherheit).

## **E.2.8 Identifikation der gebildeten Produkte**

### **E.2.8.1 Vergleich mit Steroidstandards**

Die Identität der bei den oben beschriebenen Inkubationen gefundenen Produkte sollte durch Vergleich der Retentionszeiten mit Referenzsteroiden bestimmt werden. Verwendet wurden Steroide, die aus P<sub>4</sub> oder AD, direkt oder über Zwischenstufen, gebildet werden können: Androstandion (5 $\alpha$ AD), T, E1, E2, 17OH-P<sub>4</sub>, DOC. Mit Ausnahme von 17OH-P<sub>4</sub> waren alle Steroide Tritium-markiert. Eine Übersicht der Retentionszeiten der zu identifizierenden Peaks und der Referenzen findet sich in Tabelle E-5. Probenpeaks, die mit Retentionszeiten von Referenzpeaks zusammenfallen, sind farblich hervorgehoben. Betrachtet man nur den Versuch mit P<sub>4</sub>, wird ersichtlich, dass die Retentionszeiten der Referenzsteroide alle zwischen den Retentionszeiten der frühen Peaks (P I und P II) und der späten Peaks (P III - P VII) des nach Inkubation mit P<sub>4</sub> gewonnenen Chromatogramms liegen. Es konnten somit keine der erwarteten Steroidprodukte von P<sub>4</sub> gefunden und identifiziert werden. In SH-SY5Y Zellen wird P<sub>4</sub> also zur Synthese von Steroiden, die abseits der klassischen Androgen-, Estrogen-, Mineralocorticoid- und Glucocorticoid-Biosynthese liegen, verwendet. Ein anderes Bild ergab sich für die Inkubation mit AD. Mit 5 $\alpha$ AD konnte das 5 $\alpha$ R-Produkt von AD nachgewiesen werden. Dennoch wurden weitere erwartete Produkte wie T und E1 nicht gebildet.

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:  
 Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

Probenpeak (t <sub>R</sub> [min])	Referenzpeak (t <sub>R</sub> [min])
Peak AD I (2,02)	
Peak P I (4,14)	
Peak P II (5,56)	
	[ <sup>3</sup> H]-T (8,24)
	[ <sup>3</sup> H]-E2 (8,51)
	[ <sup>3</sup> H]-DOC (10,33)
Peak AD II (11,6)	[ <sup>3</sup> H]-AD (11,6)
	[ <sup>3</sup> H]-E1 (12,75)
	17OH-P <sub>4</sub> (13,26)
Peak AD III (20,36)	[ <sup>3</sup> H]-5αAD (20,3)*
Peak P III (21,93)	
Peak P IV (23,01)	[ <sup>3</sup> H]-P <sub>4</sub> (22,9)
Peak P V (24,66)	
Peak P VI (25,08)	
Peak P VII (25,60)	

**Tabelle E-5** Übersicht über Proben- und Referenzpeaks

\* Die Retentionszeit von 5αAD wurde anhand einer Probe aus dem Routine 5αR-Assay, der die Umwandlung von AD in 5αAD misst, bestimmt (siehe Abschnitt J.2.3.1).

### E.2.8.2 Untersuchung einer möglichen Steroidsulfatbildung

Die kurze Verweilzeit von Peak P I auf der Umkehrphasentrennsäule (t<sub>R</sub> = 4,14 min) deutet auf einen recht hydrophilen Charakter dieses Metaboliten von P<sub>4</sub> hin. Denkbar wäre daher, dass ein von SH-SY5Y Zellen gebildeter P<sub>4</sub>-Metabolit von den gleichen Zellen durch eine Steroidsulfotransferase in ein entsprechendes, gut wasserlösliches Steroidsulfat überführt wird. Die direkte Umwandlung von P<sub>4</sub> in ein Sulfat sollte hingegen nicht möglich sein, da P<sub>4</sub> keine freie Hydroxygruppe, die Voraussetzung für die Umsetzung ist, trägt. Um der Frage nachzugehen, ob im Laufe der Inkubation mit P<sub>4</sub> ein Steroidsulfat gebildet wird, und um P I als solches zu identifizieren, werden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen soll das aus der Inkubation mit P<sub>4</sub> erhaltene Produktgemisch mit der kommerziell erhältlichen Sulfatase/Glucuronidase aus *Helix pomatia* behandelt werden, zum anderen soll versucht werden mittels der S9 Fraktion aus humaner Leber ein dem P<sub>4</sub> abgeleitetes Steroidsulfat zu

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

erhalten und durch Vergleich der Retentionszeiten zu bestätigen oder zu widerlegen, dass Peak P I ein aus P<sub>4</sub> gebildetes Steroidsulfat ist.

### E.2.8.2.1 Inkubationen mit einer Sulfatase

#### E.2.8.2.1.1 Aktivitätstest Sulfatase

Die über Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogene Sulfatase wurde zunächst auf ihre katalytische Aktivität geprüft. Laut Hersteller soll die gelieferte Charge eine Aktivität von 27.310 Units/g aufweisen. Zur Überprüfung dieses Wertes wurde ein Versuch nach der Produktinformation des Herstellers [102] durchgeführt. Der dort beschriebene Assay beruht auf der Umsetzung des im alkalischen gelben *p*-Nitrocatecholsulfats zum dunkelorange *p*-Nitrocatechol. Durch Messung der Absorption bei 515 nm nach 30-minütiger Inkubation und Abzug der Absorption einer Blank-Probe kann die Enzymaktivität nach Formel E-1 und Formel E-2 berechnet werden:

$$\text{Units / mL Enzym} = \frac{(A_{515\text{ nm}}^{\text{Test}} - A_{515\text{ nm}}^{\text{Blank}}) \times 2 \times V_{\text{total}}}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{Enzym}}}$$

**Formel E-1** Berechnung der Enzymaktivität pro mL Enzym

**2:** Zeitkorrekturfaktor

**V<sub>total</sub>:** Gesamtassayvolumen in mL

**V<sub>Enzym</sub>:** zugegebenes Volumen Enzym in mL

**ε<sub>mM</sub>:** millimolarer Absorptionskoeffizient von *p*-Nitrocatechol bei 515 nm

**Unit:** eine Unit setzt 1,0 μmol *p*-Nitrocatecholsulfat pro Stunde um (pH 5,0; 37 °C)

$$\text{Units / mg Feststoff} = \frac{\text{Units / mL Enzym}}{\text{mg Feststoff / mL Enzym}}$$

**Formel E-2** Berechnung der Enzymaktivität pro mg Feststoff

Es ergaben sich folgende Werte:

$$\text{Units / mL Enzym} = \frac{0,5827 \times 2 \times 6}{12,6 \times 0,1} = 5,5495$$

$$\text{Units / mg Feststoff} = \frac{5,5495}{0,1831} = 30,3086$$

Daraus wurde ein, dem Herstellerzertifikat entsprechender, Wert von 30.309 Units/g erhalten, der die Aktivität des Enzyms bestätigt.

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:  
Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

*E.2.8.2.1.2 Sulfatase-Experiment mit aus SH-SY5Y gewonnenem P<sub>4</sub>-Metabolitengemisch*

Zur Gewinnung des für diesen Versuch benötigten Metabolitengemisches wurden zunächst 600.000 SH-SY5Y-Zellen pro Well auf eine 12-well Platte ausgesät. Das Gesamtvolumen betrug 1000 µL. Nach 24-stündigem Wachstum wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen 24 Stunden mit 250 nM [<sup>3</sup>H]-P<sub>4</sub> inkubiert. Teststopp und Extraktion erfolgten analog zu Kapitel E.3.2.

Im Anschluss wurde der trockene Extrakt mit Sulfatase behandelt. Eine direkte Verwendung des Zellüberstandes wurde hierbei vermieden, da im Zellkulturmedium enthaltene Sulfat- und Phosphationen die Sulfatase inhibieren können [103]. Die Durchführung der Sulfatasebehandlung erfolgte in Anlehnung an das Enzymassayprotokoll des Herstellers [102]. Der Steroidextrakt wurde in 500 µL Testmischung aufgenommen. Darin enthalten waren 100 mM Natriumacetat (pH 5,0), 0,02 % (m/v) Natriumchlorid und 0,5 Units Sulfatase. Die Proben wurden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 800 µL Ethylacetat und direkt folgender Extraktion (10-minütiges Schütteln; 5-minütige Zentrifugation bei 15.000 g) gestoppt. Inkubationszeiten waren 30 Minuten, 2, 4 und 8 Stunden. Die organische Phase wurde entnommen, während die wässrige Phase ein zweites Mal mit 500 µL Ethylacetat extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden abgedampft und nach Aufnahme in 40 µL Acetonitril der HPLC Analyse unterzogen. Wie Abbildung E-5 zeigt, erfolgt keine Änderung der Fläche des als mögliches Sulfatierungsprodukt angenommenen Peaks P I über die Zeit. Auch die übrigen Peaks blieben über den Beobachtungszeitraum konstant (nicht abgebildet). Neue Peaks konnten nicht beobachtet werden. Die Sulfatase konnte also keines der Steroidprodukte umsetzen. Dies konnte durch eine Versuchswiederholung mit 10-fach höherer Enzymkonzentration bestätigt werden. Unter der Voraussetzung, dass jedes denkbare Steroidsulfat Substrat für die eingesetzte Sulfatase ist, ist das Vorliegen eines sulfatierten Steroidmetaboliten daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

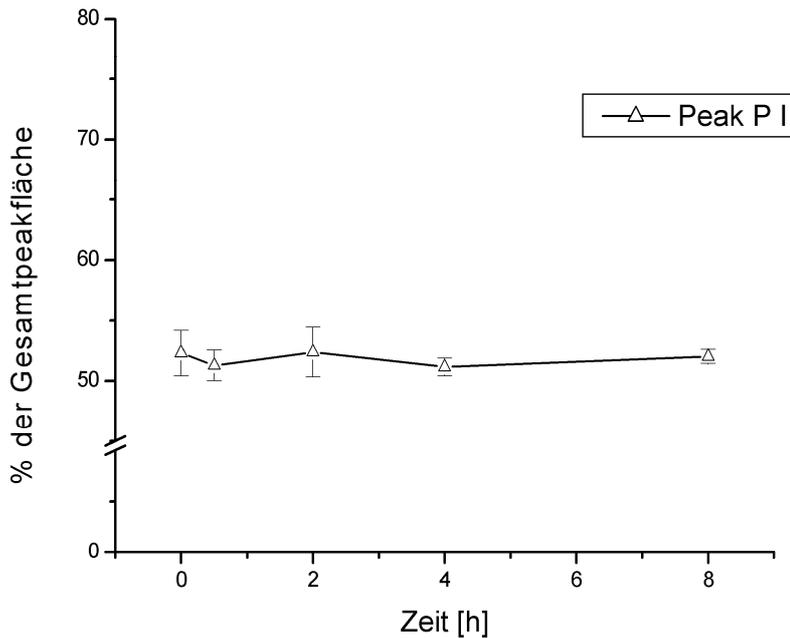


Abbildung E-5 Peak P I nach Behandlung mit Sulfatase

#### E.2.8.2.2 Inkubation von P<sub>4</sub> mit der S9 Fraktion aus humaner Leber

Steroide werden vor allem in der Leber, aber auch in ihren Zielgeweben abgebaut. Ziel des Katabolismus ist es, die Steroide in eine wasserlösliche, leicht über den Harn ausscheidbare Form zu überführen (s.a. Abschnitt A.1). Dies kann unter anderem durch Sulfatierung einer freien Hydroxygruppe des Steroids geschehen. Zur Evaluierung der metabolischen Stabilität einer chemischen Verbindung wird häufig die S9 Fraktion eines Leberhomogenats herangezogen. In dieser Fraktion finden sich sowohl Lebermikrosomen, mit ihren für den Phase I Metabolismus benötigten Enzymen (z.B. CYP Enzyme), als auch das Leberzellcytosol, das Enzyme für den Phase II Metabolismus enthält (z.B. die Sulfotransferase). Die Inkubation von P<sub>4</sub> mit S9 Fraktion aus humaner Leber eignet sich also gut zur Überprüfung, welche Abbauprodukte von P<sub>4</sub> denkbar sind. Die Retentionszeiten dieser Produkte können dann mit denen aus den SH-SY5Y Zellexperimenten verglichen werden. Ein Vorteil von Experimenten mit S9 Fraktion ist die Möglichkeit durch Zugabe oder Auslassen verschiedener Co-Faktoren zu steuern, welche Reaktionen im Inkubationsansatz ablaufen können. Durch CYP Enzyme katalysierte Phase I Reaktionen benötigen beispielsweise NADPH, Umsetzungen durch Sulfotransferase benötigen den Zusatz von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS).

Die Durchführung des Experiments erfolgte in Anlehnung an die arbeitskreisinterne SOP-017 („Testung der metabolischen Stabilität von Verbindungen mit Leber S9 Fraktionen“) in der

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

Fassung vom 01.09.2012. Eine Kurzfassung des experimentellen Vorgehens findet sich in Abschnitt J.2.3.2. Die HPLC Analyse erfolgte mit der für die SH-SY5Y Experimente entwickelten Methode.

#### *E.2.8.2.2.1 Inkubation von P<sub>4</sub> mit S9 Fraktion und PAPS*

Zunächst sollte die Annahme bestätigt werden, dass P<sub>4</sub> nicht direkt durch eine Sulfotransferase in ein Sulfat überführt werden kann. Dazu wurde der S9 Assay ohne Zugabe von NADPH regenerierendem System durchgeführt, um störende Umsetzungen durch CYP Enzyme zu unterbinden. Wie erwartet konnte auch nach 120-minütiger Inkubation im erhaltenen HPLC Chromatogramm kein Produkt gefunden werden. Ein kleiner Peak bei t<sub>R</sub>~21,8 min konnte durch Vergleich mit einem nur mit Substrat aufgenommenen Chromatogramm als Verunreinigung des Substrats identifiziert werden.

#### *E.2.8.2.2.2 Inkubation von P<sub>4</sub> mit S9 Fraktion und NADPH mit / ohne PAPS*

Eine direkte Phase II Umsetzung von P<sub>4</sub> war im vorangegangenen Experiment (E.2.8.2.2.1) nicht möglich. Der Vergleich der gebildeten Produkte einer Inkubation mit NADPH regenerierendem System und einer Inkubation mit zusätzlicher PAPS Zugabe sollte Aufschluss darüber geben, ob aus P<sub>4</sub> über ein Zwischenprodukt ein Sulfat gebildet werden kann. Sowohl nach 60- als auch nach 120-minütiger Inkubationszeit konnte in mit PAPS behandelten Proben ein deutlicher Peak bei einer niedrigen t<sub>R</sub> (~4,8 min) detektiert werden, der bei Proben, denen kein PAPS zugesetzt wurde, nicht beobachtet werden konnte. Die relative Peakfläche dieses Peaks stieg mit längerer Inkubationszeit. Der Vergleich mit der t<sub>R</sub> von Peak P I (4,14 min) zeigt allerdings, dass es sich um ein anderes Produkt handeln muss.

#### *E.2.8.2.2.3 Inkubation von P<sub>5</sub> mit S9 Fraktion und NADPH mit / ohne PAPS*

Auch P<sub>5</sub> wurde in 60-minütiger Inkubation mit S9 Fraktion behandelt. Bezüglich der Co-Faktoren wurden dabei drei verschiedene Bedingungen gewählt: Inkubation mit PAPS (nur Phase II / Sulfatierung), Inkubation mit NADPH regenerierendem System und Inkubation mit PAPS und NADPH regenerierendem System (Phase I und II). Unter diesen Bedingungen konnten aus P<sub>5</sub> diverse Produkte erhalten werden. Ein Produkt, das im Chromatogramm durch einen Peak bei t<sub>R</sub>~6,3 min detektierbar ist, konnte nur bei Inkubationen, die auch PAPS mit einschlossen, beobachtet werden. Bei der Analyse der Inkubation mit S9 Fraktion und NADPH regenerierendem System kann dieses Produkt hingegen nicht detektiert werden. Dies deutet auf eine erfolgte Sulfatierungsreaktion hin. Die Bildung eines Sulfates direkt aus P<sub>5</sub>

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:  
Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen  
scheint somit durch S9 Fraktion, im Gegensatz zur Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit P<sub>5</sub>,  
leicht möglich.

### **E.2.8.3 Zusammenfassung der Identifikation der erhaltenen Peaks**

Die Versuche zur Identifikation der aus den Experimenten mit SH-SY5Y Neuroblastomzellen erhaltenen Produkte mit den beiden beschriebenen Ansätzen – Vergleich mit Steroidstandards und Untersuchung einer möglichen Sulfatbildung – lassen drei Aussagen zu.

Das aus AD in den Zellen gebildete Hauptprodukt, Peak AD III, ist sein 5 $\alpha$ -reduziertes Derivat, 5 $\alpha$ AD.

Weiter bestätigen die Experimente mit S9 Fraktion aus humaner Leber und mit Sulfatase aus *Helix pomatia* einander in ihrer Aussage über die mögliche Identität von Peak P I. Sowohl die Tatsache, dass das Produkt aus P<sub>4</sub> im S9 Experiment mit NADPH und PAPS eine von Peak P I abweichende Retentionszeit besitzt, als auch die fehlende Umsetzung von Peak P I durch die Sulfatase, schließen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus, dass es sich bei Peak P I um ein Steroidsulfat handelt. SH-SY5Y Zellen können also aus P<sub>4</sub> kein Steroidsulfat bilden, weder direkt noch über ein Zwischenprodukt.

Im Gegensatz dazu scheint die Bildung von P<sub>5</sub>-Sulfat durch S9 Fraktion zwar leicht möglich, in SH-SY5Y Zellen findet diese Reaktion allerdings nicht statt. Eine aktive Steroidsulfotransferase fehlt also in dieser Zelllinie.

### **E.2.9 Aufklärung der Steroidbiosynthese in SH-SY5Y Zellen**

Aufgrund der erhaltenen Daten konnte gezeigt werden, dass das als neuroprotektiv angenommene E2 von der verwendeten Zelllinie SH-SY5Y weder aus P<sub>5</sub> noch aus P<sub>4</sub> noch aus AD gebildet werden konnte.

Im Folgenden soll beleuchtet werden, welche Schlüsse daraus über die Expression – oder genauer: die Aktivität – steroidogener Enzyme und Steroid metabolisierender Enzyme in der verwendeten Zelllinie gezogen werden können.

#### **E.2.9.1 3 $\beta$ -HSD/ $\Delta_5$ I**

Diese Hydroxysteroiddehydrogenase katalysiert durch Oxidation der 3 $\beta$ -Hydroxygruppe und gleichzeitige Umlagerung der  $\Delta_5$ -Doppelbindung zur  $\Delta_4$ -Doppelbindung die Umsetzungen von P<sub>5</sub> zu P<sub>4</sub>, von 17OH-P<sub>5</sub> zu 17OH-P<sub>4</sub> und von DHEA zu AD. Da P<sub>5</sub> in den durchgeführten Versuchen nicht in ein identifizierbares Produkt umgewandelt wurde, ist davon auszugehen, dass das Enzym nicht katalytisch aktiv war.

#### **E.2.9.2 CYP17A1**

Da aus P<sub>5</sub> und P<sub>4</sub> weder Δ<sub>5</sub>- noch Δ<sub>4</sub>-Produkte von CYP17A1 (17OH-P<sub>5</sub> und DHEA bzw. 17OH-P<sub>4</sub> und AD) gebildet wurden, kann die Anwesenheit von katalytisch aktivem CYP17A1 ausgeschlossen werden.

#### **E.2.9.3 CYP19 (Aromatase)**

Nach Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit AD konnte weder E2 noch E1 gefunden werden. Aromatisierung von AD fand also nicht statt, auch CYP19 war also nicht aktiv.

#### **E.2.9.4 17β-HSD1 (oder eine andere reduzierende 17β-HSD)**

Da in keinem Versuchsansatz T gefunden werden konnte, ist davon auszugehen, dass keine AD reduzierende 17β-HSD (z.B. 1, 3 oder 5) in SH-SY5Y Zellen aktiv ist.

#### **E.2.9.5 5αR**

Das einzige, durch die vorangegangenen Versuche, nachweisbar aktive steroidogene Enzym in SH-SY5Y Neuroblastomzellen ist die 5α-Reduktase. Die Inkubationen mit AD zeigen Umsatz zu 5αAD. Die Anwesenheit der 5αR ist zwar nicht Voraussetzung zur Biosynthese von E2, wohl aber zur Biosynthese von Dihydroprogesteron, dem direkten Vorläufer des neuroaktiven Steroids AP. Die Synthese von AP ausgehend von P<sub>4</sub> ist also denkbar. Da AP mit der zur Verfügung stehenden Analytik nicht erfasst werden konnte ([<sup>3</sup>H]-AP war nicht käuflich erwerblich), konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob AP in SH-SY5Y Zellen gebildet wurde.

#### **E.2.9.6 Steroidsulfotransferase**

Eine Aktivität dieses metabolisierenden Enzyms kann durch fehlende Umsetzung von P<sub>5</sub> zum korrespondierenden Sulfat praktisch ausgeschlossen werden.

### **E.3 Bewertung und Vergleich mit der Literatur**

Dieses Kapitel der vorliegenden Arbeit behandelt die nähere Erforschung des Steroidstoffwechsels in der betrachteten Zelllinie SH-SY5Y. Eine Vielzahl von an der Steroidogenese beteiligten Enzymen wurde betrachtet. Durch Inkubation mit verschiedenen Steroiden als Substrat konnte die katalytische Inaktivität vieler dieser Enzyme in der vorliegenden Zelllinie gezeigt werden. Ebenso wurde die 5αR als in der Zelllinie aktives Enzym erkannt. Weiter wurde ein steroidhaltiger Extrakt des Zellüberstandes auf die Bildung von Steroidsulfaten untersucht.

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:

Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen

Als Alternative zu dieser Vorgehensweise hätte sich die Durchführung von PCR Experimenten zum Nachweis der mRNA der betreffenden Enzyme angeboten. Das Vorliegen der mRNA eines Enzyms in der Zelle gibt allerdings keine Auskunft über eine erfolgte Translation in ein aktives Enzym. Zur Erforschung des möglichen Einflusses von GHB auf die steroidogenen Enzyme wurde das hier verwendete Verfahren demnach als deutlich geeigneter eingeschätzt.

Die Bildung von E2 durch die verwendete Zelllinie und die Aktivität der dazu in Frage kommenden Enzyme konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Dies steht im Widerspruch zu zuvor veröffentlichter Literatur [104]. Hier wurde der Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die E2 Synthese in SH-SY5Y Zellen untersucht, wobei [<sup>3</sup>H]-P<sub>5</sub> als Substrat verwendet wurde. Obwohl in der hier vorliegenden Arbeit ähnliche Kulturbedingungen gewählt und mehrere Chargen der Zelllinie einbezogen wurden, konnten weder E2 noch entsprechende Zwischenprodukte im Zellüberstand gefunden werden. Um diese Diskrepanz zu deuten, muss beachtet werden, dass Zellkulturen als sehr komplexe biologische Systeme anzusehen sind. Damit sind sie sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen und Kulturbedingungen. Änderungen dieser Rahmenbedingungen können im Laufe der Kultur Änderungen in Morphologie, Proteom und Metabolom nach sich ziehen. Für SH-SY5Y Zellen im Speziellen ist beschrieben, dass die Zelldifferenzierung mit Vitamin-A-Säure oder 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetat sowohl die Morphologie der Zellen als auch die Aktivität von steroidogenen Enzymen beeinflussen kann [105]. Ein unterschiedlicher Differenzierungsstatus ist eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich mit der Literatur.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Aktivität des Enzyms 5 $\alpha$ R, das bei der Bildung des Neurosteroids AP eine wichtige Rolle spielt, weist auf die Möglichkeit der Bildung von Neurosteroiden in der verwendeten Zelllinie hin. Abseits dieser Feststellung stellt sich die beobachtete Steroidbiosynthese jedoch anders als ursprünglich erwartet dar. So wird P<sub>4</sub> nicht als Substrat für die klassische Androgen-, Estrogen-, Mineralocorticoid- und Glucocorticoid-Synthese verwendet. Ebenso entstanden aus AD letztlich nicht die erwarteten Produkte T und E1. Ferner fand keine Bildung von sulfatierten Steroidmetaboliten statt.

Trotz erfolgreicher Durchführung der Versuche konnte kein deutlicher Einfluss von GHB auf die Steroidogenese nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen folglich gegen die These einer erhöhten Bildung von (Neuro-)Steroiden durch Behandlung der Zellen mit GHB. Die Grundlagen der in der Literatur beschriebenen neuroprotektiven Effekte von

Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn:  
Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen  
GHB [99] sind also an anderer Stelle des hochkomplexen Systems der Zellregulation zu  
suchen.

## F Diskussion

### F.1 Biologische Evaluation neuartiger Inhibitoren der humanen 5 $\alpha$ -Reduktase Typ I und II

Im Rahmen dieser Dissertation wurden etwa 40 neue Verbindungen auf ihre Hemmpotenz gegenüber der humanen 5 $\alpha$ -Reduktase Typ I und II untersucht. Ziel war es, Hemmstoffe unter den Verbindungen zu identifizieren, die bereits bekannte Hemmstoffe in ihrer Hemmpotenz übertreffen, um so zu einer Weiterentwicklung der 5 $\alpha$ R-Hemmstoffe beizutragen. Ebenso sollte gezeigt werden, ob auch die Verbindungen aus der Gruppe der 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstane, die sich stärker als die übrigen Hemmstoffe von den körpereigenen Steroiden unterscheiden, potente Hemmstoffe der humanen 5 $\alpha$ RI und 5 $\alpha$ RII sind.

Die Ergebnisse aus den biologischen Assays zeigen, dass weder der bereits etablierte Wirkstoff Finasterid noch die Verbindungen der Vorgängerstudie durch die getesteten neuen Verbindungen in Bezug auf Hemmaktivität übertroffen werden konnten (vgl. Tabelle F-1).

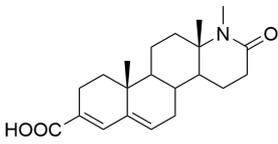
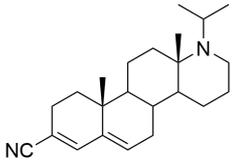
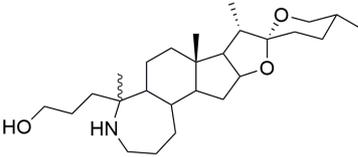
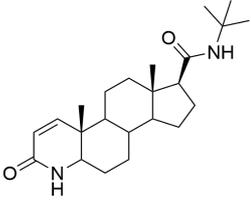
Verb.	Hemmung 5 $\alpha$ RI	Hemmung 5 $\alpha$ RII
<b>V21 [91]</b> 	< 20 % bei 10 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> 54,1 $\pm$ 9,5 nM
<b>K29 (neu)</b> 	< 20 % bei 10 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> 860 $\pm$ 20 nM
<b>K38 (neu)</b> 	< 20 % bei 10 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> 470 $\pm$ 42 nM
<b>Finasterid [91]</b> 	IC <sub>50</sub> 453 nM	IC <sub>50</sub> 30,3 nM

Tabelle F-1 Vergleich von 5 $\alpha$ R-Hemmstoffen verschiedener Klassen

Dennoch konnten anhand der Hemmprofile der neuen Verbindungen wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden, die Aufschluss über den durch Inhibitoren besetzbaren Raum und von der 5 $\alpha$ -Reduktase akzeptierte Strukturmerkmale geben, und die für die weitere 5 $\alpha$ R-Hemmstoffentwicklung genutzt werden können.

So ist die 17-Oxogruppe der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androst-3,5-dien-17-one der Vorgängerstudie wichtiges Strukturmerkmal für eine 5 $\alpha$ R-Hemmung, da ihr Wegfallen in der Serie der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androstene zu teils dramatischem Verlust der Hemmstoffaktivität führt. Weiter konnte festgestellt werden, dass die 17-Oxogruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor nicht durch die 16,17 $\alpha$ -Dionstruktur der 17-Aza-17 $\alpha$ -homo-androsten-16,17 $\alpha$ -dione ersetzt werden kann, da diese Verbindungen in den meisten Fällen schwächere 5 $\alpha$ R-Hemmstoffe darstellen als die analogen Verbindungen der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androst-3,5-dien-17-on-Gruppe.

Eine weitere interessante Erkenntnis aus der vorliegenden Arbeit ist, dass sich die 3-Carboxy- und die 3-Cyanoverbindungen der neuen 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androstene in Bezug auf die 5 $\alpha$ R-II-Hemmpotenz den 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androst-3,5-dien-17-onen entgegengerichtet verhalten. Waren die 3-Cyanoverbindungen in der Vorgängerstudie noch deutlich schwächere Hemmstoffe als die Verbindungen mit 3-Carboxygruppe, übertreffen die Carbonitrile der 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androsten-Reihe die entsprechenden Carbonsäuren teils sehr deutlich. Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass die neuen 17 $\alpha$ -Aza-17 $\alpha$ -homo-androstene einen anderen Bindungsmodus in der Bindetasche des Enzyms einnehmen als die alten Verbindungen. Von letztgenannten wird vermutet, dass sie einen ternären Komplex mit Enzym und Cofaktor ausbilden, wie durch Teil 2.) der Designrationale der Verbindungen (s. Abschnitt C.1.2 ) beschrieben. Die Ausbildung eines solchen Komplexes durch die 3-Cyanogruppe ist als eher unwahrscheinlich zu werten. Die Enzyymbindung nach Vorbild des „inverted inhibitor“ ist dagegen für diese Verbindungen als wahrscheinlicher zu betrachten. An diesen Beispielen kann anschaulich gezeigt werden, dass beide Designansätze für sich betrachtet zielführend sein können. Jedoch ist nach den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit kritisch zu hinterfragen, ob es sinnvoll ist, beide Ansätze bei einer einzelnen Verbindung zu verfolgen, da ein einzelner Hemmstoff nicht beide Prinzipien in sich vereinen kann. Wenn bei einem Hemmstoff mit 3-Carboxygruppe der A-Ring der Verbindung die gleiche Position wie der A-Ring des Steroidsubstrats einnehmen muss, kann diese Verbindung kein „inverted inhibitor“ sein, da in diesem Fall der D-Ring des Hemmstoffs ebenfalls die Position des A-Rings des Substrats einnehmen müsste.

Da die neu vorgestellten Hemmstoffe der 5 $\alpha$ RII aufgrund ihrer Unterlegenheit bezüglich der Hemmpotenz gegenüber dem etablierten Arzneistoff Finasterid in ihrer jetzigen Form nicht über das präklinische Stadium hinauskommen werden, besteht ein weiterer Gewinn aus dieser Arbeit in der Identifizierung von Strukturen, die als Basis für neue Hemmstoffserien (s. Abbildung F-1) dienen könnten. Hier sei vor allem Verbindung **K1** hervorgehoben, da dieser 5 $\alpha$ RII-Hemmstoff sowohl ein relativ potenter 5 $\alpha$ RII-Hemmstoff als auch selektiv gegenüber der 5 $\alpha$ RI ist. Die Einführung verschiedener Substituenten am 17a-Stickstoff verspricht den Erhalt interessanter Verbindungen. Weiter bietet auch **K38**, die aktivste hier vorgestellte Verbindung, zahlreiche Optionen zur Modifikation und weiteren Verbesserung der Hemmpotenz (s. Abbildung F-1, unten). In einem späteren Schritt könnte auch eine Trennung der beiden Enantiomere eine gute, wenn auch aufwendige, Möglichkeit zur weiteren Steigerung der Aktivität darstellen.

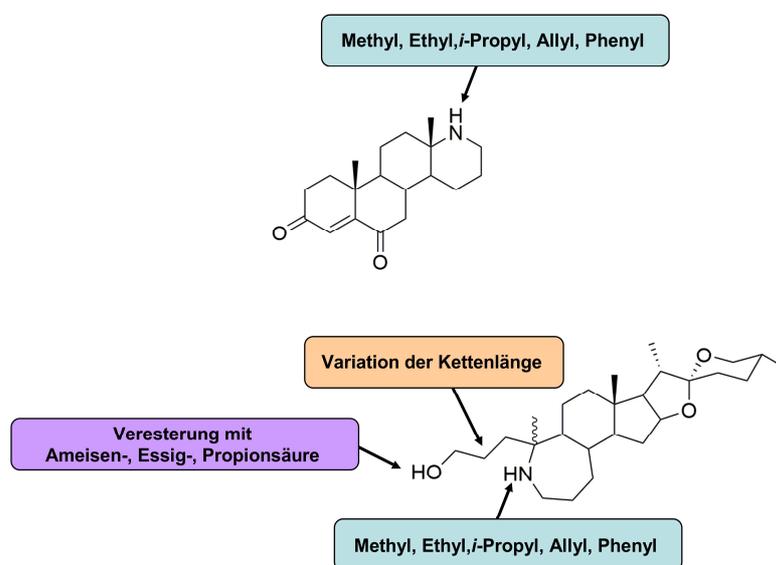


Abbildung F-1 Vorschläge zur möglichen Weiterentwicklung der Verbindungen **K1** (oben) und **K38** (unten)

Ein weiterer Vorteil einiger der neuen Verbindungen und ihrer möglichen Weiterentwicklungen liegt in deren Struktur. Aufgrund seines steroidalen Aufbaus birgt Finasterid eher die Gefahr durch Bindung an Steroidrezeptoren unerwünschte Steroid-Wirkungen zu vermitteln als das strukturell völlig anders beschaffene 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstan-Derivat **K38**. Obwohl Finasterid beispielsweise bei Bindung an den T877A mutierten AR im Zellexperiment antiandrogene Wirkung zeigt [106], ist dennoch nicht auszuschließen, dass der Hemmstoff an anderen AR-Varianten agonistische Eigenschaften hat. Eine androgene Wirkung am AR würde den Einsatz als Androgensynthese-Hemmstoff

bei PCa freilich verbieten. Dieser Nachteil könnte mit Verbindungen aus der 5-Aza-des-A-7 $\alpha$ -homo-androstan-Klasse vermieden werden.

In Hinblick darauf, dass viele der neu vorgestellten Verbindungen in der Lage sind, die 5 $\alpha$ RII und in sehr geringem Maße auch die 5 $\alpha$ RI zu hemmen, wäre es im Nachgang zu dieser Dissertation zudem interessant, auch die inhibitorische Potenz dieser neuen Hemmstoffe gegenüber dem relativ neu beschriebenen Typ III der 5 $\alpha$ R zu evaluieren. Um dem nachzugehen, ist die Etablierung eines neuen biologischen Assays im Arbeitskreis erforderlich. Der dazu nötige Aufwand könnte sich allerdings als sehr lohnend herausstellen, da nicht unwahrscheinlich ist, dass sich unter den hier beschriebenen 5 $\alpha$ RI- und 5 $\alpha$ RII-Hemmstoffen auch Hemmstoffe der 5 $\alpha$ R Typ III finden. Die Inhibitoren könnten sich sogar als potentere Hemmstoffe des Typ III als der Typen I und II herausstellen. Dieser Umstand konnte für den Inhibitor Dutasterid bereits gezeigt werden. Der Arzneistoff hemmt Typ III etwa 25-fach stärker als Typ I und sogar über 150-fach stärker als Typ II [107] und könnte somit gar als selektiver 5 $\alpha$ R Typ III-Hemmstoff bezeichnet werden. Da gezeigt wurde, dass die 5 $\alpha$ R Typ III sowohl in gesunder Prostata als auch in BPH-Gewebe [107] und PCa- bzw. CRPC-Zelllinien [25] zu einem hohen Grad exprimiert ist, könnten neue 5 $\alpha$ R Typ III-Hemmstoffe zukünftig einen wertvollen Beitrag zur Therapie von BPS und möglicherweise auch von fortgeschrittenem Prostatakrebs leisten.

## **F.2 Entwicklung eines CYP17A1 C<sub>17,20</sub>-Lyase-Assays und biologische Evaluierung einer Substanzbibliothek**

Zur Erfüllung der in dieser Dissertation definierten Ziele, wurde ein neuer biologischer C<sub>17,20</sub>-Lyase-Assay entwickelt, der es ermöglicht, gemeinsam mit einer leicht modifizierten Variante des bereits etablierten 17 $\alpha$ -Hydroxylase-Assays, die beiden katalytischen Reaktionen von CYP17A1 getrennt zu betrachten. Dies eröffnet der Arbeitsgruppe Hartmann und anderen Arbeitsgruppen die Möglichkeit, potentielle CYP17A1-Hemmstoffe auf einer zusätzlichen Ebene biologisch zu evaluieren und Wirkstoffkandidaten zu finden, die bereits bekannten Inhibitoren wie Abirateron überlegen sind. Hierbei ist besonders eine hohe Potenz zur C<sub>17,20</sub>-Lyase-Hemmung bei gleichzeitiger Selektivität gegenüber der 17 $\alpha$ -Hydroxylase von Interesse.

Der neu entwickelte Assay hat dabei eine Reihe von Vorteilen. Auf der einen Seite sind hier ökonomische Gesichtspunkte, die gerade im universitären Umfeld von Bedeutung sind, zu nennen. So ist der Assay kostengünstig, da die gleiche Enzymquelle sowie die gleichen Puffer und Lösungen wie in dem bereits etablierten CYP17A1-Assay verwendet werden. Von beiden begrenzt haltbaren Materialien lohnt es sich nun, größere Chargen und Ansätze herzustellen.

Da beispielsweise die Herstellung der Enzympräparation aus induzierten *E. coli* Bakterien bis zu einem gewissen Grad mengenunabhängig knapp einen Arbeitstag in Anspruch nimmt, kann somit wertvolle Laborzeit eingespart werden. Weiter kann nun sowohl für den Hydroxylase- als auch den Lyase-Assay das gleiche Substrat ( $[^3\text{H}]\text{-P}_5$ ) verwendet werden, was die Bevorratung mit größeren und damit kostengünstiger zu beschaffenden Mengen an radioaktiv markiertem Substrat erlaubt. Ebenso kann auf das schwierig zu beschaffende, an geeigneten Kohlenstoffatomen mit Tritium markierte,  $17\text{OH-P}_5$  als Substrat verzichtet werden. Die dem Hydroxylase-Assay ähnliche Durchführungsweise ermöglicht ferner die schnellere Einarbeitung von neuen Laboranten und Doktoranden.

Auf der anderen Seite, abseits der rein praktischen und ökonomischen Aspekte, hat der hier vorgestellte Assay weitere Vorteile gegenüber anderen in der Literatur beschriebenen Lyase-Assays. Beispielsweise stellt er besser als andere Assays, in denen  $17\text{OH-P}_5$  als Substrat verwendet wird [108, 109], die natürliche Situation dar, in der  $\text{P}_5$  zunächst durch CYP17A1 in  $17\text{OH-P}_5$  umgewandelt werden muss. In der Literatur herrscht keine Einigkeit darüber, ob  $17\text{OH-P}_5$  die Substratbindestelle vor Umsatz zu DHEA erst verlässt und dann wieder besetzt [110] oder ob das Substrat nach  $17\alpha$ -Hydroxylierung, ohne die Bindung vom Enzym wieder zu lösen, direkt der Lyase-Reaktion unterworfen wird [111]. Die Ergebnisse im Rahmen der Entwicklung des neuen Lyase-Assays sprechen allerdings deutlich für die erstgenannte These, da die Bildung von DHEA erst beginnt, wenn das Substrat  $\text{P}_5$  nahezu aufgebraucht ist (s.a. *Supplementary Data*, Teil D). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die natürliche Situation durch den neuen Assay widerspiegelt wird.

Bedeutend ist außerdem, dass die benötigte Enzympräparation in beliebiger Menge hergestellt werden kann und keine Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von humanem Testeshomogenat wie in anderen Testmethoden [59] besteht. Durch die Abwesenheit anderer CYP-Enzyme in unserer Enzympräparation werden des Weiteren keine Nebenreaktion beobachtet und die Auswertung ist dadurch deutlich einfacher als bei anderen Assaymethoden, bei denen auch CYP17A1-nachgelagerte Reaktionen und deren Produkte für die Auswertung berücksichtigt werden müssen [59, 108, 112].

Anwender des neuen Lyase-Assays müssen sich allerdings darüber bewusst sein, dass der Vorteil eines leicht und sicher verfügbaren Enzyms aus bakterieller Quelle mit dem Fehlen möglicher posttranslationaler Modifikationen einhergeht. Es ist denkbar, dass die Expression von humanem CYP17A1 durch die prokaryotische Zelle zu einer veränderten Enzymaktivität im Vergleich zur Expression durch eine eukaryotische Zelle führt, da Bakterien (Prokaryoten) nicht in gleichem Maße zu posttranslationalen Modifikationen befähigt sind wie Eukaryoten.

Phosphorylierung ist die einzige als bedeutsam erkannte posttranslationale Modifikation von CYP17A1. Es wird davon ausgegangen, dass Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threonin-Seitenketten die Interaktion von CYP17A1 mit der NADPH-P450 Reduktase verstärkt [113] und somit die Geschwindigkeit der Enzymreaktion [114] erhöht. Da jedoch die Bindung eines Liganden im aktiven Zentrum des Enzyms durch die Modifikation aller Wahrscheinlichkeit nach unbeeinflusst bleibt, spielt dieser Umstand für die Bewertung der Hemmpotenz von Inhibitoren durch unseren Assay keine Rolle. Dennoch könnte der Assay für andere Einsatzgebiete als den bei der Entwicklung vorgesehenen Zweck, nämlich Hemmstoffbewertung nach Potenz und Selektivität, nur begrenzt einsetzbar sein. So sollte beispielsweise für enzymkinetische Untersuchungen eine andere Enzymquelle gewählt werden.

Die neu erhaltenen Möglichkeiten zur Bewertung der inhibitorischen Potenz von Substanzen gegen die C<sub>17,20</sub>-Lyase und der Selektivität gegenüber der 17 $\alpha$ -Hydroxylase wurden eingesetzt, um zwanzig ausgewählte Verbindungen aus der Substanzbibliothek des Arbeitskreises Hartmann zu testen. In das Hemmstoff-Screening wurden, neben ABT als Referenzsubstanz, Verbindungen einbezogen, die bereits durch die alte CYP17A1-Testmethode als 17 $\alpha$ -Hydroxylase Hemmstoffe identifiziert wurden. Zusätzlich wurden auch Hemmstoffe aus anderen CYP-Projekten (z.B. CYP11B1 Hemmstoffe) ausgewählt, da auch diese Verbindungen durchaus das Potential haben, selektive Lyase-Hemmstoffe zu sein.

Anhand der aus dem Screening erhaltenen Daten konnte die Eignung der neuen Assaymethode durch zwei wichtige Beobachtungen belegt werden:

1. Für die getesteten Verbindungen wurden unterschiedliche Selektivitätsfaktoren ( $SF = IC_{50}(\text{Hydroxylase}) / IC_{50}(\text{Lyase})$ ) ermittelt. So wurden sowohl Inhibitoren, die eher die Lyase hemmen, als auch Inhibitoren, die eher die Hydroxylase hemmen, gefunden. Dies zeigt zum einen, dass der neue Lyase Assay zur Suche nach selektiven Lyase-Hemmstoffen genutzt werden kann. Zum anderen konnte hierdurch bestätigt werden, dass es möglich ist, selektiv nur eine Reaktion des bifunktionalen Enzyms CYP17A1 zu hemmen.
2. Die biologische Evaluierung des bereits zugelassenen Wirkstoffs Abirateron hat ergeben, dass er die Hydroxylase-Reaktion mit fast 10-fach höherer Potenz hemmt als die Lyase-Reaktion. Somit spiegeln die im biologischen Assay erhaltenen Ergebnisse auch die Ergebnisse klinischer Studien wider, in denen durch starke Hemmung der Hydroxylase-Reaktion ein sekundärer Mineralocorticoidüberschuss in Patienten nach Behandlung mit ABT festgestellt wurde [45, 52].

Die Ergebnisse der biologischen Testung auf Hydroxylase- und Lyase-Hemmung sind für die interessantesten Verbindungen in „Table 1“ in Teil D wiedergegeben.

Mit Verbindung **3** konnte eine, dem Wirkstoff Abirateron in Hemmpotenz und Hydroxylase-Selektivität nahezu ebenbürtige, Substanz identifiziert werden. Obwohl das Ziel der Arbeit im Auffinden von selektiven Lyase-Hemmstoffen bestand, ist die Verbindung wegen ihrer nicht-steroidalen Struktur dennoch interessant.

Selektive Lyase-Hemmstoffe sind hingegen die Verbindungen **1**, **2**, **4** und **5**. Verbindung **2** ist zwar ein deutlich selektiver Lyase-Hemmstoff (SF 8), scheint allerdings aufgrund der, im Vergleich zu den anderen Verbindungen, niedrigen Ligandeneffizienz für die Weiterentwicklung eher ungeeignet. Anders die Verbindungen **1**, **4** und **5**, die mit  $IC_{50}$  (Lyase)-Werten von etwa 25 - 40 nM sehr potente Hemmstoffe darstellen. Während **1** und **5** jedoch mit einem SF von lediglich 2 Lyase-Hemmstoffe mit nur sehr schwach ausgeprägter Selektivität sind, weist Verbindung **4** mit einem SF von 15 und einer mit ABT vergleichbaren Lyase-Hemmpotenz ( $IC_{50}$  23,5 nM (**4**) vs. 15,3 nM (ABT)) das gewünschte Profil auf.

Verbindung **4** wäre folglich ein guter Startpunkt für die Entwicklung noch potenterer und selektiverer Lyase-Hemmstoffe. Da die Verbindung ursprünglich als CYP11B1-Inhibitor entwickelte wurde, muss bei einer weiteren Optimierung in Richtung selektiver Lyase-Hemmstoffe auch die Selektivität gegenüber anderen CYP-Enzymen betrachtet werden. Verbindung **4** ist ein hochpotenter CYP11B1-Hemmstoff und hemmt auch CYP11B2 in beträchtlichem Maße [115]. Dieser scheinbare Nachteil im Hinblick auf CYP17A1-Selektivität kann allerdings für gewisse PCa-Patienten ein deutlicher Vorteil sein. Kommt es bei fortschreitender Erkrankung zu bestimmten Mutationen des AR, können diese dazu führen, dass der Rezeptor ein breiteres Spektrum von Liganden als Agonisten akzeptiert und auch durch Cortisol aktiviert werden kann [116]. In diesem speziellen Fall wäre die Verfügbarkeit eines dualen CYP17A1/CYP11B1-Hemmstoffs von großem Nutzen, um zusätzlich zur Androgenbiosynthese auch die Cortisolbiosynthese zu hemmen und dem betroffenen Patientenkollektiv eine möglichst individuelle Therapie anbieten zu können [73]. In den meisten Fällen wird jedoch eine duale Hemmung von CYP17A1 und CYP11B1 bei der späteren Anwendung am Patienten unerwünscht sein, sodass die Struktur der Verbindung dahingehend optimiert werden muss, dass die Hemmpotenz gegenüber CYP11B1 so weitgehend wie möglich verringert wird.

Die Selektivität gegenüber anderen steroidogenen CYP-Enzymen wurde bei der ursprünglichen Entwicklung von Verbindung **4** bereits berücksichtigt. So zeigt sie gegenüber

der humanen Aromatase (CYP19) eine etwa 100-fache Selektivität [115]. Die Angaben zur Selektivität gegenüber CYP17A1 in derselben Literaturquelle müssen allerdings mit Bedacht interpretiert werden. Hier wurde nach dem alten Testverfahren mit einem anderen CYP17A1-Substrat und zusätzlich mit deutlich höherer Substratkonzentration gearbeitet.

Abschließend lässt sich sagen, dass die in diesem Teil der Dissertation gesetzten Ziele erfüllt wurden. Ein neues Assay-System zur Bestimmung von Hemmstoff-Selektivitäten zwischen Lyase- und Hydroxylase-Hemmung wurde erfolgreich etabliert. Mit diesem Werkzeug konnten interessante, selektive Lyase-Inhibitoren identifiziert und auf Eignung zur Weiterentwicklung zu neuen Wirkstoffen gegen Prostatakrebs diskutiert werden. Die potenten nicht-steroidalen Hemmstoffe aus dem Arbeitskreis Hartmann können somit in Zukunft noch weiter verbessert werden, um dann mit der Eigenschaft einer selektiven Lyase-Hemmung ein Merkmal tragen, das von seinem Nutzen her weit über das bloße Steigern der Hemmpotenz hinausgeht. Zusammen mit der nicht-steroidalen Struktur wäre somit ein echter Vorteil gegenüber dem bereits in der Behandlung von CRPC eingesetzten Abirateron erreicht.

### **F.3 Der Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese im Gehirn: Untersuchungen an SH-SY5Y Neuroblastomzellen**

Im Zellmodell konnte an der Zelllinie SH-SY5Y gezeigt werden, dass E2 [101] und GHB [99] einem  $\beta$ -Amyloid-vermittelten Zelltod entgegen wirken. Weiter wurde für GHB *in vivo* belegt, dass es die Steroidkonzentration im Rattenhirn deutlich steigern kann [98]. Es stellte sich daher die Frage, ob beide Effekte in einem direkten Zusammenhang zueinander stehen, d.h. ob der positive Effekt von GHB auf die Zellviabilität auf einer Erhöhung der Konzentration bzw. einer Steigerung der Biosynthese von Steroiden mit neuroprotektiver Wirkung beruht.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Versuche an SH-SY5Y Neuroblastomzellen durchgeführt, um den Effekt von GHB auf die Steroidbiosynthese in dieser Zelllinie zu beobachten und zu bewerten.

Nach Zugabe der Substrate P<sub>4</sub> und AD konnte zwar eine deutliche Umsetzung dieser Steroide in diverse Produkte in SH-SY5Y Zellen gezeigt werden, die Höhe des Substratumsatzes war allerdings größtenteils unbeeinflusst von der Vorinkubation und/oder der gleichzeitigen Inkubation mit GHB. Statistisch signifikante Unterschiede im Umsatz von P<sub>4</sub> zwischen mit GHB behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrolle gab es nur bei einem einzelnen Messzeitpunkt. In den folgenden Messzeitpunkten des gleichen Experiments konnte kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden. Bei den Versuchen mit AD konnten

signifikante Unterschiede in der Umwandlung von AD, wenn überhaupt, nur gezeigt werden, wenn die Kontrolle, auch im Rahmen einer Vorinkubation, nicht mit GHB in Kontakt kam. Der Substratumsatz war in diesen Fällen in mit GHB behandelten Zellen jeweils geringfügig niedriger als in den Kontrollen. Der Zusatz von GHB schien den Substratumsatz folglich eher zu erniedrigen als ihn unbeeinflusst zu lassen oder gar zu steigern.

Nach Offenlegung der Aktivität wichtiger steroidogener Enzyme konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass die verwendete Zelllinie, trotz widersprüchlicher Angaben in der Literatur, offensichtlich nicht die notwendige Enzymausstattung ( $3\beta$ -HSD/ $\Delta_5$ I, CYP17A1, CYP19,  $17\beta$ -HSD1) besitzt, um das als neuroprotektiv angenommene E2 aus P<sub>4</sub> zu bilden. Eine Wiederholung eines Teils der Versuche mit einer unabhängigen Charge der Zelllinie bestätigte dieses Ergebnis. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand könnte ein unterschiedlicher Differenzierungsstatus zwischen der im Rahmen dieser Arbeit und der in der Literatur verwendeten Zellkulturen sein.

Obwohl der Nachweis der Synthese von AP in SH-SY5Y Zellen mangels [<sup>3</sup>H]-Referenzsubstanz nicht möglich war, konnte aufgrund der deutlichen Aktivität der 5 $\alpha$ R dennoch gezeigt werden, dass die Bildung dieses Neurosteroids durch die Zelllinie grundsätzlich denkbar ist. Ebenso konnte, ungeachtet des fehlenden Nachweises von AP unter den aus P<sub>4</sub> erhaltenen Produkten, eindeutig demonstriert werden, dass GHB keine Steroidsynthese-steigernde Wirkung in SH-SY5Y Zellen hat.

Neben einer Erhöhung der Konzentration von Neurosteroiden durch Steigerung ihrer Biosynthese wäre theoretisch auch eine Konzentrationssteigerung durch Hemmung des Steroidabbaus möglich. Die vorgestellten Zellversuche sind nicht zur Überprüfung dieser Hypothese entworfen worden und haben daher nur eine begrenzte Aussagekraft bezüglich dieser Fragestellung. Allerdings lässt die Beobachtung, dass bei den wenigsten Versuchen ein signifikanter Unterschied im Produktmuster zwischen mit GHB behandelten und unbehandelten Zellen gezeigt werden konnte, dennoch die Vermutung zu, dass es zu keiner Hemmung des Steroidabbaus kommt und GHB keinen Einfluss auf die Steroidbiosynthese in SH-SY5Y Zellen hat.

Der im Zellversuch festgestellte, gegen A $\beta$ -Toxizität schützende Effekt von GHB [99] steht den in dieser Dissertation vorgestellten Experimenten zufolge nicht in Zusammenhang mit gesteigerter Neurosteroidsynthese.

Die eingangs erwähnte, von Barbaccia *et al.* *in vivo* beobachtete Steigerung der Steroidkonzentration nach GHB-Gabe [98] lässt sich vermutlich auf systemische Effekte zurückführen. Durch Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse kann

GHB die Konzentration von Steroiden in Hirngewebe und Plasma erhöhen, wie im Rattenmodell gezeigt [117]. Dies kann freilich nicht im Zellexperiment nachgestellt werden. Schließlich lässt sich sagen, dass im Vergleich mit den hochinteressanten Ergebnissen im Bereich der  $5\alpha$ R- und der CYP17A1-Inhibitoren die an den SH-SY5Y Zellen durchgeführten Arbeiten zunächst weniger bedeutsam erscheinen. Da keine durch GHB vermittelten Effekte auf die Steroidbiosynthese in diesen Zellen aufgezeigt werden konnten, war lediglich das Widerlegen der These, dass GHB einen steroidogenen Effekt in SH-SY5Y Zellen hat, möglich. Letztlich können allerdings aus der Auseinandersetzung mit dem Themengebiet der neuroaktiven Steroide dennoch wichtige Erkenntnisse und Denkanstöße gewonnen werden, die für medizinische Chemiker, die im Bereich der Hemmstoffe von steroidogenen Enzymen forschen, von hoher Bedeutung sind. So sind die Effekte dieser Hemmstoffe im Gehirn im klinischen Einsatz nicht zu vernachlässigen. Da CYP17A1 auch ein Schlüsselenzym zur Biosynthese von E2 ist, kann der Einsatz von CYP17A1-Inhibitoren zu einer Verringerung des E2-Spiegels im Gehirn führen, vorausgesetzt der Hemmstoff ist hirngängig. In Anbetracht der langen Behandlungsdauer mit einem CYP17A1-Hemmstoff – der Median der Gesamtüberlebensdauer lag in einer Phase III Studie mit Abirateronacetat bei knapp 3 Jahren [54] – ist dann mit potentiellen Effekten auf den Neurosteroidspiegel im Gehirn zu rechnen. Zumal vor allem ältere Menschen an einem PCa leiden und somit potentielle Anwender von CYP17A1-Hemmstoffen sind, könnten sie besonders anfällig für einen Wegfall des neuroprotektiven Effekts von E2 sein. Eine beginnende oder bestehende Alzheimer-Demenz könnte in der Folge fortschreiten und eine beträchtliche Nebenwirkung bzw. Kontraindikation von klinisch eingesetzten CYP17A1-Inhibitoren darstellen. Dieser Umstand sollte so früh wie möglich bei der Weiterentwicklung dieser Wirkstoffklasse berücksichtigt werden. Bei Beachtung gewisser physikochemischer Parameter wie Molekulargewicht, logP und PSA sowie der Affinität zu Effluxpumpen wie P-Glycoprotein können somit wirksamere und sichere Arzneistoffe entwickelt werden.

## **G Fazit**

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit gesetzten Problemstellungen mit Erfolg bearbeitet wurden.

Auf dem Gebiet der  $5\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren wurden etwa 40 neue Verbindungen bezüglich ihrer Hemmpotenz evaluiert. Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnten entsprechende Struktur-Wirkungsbeziehungen diskutiert werden. Weiter wurde eine interessante Ausgangsverbindung für weitere Optimierungen identifiziert. Obschon diese im Vergleich mit

dem klinisch eingesetzten Wirkstoff Finasterid weniger potent ist, verspricht sie dennoch Ausgangspunkt zur Entwicklung eines, den heute eingesetzten  $5\alpha$ -Reduktase-Hemmstoffen überlegenen, Wirkstoffs zu sein, da sie sich strukturell stärker von den natürlich im Menschen vorkommenden Steroiden unterscheidet.

Entsprechend dazu konnte auch auf dem Feld der CYP17A1-Inhibitoren eine Verbindung gefunden werden, die die Basis für die Entwicklung einer fortgeschrittenen Hemmstoffklasse darstellt. Voraussetzung hierfür war die erfolgreiche Entwicklung eines neuen Assay Systems zur Identifizierung von selektiven  $C_{17,20}$ -Lyase-Hemmstoffen und das Untersuchen einer bereits vorhandenen Substanzbibliothek. Analog zu den  $5\alpha$ -Reduktase-Hemmstoffen wurde auch hier Wert darauf gelegt, eine potente Verbindung zu finden, deren Struktur sich von natürlich vorkommenden Steroiden unterscheidet. Der aus diesen Anstrengungen hervorgegangene Hemmstoff ist dabei bezüglich seiner Hemmpotenz gegen die Lyase-Reaktion des CYP17A1-Enzyms vergleichbar mit dem ersten zugelassenen CYP17A1-Hemmstoff Abirateron, übertrifft diesen jedoch deutlich im Hinblick auf Lyase-Selektivität und weist darüber hinaus die gewünschte nicht-steroidale Struktur auf. Weitere Optimierungen können auch hier zu verbesserten Wirkstoffen führen.

Auch die Versuchsreihen zur Untersuchung des Einflusses von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die Steroidbiosynthese in SH-SY5Y Neuroblastomzellen wurden mit Erfolg geplant und durchgeführt. Die ursprüngliche These der Steroidsynthesesteigerung durch GHB konnte allerdings durch die erhaltenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Die daraufhin durchgeführten Experimente und Auswertungen zur Identifikation der nach den Inkubationen mit Pregnenolon, Progesteron und Androstendion gefundenen Produkte und zur daraus abgeleiteten Bestimmung der in der betrachteten Zelllinie aktiven, steroidumsetzenden Enzyme zeigen, dass GHB auf zellulärer Ebene keinen Einfluss auf diese Enzyme hat. Da die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse die Effekte einer GHB-Gabe in der Zellkultur betrachten, schließen sie einen Steroidsynthese steigernden, neuroprotektiven Effekt von GHB auf systemischer Ebene allerdings nicht aus. Dies und die Tatsache, dass eine Neuromodulation auch durch Gabe von Hemmstoffen steroidogener Enzyme erreicht werden kann, macht die Forschung auf diesem Gebiet weiter interessant.

## H Ausblick

Die aus der vorliegenden Dissertation gewonnenen Erkenntnisse zeigen vor dem Hintergrund des Bedarfs an wirksameren und verträglicheren Therapieoptionen zur Behandlung von Krankheiten wie dem (kastrationsresistenten) Prostatakarzinom (CRPC), dem benignen

Prostata-syndrom (BPS) und der Alzheimer'schen Krankheit die Notwendigkeit weiterer Forschung auf. Da die genannten Leiden vor allem die Bevölkerung im letzten Lebensdrittel betreffen, ist die Vermeidung von potentiellen Wechsel- und Nebenwirkungen, unter dem Gesichtspunkt von Multimorbidität und daraus folgender Polymedikation, schon bei der Entwicklung von neuen Arzneistoffen ein wichtiges Ziel. Um diesen Zweck zu verfolgen, wurden durch diese Dissertation Leitstrukturen aufgezeigt, die Ausgangspunkte zur Entwicklung verbesserter Hemmstoffe darstellen.

So können die Verbindungen **K1**, **K29** und **K38** im Hinblick auf Hemmung der 5 $\alpha$ -Reduktase Typ II optimiert werden. Dabei zeigt Verbindung **K38** das vermutlich geringste Potential von unerwünschten Nebenwirkungen durch Aktivierung von Steroidrezeptoren. Da hier besonders der Androgenrezeptor von Interesse ist, sollte eine agonistische Wirkung der Hemmstoffe an diesem Rezeptor und bekannten Mutanten, beispielsweise mittels Luciferase-Assay, untersucht und ausgeschlossen werden. Noch besser wäre es, die Bindungsaffinität zum Rezeptor zu überprüfen und zu minimieren.

Hochinteressant ist auch die Evaluierung dieser Substanzen auf Hemmung der 5 $\alpha$ -Reduktase Typ III mittels eines noch zu entwickelnden Assays. Ein aus einer solchen Studie hervorgehender und im Anschluss weiter optimierter Inhibitor könnte in der Therapie von BPS-Patienten Verwendung finden.

Ein Einsatz verbesserter 5 $\alpha$ -Reduktase-Hemmstoffe gegen CRPC wäre zwar prinzipiell ebenfalls denkbar, jedoch muss berücksichtigt werden, dass diese lediglich die Bildung des stärksten natürlichen Androgens, Dihydrotestosteron (DHT), hemmen können. Das Substrat des 5 $\alpha$ -Reduktase-Enzyms, Testosteron (T), vermittelt jedoch ebenfalls eine androgene Wirkung [29], sodass auch dessen Bildung für eine erfolgreiche CRPC-Therapie unterbunden werden muss. Hierzu ist daher die Gabe eines CYP17A1-Hemmstoffs geeigneter.

Zudem ließe sich über eine Kombination beider Wirkprinzipien nachdenken. Die potentiell synergistische Wirkung von 5 $\alpha$ -Reduktase- und CYP17A1-Hemmstoffen könnte eine effektive Behandlung einer fortgeschrittenen Prostatakrebskrankung (PCa) darstellen. Ob dies zutrifft kann freilich nur durch einen Vergleich zwischen Mono- und Kombinationstherapie im Rahmen klinischer Studien belegt werden. Diese wären nicht zuletzt deshalb vonnöten, da aktuell klinisch eingesetzte 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren in Bezug auf ihre Wirkung zur PCa-Prävention kontrovers diskutiert werden [118]. So reduzieren zwar sowohl Finasterid als auch Dutasterid die Wahrscheinlichkeit an niedriggradigem PCa zu erkranken, erhöhen dabei aber das Risiko der Ausbildung von höhergradigem PCa leicht [119, 120]. Wie

sich dieser Umstand auf die Behandlung von PCa auswirkt, kann zurzeit noch nicht beantwortet werden.

Wie bereits erläutert, wurde durch die Entdeckung eines potenten und lyaseselektiven Inhibitors (Verbindung **4**) der Grundstein zur Entwicklung einer neuen CYP17A1-Hemmstoffklasse gelegt. Die zukünftige Weiterentwicklung dieses Screening-Hits sollte zunächst auf eine Steigerung der Lyase-Selektivität abzielen. Da Verbindung **4** weiter ein potenter Hemmstoff der Enzyme CYP11B1 und CYP11B2 ist, ist parallel dazu auch die Verbesserung der Selektivität gegenüber diesen und weiteren steroidogenen CYP-Enzymen anzustreben. Obwohl ein dualer Hemmstoff von CYP17A1 und CYP11B1 für Patienten, deren Androgenrezeptor (AR) bedingt durch Mutationen auch durch Cortisol aktiviert werden kann, eine zukunftsweisende, personalisierte Therapie („tailor made medicine“) darstellen könnte [73], würde dies dem Sinn und Nutzen der selektiven Lyase-Hemmung widersprechen. Dies begründet sich im eigentlichen Konzept eines selektiven Lyase-Hemmstoffs: Die Cortisolbiosynthese wird unbeeinflusst gelassen und dadurch werden Nebenwirkungen vermieden, die bei Hemmstoffen beider Reaktionen, die durch CYP17A1 katalysiert werden, zum Tragen kommen würden. Eine gleichzeitige Hemmung von CYP11B1 und damit der Cortisolbiosynthese würde diesen Vorteil nivellieren. Im Resümee haben somit sowohl selektive Lyase-Hemmstoffe als auch duale Hemmstoffe von CYP17A1/CYP11B1 ihre Daseinsberechtigung. Es handelt sich allerdings um unterschiedliche Konzepte, die getrennt voneinander betrachtet und verfolgt werden müssen.

In Kapitel F.3 wurde ausgeführt, dass Effekte von Hemmstoffen steroidogener Enzyme auf die Spiegel neuroaktiver Steroide im Gehirn nicht außer Acht gelassen werden dürfen, wenn eine längerfristige Therapie, wie es bei PCa aber auch bei BPS der Fall ist, angezeigt ist. Daher sollte bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe Augenmerk darauf gelegt werden, ob die Substanzen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden können. Im Falle von CYP17A1- und 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren wäre dies zu vermeiden und einer nebenwirkungsarmen Therapie abträglich, da bei Hirngängigkeit der entsprechenden Verbindungen die Gefahr besteht, die Synthese wichtiger Neurosteroiden wie Estradiol (E2), Allopregnanolon (AP) und Allotetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC) zu hemmen.

Um eine Hirngängigkeit zu vermeiden, kann man sich empirischer Vorhersagemethoden [121, 122] bedienen, die auf dem Vergleich physikochemischer Parameter von im Zentralnervensystem (ZNS) wirkenden und peripher wirkenden Substanzen beruhen. Hierbei

werden beispielsweise Molekulargewicht, logP und PSA betrachtet. Diese empirischen Regeln wurden zwar entwickelt, um die Entwicklung hirngängiger Wirkstoffe zu erleichtern, lassen sich aber durch gezielte „Nichtbeachtung“ dazu nutzen, um eine Wirkung im ZNS zu vermeiden. Bei Verletzung dieser Regeln und gleichzeitiger Beachtung der Lipinski „Rule of Five“ [123], steigt die Wahrscheinlichkeit, eine oral bioverfügbare, jedoch nicht hirngängige Verbindung zu erhalten. Der Erfolg dieser Vorgehensweise kann anschließend durch geeignete Permeationsassays (PAMPA, sowie Assays mit Caco2- oder MDR1-MDCKII-Zellen) [124, 125] sowie in *in vivo* Versuchen experimentell bestätigt werden.

## I Zusammenfassung

Steroidhormone sind wichtige Regulatoren mannigfaltiger Vorgänge im Organismus. Ein Über- oder Unterangebot bestimmter Steroidhormone kann zu schwerwiegenden Krankheiten führen. Steroidogene Enzyme stellen daher interessante Zielmoleküle zur Therapie dieser Leiden dar.

Die Hemmung der Androgenbildung ist ein erfolgreiches Therapiekonzept zur Behandlung hormonabhängiger Krankheiten wie dem Prostatakarzinom und dem benignen Prostatasyndrom. Diese Arbeit umfasst die Evaluierung der Hemmpotenz neuer Inhibitoren der androgenbildenden Enzyme  $5\alpha$ -Reduktase und CYP17A1. Neben etablierten Methoden kommt ein hier vorgestellter, neu entwickelter Assay zum Einsatz. Dieser ermöglicht die getrennte Hemmstoffbewertung gegenüber beiden Katalysereaktionen des bifunktionalen Enzyms CYP17A1 und bestätigt die These, dass zielgerichtete Hemmung des zweiten Katalyseschritts möglich ist. Weiter werden selektive Hemmstoffe jener Reaktion identifiziert und bilden die Grundlage zur Entwicklung nebenwirkungsarmer Wirkstoffe.

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Krankheit, deren Ätiologie bislang nicht vollständig geklärt ist. Unzureichende Therapieoptionen machen die Notwendigkeit neuer Behandlungskonzepte deutlich. Eine Steigerung der Synthese zellschützender Neurosteroiden könnte den Verlauf der Krankheit bremsen. In dieser Arbeit wird durch Versuche am Zellmodell gezeigt, dass die als neuroprotektiv beschriebene Gammahydroxybuttersäure keinen Einfluss auf die Aktivität steroidogener Enzyme hat.

## J Summary

Steroid hormones are important regulators of manifold processes in the organism. Both, excess as well as insufficient supply of particular steroid hormones may lead to severe diseases. Therefore, steroidogenic enzymes represent interesting targets for the therapy of these illnesses.

Inhibition of androgen formation is a successful concept of therapy for treating hormone dependant diseases like prostate cancer and benign prostatic syndrome. This thesis comprises the evaluation of the inhibitory potency of novel inhibitors of the androgen forming enzymes 5 $\alpha$ -reductase and CYP17A1. Together with established methods, a newly developed assay is used. The latter allows a separate evaluation of inhibitors against either of the two reactions of the bifunctional enzyme CYP17A1 and confirms the theory that a targeted inhibition of the second catalytic step is possible. Moreover, selective inhibitors of this reaction are identified and provide the basis for the development of active pharmaceutical ingredients with low side effects.

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease with a not yet fully understood aetiology. Insufficient treatment options emphasise the need for novel therapeutic concepts. An increase of the synthesis of cell protecting neurosteroids may slow down the course of the disease. This thesis uses cellular model experiments to demonstrate that  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, which is described as neuroprotective, has no influence on the activity of steroidogenic enzymes.

## Material und Methoden

### J.1 Material

#### J.1.1 Chemikalien und Medien

Alle Chemikalien und Grundstoffe in *p. a.* und in HPLC Qualität sowie unmarkierte Steroidstandards wurden, soweit nicht anders angegeben von Biesterfeld Chemiedistribution (Friedrichsthal), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und VWR International GmbH (Darmstadt) bezogen.

Weitere Produkte wurden von folgenden Firmen erhalten:

4-Nitrocatecholsulfat, Dikaliumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Finasterid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Lysozym aus Hühnereiweiß, lyophilisiert und albuminfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
NADP, Dinatriumsalz	GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg)
PAPS, Lithiumsalzhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
S9 Fraktion aus humaner Leber BD Gentest <sup>TM</sup>	BD Biosciences Europe (Erembodegem, Belgien)
Sulfatase/Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i> Typ H-1, lyophilisiertes Pulver, Sulfataseaktivität $\geq 10,000$ units/g, Glucuronidaseaktivität $\geq 300$ units/mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Quickszint Flow 302 LSC Cocktail	Zinsser Analytik GmbH (Frankfurt am Main)
Tritium-markierte Steroide: [1,2- <sup>3</sup> H]-11-Deoxycorticosteron	American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, USA)
[1 $\beta$ - <sup>3</sup> H(N)]-Androst-4-en-3,17-dion	Perkin Elmer (Rodgau)
[2,4,6,7- <sup>3</sup> H(N)]-Estradiol	
[2,4,6,7- <sup>3</sup> H(N)]-Estron	
[7- <sup>3</sup> H(N)]-Pregnenolon	
[1,2,6,7- <sup>3</sup> H(N)]-Progesteron	

[1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-Testosteron

Zellkultur:

CASYton

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium -  
high glucose (DMEM)

Produktnummer: D6429-500ML

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

Fetales Kälberserum, Ursprung nicht aus  
den USA (FKS)

Produktnummer: F7524-500ML

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

Geneticin Disulfat (G418 Sulfat)

GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg)

Penicillin/Streptomycin

10.000 U/mL Penicillin; 10 mg/mL  
Streptomycin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

Trypsin-EDTA, 10x

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

### J.1.2 Verbrauchsmaterialien

CASY<sup>®</sup> cups

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Nalgene Cryoware Cryogenic Vials

Thermo Fisher Scientific (Roskilde,  
Dänemark)

Röhre 15 mL 120x17 mm PP

Röhre 50 mL 114x28 mm PP

Reagiergefäß 1,5 mL

Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

Safe Lock Tube 2,0 mL

Eppendorf AG (Hamburg)

Tip One 10 µL Graduated Tip

Tip One 200 µL Yellow Tip

Tip One 1000 µL Blue, Graduated Tip

Starlab GmbH (Hamburg)

Well-Platten:

Multidish 12 Wells Nuclon Delta SI, with  
lid

Cellstar<sup>®</sup> 24 Well Cell Culture Plate, with  
lid

Thermo Fisher Scientific (Roskilde,  
Dänemark)

greiner bio one (Frickenhausen)

Zellkulturschalen:

Zellkulturschale 100x20 mm

Zellkulturschale 150x20 mm

Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

**J.1.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur****J.1.3.1 Medium für SH-SY5Y Zellen**

DMEM mit

FKS 10%

Penicillin/Streptomycin 1%

**J.1.3.2 Medium für HEK I und HEK II Zellen**

DMEM mit

FKS 10%

Penicillin/Streptomycin 1%

G418 Sulfat 0,5 mg/mL

**J.1.3.3 Trypsin-EDTA Lösung**

Trypsin-EDTA, 10x 5,0 mL

Aqua, bidest. (autoklaviert) ad 50,0 mL

Es wurden Aliquots von je 1,0 mL hergestellt.

**J.1.3.4 Lösungen und Puffer zur Herstellung von HEK-I und HEK-II Homogenat****J.1.3.4.1 TRIS HCl Stammlösung, 1 M**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 15,76 g

Hydrochlorid

Aqua, bidest. ad 100,0 mL

**J.1.3.4.2 EDTA Stammlösung, 10 mM**

Ethylendiamintetraessigsäure 292,2 mg

Aqua, bidest. ad 100,0 mL

Der Feststoff wurde unter Erwärmen und Zugabe einiger Tropfen NaOH gelöst.

**J.1.3.4.3 Homogenatpuffer**

TRIS HCl, 1 M	12,5 mL
EDTA, 10 mM	2,5 mL
Saccharose	25,67 g
Aqua, bidest.	ad 250,0 mL

Einstellen auf pH 7,3.

Aliquots zu jeweils 50 mL wurden bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

**J.1.3.4.4 TRIS-Puffer**

TRIS HCl, 1 M	12,5 mL
EDTA, 10 mM	2,5 mL
Aqua, bidest.	ad 250,0 mL

Einstellen auf pH 7,3.

**J.1.3.5 Puffer und Lösungen zur Durchführung der CYP17A1 Assays****J.1.3.5.1 0,05 M Phosphatpuffer A pH 7,4 (CYP17-Puffer)**

Dinatriumhydrogenphosphat, Dodecahydrat	8,96 g
Natriumdihydrogenphosphat	3,00 g
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	203,3 mg
Ethylendiamintetraessigsäure	29,23 mg
Dithiothreitol	15,43 mg
Aqua, bidest.	ad 1000,0 mL

Einstellen auf pH 7,4.

**J.1.3.6 Puffer für Inkubationen mit S9 Fraktion****J.1.3.6.1 100 mM Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 7,4 (KP-Puffer)**

Kaliumdihydrogenphosphat	0,68 g
Dikaliumhydrogenphosphat	1,14 g
Aqua, bidest.	ad 100,0 mL

Einstellen auf pH 7,4.

## J.1.4 Zelllinien

### J.1.4.1 SH-SY5Y

Die Zelllinie SH-SY5Y stellt einen Subklon der SK-N-SH Zelllinie dar [126]. Letztere wurde aus einer Knochenmarksbiopsie einer vierjährigen Patientin mit Neuroblastom gewonnen. Die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Manfred J. Schmitt und Herrn Dr. Matthias Engel zur Verfügung gestellt.

### J.1.4.2 HEK-I

HEK-I Zellen stellen HEK293 Zellen dar, die durch stabile Transfektion zur permanenten Expression der humanen 5 $\alpha$ RI befähigt wurden [127].

### J.1.4.3 HEK-II

HEK-II Zellen stellen HEK293 Zellen dar, die durch stabile Transfektion zur permanenten Expression der humanen 5 $\alpha$ RII befähigt wurden [127].

## J.1.5 Geräte

Axiovert 25 Umkehrmikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Bandelin Homogenisator Sonoplus HD 60 mit Ultraschallwandler UW 60	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin)
Biosafe eco Zellkultur Inkubator	Integra Biosciences (Fernwald)
CARY <sup>®</sup> 50 UV-Vis Spektrophotometer	Agilent Technologies GmbH (Böblingen)
CASY <sup>®</sup> Cell Counter + Analyser System Modell TT	Schärfe System (Reutlingen)
Holten LamiAir Sterilbank	Heto-Holten (Allerød, Dänemark)
HPLC System I: Agilent 1100 HPLC System G1322A Degasser Entgaser G1311A QuatPump Quartäre Pumpe G1329A ALS Autosampler G1316A COLCOM Säulenofen G1315B DAD UV-Detektor 35900E Interface ChemStation <sup>®</sup> Software	Agilent Technologies GmbH (Böblingen)
CC 125/3 Nucleodur 100-3 C-18 ec HPLC Säule mit CC 8/3 Nucleodur 100-3 C18ec Vorsäule	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
Radioflow Detector LB509 mit	Berthold Technologies GmbH & Co. KG

Flüssigszintillatorpumpe

(Bad Wildbad)

HPLC System II:

Agilent 1200 HPLC System  
G1322A Degasser Entgaser  
G1311A QuatPump Quartäre Pumpe  
G1329A ALS Autosampler  
G1315B DAD UV-Detektor (1100er  
Reihe)

Agilent Technologies GmbH (Böblingen)

35900E Interface  
ChemStation® Software  
CC 125/3 Nucleodur 100-3 C-18 ec  
HPLC Säule mit CC 8/3 Nucleodur 100-3  
C18ec Vorsäule  
RAMONA Star radioactivity HPLC-  
flow-monitor mit HPLC-LS-piston pump

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)

raytest Isotopenmessgeräte GmbH  
(Straubenhardt)

HPLC System III:

Agilent 1200 HPLC System  
G1379B Degasser Entgaser  
G1312A BinPump Binäre Pumpe  
G1329A ALS Autosampler  
G1314B VWD UV-Detektor  
35900E Interface

Agilent Technologies GmbH (Böblingen)

ChemStation® Software  
CC 125/3 Nucleodur 100-5 C-18 ec  
HPLC Säule mit CC 8/3 Nucleodur 100-3  
C18ec Vorsäule  
RAMONA Star radioactivity HPLC-  
flow-monitor mit HPLC-LS-piston pump

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)

raytest Isotopenmessgeräte GmbH  
(Straubenhardt)

Savant SPD121P Speedvac Concentrator  
mit RVT400 Refrigerated Vapor Trap

Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham,  
MA, USA)

Mettler-Toledo SevenEasy pH-Meter

Mettler-Toledo GmbH (Gießen)

Millipore Q plus Reinstwasseranlage

Millipore (Eschborn)

UV/Vis-Spektralphotometer Helios β

Unicam, Thermo-Spectronic (Neuss)

Vortex Schüttler, VV 3

VWR International GmbH (Darmstadt)

Waagen:

Kern ABT 220-5DM  
Sartorius R200D

Kern & Sohn GmbH (Balingen)  
Sartorius AG (Göttingen)

Zentrifugen:

Hettich Universal 32 R  
mit Ausschwingrotor 8-fach 45°  
(Best. Nr. 1617)  
Heraeus Fresco 17

Andreas Hettich GmbH & Co.KG  
(Tuttlingen)

Thermo Electron LED GmbH (Osterode)

Sorvall RC5B Plus  
Rotoren SS-34 und SLA-1500

Sorvall (Newton, CT, USA)

## J.2 Methoden

### J.2.1 HPLC Methoden

Die verwendeten HPLC Methoden sind auf den zu den einzelnen Systemen zugehörigen PCs unter folgenden Pfaden abgespeichert:

HPLC System I:

D:\HPCHEM\1\METHODS

HPLC Systeme II und III:

C:\Chem32\1\METHODS

Die erhaltenen Chromatogramme können unter den folgenden Pfaden gefunden werden:

HPLC System I:

D:\HPCHEM\1\DATA\SJK

HPLC Systeme II und III:

C:\Chem32\1\DATA\SJK

#### J.2.1.1 HPLC Methoden für die CYP17A1 Assays

Die Analysen wurden auf dem unter Abschnitt J.1.5 aufgeführten HPLC System I durchgeführt. Die Einstellungen für den Berthold Radioflow Detektor waren:

Select Param.	file
Nuklid	<sup>3</sup> H
Ratem. Units	min
L-Backgnd	0
Eff.Correct.	no
L-Range	100k
L-Range	50k
Peak-FWHM	30
L-Time-C (FWHM)	1
Fill-time (s)	0
Valve Delay (s)	1
Pump-flow	0.5

Pump on	0
Pump off	8

#### J.2.1.1.1 CYP17A1 Hydroxylase Assay („CYP173.M“)

Zur Analyse des Hydroxylase Assays wurde eine 13-minütige, isokratische Methode verwendet, bei der Millipore Wasser und Acetonitril (jeweils mit 0,1 % TFA) als Elutionsmittel diente. Der Lösungsmittel- und der Szintillatorfluss wurden auf 0,9 mL/min gesetzt. Die restlichen Einstellungen des Berthold Radioflow Detektors wurden wie in Abschnitt J.2.1.1 aufgeführt übernommen. Der Druck während der Analyse betrug etwa 250 bar. Die Methode wurde unter dem Namen „CYP173.M“ unter dem in Abschnitt J.2.1 angegebenen Pfad abgespeichert.

#### J.2.1.1.2 CYP17A1 Lyase Assay („CYP172.M“)

Die Analysen wurden unter Verwendung der in Tabelle J-1 aufgeführten Gradientenmethode durchgeführt. Die Methode wurde unter dem Namen „CYP172.M“ unter dem in Abschnitt J.2.1 angegebenen Pfad abgespeichert.

Zeit [min]	Wasser	Acetonitril
	mit 0,1% TFA [%]	mit 0,1% TFA [%]
0,0	40	60
0,5	25	75
4,0	25	75
4,5	0	100
7,0	0	100
10,0	40	60

Stopp: 10,0 min

Fluss 0,5 mL/min

Szintillatorfluss 0,5 mL/min

Druck<sub>Start</sub> = 218 bar

Injektionsvolumen 20 µL

**Tabelle J-1 HPLC Gradientenmethode für den CYP17A1 Lyase Assay**

### J.2.1.2 HPLC Methode für SH-SY5Y Experimente

Die Entwicklung (siehe Abschnitt E.2.1 ) und Anwendung der Methode erfolgte auf dem in Abschnitt J.1.5 beschriebenen HPLC System III. Die Methode wurde dort unter dem Namen „SHSY5Y.M“ abgespeichert. Sie ist der Vollständigkeit halber an dieser Stelle erneut wiedergegeben:

Zeit [min]	Wasser	Acetonitril
	mit 0,1% TFA [%]	mit 0,1% TFA [%]
0,0	65	35
15,0	65	35
32,0	0	100
35,0	65	35

Stopp: 38,0 min

Fluss 1,0 mL/min

Szintillatorfluss 2,5 mL/min

Druck<sub>Start</sub> = 173 bar

Injektionsvolumen 25 µL

**Tabelle J-2 HPLC Methode für die SH-SY5Y Versuche**

### J.2.1.3 HPLC Methode für 5αRI und 5αRII („5ALPHA\_SK.M“)

Die aus dem Test auf Hemmstoffaktivität gegen die beiden 5αR Isoformen I und II erhaltenen Proben wurden mit Hilfe einer isokratischen Methode auf dem in Abschnitt J.1.5 beschriebenen HPLC System II durchgeführt. Als Fließmittel diente eine Mischung aus 28 % Millipore Wasser, 72 % Methanol und 0,1 % TFA. Die Flussrate wurde auf 0,325 mL/min gesetzt wodurch ein Druck von etwa 140 bar erreicht wurde. Die Szintillationsflüssigkeit wurde mit einem Fluss von 1,2 mL/min zugesetzt. Die Methodendauer betrug 13,0 Minuten, das Injektionsvolumen 25 µL.

### J.2.1.4 Elektronische Zellzahlbestimmung mittels CASY® Modell TT

Zellzahlbestimmungen wurden mit Hilfe des CASY® Cell Counter + Analyser Systems durchgeführt. Das Gerät erlaubt es in einer einzigen Messung sowohl die Zellzahl zu ermitteln als auch lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Dazu muss eine Zellkulturprobe in CASY®ton, einer speziell für die Zellzählung entwickelten isotonen Elektrolytlösung, verdünnt (im Regelfall 1:1001) und suspendiert werden. Dies wird durch Pipettieren von

10 µL zu vermessender Zellsuspension in ein mit 10 mL CASY<sup>®</sup>ton gefülltes CASY<sup>®</sup>cup und nachfolgendes, mehrmaliges Invertieren erreicht. Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden.

Bei der Messung wird die Suspension mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Präzisionsmesspore gesaugt und über ein Niederspannungsfeld geleitet. Die elektrolytgefüllte Messpore stellt dabei einen definierten elektrischen Widerstand dar. Zellen verdrängen beim Durchtritt durch die Messpore ein dem Zellvolumen entsprechendes Volumen an Elektrolytlösung. Eine intakte Zellwand kann dabei als Isolator betrachtet werden und erhöht so den Widerstand über die Kapillarstrecke. Messgröße zur Bestimmung des Volumens ist somit die Änderung des Widerstands. Die Zellmembran toter Zellen stellt hingegen keine elektrische Barriere mehr dar. Tote Zellen werden mit der Größe des Zellkerns erfasst.

Zur automatischen Auswertung des Messergebnisses müssen unter anderem der linke und der rechte Auswertecursor (Evaluierungscursor) sowie der linke und der rechte Normierungscursor angegeben werden. Die Normierungscursor bestimmen den Bereich der Größenverteilung, der bei allen Prozentberechnungen (% Viability, % Counts, % Volume) den 100% Wert definiert. Die Auswertecursor hingegen bestimmen, welcher Bereich der Größenverteilung zur Berechnung der Messergebnisse verwendet wird. Das heißt, sie definieren bei prozentualen Berechnungen den Größenbereich, für den der prozentuale Anteil bezogen auf den Normierungsbereich berechnet wird.

(nach Casy<sup>®</sup> Cell Counter und Analyser System Model TT Bedienungsanleitung, Schärfe System GmbH, Reutlingen)

Zur Zählung der Zellen wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Programme verwendet:

Zelllinie	Evaluierungscursor	Normierungscursor
HEK-I	11,38 - 50,00 µm	6,00 - 50,00 µm
HEK-II	11,75 - 50,00 µm	8,25 - 50,00 µm
SH-SY5Y	11,75 - 50,00 µm	8,25 - 50,00 µm

## J.2.2 Arbeitstechniken mit Zellkulturen

### J.2.2.1 Kryokonservierung

Im Zusammenhang mit der Zellkultur versteht man unter Kryokonservierung das Einfrieren und Lagern von Zellen bei Temperaturen unter -130 °C unter Verwendung von Gefrierschutzsubstanzen. Ziel der Kryokonservierung ist die zeitlich unbefristete Lagerung von Zellmaterial, wobei nach dem Auftauen wieder lebensfähiges biologisches Material zur Verfügung stehen soll. Durch Lagerung in Flüssigstickstoff wird das biologische Material auf

-196 °C heruntergekühlt. Dabei kommen Stoffwechselprozesse vollständig zum Erliegen und das eingefrorene Material kann über Jahrzehnte gelagert werden [128].

#### **J.2.2.1.1 Auftauen kryokonservierter Zellen**

Nachdem 10 mL Kulturmedium auf 37 °C vorgewärmt wurden, wurde das Kryoröhrchen, das die aufzutauende Zelllinie enthielt, im auf 37 °C eingestellten Wasserbad erwärmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass weder der Schraubdeckel noch sein Gewinde mit Wasser benetzt wurden. Sobald der Inhalt des Kryoröhrchens aufgetaut war, wurde er in das vorgewärmte Kulturmedium überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 420 g wurde der Überstand abgesaugt um das zelltoxische Gefrierschutzmittel zu entfernen. Das Zellpellet wurde in frischem, auf 37 °C temperiertem Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine kleine Zellkulturschale gegeben und im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

#### **J.2.2.1.2 Einfrieren von kultivierten Zellen**

Die einzufrierenden, konfluenten Zellen wurden mit Trypsin behandelt um den Zellrasen abzulösen (siehe auch Abschnitt J.2.2.3). Die erhaltene Suspension wurde bei 420 g 5 Minuten zentrifugiert. Das alte Medium wurde verworfen, die Zellen in eisgekühltem Einfriermedium (= DMEM mit 20 % FKS und 10 % DMSO als Gefrierschutz) resuspendiert und auf vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt. Das Volumen an Einfriermedium wurde dabei so gewählt, dass eine Zellzahl im Bereich von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>7</sup> Zellen/mL erreicht wurde. Die Kryoröhrchen wurden in einen, mit Isopropanol aufgefüllten und auf 4 °C vorgekühlten, Nalgene Cryo 1C Freezing Container gestellt. 24-stündige Lagerung des Behälters bei -70 °C ermöglichte eine konstante Abkühlrate von 1 °C/min. Im Anschluss daran wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank überführt.

#### **J.2.2.2 Kultivierung der Zelllinien**

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zellen wurden in einem Biosafe eco Zellkultur Inkubator bei 37 °C kultiviert. Der Inkubator ermöglicht die Kultivierung in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und die Einstellung eines konstanten CO<sub>2</sub>-Gehalts auf 5 %. Im Zusammenspiel mit dem im Kulturmedium enthaltenen Natriumhydrogencarbonat entsteht so ein Kohlensäure/Hydrogencarbonat Puffersystem, das Schwankungen im pH-Wert, die beispielsweise durch Stoffwechselprodukte verursacht werden können, abpuffern kann.

Zum Schutz vor bakterieller Kontamination wurden den Kulturmedien des Weiteren die Antibiotika Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) zugesetzt.

#### **J.2.2.2.1 Kultivierung von SH-SY5Y Zellen**

Die Zellen wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle 5-7 Tage wurden die Zellen nach dem in Abschnitt J.2.2.3.1 beschriebenen Verfahren passagiert, und weiter kultiviert. Nach Bedarf wurden außerdem alle 3-5 Tage ca. 50 % des Kulturmediums gegen frisches Medium ausgetauscht.

#### **J.2.2.2.2 Kultivierung von HEK-I und HEK-II Zellen**

Beide Zelllinien wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Dem Medium wurde weiter Genetecin Disulfat in der Konzentration 0,5 mg/mL zugesetzt. Dieses Aminoglykosid Antibiotikum hemmt auch in eukaryotischen Zellen die ribosomale Proteinsynthese. Das zur stabilen Transfektion der beiden 5αR Subtypen verwendete Plasmid enthält ein Resistenzgen zur Inaktivierung des Antibiotikums. Durch den entstehenden Selektionsdruck können nur Zellen ungehindert wachsen, die im Laufe der Kultur das transfizierte Plasmid nicht verloren haben.

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage, wie in Abschnitt J.2.2.3.2 erläutert, passagiert und weiter kultiviert.

### **J.2.2.3 Passagieren der Zelllinien**

#### **J.2.2.3.1 Passagieren von SH-SY5Y Zellen**

Nachdem durch Kultivierung der Zellen ein konfluenten Zellrasen erhalten wurden, wurden die Zellen vorsichtig mit ca. 5 mL PBS (RT) gewaschen. Nach Absaugen der Waschlösung wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA Lösung behandelt und so enzymatisch von der Kulturschale abgelöst. Für eine 100x20 mm Schale wurde 1 mL Lösung, für eine 150x20 mm Schale wurden 2 mL Lösung verwendet. Die Zellen wurden im Inkubationsschrank 2-3 Minuten inkubiert. Danach wurde die Ablösung der Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Dies war bei SH-SY5Y sehr leicht möglich, da die Zellen bei Ablösung von der Schalenoberfläche von einer länglichen Form in eine kugelige Form übergehen. Die enzymatische Reaktion wurde mit 9 mL frischem Kulturmedium (37 °C) abgestoppt. Das nach Zentrifugation (5 min, 420 g) der erhaltenen Zellsuspension und Verwerfen des trypsinhaltigen Überstands erhaltene Zellpellet wurde in 10 mL frischem Kulturmedium (37 °C) resuspendiert. Dieser Schritt musste sehr sorgfältig durchgeführt werden, da die Zellen zur Aggregation neigten. Die Zellsuspension wurde im Anschluss daran 1:2 bis 1:4 in Kulturmedium (37 °C) verdünnt und auf frische Zellkulturschalen verteilt.

#### **J.2.2.3.2 Passagieren von HEK-I und HEK-II Zellen**

Nach Erreichen der Konfluenz konnten beide Zelllinien durch einfaches Abspülen mit 10 mL PBS (RT) von der Kulturschale gelöst werden. Eine Behandlung mit Trypsin war nicht nötig. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 420 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium (37 °C) gründlich resuspendiert, da HEK Zellen zur Aggregation neigten. Durch 1:3 bis 1:5 Verdünnung mit Kulturmedium und Überführung auf frische Zellkulturschalen wurden die Zellen passagiert und weiter kultiviert. [129]

#### **J.2.2.4 Herstellung von HEK-I und HEK-I Homogenat**

Die Herstellung des Zellhomogenats erfolgte wie von Dr. Martina Streiber beschrieben [129]: Zur Herstellung des Zellhomogenats wurden fünf, mit einem konfluenten Zellrasen bewachsene 150x20 mm Zellkulturschalen verwendet. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden vorsichtig mit 2 x 20 mL PBS (RT) gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 10 mL frischem PBS (RT) abgespült und in ein 50 mL Röhrchen überführt. Auf der Kulturschale verbleibende Zellen wurden durch Nachspülen mit 2 x 5 mL PBS (RT) der Zellsuspension zugefügt. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 420 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 15 mL Homogenatpuffer gründlich resuspendiert und die Zellzahl mittels elektronischer Zellzählung (siehe auch Abschnitt J.2.1.4) ermittelt. Durch Zugabe von weiterem Homogenatpuffer wurde eine Konzentration von 16 Millionen Zellen/mL eingestellt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe des Ultraschallstabs, eingestellt auf die höchste Stufe. Die Zellsuspension wurde dabei fünfmal 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Dazwischen wurden die Zellen 50 Sekunden auf Eis gelegt. Das erhaltene Homogenat wurde in Aliquots von jeweils 1,5 mL im Ethanol/Trockeneisbad eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **J.2.3 Biologische Assays**

#### **J.2.3.1 Test auf Hemmung von 5αRI und 5αRII**

Die Testung auf Hemmaktivität erfolgte in Anlehnung an den von Dr. Martina Streiber entwickelten zellfreien Assay [129]. Im Folgenden wird die Vorgehensweise im Detail wiedergegeben.

### J.2.3.1.1 Herstellung der Hemmstoffstammlösungen

Aus den von Prof. Dr. Manoj Kumar von der Panjab Universität in Indien übersandten Feststoffen wurden 10 mM Stammlösungen nach Formel J-1 hergestellt.

$$\frac{\text{Einwaage in mg}}{\text{Molekulargewicht in mg / mmol} \times 10 \text{ mmol / l}} \times 10^6 = \text{Lösungsmittelvolumen in } \mu\text{l}$$

**Formel J-1** Berechnung des benötigten Lösungsmittelvolumens zur Herstellung von 10 mM Hemmstoffstammlösungen

Zunächst war DMSO das Lösungsmittel der Wahl. War die Substanz auch nach mehrminütigem Schütteln auf dem Vortex Schüttler nicht gelöst, wurde versucht die Verbindung durch Erwärmen auf 37 °C im Wasserbad und/oder durch Behandlung im Ultraschallbad zu lösen. Für den Fall, dass eine Verbindung auch dadurch nicht gelöst werden konnte, wurde das nach Formel J-1 berechnete Volumen DMSO erneut zugegeben und so eine 5 mM Stammlösung hergestellt. Die Verbindungen **K19**, **K30**, **K33** und **K36** konnten auch auf diese Weise nicht gelöst werden. Von diesen Verbindungen wurden nach analoger Vorgehensweise Stammlösungen in Methanol hergestellt.

### J.2.3.1.2 Hemmstoffverdünnungen

Die Verdünnung der Hemmstoffstammlösungen auf die im Assay gewünschte Hemmstoffkonzentration erfolgte mit dem zur Herstellung der Stammlösung benutzten Lösungsmittel. Unter Verwendung von Verdünnungsschritten, die üblicherweise zwischen 1:2,5 und 1:10 lagen, wurde so eine Hemmstoffverdünnung hergestellt, die 50-fach höher konzentriert war als im Assay gewünscht. Diese Verdünnung wurde mit TRIS-Puffer wiederum 1:2,5 verdünnt. Die weitere Verdünnung auf die gewünschte Endkonzentration im Test erfolgte durch die übrigen Komponenten des Testansatzes (siehe auch Abschnitt J.2.3.1.5).

### J.2.3.1.3 Homogenatverdünnung

Das, wie in Abschnitt J.2.2.4 beschrieben, gewonnene Zellhomogenat wurde mit TRIS-Puffer verdünnt. Zur Bestimmung eines passenden Verdünnungsfaktors wurde ein Aktivitätstest ohne Hemmstoffzugabe analog zum in Abschnitt J.2.3.1.5 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Dazu wurden verschieden starke Homogenatverdünnungen hergestellt. Zur Verwendung im Assay wurde eine Homogenatverdünnung gewählt, die einen Substratumsatz von etwa 20-25 % gewährleistete.

#### J.2.3.1.4 NADPH regenerierendes System

Das verwendete NADPH regenerierende System bestand aus drei Komponenten, die erst kurz vor Verwendung zusammengegeben wurden. Es wurden gemischt: ein Teil 23 mM NADP Lösung in TRIS-Puffer, ein Teil Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (27,5 U/mL in TRIS-Puffer) und zwei Teile 100 mM Glucose-6-phosphat Lösung in TRIS-Puffer.

#### J.2.3.1.5 Assaydurchführung

Der 5 $\alpha$ R Assay wurde in 2 mL Eppendorf Reagiergefäßen durchgeführt. Jeder Testansatz enthielt:

TRIS-Puffer	174,37 $\mu$ L
[ <sup>3</sup> H]-Androstendion 26,3 Ci/mmol; 1 Ci/mL	0,131 $\mu$ L
Androstendion (495 $\mu$ M in Methanol)	0,5 $\mu$ L
NADPH regenerierendes System	50 $\mu$ L
Hemmstoffverdünnung	25 $\mu$ L
Homogenatverdünnung	250 $\mu$ L

Kontrollen enthielten keine Hemmstoffverdünnung, sondern eine 1:2,5 Verdünnung des für die Herstellung der Hemmstoffstammlösungen verwendeten Lösungsmittels in TRIS-Puffer. Die Testansätze wurden im Wasserbad bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 750  $\mu$ L Ether abgestoppt. Im Anschluss daran erfolgte die Extraktion der Steroide durch 10-minütiges Schütteln und 10-minütiges Zentrifugieren bei 6.500 g. Die Wasserphase wurde im Ethanol-/Trockeneisbad eingefroren, wodurch die noch flüssige, steroidhaltige Etherphase leicht in ein frisches Reagiergefäß überführt werden konnte. Nach Abdampfen des Lösungsmittels und Aufnahme der Steroide in 40  $\mu$ L Methanol erfolgte die HPLC Analyse.

#### J.2.3.2 Tests auf Hemmung von CYP17A1

##### J.2.3.2.1 Herstellung von CYP17A1 Enzymhomogenat

Co-expression von humanem CYP17A1 Enzym mit NADPH-P450 Reduktase aus der Ratte in *Escherichia coli* und die Aufbereitung der Membranfraktionen wurde nach Hutschenreuter *et al.* [65] durchgeführt.

#### **J.2.3.2.2 Hemmstoffstammlösungen und Hemmstoffverdünnungen**

Von den zu testenden Hemmstoffen wurden zunächst Stammlösungen in DMSO analog Abschnitt J.2.3.1.1 hergestellt.

Die Verdünnung der Hemmstoffstammlösungen auf die im Assay gewünschte Hemmstoffkonzentration erfolgte mit DMSO. Unter Verwendung von Verdünnungsschritten, die üblicherweise zwischen 1:2,5 und 1:10 lagen, wurde so eine Hemmstoffverdünnung hergestellt, die 50-fach höher konzentriert war als im Assay gewünscht. Die weitere Verdünnung auf die gewünschte Endkonzentration im Test erfolgte durch die übrigen Komponenten des Testansatzes (siehe auch Abschnitte J.2.3.2.5/J.2.3.2.6).

#### **J.2.3.2.3 Homogenatverdünnung**

Das, wie in Abschnitt J.2.3.2.1 beschrieben, gewonnene Enzymhomogenat wurde mit CYP17-Puffer verdünnt. Zur Bestimmung eines passenden Verdünnungsfaktors wurde ein Aktivitätstest ohne Hemmstoffzugabe analog zu den in Abschnitt J.2.3.2.5 bzw. J.2.3.2.6 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Dazu wurden verschieden konzentrierte Homogenatverdünnungen hergestellt. Zur Verwendung im Assay wurde eine Homogenatverdünnung gewählt, die einen Substratumsatz von etwa 15-25 % gewährleistete.

#### **J.2.3.2.4 NADPH regenerierendes System**

Das verwendete NADPH regenerierende System bestand aus drei Komponenten, die erst kurz vor Verwendung zusammengegeben wurden. Es wurden gemischt: ein Teil 23 mM NADP Lösung in CYP17-Puffer, ein Teil Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (27,5 U/mL in CYP17-Puffer) und zwei Teile 100 mM Glucose-6-phosphat Lösung in CYP17-Puffer.

#### **J.2.3.2.5 17 $\alpha$ -Hydroxylase Assaydurchführung**

Die Bestimmung der 17 $\alpha$ -Hydroxylaseaktivität bzw. -hemmung erfolgte mittels Messung der Umwandlung von P<sub>5</sub> in 17OH-P<sub>5</sub> durch CYP17A1. Ein Ansatz aus 140  $\mu$ L CYP17-Puffer, 50  $\mu$ L NADPH regenerierendem System, 5  $\mu$ L Substratlösung (25  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-P<sub>5</sub>) und 5  $\mu$ L Hemmstofflösung in DMSO (Kontrollen enthielten die gleichen Menge DMSO ohne Hemmstoff) wurde 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ L Enzymhomogenat gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ L 1 N HCl gestoppt. Durch Zugabe von 1000  $\mu$ L Ethylacetat und 10-minütiges, heftiges Schütteln wurden die Steroide extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 15.000 g) wurden 900  $\mu$ L der organischen Phase in ein frisches Röhrchen mit 250  $\mu$ L CYP17-Puffer und 50  $\mu$ L 1 N HCl überführt. Der Schüttel- und der

Zentrifugationsschritt wurden noch ein weiteres Mal wie beschrieben wiederholt. 800 µL der Ethylacetatlösung wurden in einem frischen Röhrchen bis zur Trockne eingedampft und in 40 µL Acetonitril/Wasser Mischung (1+1) zur HPLC Analyse aufgenommen.

#### **J.2.3.2.6 C<sub>17,20</sub>-Lyase Assaydurchführung**

Die Bestimmung der C<sub>17,20</sub>-Lyaseaktivität bzw. -hemmung erfolgte mittels Messung der Umsetzung von 17OH-P<sub>5</sub> in DHEA durch CYP17A1. Das Substrat wurde in einem ersten Inkubationsschritt von CYP17A1 selbst *in situ* aus P<sub>5</sub> generiert. Der Assay wurde wie folgt durchgeführt:

Ein Ansatz aus 140 µL CYP17-Puffer, 50 µL NADPH regenerierendem System und 5 µL Substratlösung (25 µM [<sup>3</sup>H]-P<sub>5</sub>) wurde 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µL Enzymhomogenat gestartet. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C wurden 98 µL der Reaktionsmischung mit 25 µL 1 N HCl gemischt, um die enzymatische Reaktion abzustoppen („Testlösung A“). Weitere 98 µL Reaktionsmischung wurden in einem frischen Röhrchen mit 2 µL Hemmstofflösung in DMSO (Kontrollen enthielten die gleichen Menge DMSO ohne Hemmstoff) gemischt. Diese Mischung wurde weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von 25 µL 1 N HCl gestoppt („Testlösung B“). Durch Zugabe von 500 µL Ethylacetat und 10-minütiges, heftiges Schütteln wurden die Steroide extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 15.000 g) wurden 470 µL der organischen Phase in ein frisches Röhrchen mit 125 µL CYP17-Puffer und 25 µL 1 N HCl überführt. Der Schüttel- und der Zentrifugationsschritt wurden noch ein weiteres Mal wie beschrieben wiederholt. 400 µL der Ethylacetatlösung wurden in einem frischen Röhrchen bis zur Trockne eingedampft und in 40 µL Acetonitril/Wasser Mischung (3+2) zur HPLC Analyse aufgenommen.

Die Auswertung der Enzymaktivität bzw. -hemmung erfolgte anhand des Verhältnisses des DHEA Umsatzes in den Testlösungen A und B.

### **J.2.3.3 Inkubation mit S9 Fraktion aus humaner Leber**

#### **J.2.3.3.1 NADPH regenerierendes System**

Das für die Versuche mit S9 Fraktion verwendete NADPH regenerierende System bestand aus drei Komponenten, die erst kurz vor Verwendung zusammengegeben wurden. Es wurden gemischt: ein Teil 40 mM NADP Lösung in KP-Puffer pH 7,4, ein Teil Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (200 U/mL in KP-Puffer pH 7,4) und zwei Teile 100 mM Glucose-6-phosphat Lösung in KP-Puffer pH 7,4.

### J.2.3.3.2 Assaydurchführung

Der Assay wurde in 1,5 mL Eppendorf Reagiergefäßen durchgeführt. Testansätze, in denen Phase I und Phase II Reaktionen betrachten sollten, enthielten:

KP-Puffer	20 µL
PAPS (0,5 mM)	20 µL
NADPH regenerierendes System	20 µL
Magnesiumchlorid-Lösung (50 mM)	20 µL
S9 Fraktion (10 mg/mL in KP-Puffer)	10 µL

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µL Substratlösung (12,5 µM) gestartet. Die Proben wurden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Testansätze, die ausschließlich Phase I Reaktionen betrachten sollten, enthielten kein PAPS. Testansätze, die ausschließlich Phase II Reaktionen betrachten sollten, enthielten kein NADPH regenerierendes System. Statt dieser Co-Faktoren wurde 20 µL KP-Puffer zugegeben.

Die Reaktion wurde nach den vorher festgelegten Inkubationszeiten durch Zugabe von 200 µL kaltem Acetonitril und heftigem Schütteln gestoppt. Nach 10-minütigem Schütteln und anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 17.000 g wurden 200 µL Überstand entnommen und in einem frischen Reagiergefäß eingedampft. Nach Aufnahme in 40 µL Acetonitril-Wasser-Gemisch (45+55) wurde die HPLC Analytik mit der HPLC Methode für SH-SY5Y Experimente durchgeführt.

## K Referenzen

- [1] **G.P. Moss** Nomenclature of Steroids. *Pure & Appl. Chem.* 61 (1989) 1783-1822.
- [2] **J.F. Dunn, B.C. Nisula, D. Rodbard** Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 Endogenous Steroids to Both Testosterone-Binding Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53 (1981) 58-68.
- [3] **J.B. Adams, D. McDonald** Enzymic synthesis of steroid sulphates XII. Isolation of dehydroepiandrosterone sulphotransferase from human adrenals by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 567 (1979) 144-153.
- [4] **J.B. Adams, J. Low** Enzymic synthesis of steroid sulphates: X. Isolation of oestrogen sulphotransferase from bovine placenta and comparison of its properties with adrenal oestrogen sulphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 370 (1974) 189-196.
- [5] **H. Gronemeyer, J.-A. Gustafsson, V. Laudet** Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 950-964.
- [6] **L. Träger**, Steroidhormone, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1977).
- [7] **Y. Ma, H. Guo, L. Zhang, L. Tao, A. Yin, Z. Liu, Y. Li, H. Dong, L. Xiong, W. Hou** Estrogen replacement therapy-induced neuroprotection against brain ischemia-reperfusion injury involves the activation of astrocytes via estrogen receptor  $\beta$ . *Sci Rep* 6 (2016) 21467.
- [8] **W.L. Miller** Minireview: Regulation of Steroidogenesis by Electron Transfer. *Endocrinology* 146 (2005) 2544-2550.
- [9] **M. Sono, M.P. Roach, E.D. Coulter, J.H. Dawson** Heme-Containing Oxygenases. *Chemical Reviews* 96 (1996) 2841-2888.
- [10] **R.J. Auchus, T.C. Lee, W.L. Miller** Cytochrome  $b_5$  Augments the 17,20-Lyase Activity of Human P450c17 without Direct Electron Transfer. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3158-3165.
- [11] **C.E. Fardella, D.W. Hum, J. Homoki, W.L. Miller** Point mutation of Arg440 to His in cytochrome P450c17 causes severe 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 160-164.
- [12] **R.C. Kok, M.A. Timmerman, K.P. Wolffenbuttel, S.L.S. Drop, F.H. de Jong** Isolated 17,20-Lyase Deficiency due to the Cytochrome  $b_5$  Mutation W27X. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (2010) 994-999.
- [13] **V. Pezzi, J.M. Mathis, W.E. Rainey, B.R. Carr** Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87 (2003) 181-189.

- [14] **M. Nishimura, H. Yaguti, H. Yoshitsugu, S. Naito, T. Satoh** Tissue Distribution of mRNA Expression of Human Cytochrome P450 Isoforms Assessed by High-Sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR. *YAKUGAKU ZASSHI* 123 (2003) 369-375.
- [15] **G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel**, Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1999).
- [16] **H. Sasano, J.I. Mason, N. Sasano** Immunohistochemical study of cytochrome P-45017 $\alpha$  in human adrenocortical disorders. *Hum. Patol.* 20 (1989) 113-117.
- [17] **H. Gray**, Anatomy of the Human Body, Lea & Febiger 1918; Bartleby.com, 2000. [www.bartleby.com/107/](http://www.bartleby.com/107/). [abgerufen am 15.10.2014], Philadelphia (1918).
- [18] **D.H. Abbott, I.M. Bird** Nonhuman primates as models for human adrenal androgen production: Function and dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord* 10 (2009).
- [19] **J.S. Gell, B.R. Carr, H. Sasano, B. Atkins, L. Margraf, J.I. Mason, W.E. Rainey** Adrenarche Results from Development of a 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-Deficient Adrenal Reticularis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 3695-3701.
- [20] **T. Yanase, H. Sasano, T. Yubisui, Y. Sakai, R. Takayanagi, H. Nawata** Immunohistochemical Study of Cytochrome b5 in Human Adrenal Gland and in Adrenocortical Adenomas from Patients with Cushing's Syndrome. *Endocr. J.* 45 (1998) 89-95.
- [21] **SRD5A1** [www.uniprot.org/uniprot/P18405](http://www.uniprot.org/uniprot/P18405), abgerufen am 07.02.2015.
- [22] **SRD5A2** [www.uniprot.org/uniprot/P31213](http://www.uniprot.org/uniprot/P31213), abgerufen am 07.02.2015.
- [23] **A.E. Thigpen, R.I. Silver, J.M. Guileyaro, L. Casey, J.D. McConnell, D.W. Russell** Tissue Distribution and Ontogeny of Steroid 5 $\alpha$ -Reductase Isozyme Expression. *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 903-910.
- [24] **SRD5A3** [www.uniprot.org/uniprot/Q9H8P0](http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H8P0), abgerufen am 07.02.2015.
- [25] **M. Uemura, K. Tamura, S. Chung, S. Honma, A. Okuyama, Y. Nakamura, H. Nakagawa** Novel 5 $\alpha$ -steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Science* 99 (2008) 81-86.
- [26] **Y.J. Abul-Hajj** Stereospecificity of hydrogen transfer from NADPH by steroid  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ - and  $\Delta^4$ -5 $\beta$ -reductase. *Steroids* 20 (1972) 215-222.
- [27] **B. Houston, G.D. Chisholm, F.K. Habib** A kinetic analysis of the 5 $\alpha$ -reductases from human prostate and liver. *Steroids* 49 (1987) 355-369.
- [28] **X. Li, C. Chen, S.M. Singh, F. Labire** The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase. *Steroids* 60 (1995) 430-441.

- [29] **P.B. Grino, J.E. Griffin, J.D. Wilson** Testosterone at High Concentrations Interacts with the Human Androgen Receptor Similarly to Dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126 (1990) 1165-1172.
- [30] **D.W.W. Newling** Issues with the Use of Prostate-Specific Antigen as a Surrogate End Point in Hormone-Resistant Prostate Cancer. *European Urology Supplements* 8 (2009) 13-19.
- [31] **K. Aktories, U. Förstermann, F.B. Hoffmann, K. Starke**, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Ausgabe, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München (2009).
- [32] **H. Lepor** Pathophysiology, Epidemiology, and Natural History of Benign Prostatic Hyperplasia. *Rev Urol* 6, Suppl. 9 (2004) S3-S10.
- [33] Leitlinie zur Therapie des benignen Prostatasyndroms der Qualität S2e, Arbeitskreis Benignes Prostatasyndrom (AK BPS) der Akademie der Deutschen Urologen, Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., Berufsverband der Deutschen Urologen e.V., (2014).
- [34] **D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavec, H.J. Roth**, Medizinische Chemie, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (2005).
- [35] **P. Narayan, A. Tewari** Overview of  $\alpha$ -Blocker Therapy for Benign Prostatic Hyperplasia. *Urology* 51 (1998) 38-45.
- [36] **C.G. Roehrborn, P. Boyle, J.C. Nickel, K. Hoefner, G. Andriole** Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5-alpha-reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 60 (2002) 434-441.
- [37] **J.C. Nickel, Y. Fradet, R.C. Boake, P.J. Pommerville, J.P. Perreault, S.K. Afridi, M.M. Elhilali** Efficacy and safety of finasteride therapy for benign prostatic hyperplasia: results of a 2-year randomized controlled trial (the PROSPECT study). PROscar Safety Plus Efficacy Canadian Two year Study. *Can Med Assoc J* 155 (1996) 1251-1259.
- [38] Fachinformation Avodart<sup>®</sup> 0,5 mg Weichkapseln (Wirkstoff: Dutasterid), GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, (Oktober 2014).
- [39] Fachinformation Finasterid AbZ 5 mg Filmtabletten (Wirkstoff: Finasterid), AbZ-Pharma GmbH, (Januar 2016).
- [40] Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin (2012).
- [41] Todesursachen in Deutschland, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden (2012).
- [42] Cancer Facts & Figures 2013, American Cancer Society, Atlanta (2013).

- [43] **H. Shimizu, R.K. Ross, L. Bernstein, R. Yatani, B.E. Henderson, T.M. Mack** Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br. J. Cancer* 63 (1991) 963-966.
- [44] **J.S. de Bono, H.I. Scher, R.B. Montgomery, C. Parker, M.C. Miller, H. Tissing, G.V. Doyle, L.W.W.M. Terstappen, K.J. Pienta, D. Raghavan** Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 6302-6309.
- [45] **G. Attard, A.H. Reid, T.A. Yap, F. Raynaud, M. Dowsett, S. Settatree, M. Barrett, C. Parker, V. Martins, E. Folkerd, J. Clark, C.S. Cooper, S.B. Kaye, D. Dearnaley, G. Lee, J.S. de Bono** Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven. *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 4563-4571.
- [46] **M.A. Titus, M.J. Schell, F.B. Lih, K.B. Tomer, J.L. Mohler** Testosterone and Dihydrotestosterone Tissue Levels in Recurrent Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 4653-4657.
- [47] **J.A. Locke, E.S. Guns, A.A. Lubik, H.H. Adomat, S.C. Hendy, C.A. Wood, S.L. Ettinger, M.E. Gleave, C.C. Nelson** Androgen Levels Increase by Intratumoral De novo Steroidogenesis during Progression of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Res.* 68 (2008) 6407-6415.
- [48] **M.-E. Taplin, G.J. Bubley, T.D. Shuster, M.E. Frantz, A.E. Spooner, G.K. Ogata, H.N. Keer, S.P. Balk** Mutation of the Androgen-Receptor Gene in Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1393-1398.
- [49] **J. Veldscholte, C. Ris-Stalpers, G.G.J.M. Kuiper, G. Jenster, C. Berrevoets, E. Claassen, H.C.J. van Rooij, J. Trapman, A.O. Brinkmann, E. Mulder** A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 534-540.
- [50] **C.J. Ryan, S. Halabi, S.-S. Ou, N.J. Vogelzang, P. Kantoff, E.J. Small** Adrenal Androgen Levels as Predictors of Outcome in Prostate Cancer Patients Treated with Ketoconazole Plus Antiandrogen Withdrawal: Results from a Cancer and Leukemia Group B Study. *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 2030-2037.
- [51] European Medicines Agency recommends suspension of marketing authorisations for oral ketoconazole, European Medicines Agency, (Press Release EMA/458028/2013).

- [52] **G. Attard, A.H. Reid, R. A'Hern, C. Parker, N.B. Oommen, E. Folkerd, C. Messiou, L.R. Molife, G. Maier, E. Thompson, D. Olmos, R. Sinha, G. Lee, M. Dowsett, S.B. Kaye, D. Dearnaley, T. Kheoh, A. Molina, J.S. de Bono** Selective inhibition of CYP17 with abiraterone acetate is highly active in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 3742-3748.
- [53] **A.H. Reid, G. Attard, D.C. Danila, N.B. Oommen, D. Olmos, P.C. Fong, L.R. Molife, J. Hunt, C. Messiou, C. Parker, D. Dearnaley, J.F. Swennenhuis, L.W. Terstappen, G. Lee, T. Kheoh, A. Molina, C.J. Ryan, E. Small, H.I. Scher, J.S. de Bono** Significant and sustained antitumor activity in post-docetaxel, castration-resistant prostate cancer with the CYP17 inhibitor abiraterone acetate. *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1489-1495.
- [54] **C.J. Ryan, M.R. Smith, K. Fizazi, F. Saad, P.F.A. Mulders, C.N. Sternberg, K. Miller, C.J. Logothetis, N.D. Shore, E.J. Small, J. Carles, T.W. Flaig, M.-E. Taplin, C.S. Higano, P. de Souza, J.S. de Bono, T.W. Griffin, P. De Porre, M.K. Yu, Y.C. Park, J. Li, T. Kheoh, V. Naini, A. Molina, D.E. Rathkopf** Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 16 (2015) 152-160.
- [55] **K. Fizazi, H.I. Scher, A. Molina, C.J. Logothetis, K.N. Chi, R.J. Jones, J.N. Staffurth, S. North, N.J. Vogelzang, F. Saad, P. Mainwaring, S. Harland, O.B. Goodman Jr, C.N. Sternberg, J.H. Li, T. Kheoh, C.M. Haqq, J.S. de Bono** Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 13 (2012) 983-992.
- [56] **C.J. Ryan, M.R. Smith, L. Fong, J.E. Rosenberg, P. Kantoff, F. Raynaud, V. Martins, G. Lee, T. Kheoh, J. Kim, A. Molina, E.J. Small** Phase I clinical trial of the CYP17 inhibitor abiraterone acetate demonstrating clinical activity in patients with castration-resistant prostate cancer who received prior ketoconazole therapy. *J Clin Oncol* 28 (2010) 1481-1488.
- [57] **D.C. Danila, M.J. Morris, J.S. de Bono, C.J. Ryan, S.R. Denmeade, M.R. Smith, M.E. Taplin, G.J. Bubley, T. Kheoh, C. Haqq, A. Molina, A. Anand, M. Koscuizska, S.M. Larson, L.H. Schwartz, M. Fleisher, H.I. Scher** Phase II multicenter study of abiraterone acetate plus prednisone therapy in patients with docetaxel-treated castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1496-1501.

- [58] **M.A. Levy, M. Brandt, K.M. Sheedy, J.T. Dinh, D.A. Holt, L.M. Garrison, D.J. Bergsma, B.W. Metcalf** Epristeride is a selective and specific uncompetitive inhibitor of human steroid 5 $\alpha$ -reductase isoform 2. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 48 (1994) 197-206.
- [59] **G.A. Potter, S.E. Barrie, M. Jarman, M.G. Rowlands** Novel steroidal inhibitors of human cytochrome P45017 alpha (17 alpha-hydroxylase-C17,20-lyase): potential agents for the treatment of prostatic cancer. *J. Med. Chem.* 38 (1995) 2463-2471.
- [60] **S. Haidar, P.B. Ehmer, R.W. Hartmann** Novel steroidal pyrimidyl inhibitors of P450 17 (17 alpha-hydroxylase/C17-20-lyase). *Arch Pharm (Weinheim)* 334 (2001) 373-374.
- [61] **V.D. Handratta, T.S. Vasaitis, V.C. Njar, L.K. Gediya, R. Kataria, P. Chopra, D. Newman, Jr., R. Farquhar, Z. Guo, Y. Qiu, A.M. Brodie** Novel C-17-heteroaryl steroidal CYP17 inhibitors/antiandrogens: synthesis, in vitro biological activity, pharmacokinetics, and antitumor activity in the LAPC4 human prostate cancer xenograft model. *J Med Chem* 48 (2005) 2972-2984.
- [62] **T. Vasaitis, A. Belosay, A. Schayowitz, A. Khandelwal, P. Chopra, L.K. Gediya, Z. Guo, H.-B. Fang, V.C.O. Njar, A.M.H. Brodie** Androgen receptor inactivation contributes to antitumor efficacy of 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase inhibitor 3 $\beta$ -hydroxy-17-(1H-benzimidazole-1-yl)androst-5,16-diene in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (2008) 2348-2357.
- [63] **R.D. Bruno, T.D. Gover, A.M. Burger, A.M. Brodie, V.C.O. Njar** 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20 lyase inhibitor VN/124-1 inhibits growth of androgen-independent prostate cancer cells via induction of the endoplasmic reticulum stress response. *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (2008) 2828-2836.
- [64] Fachinformation Zytiga<sup>®</sup> 250 mg Tabletten (Wirkstoff: Abirateronacetat), Janssen-Cilag International NV, (November 2014).
- [65] **T.U. Hutschenreuter, P.B. Ehmer, R.W. Hartmann** Synthesis of Hydroxy Derivatives of Highly Potent Non-steroidal CYP 17 Inhibitors as Potential Metabolites and Evaluation of their Activity by a Non Cellular Assay using Recombinant Human Enzyme. *J Enzyme Inhib Med Chem* 19 (2004) 17-32.
- [66] **P.B. Ehmer, J. Jose, R.W. Hartmann** Development of a simple and rapid assay for the evaluation of inhibitors of human 17 $\beta$ -hydroxylase-C17,20-lyase (P450c17) by coexpression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in Escherichia coli. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75 (2000) 57-63.

- [67] **B.G. Wachall, M. Hector, Y. Zhuang, R.W. Hartmann** Imidazole substituted biphenyls: A new class of highly potent and in vivo active inhibitors of P450 17 as potential therapeutics for treatment of prostate cancer. *Bioorg. Med. Chem.* 7 (1999) 1913-1924.
- [68] **Y. Zhuang, B.G. Wachall, R.W. Hartmann** Novel imidazolyl and triazolyl substituted biphenyl compounds: synthesis and evaluation as nonsteroidal inhibitors of human 17 $\alpha$ -hydroxylase-C17, 20-Lyase (P450 17). *Bioorg. Med. Chem.* 8 (2000) 1245-1252.
- [69] **F. Leroux, T.U. Hutschenreuter, C. Charrière, R. Scopelliti, R.W. Hartmann** N-(4-Biphenylmethyl)imidazoles as Potential Therapeutics for the Treatment of Prostate Cancer: Metabolic Robustness Due to Fluorine Substitution? *Helv. Chim. Acta* 86 (2003) 2671-2686.
- [70] **Q. Hu, M. Negri, S. Olgen, R.W. Hartmann** The Role of Fluorine Substitution in Biphenyl Methylene Imidazole-Type CYP17 Inhibitors for the Treatment of Prostate Carcinoma. *ChemMedChem* 5 (2010) 899-910.
- [71] **U.E. Hille, Q. Hu, C. Vock, M. Negri, M. Bartels, U. Müller-Vieira, T. Lauterbach, R.W. Hartmann** Novel CYP17 inhibitors: Synthesis, biological evaluation, structure-activity relationships and modelling of methoxy- and hydroxy-substituted methyleneimidazolyl biphenyls. *Eur J Med Chem* 44 (2009) 2765-2775.
- [72] **Q. Hu, M. Negri, K. Jahn-Hoffmann, Y. Zhuang, S. Olgen, M. Bartels, U. Müller-Vieira, T. Lauterbach, R.W. Hartmann** Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of methylene imidazole substituted biaryls as inhibitors of human 17 $\alpha$ -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17)-Part II: Core rigidification and influence of substituents at the methylene bridge. *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 7715-7727.
- [73] **Q. Hu, C. Jagusch, U.E. Hille, J. Hauptenthal, R.W. Hartmann** Replacement of Imidazolyl by Pyridyl in Biphenylmethylenes Results in Selective CYP17 and Dual CYP17/CYP11B1 Inhibitors for the Treatment of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5749-5758.
- [74] **Q. Hu, L. Yin, C. Jagusch, U.E. Hille, R.W. Hartmann** Isopropylidene Substitution Increases Activity and Selectivity of Biphenylmethylene 4-Pyridine Type CYP17 Inhibitors. *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5049-5053.
- [75] **M.A.E. Pinto-Bazurco Mendieta, M. Negri, C. Jagusch, U. Müller-Vieira, T. Lauterbach, R.W. Hartmann** Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of Abiraterone Analogues: Novel CYP17 Inhibitors for the Treatment of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* 51 (2008) 5009-5018.
- [76] **M.A.E. Pinto-Bazurco Mendieta, M. Negri, Q. Hu, U.E. Hille, C. Jagusch, K. Jahn-Hoffmann, U. Müller-Vieira, D. Schmidt, T. Lauterbach, R.W. Hartmann** CYP17

- Inhibitors. Annulations of Additional Rings in Methylene Imidazole Substituted Biphenyls: Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modelling. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 341 (2008) 597-609.
- [77] **A. Alzheimer** Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr Psychiatr* 64 (1907) 146-148.
- [78] **C.P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P.R. Menezes, E. Rimmer, M. Scazufca, I. Alzheimer's Disease** Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366 (2005) 2112-2117.
- [79] **Alzheimer's Association** 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 10 (2014) e47-e92.
- [80] **W.F.A. den Dunnen, W.H. Brouwer, E. Bijlard, J. Kamphuis, K. van Linschoten, E. Eggens-Meijer, G. Holstege** No disease in the brain of a 115-year-old woman. *Neurobiol. Aging* 29 (2008) 1127-1132.
- [81] **F. Olsson, S. Schmidt, V. Althoff, L.M. Munter, S. Jin, S. Rosqvist, U. Lendahl, G. Multhaup, J. Lundkvist** Characterization of Intermediate Steps in Amyloid Beta (A $\beta$ ) Production under Near-native Conditions. *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 1540-1550.
- [82] **V. Wilquet, B.D. Strooper** Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14 (2004) 582-588.
- [83] **D.J. Selkoe** The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6 (1991) 487-498.
- [84] **J.A. Hardy, G.A. Higgins** Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256 (1992) 184-185.
- [85] **S. Hauptmann, U. Keil, I. Scherping, A. Bonert, A. Eckert, W.E. Müller** Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 668-673.
- [86] **H.W. Querfurth, F.M. LaFerla** Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 329-344.
- [87] **K. Hensley, J.M. Carney, M.P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J.F. Wu, R.A. Floyd, D.A. Butterfield** A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 3270-3274.
- [88] **A. Cardounel, W. Regelson, M. Kalimi** Dehydroepiandrosterone Protects Hippocampal Neurons Against Neurotoxin-Induced Cell Death: Mechanism of Action. *Exp. Biol. Med.* 222 (1999) 145-149.

- [89] **M. Napolitano, L. Costa, R. Piacentini, C. Grassi, A. Lanzone, A. Gulino** 17 $\beta$ -Estradiol protects cerebellar granule cells against  $\beta$ -amyloid-induced toxicity via the apoptotic mitochondrial pathway. *Neurosci. Lett.* 561 (2014) 134-139.
- [90] **A. Jayaraman, J.C. Carroll, T.E. Morgan, S. Lin, L. Zhao, Jason M. Arimoto, M.P. Murphy, T.L. Beckett, C.E. Finch, R.D. Brinton, C.J. Pike** 17 $\beta$ -Estradiol and Progesterone Regulate Expression of  $\beta$ -Amyloid Clearance Factors in Primary Neuron Cultures and Female Rat Brain. *Endocrinology* 153 (2012) 5467-5479.
- [91] **S. Aggarwal, S. Thareja, T.R. Bhardwaj, J. Haupenthal, R.W. Hartmann, M. Kumar** Synthesis and biological evaluation of novel unsaturated carboxysteroids as human 5 $\alpha$ -reductase inhibitors: A legitimate approach. *European Journal of Medicinal Chemistry* 54 (2012) 728-739.
- [92] **I.A. McDonald, P.L. Nyce, D.M. Muench, C.A. Gates, T.R. Blohm, M.E. Laughlin, P.M. Weintraub** Inhibition of steroid 5 $\alpha$ -reductase by "inverted", competitive inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 4 (1994) 847-851.
- [93] **M.A. Levy, M. Brandt, J.R. Heys, D.A. Holt, B.W. Metcalf** Inhibition of rat liver steroid 5.alpha.-reductase by 3-androstene-3-carboxylic acids: mechanism of enzyme-inhibitor interaction. *Biochemistry* 29 (1990) 2815-2824.
- [94] **B.W. Metcalf, D.A. Holt, M.A. Levy, J.M. Erb, J.I. Heaslip, M. Brandt, H.-J. Oh** Potent inhibition of human steroid 5 $\alpha$ -reductase (EC 1.3.1.30) by 3-androstene-3-carboxylic acids. *Bioorg Chem* 17 (1989) 372-376.
- [95] **R. Boscolo-Berto, G. Viel, S. Montagnese, D.I. Raduazzo, S.D. Ferrara, Y. Dauvilliers** Narcolepsy and effectiveness of gamma-hydroxybutyrate (GHB): A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sleep Med Rev* 16 (2012) 431-443.
- [96] **W.G. Ondo, T. Perkins, T. Swick, et al.** Sodium oxybate for excessive daytime sleepiness in parkinson disease: An open-label polysomnographic study. *Arch. Neurol.* 65 (2008) 1337-1340.
- [97] **A. Ottani, S. Saltini, M. Bartiromo, D. Zaffe, A. Renzo Botticelli, A. Ferrari, A. Bertolini, S. Genedani** Effect of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in two rat models of focal cerebral damage. *Brain Research* 986 (2003) 181-190.
- [98] **M.L. Barbaccia, G. Colombo, D. Affricano, M.A.M. Carai, G. Vacca, S. Melis, R.H. Purdy, G.L. Gessa** GABAB receptor-mediated increase of neurosteroids by  $\gamma$ -hydroxybutyric acid. *Neuropharmacology* 42 (2002) 782-791.
- [99] **G. Wendt, V. Kemmel, C. Patte-Mensah, B. Uring-Lambert, A. Eckert, M.J. Schmitt, A.G. Mensah-Nyagan** Gamma-hydroxybutyrate, acting through an anti-apoptotic

mechanism, protects native and amyloid-precursor-protein-transfected neuroblastoma cells against oxidative stress-induced death. *Neuroscience* 263 (2014) 203-215.

[100] **G. Wendt**, Assessment of neuroprotective effects of gamma-hydroxybutyrate and neurosteroids on cellular models of Alzheimer's disease [Dissertation]. Saarbrücken: Universität des Saarlandes; 2014.

[101] **L. Mateos, T. Persson, S. Kathozi, F.J. Gil-Bea, A. Cedazo-Minguez** Estrogen protects against amyloid- $\beta$  toxicity by estrogen receptor  $\alpha$ -mediated inhibition of Daxx translocation. *Neuroscience Letters* 506 (2012) 245-250.

[102] **Produktinformation S9626** - Enzyme Assay, abrufbar unter [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), aufgerufen am 13.05.13.

[103] **V. Graef, M. Fuchs** Untersuchungen zur vollständigen enzymatischen Hydrolyse von Steroidkonjugaten im Harn. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 13 (1975) 163-167.

[104] **V. Schaeffer, C. Patte-Mensah, A. Eckert, A.G. Mensah-Nyagan** Selective regulation of neurosteroid biosynthesis in human neuroblastoma cells under hydrogen peroxid-induced oxidative stress condition. *Neuroscience* 151 (2008) 758-770.

[105] **P. Guarneri, C. Cascio, T. Piccoli, F. Piccoli, R. Guarneri** Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: Neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *Journal of Neuroscience Research* 60 (2000) 656-665.

[106] **Y. Wu, R.R. Chhipa, H. Zhang, C. Ip** The antiandrogenic effect of finasteride against a mutant androgen receptor. *Cancer Biol. Ther.* 11 (2011) 902-909.

[107] **K. Yamana, F. Labrie, V. Luu-The** Human type 3 5 $\alpha$ -reductase is expressed in peripheral tissues at higher levels than types 1 and 2 and its activity is potently inhibited by finasteride and dutasteride. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2 (2010) 293-299.

[108] **M. Yamaoka, T. Hara, T. Hitaka, T. Kaku, T. Takeuchi, J. Takahashi, S. Asahi, H. Miki, A. Tasaka, M. Kusaka** Orteronel (TAK-700), a novel non-steroidal 17,20-lyase inhibitor: Effects on steroid synthesis in human and monkey adrenal cells and serum steroid levels in cynomolgus monkeys. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 129 (2012) 115-128.

[109] **D.N. Grigoryev, K. Kato, V.C.O. Njar, B.J. Long, Y.-Z. Ling, X. Wang, J. Mohler, A.M.H. Brodie** Cytochrome P450c17-Expressing Escherichia coli as a First-Step Screening System for 17 $\alpha$ -Hydroxylase- C17,20-lyase Inhibitors. *Ana. Biochem.* 267 (1999) 319-330.

[110] **P. Soucy, V. Luu-The** Conversion of pregnenolone to DHEA by human 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (P450c17). *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 3243-3247.

- [111] **S. Kominami, S. Inoue, A. Higuchi, S. Takemori** Steroidogenesis in liposomal system containing adrenal microsomal cytochrome P-450 electron transfer components. *Biochim. Biophys. Acta* 985 (1989) 293-299.
- [112] **S. Ahmed, I. Shahid, S. Dhanani, C.P. Owen** Synthesis and biochemical evaluation of a range of sulfonated derivatives of 4-hydroxybenzyl imidazole as highly potent inhibitors of rat testicular 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (P-45017 $\alpha$ ). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 4698-4701.
- [113] **L.H. Zhang, H. Rodriguez, S. Ohno, W.L. Miller** Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 10619-10623.
- [114] **A.V. Pandey, W.L. Miller** Regulation of 17,20 Lyase Activity by Cytochrome b5 and by Serine Phosphorylation of P450c17. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13265-13271.
- [115] **L. Yin, S. Lucas, F. Maurer, U. Kazmaier, Q. Hu, R.W. Hartmann** Novel Imidazol-1-ylmethyl Substituted 1,2,5,6-Tetrahydropyrrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-ones as Potent and Selective CYP11B1 Inhibitors for the Treatment of Cushing's Syndrome. *J. Med. Chem.* 55 (2012) 6629-6633.
- [116] **A.V. Krishnan, X.-Y. Zhao, S. Swami, L. Brive, D.M. Peehl, K.R. Ely, D. Feldman** A Glucocorticoid-Responsive Mutant Androgen Receptor Exhibits Unique Ligand Specificity: Therapeutic Implications for Androgen-Independent Prostate Cancer. *Endocrinology* 143 (2002) 1889-1900.
- [117] **P. Porcu, C. Sogliano, C. Ibba, M. Piredda, S. Tocco, C. Marra, R.H. Purdy, G. Biggio, A. Concas** Failure of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid both to increase neuroactive steroid concentrations in adrenalectomized-orchiectomized rats and to induce tolerance to its steroidogenic effect in intact animals. *Brain Research* 1012 (2004) 160-168.
- [118] **M.R. Theoret, Y.-M. Ning, J.J. Zhang, R. Justice, P. Keegan, R. Pazdur** The Risks and Benefits of 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitors for Prostate-Cancer Prevention. *New England Journal of Medicine* 365 (2011) 97-99.
- [119] **G.L. Andriole, D.G. Bostwick, O.W. Brawley, L.G. Gomella, M. Marberger, F. Montorsi, C.A. Pettaway, T.L. Tammela, C. Teloken, D.J. Tindall, M.C. Somerville, T.H. Wilson, I.L. Fowler, R.S. Rittmaster** Effect of Dutasteride on the Risk of Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 1192-1202.
- [120] **I.M. Thompson, P.J. Goodman, C.M. Tangen, M.S. Lucia, G.J. Miller, L.G. Ford, M.M. Lieber, R.D. Cespedes, J.N. Atkins, S.M. Lippman, S.M. Carlin, A. Ryan, C.M.**

- Szczepanek, J.J. Crowley, C.A. Coltman** The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 215-224.
- [121] **D.E. Clark** In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discov. Today* 8 (2003) 927-933.
- [122] **K.M.M. Doan, J.E. Humphreys, L.O. Webster, S.A. Wring, L.J. Shampine, C.J. Serabjit-Singh, K.K. Adkison, J.W. Polli** Passive Permeability and P-Glycoprotein-Mediated Efflux Differentiate Central Nervous System (CNS) and Non-CNS Marketed Drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303 (2002) 1029.
- [123] **C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3-25.
- [124] **N.J. Abbott** Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discov Today Technol* 1 (2004) 407-416.
- [125] **P. Garberg, M. Ball, N. Borg, R. Cecchelli, L. Fenart, R.D. Hurst, T. Lindmark, A. Mabondzo, J.E. Nilsson, T.J. Raub, D. Stanimirovic, T. Terasaki, J.O. Öberg, T. Österberg** In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol in Vitro* 19 (2005) 299-334.
- [126] **J.L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, L.S. Freedman** Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Research* 38 (1978) 3751-3757.
- [127] **W. Reichert, R.W. Hartmann, J. Jose** Stable Expression of the Human 5 $\alpha$ -Reductase Isoenzymes Type I and Type II in HEK293 Cells to Identify Dual and Selective Inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 16 (2001) 47-53.
- [128] **S. Schmitz**, Der Experimentator: Zellkultur, 3. Ausgabe, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (2011).
- [129] **M. Streiber**, Hybridinhibitoren der humanen 5 $\alpha$ -Reduktase - Ein neues Konzept zur Hemmung der 5 $\alpha$ -Reduktase Isoenzyme Typ I und Typ II. Saarbrücken: Universität des Saarlandes; 2006.

## L Danksagung

Zum Abschluss dieser Promotionsschrift ist es mir ein wichtiges Anliegen noch einmal kurz innezuhalten und die vergangenen acht Jahre, die durch die Arbeit an meiner Dissertation geprägt waren, Revue passieren zu lassen. Im Laufe dieser Jahre hat sich mein Weg mit vielen wunderbaren Menschen gekreuzt, denen ich zu großem Dank verpflichtet bin, und ohne die vieles so nicht möglich gewesen wäre. Alle diese Menschen und die mit ihnen verbundenen Geschichten hier aufzuführen würde freilich den Rahmen sprengen. Ich hoffe, dass jeder dieser Personen weiß wie sehr ich ihnen verbunden bin und bleibe, auch wenn sie in diesem Abschnitt nicht namentlich erwähnt sind.

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. Rolf W. Hartmann für die Gelegenheit, mich anhand vielfältiger Themen rund um Steroidhormone mit den vielen Facetten der präklinischen Wirkstoffforschung auseinander zu setzen. Weiter danke ich ihm für die motivierenden Gespräche und die Unterstützung bis zum Vorliegen der druckfertigen Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hans H. Maurer für die Übernahme des Koreferats.

Dr. Qingzhong Hu für die Einführung in den Arbeitskreis, die Betreuung des CYP17A1 Lyase Hemmstoff Projekts und die stets schnelle und wertvolle Unterstützung beim Verfassen der hier eingeflossenen Publikation.

Dr. Stefan Boettcher für die Einführung in die Welt der HPLC und LC-MS/MS, die vielen guten Gespräche und die vielen, vielen kurzweiligen Trainingseinheiten im Fitklusiv.

Dr. Guillaume Wendt für die Zusammenarbeit zum Thema Gammahydroxybuttersäure und den wertvollen Austausch während der Auszeiten im AC.

Dr. Martin Frotscher für die Leitung des Praktikums "Instrumentelle Analytik", sein offenes Ohr und seine aufmunternden Worte in schwierigen Momenten.

Dr. Ruth Werth-Brill und Dr. Christina Zimmer für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen Antworten auf die vielen biologischen Fragen.

Dr. Sabrina Rau für ihre Einführung in die Welt der Zellkultur und für das entgegengebrachte Vertrauen beim Babysitten ihrer Zellen.

Tamara "TMMP, TamPau" Paul für das Vertiefen der Kenntnisse über die Arbeit mit Zellkulturen, das Einweihen in den Karton-Trick und ihre fortwährende Hilfsbereitschaft auch in angespannten Zeiten.

Juliette „Julie“ Emmerich für die Motivation in allen Lebenslagen, die gelegentlich bitter nötigen Tritte in die richtige Richtung sowie für die vielen guten Gespräche und tollen Momente. Ohne Dich wäre ich nicht der, der diese Zeilen heute schreibt!

Dr. Stefan Hinsberger für die Zeit Rücken an Rücken in der Bürozeile, die zusammen getrunkenen "Erichs", Kaffees, Biere und Zirbenliköre sowie seinen Humor und seine Freundschaft.

Dr. Benjamin "HG" Kirsch für die unzähligen Erheiterungen, Filmzitat-Rätsel und das legen-, warte, es kommt gleich, -däre Sebastian-Meryl Bild.

Dr. Martina Fruth für die Zeit im Praktikum, die gelegentlich folgenden Feierabendweinchen und die feurigen Tänze.

Dr. Michael Heydel für die aufschlussreichen Diskussionen im Rahmen des Praktikums und die Ehre der Namenspatenschaft.

Dr. Kristina Hüsecken für die Einführung in die Saarbrücker Kinolandschaft, den schönen 7-Dinge-Abend und alles, an dem sie "Schuld" ist.

Isabelle Klein für die tolle Zeit bei uns und das wunderschöne Ständchen. Auf Englisch!

Dr. Cornelia Grombein für die immerwährende Hilfsbereitschaft und den unbarmherzig guten Ski-Unterricht.

Isabella "Bellala" Reichert für die guten Gespräche beim Eppi-Stecken im Labor und für ihre Sonnenschein-Art.

Martina Jankowski, Jeannine Jung, Jannine Ludwig, Simone Amann und Victoria Krämer für die stetige Hilfsbereitschaft und das Verbreiten guter Laune im Labor.

Martina Schwarz und Katrin Schmitt für die gute Zusammenarbeit und die tolle Organisation im Sekretariat.

Lothar Jager und Gerhard Müller für die (IT-)technische Unterstützung und die schnellen Problemlösungen.

Dr. Peter Ehmer für die guten Tipps zur LC-MS/MS Optimierung und die konstruktiven Gespräche, sei es am Stickstofftank oder beim Sushi.

Holger Schu für die Stunden auf dem Crosstrainer, die musikalischen Inspirationen und die Abende im Oishii, die alle einen wohltuenden Ausgleich zum wissenschaftlichen Alltag dargestellt haben.

Dr. Sandra Hegemann für ihren wunderbaren Führungsstil, die vielen lehrreichen Gespräche mit und ohne Nachmittags-Hysterie und den "Wiederaufbau". Ebenso Kathrin Bell für den Austausch zu Promotionsthemen und allen weiteren aktuellen Vorgesetzten und Kollegen, die mir immer die großen und kleinen Auszeiten zum Schreiben an dieser Arbeit ermöglicht haben.

Prof. em. Dr. Manfred und Waltraud Tietz für die stets ermunternden Worte und das Lehren der elementaren Regel zum Schreiben einer Dissertation.

Ute und Andreas Diehl für die Förderung meines Interesses an den Naturwissenschaften.

Carsten Büttner, Florian Kern und Sebastian Knollmann für ihre langjährige, treue Freundschaft, die unvergesslichen Besuche in Saarbrücken und die schönen Zeiten, die waren und die noch kommen werden.

Meinen Eltern Ursula und Robert, denen ich nicht genug danken kann, für ihre Liebe und Unterstützung, den Glauben an mich und die E-Mail vom 24.04.2013.

Silvia und Peter Oswald für die herzliche Aufnahme in die Familie.

Und Isabel.

Für ihren Beistand und Halt in Zeiten, in denen es scheinbar nicht voran ging, für das Ertragen meiner Launen sowie die wunderschöne Zeit zusammen, die mir immer und immer wieder Kraft zum Durchhalten gegeben hat. Und für Alles, was noch kommt.