

4,5-Diaryl-2-imidazoline als Liganden des Estrogenrezeptors:

Untersuchungen zur Synthese, Stabilität, Struktur und Pharmakologie

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Moriz von Rauch

Berlin 2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Hilger

1. Gutachter:

Prof. Dr. R. Gust

2. Gutachter:

Priv.-Doz. Dr. B. Kleuser

Datum der Disputation:

4. Juni 2003

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 1999 bis April 2003 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Gust angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. R. Gust für die Überlassung und die große Freiheit bei der Bearbeitung des interessanten, vielfältigen Themas sowie für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen,

Herrn PD Dr. B. Kleuser für die Betreuung der pharmakologischen Untersuchungen an der TGF- β -Signalkaskade,

Frau Prof. Dr. M. Schäfer-Korting für die freundliche Aufnahme in ihr Zelllabor und die Bereitstellung diverser Arbeitsgeräte,

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, die mir durch ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft eine wertvolle Unterstützung waren, insbesondere Frau S. Bergemann und Frau I. Schnautz für ihre Mitarbeit bei einigen Zelltests und Frau M. Baacke für die Mitwirkung während ihrer Ausbildungszeit,

den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie für die Aufnahme der Spektren

und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Der Estrogenrezeptor	2
1.1.1	Allgemeines	2
1.1.2	Der Aufbau der Estrogenrezeptoren	4
1.1.3	Rezeptortransformation und Genaktivierung.....	7
1.1.4	Koregulatoren und Wachstumsfaktoren	8
1.1.5	Bindungsmodus verschiedener Liganden an den Estrogenrezeptor	10
1.1.6	Verbindungen mit selektiver Wirkung an ER α bzw. ER β	15
1.2	Der transformierende Wachstumsfaktor TGF-β.....	17
1.3	Problemstellung - Auswahl der Verbindungen.....	20
2	Synthetischer Teil.....	24
2.1	Übersicht über Strukturklassen, Synthesewege und synthetisierte Verbindungen.....	24
2.2	Synthese halogen-/methoxysubstituierter Benzylalkohole und Benzaldehyde	30
2.3	Synthese der 1,2-Diamino-1,2-diarylethane	32
2.3.1	Symmetrisch substituierte (<i>1R,2S</i>)/(<i>1S,2R</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane und deren Vorstufen.....	32
2.3.1.1	Synthese des (<i>1R,2S</i>)/(<i>1S,2R</i>)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethans	32
2.3.1.2	Synthese der (<i>1R,2S</i>)/(<i>1S,2R</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane	34
2.3.2	Symmetrisch substituierte (<i>1R,2R</i>)/(<i>1S,2S</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane ..	35
2.3.3	Asymmetrisch substituierte (<i>1R,2S</i>)/(<i>1S,2R</i>)- und (<i>1R,2R</i>)/(<i>1S,2S</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane und deren Vorstufen.....	37
2.3.3.1	Synthese des <i>E/Z</i> -1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethens	37
2.3.3.2	Synthese der (<i>1R,2S</i>)/(<i>1S,2R</i>) und (<i>1R,2R</i>)/(<i>1S,2S</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane	38

2.4	Synthese der Iminoester.....	39
2.5	Synthese der Heterozyklen	40
2.5.1	Synthese der 2-Imidazoline	40
2.5.1.1	Synthese der 2-Imidazoline mit Orthoestern.....	40
2.5.1.2	Synthese der 2-Imidazoline mit Iminoestern	42
2.5.2	Synthese der 1-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline	43
2.5.2.1	Synthese der 1-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline aus 4,5-Diaryl- 2-imidazolinen.....	43
2.5.2.2	Synthese der 1-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline aus <i>N</i> -Alkyl-1,2-diamino- 1,2-diarylethanen.....	44
2.5.3	Synthese des 1,3-Dialkyl-4,5-diarylimidazoliumchlorids.....	45
2.5.4	Synthese der 2,3-Diaryltetrahydropyrroloimidazole und 2,3-Diarylhexa- hydroimidazopyridine	45
2.6	Abspaltung der Methylschutzgruppen.....	46
2.7	Synthese der 4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette.....	47
2.8	Synthese des 1-Formamido-2-amino-1,2-diarylethans	49
3	Stabilitätsuntersuchungen.....	52
3.1	Hydrolyse von 2-Imidazolin	52
3.1.1	Hydrolyse von 2-Imidazolin im Sauren	52
3.1.2	Hydrolyse von 2-Imidazolin im Alkalischen	53
3.2	HPLC-Methode zur Untersuchung der Hydrolyse von 4,5-Diaryl- 2-imidazolin.....	54
3.2.1	<i>Reversed-Phase</i> Chromatographie	54
3.2.2	Stationäre Phase	55
3.2.3	Mobile Phase	55
3.2.4	Detektion	55
3.3	HPLC-Untersuchungen von 4,5-Diaryl-2-imidazolin	56
3.3.1	HPLC-Untersuchungen von 4,5-Diaryl-2-imidazolin in PBS.....	57
3.3.2	HPLC-Untersuchungen von 4,5-Diaryl-2-imidazolin in Wasser	68

4	Strukturuntersuchungen	74
4.1	Molecular Modeling Untersuchungen	74
4.2	Ergebnisse der Strukturuntersuchungen	75
4.2.1	1,2-Diamino-1,2-diarylethane.....	75
4.2.1.1	Allgemeine Betrachtungen	75
4.2.1.2	Strukturaufklärung des Hydrolyseprodukts 100	78
4.2.2	4,5-Diaryl-2-imidazoline	80
4.2.3	1,3-Dialkyl-4,5-diarylimidazoliniumsalze.....	89
4.2.4	2,3-Diaryltetrahydropyrroloimidazole und 2,3-Diarylhexahydroimidazo- pyridine	90
5	Pharmakologische Untersuchungen am Estrogenrezeptor	94
5.1	Testsysteme.....	94
5.1.1	Relativen Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor.....	95
5.1.2	Testung der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung im Luciferase- Assay.....	95
5.1.2.1	Allgemeines	95
5.1.2.2	Ermittlung der agonistischen Wirkung.....	96
5.2	Testergebnisse	99
5.2.1	Relative Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor.....	99
5.2.1.1	1,2-Diamino-1,2-diarylethane.....	99
5.2.1.2	4,5 Diaryl-2-imidazoline und 1,3-Dialkyl-4,5-diarylimidazolinium- bromid.....	100
5.2.2	Agonistische Wirkung	101
5.2.2.1	1,2-Diamino-1,2-diarylethane.....	102
5.2.2.2	4,5 Diaryl-2-imidazoline und 1,3-Dialkyl-4,5-diarylimidazoliniumbromid	103
5.2.2.3	2,3-Diaryltetrahydropyrroloimidazole und 2,3-Diarylhexahydroimidazo- pyridine	107
5.2.3	Antagonistische Wirkung	108
5.3	Diskussion der Testergebnisse	108

6	Pharmakologische Untersuchungen an der TGF-β- Signalkaskade	122
6.1	Testsysteme	122
6.1.1	Migrations-Assay	122
6.1.2	Hemmung des Thymidineinbaus.....	123
6.1.3	MTT-Test	123
6.2	Testergebnisse.....	124
6.2.1	Migrations-Assay	124
6.2.2	Hemmung des Thymidineinbaus.....	125
6.2.3	MTT-Test	125
6.3	Diskussion der Testergebnisse.....	126
7	Zusammenfassung	128
8	Experimenteller Teil.....	132
8.1	Allgemeine Angaben	132
8.1.1	Synthetischer und analytischer Teil	132
8.1.1.1	Chemikalien	132
8.1.1.2	Verwendete Geräte.....	132
8.1.2	Biochemischer und pharmakologischer Teil.....	133
8.1.2.1	Biologisches Material.....	133
8.1.2.2	Verwendete Geräte.....	134
8.1.2.3	Verbrauchsmaterialien	134
8.1.2.4	Chemikalien und Lösungen.....	135
8.2	Synthesvorschriften – Analytische Daten.....	136
8.2.1	Synthese der symmetrisch substituierten 1,2-Diamino-1,2-diarylalkane.....	136
8.2.1.1	Benzaldehyde	136
8.2.1.1.1	2-Halo-4-methoxybenzaldehyde	136
8.2.1.1.2	2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd	140
8.2.1.2	(<i>1R,2S</i>)/(<i>1S,2R</i>)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan.....	141
8.2.1.3	(<i>1R,2S</i>)/(<i>1S,2R</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane	143
8.2.1.4	(<i>1R,2R</i>)/(<i>1S,2S</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane	147

8.2.2	Synthese der unsymmetrisch substituierten 1,2-Diamino-1,2-diaryl-ethane und ihrer Vorstufen	149
8.2.2.1	Synthese des <i>E/Z</i> -1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethens	149
8.2.2.2	(<i>1R,2S</i>)/(<i>1S,2R</i>)- und (<i>1R,2R</i>)/(<i>1S,2S</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane	151
8.2.3	Synthese der Iminoester	154
8.2.4	Synthese der 4,5-Diaryl-2-imidazoline	156
8.2.4.1	Synthese der 4,5-Diaryl-2-imidazoline mit Orthoestern	156
8.2.4.1.1	4,5-Diaryl-2-imidazoline	156
8.2.4.1.2	2-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline	159
8.2.4.2	Synthese der 4,5-Diaryl-2-imidazoline mit Iminoestern	162
8.2.4.2.1	4,5-Diaryl-2-imidazoline	162
8.2.4.2.2	2-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline	163
8.2.4.3	Synthese der 1-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline	165
8.2.4.3.1	Synthese der 1-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline aus 4,5-Diaryl-2-imidazolen	165
8.2.4.3.2	Synthese der 1-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline aus <i>N</i> -Alkyl-1,2-Diamino-1,2-diarylethanen	167
8.2.5	Synthese des 1,3-Dialkyl-4,5-diarylimidazoliniumchlorids	168
8.2.6	Synthese der 2,3-Diaryltetrahydropyrroloimidazole und 2,3-Diarylhexahydroimidazopyridine	169
8.2.7	Abspaltung der Methylschutzgruppen	172
8.2.7.1	1,2-Diamino-1,2-diarylethane	172
8.2.7.2	4,5-Diaryl-2-imidazoline	174
8.2.7.3	2-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline	178
8.2.7.4	1-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline	183
8.2.7.5	1,3-Diethyl-4,5-diarylimidazoliniumbromid	186
8.2.7.6	2,3-Diaryltetrahydropyrroloimidazole und 2,3-Diarylhexahydroimidazopyridine	186
8.2.8	Synthese der 4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette	189
8.2.9	Synthese des 1-Formamido-2-amino-1,2-diarylethans	194

8.3	HPLC-Untersuchungen	195
8.3.1	Stabilitätsuntersuchungen der 4,5-Diarylimidazoline	195
8.3.1.1	HPLC-System.....	195
8.3.1.2	Mobile Phase	195
8.3.1.3	Probenvorbereitung	196
8.3.1.4	Vermessung und Versuchsbedingungen	196
8.4	Biochemischer Teil, <i>in vitro</i>-Modelle	197
8.4.1	Estrogenrezeptoraffinitätsbestimmung.....	197
8.4.1.1	Bereitung des Cytosols aus biologischem Material	197
8.4.1.2	Bestimmung der relativen Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor	197
8.4.2	Luciferase-Assay	199
8.4.2.1	Allgemeine zellbiologische Arbeitsmethoden	199
8.4.2.1.1	Die MCF-7-2a Zelllinie.....	199
8.4.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	199
8.4.2.1.3	Herstellung von ct-FCS.....	200
8.4.2.2	Testung auf estrogen Wirkung im Luciferase-Assay	200
8.4.2.2.1	Kultivierung der Zelllinie.....	200
8.4.2.2.2	Aussaat der Zellen.....	201
8.4.2.2.3	Substanzzugabe	201
8.4.2.2.5	Messung der Lumineszenz	202
8.4.2.2.6	Proteinbestimmung nach Bradford.....	203
8.4.2.3	Testung auf antiestrogene Wirkung	203
8.4.3	Untersuchungen an der TGF- β -Signalkaskade	204
8.4.3.1	Kultivierung der Keratinozyten.....	204
8.4.3.2	Migrations-Assay	204
8.4.3.3	Hemmung des Thymidineinbaus.....	206
8.4.3.4	MTT-Test	207
8.5	Röntgenkristallstrukturen der Brookhaven Protein Database	207

9	Anhang.....	210
9.1	Hydrolyseverlauf der Verbindungen in den HPLC-Untersuchungen..	210
9.2	Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen an der MCF-7-2a Zelllinie	212
9.2.1	1,2-Diamino-1,2-diarylethane.....	212
9.2.2	4,5-Diaryl-2-imidazoline und 1,3-Diethyl-4,5-diarylimidazolinium- bromid.....	214
9.2.3	2,3-Diaryltetrahydropyrroloimidazole und 2,3-Diarylhexahydroimidazo- pyridine	221
9.3	Untersuchungen an der TGF-β-Signalkaskade	222
9.3.1	Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen im Migrations-Assay	222
9.3.2	Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen der Hemmung des Thymidineinbaus	223
9.3.3	Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen im MTT-Test.....	223
10	Literatur	226

Häufig verwendete Abkürzungen:

AF-1	Aktivierungsfunktion 1 des Estrogenrezeptors
AF-2	Aktivierungsfunktion 2 des Estrogenrezeptors
DES	Diethylstilbestrol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E2	Estradiol
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen Response Element
FCS	fetales Kälberserum
HES	<i>meso</i> -Hexestrol
LBD	Ligandenbindungsdomäne
OHT	4-Hydroxytamoxifen
PBS	Phosphat Buffered Saline
RAL	Raloxifen
RBA	Relative Bindungsaffinität
RTP	Relative Transkriptionspotenz
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
SHR	Steroidhormonrezeptor
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator 1
TAF	TBP-assozierte Faktoren
TAM	Tamoxifen
TATA	Basensequenz TATAAA innerhalb des Promotors
TBP	TATA-bindendes Protein
TFII	Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II
TGF	Transforming Growth Factor
THC	(<i>R,R</i>)-Tetrahydrochrysen