

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Estrogenrezeptor	4
1.1.1	Allgemeines	4
1.1.2	Aufbau der Estrogenrezeptoren	5
1.1.3	Rezeptortransformation und Genaktivierung	7
1.1.4	Koregulatoren und Wachstumsfaktoren	10
1.1.5	Liganden des Estrogenrezeptors	11
1.1.6	Interaktion zwischen dem physiologischen Ligand E2 und der LBD des ER	13
1.1.7	Nicht-steroidale Agonisten	14
1.1.8	„Aktive“ antagonistische Wirkung	14
1.1.9	„Reiner“ Antagonismus	16
1.1.10	„Passiver“ Antagonismus	17
1.2	Die Cyclooxygenase	18
1.2.1	Allgemeines	18
1.2.2	Cyclooxygenase-1 und -2	19
1.2.3	Lokalisation	20
1.2.4	Cyclooxygenase- und Hydroperoxidase-Aktivität	20
1.2.5	Interaktion der Cyclooxygenase mit „Nonsteroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAIDs)	22
1.2.6	Cox-Inhibitoren und Tumorwachstum	26
2	Problemstellung	27
3	Synthese von <i>N,N'</i>-Bis(benzyliden)arylmethandiaminen	30
3.1	Darstellung von <i>N,N'</i> -Bis(4-methoxybenzyliden)-4-methoxyphenylmethan- diamin und <i>N,N'</i> -Bis(4-fluorbenzyliden)-4-fluorphenylmethandiamin	30
3.2	Entschützung von <i>N,N'</i> -Bis(4-methoxybenzyliden)- 4-methoxyphenylmethandiamin mit Natriumethanthiolat	31
4	Synthese von <i>meso</i>-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen	32
4.1	Synthese von <i>meso</i> -1,2-Diarylethan-1,2-diaminen	32
4.2	Synthese von Benzimidssäureethylestern	35
4.2.1	Synthese von Benzonitrilen aus Benzaldehyden	35
4.2.2	Synthese von 4-Methoxybenzimidssäureethylester aus 4-Methoxybenzonitril mit SOCl ₂ in Ethanol	36
4.2.3	Synthese von Benzimidssäureethylester Hydrotetrafluorboraten	36

4.3	Cyclisierung von meso-1,2-Diarylethan-1,2-diaminen mit Benzimidssäureethylestern zu <i>meso</i> -2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen	37
4.4	Etherspaltung von methoxylierten <i>meso</i> -2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen	38
5	Synthese von 1,2,4-tri-, 1,2,5-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten	
	1<i>H</i>-Imidazolen	40
5.1	Darstellung von 2,4,5-Triaryl-1 <i>H</i> -imidazolen und 1-Alkyl-2,4,5-triaryl-1 <i>H</i> -imidazolen	40
5.2	Synthese von 5-Ethyl-1,4-bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenyl-1 <i>H</i> -imidazol	40
5.3	Synthese von unsymmetrisch substituierten 1 <i>H</i> -Imidazolen aus <i>N</i> -Arylbenzamidinen und α -Bromketonen	41
5.4	<i>C,N</i> -Diarylamidine	44
5.4.1	Synthese von <i>C,N</i> -Diarylamidinen	44
5.4.2	Synthese von <i>N</i> -(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-4-methoxybenzamidin und <i>N</i> -(4-Chlor-2-methoxyphenyl)-4-methoxybenzamidin	46
5.5	Synthese von Ketonen und α -Bromketonen	47
5.5.1	Synthese von 1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on mit Essigsäureanhydrid	47
5.5.2	Synthese von 1-Phenylketonen und 1-Phenyl- α -bromketonen durch Friedel-Craft's-Acylierung	48
5.5.3	Darstellung von 1-Phenylketonen und 1-Phenyl- α -bromketonen aus Carbonsäuren	48
5.5.4	Bromierung von 1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on, 1-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylethan-1-on und 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on	49
5.6	Synthese von unsymmetrischen 1 <i>H</i> -Imidazolen	50
5.6.1	Cyclisierung von <i>C,N</i> -Diarylamidinen mit α -Bromketonen zu unsymmetrischen tri- und tetraarylierten 1 <i>H</i> -Imidazolen	50
5.6.2	Etherspaltung der methoxylierten 1 <i>H</i> -Imidazole (I)	51
5.6.3	Strukturaufklärung von 1,2,4-Triaryl-1 <i>H</i> -imidazolen	52
5.6.3.1	Strukturaufklärung von 1,2,4-Tris(4-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol	52
5.6.3.2	Strukturaufklärung von 2-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-5-ethyl-1,4-bis-(4-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol	57
5.6.4	Cyclisierung von <i>C,N</i> -Diarylamidinen mit Ketonen zu unsymmetrischen 1 <i>H</i> -Imidazolen in einer Einpot-Reaktion	59
5.6.5	Cyclisierung von <i>C,N</i> -Diarylamidin mit Butanal und Pentan-3-on zu unsymmetrischen, in den Positionen C(5) bzw. C(4) und C(5) alkylierten 1 <i>H</i> -Imidazolen in einer Einpot-Reaktion	59

5.6.6	Etherspaltung der methoxylierten <i>1H</i> -Imidazole (II)	60
5.6.6.1	Strukturaufklärung von 5-Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)- <i>1H</i> -imidazol und 4-Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-5-methyl- <i>1H</i> -imidazol	61
5.6.7	Cyclisierung von <i>C,N</i> -Diarylamidin mit 1-Brom-3-trifluoraceton zu 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)-4-(trifluormethyl)- <i>1H</i> -imidazol mit anschließender Demethylierung zum freien Phenol	64
5.6.7.1	Strukturuntersuchung an 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-(trifluormethyl)- <i>1H</i> -imidazol	64
5.6.8	Cyclisierung von <i>C,N</i> -Diarylamidinen mit 1-Bromindan-2-on zu 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)-4 <i>H</i> -indeno[2,3- <i>d</i>]imidazol mit anschließender Demethylierung zum freien Phenol	66
5.6.9	Cyclisierung von <i>C,N</i> -Diarylamidin mit 2-Brom-2-phenylethanal zu 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)-4-phenyl- <i>1H</i> -imidazol mit anschließender Demethylierung zum freien Phenol	66
5.6.9.1	NOESY-Untersuchung an 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-phenyl- <i>1H</i> -imidazol	67
5.6.10	Cyclisierung von 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)ethan-1-on mit dem Isomerengemisch aus <i>N</i> -(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-4-methoxybenzamidin und <i>N</i> -(4-Chlor-2-methoxyphenyl)-4-methoxybenzamidin zum Isomerengemisch der analogen <i>1H</i> -Imidazole	68
5.7	Übersicht aller Cyclisierungsexperimente von <i>C,N</i> -Diarylamidinen mit α -Bromketonen und Ketonen zu unsymmetrischen 1,2,4-Triaryl-, 5-Alkyl-1,2,4-triaryl-, 1,2,4,5-Tetraaryl-, 4,5-Dialkyl-1,2-diaryl-, 5-Alkyl-1,2-diaryl- und 4-Alkyl-1,2-diaryl- <i>1H</i> -imidazolen	71
5.8	Formulierung des Cyclisierungsmechanismus von <i>C,N</i> -Diarylamidinen mit α -Bromketonen	74
6	Synthese von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-<i>1H</i>-imidazol	76
6.1	Darstellung von <i>N</i> -(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diamin Hydrochlorid	76
6.2	Cyclisierung von <i>N</i> -(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diamin Hydrochlorid mit 4-Methoxybenzimidssäureethylester zu 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin	76
6.3	Oxidative Aromatisierung von 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin zu 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)- <i>1H</i> -imidazol	77
6.4	Darstellung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)- <i>1H</i> -imidazol	78

7	Kernresonanz-Spektroskopische Untersuchungen	79
7.1	¹ H-NMR-Signale	79
7.2	Zuordnung der ¹³ C-NMR-Signale	82
7.2.1	Zweidimensionale ¹³ C/ ¹ H-„Long-Range“, „Heteronucleare Multiple-Bond Correlation“- (HMBC) Spektroskopie von 1,2,4-Tris(4-hydroxyphenyl)- <i>1H</i> -imidazol	83
7.2.2	Zweidimensionale ¹³ C/ ¹ H-„Long-Range“, „Heteronucleare Multiple-Bond Correlation“- (HMBC) Spektroskopie von 2-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-5-ethyl-1,4-bis-(4-hydroxyphenyl)- <i>1H</i> -imidazol	83
7.2.3	¹³ C-NMR-Daten von <i>1H</i> -Imidazolen, 2-Imidazolinen, <i>C,N</i> -Diarylamidin 71a , 1,2-Diarylethan-1,2-diamin 16a und <i>N,N'</i> -Dibenzylidenaryl-methandiamin 23	87
8	UV-Spektren und Extinktionskoeffizienten von 1,2,4-tri- und 1,2,4,5-tetraarylierten <i>1H</i>-Imidazolen und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-<i>4H</i>-indeno[2,3-<i>d</i>]imidazol	91
9	Fluoreszenzspektroskopie	95
9.1	Fluoreszenzspektren von 1,2-Diaryl-, 1,2,4-Triaryl- und 1,2,4,5-Tetraaryl- <i>1H</i> -imidazolen sowie 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)- <i>4H</i> -indeno[2,3- <i>d</i>]imidazol	95
9.2	Wiederfindung von 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)- <i>1H</i> -imidazol im Lysat der Zelllinie MDA-MB 231	97
10	Pharmakologische Untersuchungen	100
10.1	Testung der agonistischen und antagonistischen Wirkung im Luciferase-Assay	100
10.1.1	Bestimmung der agonistischen Wirkung im Luciferase-Assay	100
10.1.2	Ermittlung der antagonistischen Wirkung im Luciferase-Assay	101
10.2	Bestimmung der relativen Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor	101
10.3	In vitro Cytotoxizitätstest an der MCF-7 und MDA-MB 231 Zelllinie	102
10.3.1	Die MCF-7 Zelllinie	102
10.3.2	Die MDA-MB 231 Zelllinie	103
10.4	In vitro Cytotoxizitätstest an der SUP-B15 und LAMA84 Zelllinie	103
10.5	Untersuchung auf Apoptose durch Nachweis von Einzelstrang-DNA	103
10.6	Untersuchung auf Inhibierung der Cyclooxygenase-1 und -2 Aktivität	104
11	Ergebnisse	105
11.1	Eigenschaften von <i>N,N'</i> -Bis[benzyliden]arylmethandiaminen	105

11.1.1	Agonistische und antagonistische Wirkung von <i>N,N'</i> -Bis[benzyliden]arylmethandiaminen im Luciferase-Assay	105
11.1.2	Antiproliferative Wirkung von <i>N,N'</i> -Bis[benzyliden]arylmethandiaminen auf MCF-7 Zellen	106
11.2	Eigenschaften von <i>meso</i> -2,4,5-Triaryl-2-imidazolin	107
11.2.1	Agonistische und antagonistische Wirkung von <i>meso</i> -2,4,5-Triaryl-2-imidazolin im Luciferase-Assay	107
11.2.2	Antiproliferative Wirkung von <i>meso</i> -2,4,5-Triaryl-2-imidazolin auf MCF-7 Zellen	108
11.3	Eigenschaften von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol	109
11.3.1	Agonistische und antagonistische Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol im Luciferase-Assay	109
11.3.2	Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol an MCF-7 Zellen	110
11.4	Eigenschaften von 1,2,4-tri-, 1,2,5-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten 1 <i>H</i> -Imidazolen sowie 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4 <i>H</i> -indeno[2,3- <i>d</i>]imidazol	111
11.4.1	Agonistische Wirkung von 1,2,4-Triaryl-1 <i>H</i> -imidazolen im Luciferase-Assay	112
11.4.2	Agonistische Wirkung von 1,2,4-Triaryl-5-methyl-1 <i>H</i> -imidazolen im Luciferase-Assay	112
11.4.3	Agonistische Wirkung von 1,2,4-Triaryl-5-ethyl-1 <i>H</i> -imidazolen, 5-Ethyl-2,4-bis-(4-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol und 5-Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol im Luciferase-Assay	113
11.4.4	Agonistische Wirkung von 1,2,4,5-Tetraaryl-1 <i>H</i> -imidazolen im Luciferase-Assay	116
11.4.5	Agonistische Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol mit CF ₃ -, Ethyl- und Phenylgruppen in der Position C(4) im Luciferase-Assay	116
11.4.6	Antagonistische Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4 <i>H</i> -indeno[2,3- <i>d</i>]imidazol im Luciferase-Assay	117
11.4.7	Bestimmung der relativen Bindungsaffinität von 1 <i>H</i> -Imidazolen zum Estrogenrezeptor	118

11.4.8	Antiproliferative Wirkung von chlorierten 1,2,4-Triaryl- <i>1H</i> -imidazolen an MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen	120
11.4.9	Antiproliferative Wirkung von chlorierten 1,2,4-Triaryl- <i>1H</i> -imidazolen an SUP-B15 und LAMA84 Zellen	121
11.4.10	Untersuchung auf apoptoseinduzierende Wirkung von chlorierten 1,2,4-Triaryl- <i>1H</i> -imidazolen durch Detektion von ssDNA	123
11.4.11	Inhibitorische Wirkung von chlorierten 1,2,4-Triaryl- <i>1H</i> -imidazolen an Cox-1 und Cox-2	125
12	Diskussion	127
12.1	Strukturelle Analogien zwischen 2-Imidazolinen, <i>1H</i> -Imidazolen und benzylierten Methandiaminen	127
12.2	Strukturelemente und estrogene Wirkung	129
12.2.1	<i>N,N'</i> -Bis[benzyliden]arylmethandiamine als Liganden für den Estrogenrezeptor	129
12.2.2	<i>meso</i> -Konfigurierte 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline als Liganden für den Estrogenrezeptor	130
12.2.3	<i>1H</i> -Imidazole als Liganden für den Estrogenrezeptor	138
12.2.3.1	Agonistische Interaktion	138
12.2.3.2	Antagonistische Interaktion	147
12.3	Wachstumshemmende Wirkung von chlorierten <i>1H</i> -Imidazolen an Mammakarzinom- und Leukämiezelllinien	150
12.4	Inhibitorische Wirkung von chlorierten <i>1H</i> -Imidazolen auf die Cyclooxygenase-1 und -2	152
13	Zusammenfassung	157
14	Experimenteller Teil	161
14.1	Synthetischer und analytischer Teil	161
14.1.1	Materialien und Methoden	161
14.1.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	161
14.1.1.2	Arbeitsvorschriften	162
14.1.1.2.1	<i>N,N'</i> -Bis(benzyliden)arylmethandiamine	162
14.1.1.2.2	2,4,5-Triaryl-2-imidazoline	163
14.1.1.2.3	<i>1H</i> -Imidazole	172
14.1.1.2.4	1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)- <i>1H</i> -imidazol	209
14.2	Biochemischer und pharmakologischer Teil	212
14.2.1	Materialien	212

14.2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	212
14.2.1.2	Reagenzien und Lösungen	213
14.2.1.3	Zellkulturmedien	214
14.2.1.4	Kalbsuteri	215
14.2.1.5	Zelllinien	215
14.2.2	Methoden	216
14.2.2.1	Estrogenrezeptoraffinitätsbestimmung	216
14.2.2.1.1	Cytosolgewinnung aus Kalbsuteri	216
14.2.2.1.2	Bestimmung des RBA-Werts	217
14.2.2.2	Allgemeine zellbiologische Arbeiten	218
14.2.2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	218
14.2.2.2.2	Passagieren der Zellen	218
14.2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	218
14.2.2.2.4	Zellzahlbestimmung	219
14.2.2.2.5	ct-FCS	219
14.2.2.3	Luciferase-Assay (Testung auf agonistisch und antagonistische Wirkung)	220
14.2.2.3.1	Zellanzucht	220
14.2.2.3.2	Zellaussaat	220
14.2.2.3.3	Substanzzugabe	221
14.2.2.3.4	Zelllyse	221
14.2.2.3.5	Messung der Lumineszenz	222
14.2.2.3.6	Bestimmung des Proteingehalts der Zelllysate nach Bradford	222
14.2.2.3.7	Auswertung	223
14.2.2.4	Cytotoxizitätstests	224
14.2.2.4.1	Anzucht und Aussaat der Zellen	224
14.2.2.4.2	Substanzzugabe	224
14.2.2.4.3	Aufnahme der Messpunkte bei zeitabhängiger Versuchsführung	225
14.2.2.4.4	Bestimmung der Zellmasse mit Kristallviolett	225
14.3	Messung von UV- und Fluoreszenzspektren	226
14.3.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	226
14.3.2	Aufnahme der UV-Spektren	226
14.3.3	Aufnahme der Fluoreszenzspektren	227
14.4	Untersuchung auf antiproliferative Wirkung an Zellen der SUP-B15 und LAMA84 Zelllinien sowie Untersuchung auf apoptotische Wirkung an SUP-B15, LAMA84 und MDA-MB 231 Zellen	227
14.4.1	In vitro Cytotoxizitätstest an der SUP-B15 und LAMA84 Zelllinie	227

14.4.2	Untersuchung auf Apoptose durch Nachweis von Einzelstrang-DNA	228
14.5	Untersuchung der inhibitorischen Wirkung auf Cyclooxygenase-1 und -2	228
14.6	Röntgenkristallstrukturen der Brookhaven Protein Datenbank und Molekular Modeling	228
15	Abkürzungsverzeichnis	230
16	Literaturverzeichnis	232