

**Charakterisierung vasorelaxierender Effekte von selektiven  
Estrogenrezeptor-Modulatoren unter besonderer  
Berücksichtigung von Raloxifen und d,l-N,N'-Dipropyl-1,2-  
bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethyldiamin**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
ALKJE MORITZ  
aus Berlin

September 2007



1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Heinz H. Pertz  
Institut für Pharmazie  
Freie Universität Berlin  
Königin-Luise-Straße 2+4  
14195 Berlin

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ronald Gust  
Institut für Pharmazie  
Freie Universität Berlin  
Königin-Luise-Straße 2+4  
14195 Berlin

Disputation am 30.11.2007



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 <b>Epidemiologische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen</b> .....	<b>5</b>
1.2 <b>Einfluss der Estrogene auf das kardiovaskuläre System</b> .....	<b>5</b>
1.3 <b>Estrogene</b> .....	<b>6</b>
1.3.1 Synthese, Freisetzung und Aktivierung von Estrogenen.....	8
1.4 <b>Estrogenrezeptoren</b> .....	<b>9</b>
1.4.1 Estrogenrezeptorsubtypen .....	9
1.4.2 Rezeptortransformation und Genaktivierung.....	11
1.4.3 Alternative Estrogensignalwege .....	13
1.4.3.1 Cross talk mit Wachstumsfaktoren: Liganden-unabhängige Aktivierung des ER .....	15
1.4.3.2 Estrogen-vermittelte Signalwege via Rezeptoren in der Plasmamembran..	15
1.4.4 Hemmung estrogener Effekte .....	18
1.4.4.1 Estrogenrezeptorantagonisten .....	18
1.4.4.2 Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs).....	19
1.5 <b>Einfluss der Estrogene auf die Gefäßkontraktilität</b> .....	<b>22</b>
1.5.1 Vorkommen von Estrogenrezeptoren in Blutgefäßen.....	22
1.5.2 Genomische, kardiovaskuläre Effekte von Estrogenen.....	23
1.5.3 Genomische, kardiovaskuläre Effekte von SERMs .....	24
1.5.4 Nicht-genomische, kardiovaskuläre Effekte von Estrogenen .....	24
1.5.5 Nicht-genomische, kardiovaskuläre Effekte von SERMs .....	28
1.6 <b>Zielsetzung</b> .....	<b>29</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
2.1 <b>Material</b> .....	<b>30</b>
2.1.1 Technische Geräte.....	30
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	30
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	31
2.1.4 Zubereitung der Testsubstanzen.....	33
2.2 <b>Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.2.1 Versuche an isolierten Organen.....	33
2.2.1.1 Isolierte Koronararterie des Schweins.....	33

---

2.2.1.2	Verwendete Pufferlösungen.....	34
2.2.1.3	Allgemeine Versuchsdurchführung .....	34
2.2.1.4	Untersuchung von vasorelaxierenden Effekten.....	35
2.2.1.5	Pharmakologische Charakterisierung vasorelaxierender Effekte mittels Antagonisten .....	36
2.2.1.5.1	Beteiligung klassischer Estrogenrezeptoren.....	36
2.2.1.5.2	Beteiligung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPR30 .....	36
2.2.1.5.3	Beteiligung von Kalium-Kanälen.....	37
2.2.1.5.4	Untersuchung beteiligter Signalkaskaden.....	37
2.2.1.5.5	Beteiligung intrazellulären Calciums.....	38
2.2.1.6	Untersuchung der Reversibilität vasorelaxierender Effekte.....	38
2.2.1.7	Untersuchungen im Calcium-freien Medium .....	38
2.2.1.8	Untersuchung zur Beteiligung von intrazellulären Calcium-Speichern mit Hilfe einer Koffein-induzierten Kontraktion .....	39
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.2.2.1	Extraktion zellulärer Proteine .....	40
2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	42
2.2.2.3	Proteinbestimmung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	43
2.2.2.3.1	Lösungen für die Gelelektrophorese und Western Blot-Experimente .....	43
2.2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	45
2.2.2.3.3	Western Blot.....	46
2.2.3	Datenanalyse und Statistik.....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Validierung des pharmakologischen Modells der Koronararterie des Schweins .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von 17<math>\beta</math>-Estradiol ...</b>	<b>51</b>
3.2.1	Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins.....	51
3.2.1.1	Verwendung unterschiedlicher 17 $\beta$ -Estradiol-Lösungen; Einfluss des Endothels auf die Relaxation durch 17 $\beta$ -Estradiol.....	51
3.2.1.2	Zeitabhängigkeit der Relaxation.....	52
3.2.2	Reversibilität der Relaxation durch 17 $\beta$ -Estradiol.....	52
3.2.3	Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf Calcium-Kanäle.....	53

---

3.2.4	Beteiligung von Signalkaskaden an der Relaxation durch 17 $\beta$ -Estradiol ....	55
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von Raloxifen .....</b>	<b>57</b>
3.3.1	Einfluss von Raloxifen auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins .	57
3.3.2	Reversibilität der Raloxifen-induzierten Relaxation .....	58
3.3.3	Einfluss von ICI 182,780 auf die Raloxifen-induzierte Relaxation .....	59
3.3.4	Einfluss von Raloxifen auf intrazelluläre Calcium-Kanäle .....	60
3.3.5	Einfluss von Raloxifen auf L-Typ-Calcium-Kanäle .....	60
3.3.6	Beteiligung von Signalkaskaden an der Raloxifen-induzierten Relaxation..	62
<b>3.4</b>	<b>Aspekte der Tamoxifen-induzierten Vasorelaxation .....</b>	<b>64</b>
3.4.1	Einfluss von Tamoxifen auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins.....	64
3.4.2	Einfluss von ICI 182,780 auf die Tamoxifen-induzierte Relaxation .....	65
3.4.3	Beteiligung von Signalkaskaden an der Tamoxifen-induzierten Relaxation .....	65
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der relaxierenden Effekte von <i>N,N'</i>-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen .....</b>	<b>67</b>
3.5.1	Vergleich der relaxierenden Effekte von <i>N,N'</i> -Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins .....	67
3.5.2	Kumulative Konzentrations-Wirkungskurven ausgewählter <i>N,N'</i> -Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine.....	69
3.5.3	Reversibilität der Relaxation durch d,l- <i>N,N'</i> -Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin.....	71
3.5.4	Einfluss von d,l- <i>N,N'</i> -Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin auf Kalium-Kanäle.....	72
3.5.5	Einfluss von d,l- <i>N,N'</i> -Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin auf Calcium-Kanäle.....	72
3.5.6	Beteiligung von Signalkaskaden an der Vasorelaxation durch d,l- <i>N,N'</i> -Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin .....	74
<b>3.6</b>	<b>Relaxierende Effekte von weiteren 1,2-Diarylethylendiaminen und <i>N</i>-Alkyl-2,6-dichlor-4-hydroxybenzylaminen .....</b>	<b>77</b>
3.6.1	Untersuchung der relaxierenden Effekte von <i>N,N'</i> -Dialkyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen.....	77

---

3.6.2	Untersuchung der relaxierenden Effekte von <i>N</i> -Ethyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)- und <i>N</i> -Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen ..	78
3.6.3	Untersuchung der relaxierenden Effekte von <i>N,N'</i> -Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamine .....	79
3.6.4	Untersuchung der relaxierenden Effekte von <i>N</i> -Alkyl-2,6-dichlor-4-hydroxybenzylaminen als strukturelle Bestandteile der <i>N,N'</i> -Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine .....	80
3.6.5	Vergleich der vasorelaxierenden Effekte ausgewählter Verbindungen .....	82
<b>3.7</b>	<b>Expression von GPR30 in der Koronararterie des Schweins.....</b>	<b>84</b>
<b>3.8</b>	<b>Einfluss von Pertussistoxin auf die Vasorelaxation durch Estrogene und SERMs.....</b>	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>SERMs: Eine Alternative zur Hormonersatztherapie? .....</b>	<b>87</b>
4.1.1	Einfluss des arteriosklerotischen Zustands der Gefäße auf die Vasorelaxation .....	89
<b>4.2</b>	<b>Verwendbarkeit des Modells isolierter Koronararterien des Schweins .....</b>	<b>91</b>
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von 17<math>\beta</math>-Estradiol ...</b>	<b>93</b>
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von Raloxifen .....</b>	<b>96</b>
<b>4.5</b>	<b>Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von 1,2-Diaryl-ethylendiaminen.....</b>	<b>100</b>
4.5.1	Strukturelle Abwandlungen der 1,2-Diarylethylendiamine.....	104
<b>4.6</b>	<b>Bedeutung des GPR30 für akute, estrogene Effekte .....</b>	<b>105</b>
<b>4.7</b>	<b>Vergleich der Effekte von 17<math>\beta</math>-Estradiol und SERMs.....</b>	<b>107</b>
<b>4.8</b>	<b>Ausblick: Therapeutische Verwendung von 17<math>\beta</math>-Estradiol und SERMs.....</b>	<b>107</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>142</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>144</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**

4-AP	4-Aminopyridin
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluoridhydrochlorid
AF	Transaktivierungsfunktion
AHA	<i>American Heart Association</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Aktivatorprotein-1
Aqua bidest	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure tetrakis(acetoxymethylester)
Bay K	(S)-(-)-Bay K 8644; (S)-(-)-1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluormethyl)phenyl]-3-pyridincarbonsäuremethylester
BK <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> -aktivierte, spannungsabhängige K <sup>+</sup> -Kanäle
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COS	Nierenzellen des Affen
COX	Cylooxygenase
DBD	DNA-bindende Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DES	Diethylstilbestrol
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EDHF	<i>endothelium derived hyperpolarising factor</i> (Endothel-abhängiger, hyperpolarisierender Faktor)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure

---

EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
$E_{\max}$	beobachteter Maximaleffekt
eNOS	endotheliale NOS
ER $\alpha/\beta$	Estrogenrezeptor $\alpha/\beta$
ERE	Estrogen-responsives Element
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ET-1	Endothelin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosintriphosphat
GPR30	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 30
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	<i>high density</i> -Lipoprotein
HEX	Hexestrol
HRP	Merrettich-Peroxidase
HRT	Hormonersatztherapie
HSP90	Hitzeschockprotein-90
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
ICI 182,780	7 $\alpha$ -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluorpentyl)sulfinyl]nonyl]-estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol; Fulvestrant; Faslo-dex <sup>®</sup>
iNOS	induzierbare NOS
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K <sub>ATP</sub>	ATP-sensitive K <sup>+</sup> -Kanäle
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
KHS	Krebs-Henseleit-Lösung
KT 5720	(9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>R</i> )-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo-[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-10-carbonsäurehexylester

---

KT 5823	(9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,12 <i>R</i> )-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-methoxy-2,9-dimethyl-1-oxo-9,12-epoxy-1 <i>H</i> -diindolo[1,2,3- <i>fg</i> :3',2',1'- <i>kl</i> ]pyrrolo[3,4- <i>i</i> ][1,6]benzodiazocin-10-carbonsäuremethylester
K <sub>V</sub>	spannungsabhängige K <sup>+</sup> -Kanäle
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-argininmethylester
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDL	<i>low density</i> -Lipoprotein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mER	membranständiger ER
MLC	<i>myosin light chain</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
ODQ	1 <i>H</i> -[1,2,4]Oxadiazolo[4,3- <i>a</i> ]quinoxalin-1-on
nNOS	neuronale NOS
NOS	NO-Synthase
PBS	phosphathaltige Pufferlösung
PCA	Koronararterie des Schweins
PD 98059	2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-on
PDE	Phosphodiesterase
pEC <sub>50</sub>	negativer, dekadischer Logarithmus der molaren Stoffmengenkonzentration eines Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

---

PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Ralox	Raloxifen
RNA	Ribonukleinsäure
SB 203580	4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1 <i>H</i> -imidazol
Scr	Scr-Thyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERM	Selektiver Estrogenrezeptor-Modulator
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwerts
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SQ 22536	9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9 <i>H</i> -purin-6-amin
Tamox	Tamoxifen
TATA-BOX	Basensequenz 5'-TATAAA-3'
TBS	Tris-haltige Pufferlösung
TBST	Tris-haltige Pufferlösung mit Tween 20
TGF- $\alpha$	transformierender Wachstumsfaktor $\alpha$
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol; Trometamol
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U46619	9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethanoprostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
VSM	glatte Gefäßmuskulatur
VSMC	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten und kostspieligsten Krankheiten. Sie gelten als Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen (Brezinka und Kittel, 1996).

Zu den kardiovaskulären Erkrankungen zählen alle Erkrankungen des arteriellen und venösen Systems, wie rheumatische Herzkrankheiten, Hypertonie und Hochdruckkrankheiten, ischämische Herzkrankheiten, Krankheiten des Lungenkreislaufs, sonstige Formen von Herzkrankheiten inklusive Herzinsuffizienz, Krankheiten des zerebrovaskulären Systems, Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren. In der Altersgruppe der 30- bis 50-jährigen ist das Vorkommen kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich häufiger bei Männern als bei Frauen. Die Tatsache, dass sich koronare Herzerkrankungen (KHK) bei Frauen erst durchschnittlich zehn Jahre später manifestieren als bei Männern, und die Beobachtung, dass das Risiko koronarer Herzerkrankungen bei postmenopausalen Frauen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen deutlich ansteigt, weist darauf hin, dass Estrogene möglicherweise kardioprotektiv sein könnten (Mobasserri et al., 2004).

## 1.2 Einfluss der Estrogene auf das kardiovaskuläre System

Über einen Zeitraum von etwa 20 Jahren galt die Hormonersatztherapie (HRT) mit Estrogenen und Estrogen-Progesteron-Kombinationen als protektiv gegen koronare Herzerkrankungen (Stampfer und Colditz, 1991). Zunächst konnte in Tierversuchstudien und in Beobachtungsstudien wie der *Nurses' Health Study* (NHS, USA) (Grodstein et al., 1996) ein protektiver, kardiovaskulärer Benefit der HRT nach der Menopause nachgewiesen werden (Ouyang et al., 2006). In der Theorie wirken Estrogene über zahlreiche Mechanismen kardioprotektiv. Es konnte gezeigt werden, dass die HRT einen positiven Einfluss auf die Zusammensetzung der Plasmalipide ausübt. Beispielsweise führen Estrogene zu einer Erhöhung des HDL (*high density-Lipoprotein*)-Spiegels und gleichzeitig zu einer Reduktion des LDL (*low density-Lipoprotein*)-Spiegels (Godsland, 2001). Des Weiteren konnte eine Erniedrigung des Blutdrucks, eine Verstärkung der Insulinsensitivität und ein Einfluss auf die Körperfettverteilung beobachtet werden (Walsh et al., 1991; Mercuro et al., 1998; O'Sullivan und Ho, 1995; Haarbo et al., 1991). Außerdem ist gezeigt worden, dass Estrogene

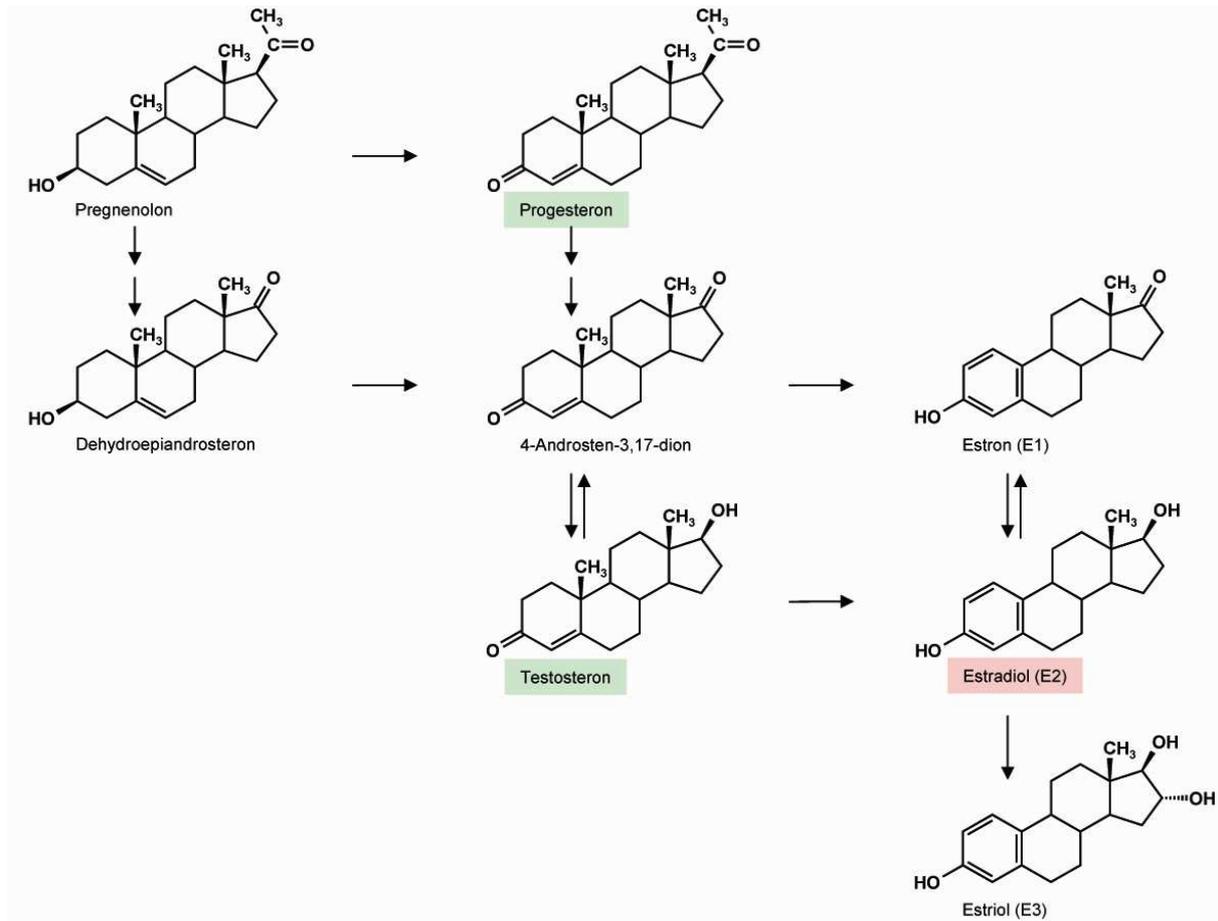
---

antioxidative Eigenschaften aufweisen, die Plättchenaggregation verringern, die Proliferation glatter Muskelzellen hemmen und die endotheliale und arterielle Funktion verbessern (Bar et al., 1993; Gerhard und Ganz, 1995).

In jüngster Zeit ist allerdings der Nutzen der HRT durch die Ergebnisse randomisierter, placebokontrollierter klinischer Studien in Frage gestellt worden. Ein kardioprotektiver Effekt ließ sich weder in der Primär- (*Women's Health Initiative (WHI) Study*, USA) (Rossouw et al., 2002) noch in der Sekundärprävention (*Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS)*, USA) (Hulley et al., 1998) bestätigen. Stattdessen zeigte sich ein umgekehrter Trend (Ouyang et al., 2006). Als bisher größte derartige Studie gilt die so genannte WHI-Studie, bei der insgesamt mehr als 26.000 Frauen zwischen 1993 und 1998 beobachtet wurden. Unter anderem wurde die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse ausgewertet. Die WHI-Studie wurde 1998 vorzeitig abgebrochen, weil die Applikation der Estrogen-Gestagen-Kombination im Vergleich zur Placebogruppe zu einer Zunahme des Risikos kardiovaskulärer Ereignisse und invasiver Mammakarzinome führte. Diesen Befund bestätigte auch eine Kohortenstudie, die die Daten von mehr als einer Million Frauen (*Million Women Study*, Großbritannien) im Alter von 50 bis 64 Jahren hauptsächlich bezüglich der Beziehung zwischen einer Hormonersatztherapie und dem Auftreten von Brustkrebs und der Sterblichkeit untersuchen sollte (Beral et al., 2003). Als Folge dieser Studien ist das Interesse an der Wirkung und den kardiovaskulären Effekten selektiver Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) als Alternative zur Hormonersatztherapie erheblich gestiegen (Christodoulakos et al., 2006). So konnte beispielsweise die randomisierte Studie *Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE)* einen kardioprotektiven Effekt von Raloxifen für postmenopausale Frauen mit hohem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zeigen (Barrett-Connor et al., 2002).

### **1.3 Estrogene**

Estrogene gehören, wie auch Gestagene und Androgene, zu den Steroidhormonen. Natürlich vorkommende Estrogene mit C18-Steroid-Gerüst sind 17 $\beta$ -Estradiol, Estron und Estriol. Entsprechend ihrer Position in der Biosynthesekaskade werden sie auch E1 (Estron), E2 (17 $\beta$ -Estradiol) und E3 (Estriol) genannt (Abb. 1).



**Abb.1.** Biosynthese der Sexualhormone.

Der wirksamste Vertreter der Estrogene ist das Estradiol. Estron und Estriol besitzen verglichen mit diesem eine sehr schwache biologische Aktivität (Berger et al., 1997; Gutendorf und Westendorf, 2001; Terasaka et al., 2004). Estron und Estriol entstehen auch als Metabolite im Verlaufe der Biotransformation des Estradiols (Abb. 1). Zusammen mit Gestagenen regulieren Estrogene im weiblichen Organismus essentielle biologische Prozesse wie die Embryonalentwicklung und die neuroendokrine Steuerung des weiblichen Zyklus. Außerdem wirken sie auf Uterus, Zervix, Vagina und Mamma und bewirken die Ausprägung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale. Neben diesen sexualspezifischen Wirkungen besitzen Estrogene auch eine Reihe sexualunspezifischer Wirkungen: Sie hemmen den Knochenabbau durch Osteoklasten und fördern das Knochenwachstum durch Osteoblasten. Sie wirken prokoagulatorisch, steigern aber gleichzeitig die fibrinolytische Aktivität. Estrogene fördern das Wachstum von Endothelzellen, während die Proliferation glatter Muskelzellen gehemmt wird. Im Herz-Kreislauf-System führen Estrogene zu einer Dilatation der Blutgefäße. Des Weiteren wirken sie proteinanabol und haben Einfluss

---

auf den Lipidstoffwechsel, die Blutzuckerwerte, den Melaningehalt der Haut und die Talgdrüsen. Psychotrope Effekte werden den Estrogenen ebenfalls zugeschrieben. Neben zahlreichen potentiell protektiven Effekten sind aber auch proliferative Effekte der Estrogene auf estrogensensitive Gewebe bekannt, wodurch die Entstehung von Tumoren in Uterus, Brust und Ovarien gefördert wird (Albanito et al., 2007; Marquez und Pietras, 2001; Russo und Russo, 2006; Vivacqua et al., 2006).

### **1.3.1 Synthese, Freisetzung und Aktivierung von Estrogenen**

Unmittelbare Vorstufe für die Biosynthese der Sexualhormone ist Cholesterol. Über die Zwischenstufe der Gestagene (C21-Steroide) entstehen die Androgene (C19-Steroide). Die Transformation dieser androgenen Vorläufermoleküle wird katalysiert durch das Enzym Aromatase. Insbesondere aus Testosteron und Androstendion entstehen durch Aromatisierung von Ring A und Abspaltung des C19-Kohlenstoffatoms die Estrogene (C18-Steroide). Estrogene werden hauptsächlich in den Ovarien gebildet. Die Steroidbiosynthese erfolgt hier in engem Zusammenspiel zwischen Theka- und Granulosazellen. In den Granulosazellen ist die dafür erforderliche Aromataseaktivität besonders hoch. Daneben findet sich auch im Fettgewebe eine hohe Aromataseaktivität. Deshalb können hier ebenfalls Estrogene in erheblichem Maße entstehen. Außerdem lässt sich eine geringere Aromataseaktivität auch in Brust, Gehirn, Knochen, Fibroblasten, in glatten und Skelettmuskelzellen und in testikulären Sertoli-Zellen feststellen. Insbesondere nach der Menopause werden Estrogene auch aus dem in der Nebenniere gebildeten Dehydroepiandrosteron gebildet. Während der Schwangerschaft produziert die Plazenta große Mengen E2.

Übermäßige Aromataseexpression in Brust und umgebendem Fettgewebe kann durch *in situ*-Synthese zu extrem hohen lokalen und pathologischen E2-Konzentrationen führen (Simpson, 2003). Auf diese Weise können im Brustkrebsgewebe 50–100-fach höhere Konzentrationen an E2 in Vergleich zu gesundem Brustgewebe auftreten (Purohit et al., 2002).

Die E2-Serumkonzentration beträgt bei prämenopausalen, erwachsenen Frauen 40–500 pg/ml in Abhängigkeit des Menstruationszyklus und bei postmenopausalen Frauen unter 20 pg/ml (Gruber et al., 2002). Gegen Ende einer Schwangerschaft sezerniert die Plazenta bis zu 30 mg/d E2. Männer produzieren etwa 20 pg/ml E2.

Im Blut liegt E2 zu ca. 99 % gebunden an Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG) und Albumin vor, so dass nur etwa 1 % ungebunden ist. Aufgrund seiner Lipophilie

kann nur freies E2 durch Diffusion die Zellmembran überwinden. Deshalb ist nicht der Plasmaspiegel an Gesamttestrogen, sondern nur der freie, ungebundene Anteil an Estrogen für die spezifische Zellantwort entscheidend (Gudermann, 2005).

## 1.4 Estrogenrezeptoren

Die Estrogenrezeptoren (ER) gehören zu den Steroidhormonrezeptoren der Superfamilie der ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktoren (Nilsson et al., 2001). Diese Superfamilie umfasst sechs Subfamilien, die mit Liganden wie Steroidhormonen, Retinoiden, Vitamin D3, Schilddrüsenhormonen und verschiedenen Eicosanoiden interagieren. Für andere Rezeptorproteine dieser Familie sind bisher keine natürlichen Liganden bekannt. Sie werden als *orphan receptors* bezeichnet (Gudermann, 2005).

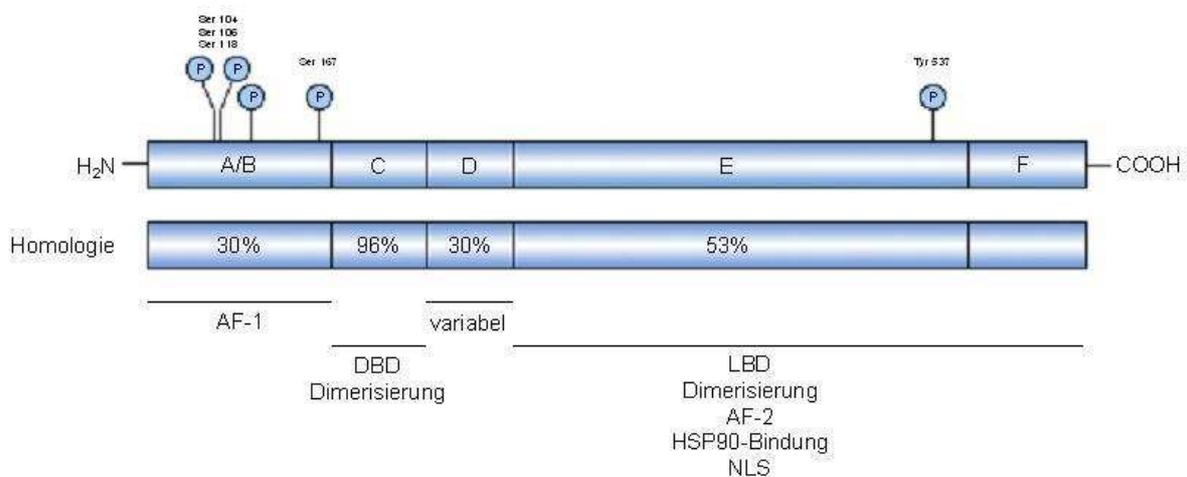
### 1.4.1 Estrogenrezeptorsubtypen

Ein Großteil der estrogenvermittelten Effekte wird über sogenannte klassische, intrazelluläre Estrogenrezeptoren vermittelt, von denen zurzeit zwei humane Formen bekannt sind: ER $\alpha$  (Greene et al., 1986) und ER $\beta$  (Kuiper et al., 1996).

Strukturell weisen ER $\alpha$  und ER $\beta$  einen hohen Grad an Homologie auf. Beide Isoformen bestehen aus sechs funktionellen Domänen (Abb. 2). Die N-terminale A/B-Domäne variiert sehr stark innerhalb der beiden Subtypen. Sie übernimmt regulatorische Aufgaben und aktiviert zelltypspezifisch und ligandenunabhängig die Transkription (Aktivierungsfunktion 1, AF-1) (Katzenellenbogen et al., 1996; Berry et al., 1990; Ruff et al., 2000). Sie kann unter anderem durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Leclercq et al., 2006). Agonistische Effekte der SERMs wie Tamoxifen und Raloxifen werden der Aktivität der AF-1 zugeschrieben (Berry et al., 1990).

Die sich anschließende hochkonservierte C-Region der Estrogenrezeptoren enthält die DNA-bindende Domäne (DBD), die über ein sogenanntes Zinkfingermotiv verfügt. Dabei erfolgt die tetrahedrale Koordination jeweils eines Zinkions durch vier der insgesamt acht Cysteinreste, wodurch es zur charakteristischen Anordnung benachbarter Aminosäuresequenzen kommt, die als Zinkfinger bzw. P- und D-Box bezeichnet werden. Diese beiden Zinkfinger sind für die Spezifität der Rezeptorbindung an bestimmte palindromische DNA-Abschnitte (Estrogen-responsive Elemente, ERE) verantwortlich. Außerdem ist diese Region an der Dimerisierung der Rezeptoren beteiligt (Evans, 1988; Freedman, 1992; Ruff et al., 2000). Die E-Region trägt neben ihrer

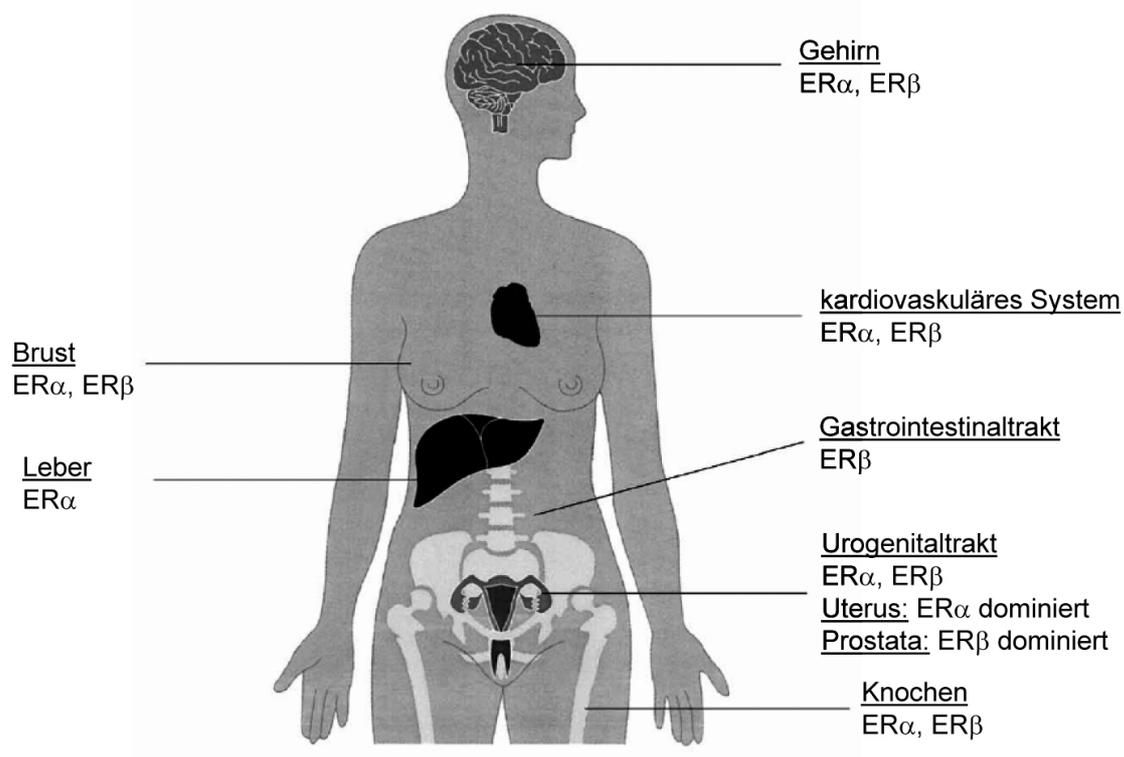
Funktion als Ligandenbindungsdomäne ebenfalls zur Hetero- und Homodimerisierung der Rezeptoren bei. Außerdem tritt sie in Interaktion mit Koaktivatoren und Korepressoren und fungiert als ligandenabhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2). AF-1 und AF-2 können die Transkription zwar unabhängig voneinander aktivieren, jedoch wird in der Regel ein synergistisches Zusammenwirken der beiden AF beobachtet (Leclercq et al., 2006). Daneben finden sich hier das sogenannte *nuclear localisation signal* (NLS) und die Hitzeschockprotein (HSP) 90-bindende Region (Leclercq et al., 2006). Trotz geringer Sequenzhomologie der Ligandenbindungsdomäne (LBD) von ER $\alpha$  und  $\beta$  sind sich die dreidimensionalen Strukturen dieser Regionen sehr ähnlich (Ruff et al., 2000). Innerhalb der Familie der kernständigen Rezeptoren variieren die Regionen D und F in ihrer Größe und zeigen nur eine geringe Sequenzhomologie. Die D-Region verknüpft die LBD mit der DNA-bindenden Domäne (DBD). Die F-Region verlängert die LBD und enthält das C-terminale Ende der Estrogenrezeptoren (Ruff et al., 2000).



**Abb. 2.** Funktionelle Domänen der humanen ERs und Grad der Homologie zwischen ER $\alpha$  und  $\beta$  (nach Malek, 2006). DBD: DNA-bindende Domäne; LBD: ligandenbindende Domäne; AF-1/2: Transaktivierungsfunktionen 1 und 2; HSP90: Hitzeschockprotein 90; NLS: *nuclear localisation signal*.

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass ER $\alpha$  und ER $\beta$  sehr unterschiedliche Funktionen in den reproduktiven Organen übernehmen (Couse und Korach, 1999). Die Verteilung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  und der jeweilige zelluläre Kontext werden für deren unterschiedliche Funktionen verantwortlich gemacht. Es mehren sich die Hinweise, dass die Estrogenrezeptorsubtypen in Geweben, in denen sie nebeneinander vorkommen, entgegengesetzte Funktionen ausüben (Hall und McDonnell, 1999). Im 10

zentralen Nervensystem, im Herz-Kreislauf-System, in Knochen und im Urogenitaltrakt kommen beide Subtypen gleichzeitig vor. Sie unterscheiden sich hier jedoch im Ausmaß ihres Auftretens. In Leber, Brust und Uterus ist fast ausschließlich ER $\alpha$  exprimiert, wohingegen im Gastrointestinaltrakt nur ER $\beta$  nachgewiesen werden konnte (Gustafsson, 1999; Pearce und Jordan, 2004) (Abb. 3).



**Abb. 3.** Vorkommen von ER $\alpha$  und ER $\beta$  im menschlichen Organismus (nach Pearce und Jordan, 2004).

Aufgrund des vorwiegenden Auftretens von ER $\alpha$  im Brust- und Uterusgewebe wird diesem Subtyp die Regulation reproduktiver Prozesse zugeschrieben. Infolge seiner proliferativen Eigenschaften wird ER $\alpha$  auch mit der Entstehung von Brustkrebs in Verbindung gebracht. Dagegen wird angenommen, dass ER $\beta$  im gesunden Brustgewebe protektive Eigenschaften durch einen modulierenden Effekt auf ER $\alpha$  in Bezug auf das Zellwachstum ausübt (Gustafsson, 1999).

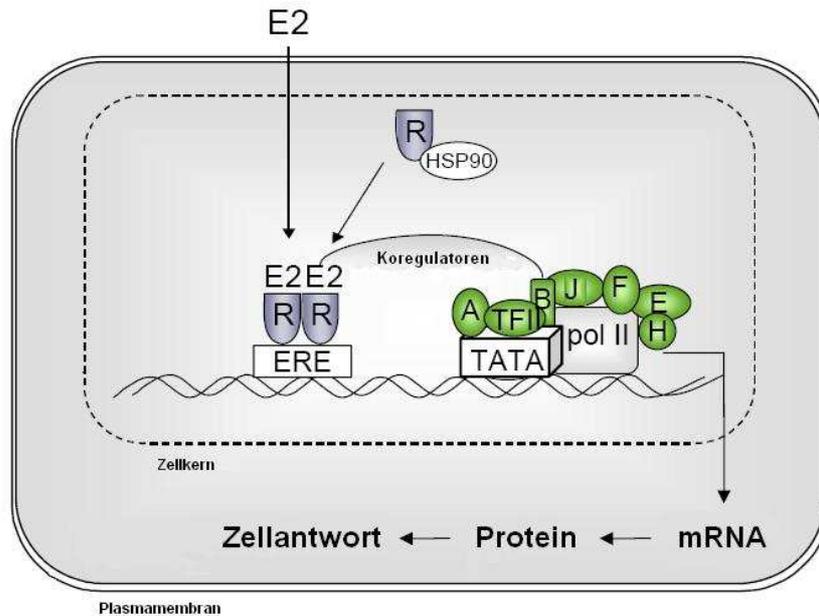
#### 1.4.2 Rezeptortransformation und Genaktivierung

Obwohl im Allgemeinen von kernständigen Estrogenrezeptoren gesprochen wird, ist deren Lokalisation in der Zelle noch nicht abschließend geklärt. Insbesondere für den

---

ER $\alpha$  wird beschrieben, dass er sich in Abwesenheit von Liganden im Zellkern, im Zytoplasma oder an der Zellmembran aufhalten kann. Mittlerweile wird diskutiert, dass es sich auch bei den Estrogenrezeptoren um hochmobile Proteine handelt, die einem kontinuierlichen Shuttling-Mechanismus unterliegen und sich beständig zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten hin- und herbewegen (Leclercq et al., 2006).

In Abwesenheit von Liganden liegen Estrogenrezeptoren in ihrer physiologisch inaktiven monomeren Form gebunden an HSP90 und andere Cochaperone vor. Durch die Bindung eines Liganden kommt es zu einem Konformationswechsel des Rezeptors, der die Dissoziation von HSP90 vom Rezeptor ermöglicht (Abb. 4). Außerdem steigt der basale Phosphorylierungsgrad des ER auf das 3–4-fache (Le Goff et al., 1994). Durch Phosphorylierung am N-terminalen Ende des Rezeptors (Serin 104 und/oder 106 und 118) steigt die Affinität zu bestimmten DNA-Sequenzen und damit die Transaktivierungsstärke (Le Goff et al., 1994). Der ligandenabhängige Konformationswechsel des ER ermöglicht außerdem die Dimerisierung des Rezeptors, wobei Homodimere oder Heterodimere aus ER $\alpha$  und ER $\beta$  gebildet werden. Die Rezeptordimere binden an Estrogen-responsive DNA-Sequenzen (ERE) und regulieren zusammen mit Kofaktoren eine spezifische Genexpression (McDonnell und Norris, 2002). Als gesichert gelten die AF-2-Koaktivatoren-1 (*steroid receptor coactivator–1*), TIF2 (*transcriptional intermediary factor–2*, auch bezeichnet als *glucocorticoid receptor-interacting protein-1* oder GRIP1) und AIB1 [*amplified in breast cancer*, auch bezeichnet als *receptor-associated coactivator 3* (RAC3) und *activator of thyroid and retinoic acid receptors* (ACTR)]. Diese Proteine weisen allesamt ähnliche Affinitäten zu dem ER $\alpha$  auf, so dass davon ausgegangen wird, dass das relative Vorkommen im entsprechenden Gewebe bestimmt, welcher ER-Koaktivator-Komplex gebildet wird (McDonnell und Norris, 2002). Aufgabe der Koaktivatoren ist es, weitere Koaktivatoren und Histonacetyltransferasen wie p300, CBP [*CREB (cAMP response element-binding protein) binding protein*] und pCAF (*p300/ CBP-associated factor*) zu rekrutieren. Auf diese Weise wird ein Proteinkomplex an der Promoterregion des Zielgens aufgebaut, der potente Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität aufweist, die Histonproteine moduliert und eine lokale Dekondensation von Chromatin ermöglicht (McDonnell und Norris, 2002).

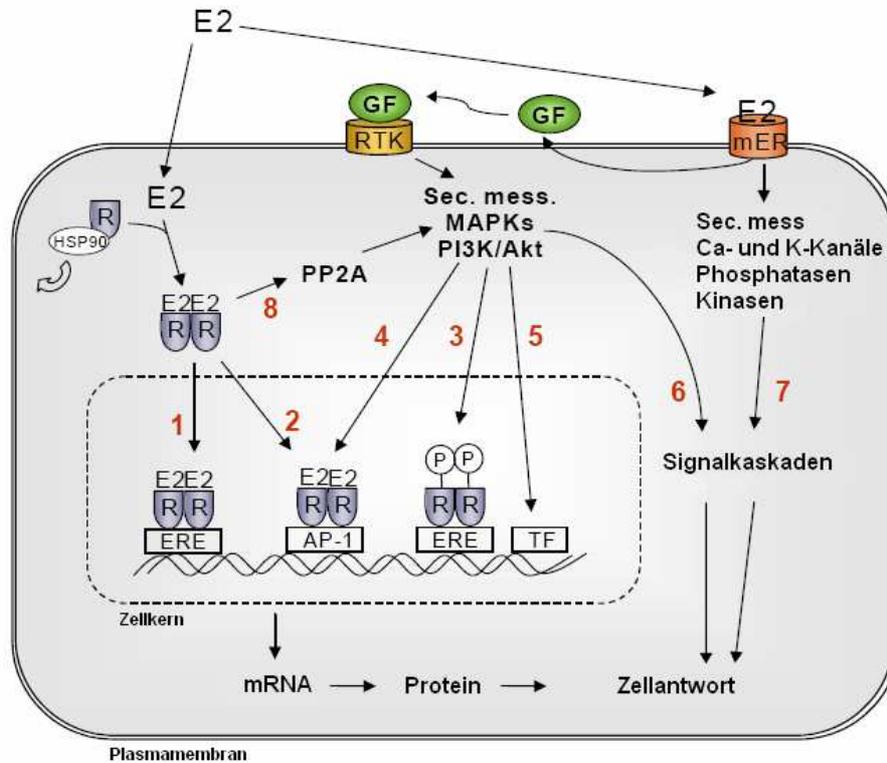


**Abb. 4.** Transkriptionsaktivierung durch ERs. R: ER $\alpha$  oder  $\beta$ ; E2: 17 $\beta$ -Estradiol; TATA: Basensequenz 5'-TATAAA-3' innerhalb der Promoterregion (TATA-Box); ERE: Estrogen-responsives Element; HSP90: Hitzeschockprotein 90; pol II: RNA-Polymerase II; TFII: Transkriptionsfaktoren der TFII-Familie; A/B/E/F/H/J: Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II (Malek, 2006, nach Katzenellenbogen et al., 1997; Tsai et al., 1994).

### 1.4.3 Alternative Estrogensignalwege

Neben der Estrogen-induzierten Regulation des Estrogenrezeptors gilt es mittlerweile als erwiesen, dass die Estrogenrezeptoren mit einer Vielzahl von zellulären Kofaktoren interagieren (Katzenellenbogen et al., 2000; Mendelsohn und Karas, 2005). Jedoch können nicht alle estrogenen Effekte mit der transkriptionalen Regulation von Zielgenen durch Estrogenrezeptoren erklärt werden. Man unterscheidet die estrogenen Effekte in Abhängigkeit von der Zeit des eintretenden Effekts in zwei Hauptmechanismen: genomische (sog. chronische) und nicht-genomische (sog. akute) Effekte (Austin, 2000) (Abb. 5). Neben den chronischen Effekten, die innerhalb von Stunden oder auch Tagen eintreten, können Estrogene wie auch viele andere Steroidhormone innerhalb von Sekunden oder Minuten eine Aktivierung von Signalmolekülen und Signalkaskaden induzieren und akute Effekte auslösen. Diese Ereignisse scheinen unabhängig vom klassischen Estrogenrezeptor-Signalweg und der Aktivierung der ERE abzulaufen. Die beteiligten Mechanismen scheinen dabei abhängig zu sein von der untersuchten Spezies, vom entsprechenden Organ und vom biologischen Status

der betreffenden Gewebe oder Zellen. Diverse Mechanismen und Signalwege der nicht-genomischen Estrogeneffekte werden zurzeit sehr kontrovers diskutiert.



**Abb. 5.** Genomische und nicht-genomische Effekte von Estrogenen (nach Malek, 2006).

Transkriptionsaktivierung von Zielgenen durch E2 (genomische Effekte):

- (1) klassischer Mechanismus von kernständigen ERs (R) an Estrogen-responsiven Elementen (EREs)
- (2) ERE-unabhängig via Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an AP-1 (Aktivatorprotein-1) oder SP-1 durch kernständige ERs

Bindung von Wachstumsfaktoren (GF) an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) induziert eine Aktivierung von MAPKs und PI3K und bewirkt transkriptionale Aktivität:

- (3) ligandenunabhängig via Phosphorylierung von kernständigen ERs
- (4) ERE-unabhängig an AP-1- oder SP-1-Bindungsstellen
- (5) unabhängig von kernständigen ERs durch Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren (TF)

Nicht-genomische Effekte via membranständige Estrogen-responsive Rezeptoren durch

- (6) Induktion von Signalkaskaden durch MAPKs oder PI3K/Akt oder
- (7) direkte Aktivierung von verschiedenen Enzymen oder *second messengers*, Einfluss auf Ca<sup>2+</sup>- oder K<sup>+</sup>-Kanäle
- (8) Interaktion mit intrazellulären Zielstrukturen (PP2A: Proteinphosphatase 2A)

#### **1.4.3.1 Cross talk mit Wachstumsfaktoren: Liganden-unabhängige Aktivierung des ER**

Zahlreiche Studien belegen mittlerweile, dass nicht-estrogene Verbindungen, wie z.B. EGF, IGF-1 und TGF- $\alpha$ , Estrogenrezeptoren und damit die Expression von Zielgenen aktivieren können (Smith, 1998). Vermittelt wird diese Transaktivierung durch zelluläre Kinasen (Martin et al., 2000). Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren führt zur deren Autophosphorylierung und in Folge zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, wie z.B. der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden. Mittlerweile mehren sich die Hinweise, dass durch Wachstumsfaktoren aktivierte Kinasen, wie z.B. Akt (Martin et al., 2000), JNK (Feng et al., 2001), pp90rsk (Joel et al., 1998) und p38 MAPK (Lee et al., 2000), in der Lage sind, Estrogenrezeptoren zu phosphorylieren und/oder zu aktivieren. Darüber hinaus werden auch die ER-Koregulatoren, die die ERs mit der transkriptionellen Maschinerie verknüpfen, von denselben Kinasen phosphoryliert und sind damit Bestandteil der ligandenunabhängigen Aktivierung der ER (Thorne und Lee, 2003). Voraussetzung für die ligandenunabhängige Aktivierung scheint eine Phosphorylierung der ERs an Serinresten, insbesondere Serin 118, der AF-1 zu sein (Ignar-Trowbridge et al., 1996). Neben einer Phosphorylierung von ERs durch die Signalkaskaden der Wachstumsfaktoren ist außerdem die Aktivierung des IGF-1-Rezeptor-Signalwegs durch ER $\alpha$  beschrieben (Kahlert et al., 2000).

#### **1.4.3.2 Estrogen-vermittelte Signalwege via Rezeptoren in der Plasmamembran**

In Knochen- und Brustgewebe, in Blutgefäßen und im zentralen Nervensystem können Estrogene innerhalb von Sekunden oder Minuten zahlreiche *second messenger*-Signaltransduktionskaskaden, die Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen und eine Mobilisation von Calcium stimulieren. Dieses kann einerseits zu genomischen Effekten der Estrogene führen, daneben sind aber vor allem nicht-genomische Effekte zu beobachten. In den letzten Jahren gibt es zunehmend Studien, die dafür Estrogen-responsive Strukturen an der Plasmamembran (mER) verantwortlich machen. Erst seit einigen Jahren gelten die Existenz und die physiologische Relevanz membranständiger Estrogenrezeptoren als erwiesen. Allerdings besteht noch immer eine kontroverse Diskussion über die Art und Beschaffenheit dieser Rezeptoren. Ver-

schiedene vermeintlich membranständige Estrogenrezeptoren, ihr Vorkommen und ihre funktionellen Charakteristika sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1.** Mögliche membranständige Estrogenrezeptoren, ihr Vorkommen und deren funktionelle Charakteristika (Malek, 2006, nach Hasbi et al., 2005).

Name	Verteilung	Charakteristika	Literaturverweise
pER	Maus: Leber, Knochen, Nerven, Gefäße, Retina, Brustkrebsgewebe, Endometrium, Prostata	Serinphosphatase-Aktivität, auf der Zellmembran oder der nukleären Membran	1
ER-X	Maus: Neocortex, Uterus; Hypothalamus, Cerebellum und Lunge des fetalen Pavians	MAPK/ERK-Aktivierung	2, 3
ER $\alpha$ , ER $\beta$	Brustkrebszelllinie MCF-7 (human), Tumorzelllinie der Hypophyse GH3/B6/F10 (Ratte), endotheliale und COS1-Nierenzellen (Affe), MCF-7-Mitochondrien und Endothelzellen, glattmuskuläre Zellen der humanen Koronararterie	identischer genetischer Ursprung wie nukleäre ER $\alpha$ / $\beta$ , EGFR-Transaktivierung, ERK-, Adenylylcyclase-, PI3K-, und G $_i$ -, G $_s$ - oder G $_q$ -Protein-Aktivierung, lokalisiert in Caveolae, Stimulation von BK $_{Ca}$ -Kanälen	4 – 14, 36
GPR30	Herz, Brust, Lunge, ZNS, Gefäße Endothel, Leukozyten, Brustkrebszelllinien MCF-7 und SKBR3, humane Keratinozyten	EGFR-Transaktivierung und MAPK/ERK-Aktivierung, Adenylylcyclase-, PKA-, PKC-, Src-Tyrosinkinase-, und NO-Synthase-Aktivierung, Mobilisation von intrazellulärem Ca $^{2+}$ , <i>c-fos</i> -Expression, G-Protein-Aktivierung	15 - 25
nicht identifiziert	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1), Nierenzellen des Affen (COS7), Rat2-Fibroblasten der Ratte	MAPK-Aktivierung	26
nicht identifiziert	isolierte Endometriumzellen	binden E2	27
nicht identifiziert	kortikale Explantate der Maus	MAPK/ERK- und B-Raf-Aktivierung	28
nicht identifiziert	hypothalamische GABA-, POMC- und Dopaminneurone des Meerschweinchens	Modulation von $\mu$ -Opioid- und GABA $_B$ -Neurotransmission, PKC-, G $_q$ -Protein-Aktivierung	29, 30
nicht identifiziert	hypothalamische Neurone des Meerschweinchens	Minderung der $\mu$ -Opioid-agonistischen Aktivierung des K $^+$ -Einstroms, Beteiligung der PKA	31

nicht identifiziert	neuronale Zelllinie GT1-7	Modulation der Acetylcholin-induzierten Ca <sup>2+</sup> -Mobilisation	32
nicht identifiziert	β-Zellen des Pankreas	Aktiviert durch Xenoestrogene und E2, G-Protein-Aktivierung	33
nicht identifiziert	Makrophagen der Maus (IC-21)	G-Protein-Aktivierung, Internalisierung nach Bindung des Agonisten	34
na-ER	Plasmamembran von Uteruszellen (Ziege)	Internalisierung, abhängig von Clathrin-haltigen Vesikeln	35

1 (Rao, 1998); 2 (Toran-Allerand et al., 2002); 3 (Toran-Allerand, 2004); 4 (Norfleet et al., 1999); 5 (Pappas et al., 1995); 6 (Razandi et al., 1999); 7 (Razandi et al., 2004a); 8 (Pedram et al., 2006); 9 (Chambliss et al., 2002); 10 (Zhang et al., 2002); 11 (Campbell et al., 2002); 12 (Zivadinovic et al., 2005); 13 (Wyckoff et al., 2001); 14 (Chen et al., 2004b); 15 (Sukocheva et al., 2006); 16 (Filardo und Thomas, 2005); 17 (Filardo, 2002); 18 (Filardo et al., 2002); 19 (Filardo et al., 2000); 20 (Carmeci et al., 1997); 21 (Kanda und Watanabe, 2004); 22 (Thomas et al., 2005); 23 (Revankar et al., 2005); 24 (Ylikomi et al., 2004); 25 (Maggiolini et al., 2004); 26 (Nethrapalli et al., 2005); 27 (Pietras und Szego, 1977); 28 (Singh et al., 2000); 29 (Qiu et al., 2003); 30 (Kelly et al., 2003); 31 (Lagrange et al., 1997); 32 (Morales et al., 2003); 33 (Nadal et al., 2000); 34 (Benten et al., 2001); 35 (Sreeja und Thampan, 2004), 36 ( Han et al., 2006).

GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C; POMC: Proopiomelanocortin; ZNS: zentrales Nervensystem

Wenn man die Vielzahl der möglichen estrogenbindenden Strukturen berücksichtigt, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass verschiedene mER existieren und diese auch nebeneinander vorkommen können. Zahlreiche Arbeitsgruppen belegten, dass es sich bei den mER um Varianten der nukleären ER $\alpha$  und  $\beta$  handeln könnte. In der Regel wird eine Homologie des mER mit dem ER $\alpha$  beschrieben (Chambliss et al., 2002; Han et al., 2006; Norfleet et al., 1999; Pedram et al., 2006a; Razandi et al., 1999; Razandi et al., 2004a; Wyckoff et al., 2001), aber es gibt ebenfalls Hinweise, dass die mER verwandt sein könnten mit dem ER $\beta$  (Chambliss et al., 2002; Razandi et al., 1999; Razandi et al., 2004a).

Erst in den letzten Jahren konnten ER $\alpha$  und  $\beta$  ebenfalls in Mitochondrien von MCF-7- und Endothelzellen nachgewiesen werden (Chen et al., 2004b; Pedram et al., 2006b). In zunehmendem Maße wird mittlerweile der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR30 für nicht-genomische Effekte von Estrogenen verantwortlich gemacht. Der GPR30 gehört zur großen Gruppe der siebenfach membrangängigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Diese Rezeptoren wandeln durch Interaktionen ihrer zytosolischen Bereiche mit G-Proteinen extrazelluläre Stimuli in intrazelluläre

---

Signale um. Der GPR30 konnte in zahlreichen Geweben, wie Plazenta, Knochen, Gehirn, Ovarien, Prostata, Leber und Blutgefäßen, aber auch in Brustkrebsgewebe nachgewiesen werden. Inzwischen belegen zahlreiche Studien, dass der GPR30 eine ganze Reihe von nicht-genomischen Effekten der Estrogene bedingt. Der GPR30 führt zur Phosphorylierung der ERK1/2 (Filardo et al., 2000; Filardo, 2002; Sukocheva et al., 2006), induziert die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, die Synthese von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat und die Bildung von cAMP (Filardo et al., 2002; Revankar et al., 2005). Daneben wird in zunehmendem Maße auch diskutiert, dass die membranständigen, klassischen ERs  $\alpha$  und  $\beta$  ihre Signalkaskaden über eine Aktivierung von GPCRs vermitteln (Razandi et al., 1999; Razandi et al., 2004b; Thomas et al., 2005; Wyckoff et al., 2001).

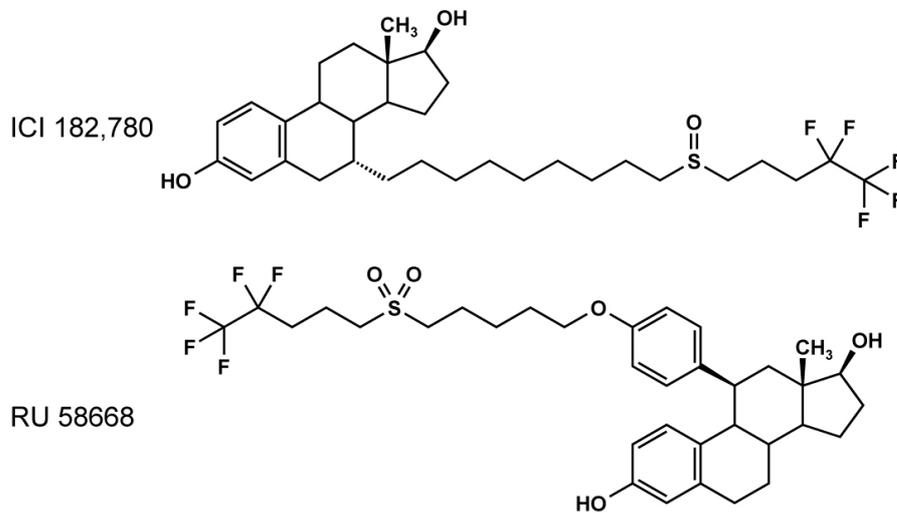
#### **1.4.4 Hemmung estrogener Effekte**

Interaktionen zwischen E2 und Estrogenrezeptoren können mit Hilfe unterschiedlicher Wirkstoffklassen gehemmt werden. Aromataseinhibitoren, wie z.B. Anastrozol, hemmen die Umsetzung von Androstendion oder Testosteron zu E2 oder E1. Reine Antiestrogene, wie ICI 182,780 (Fulvestrant, Faslodex<sup>®</sup>), bewirken ausschließlich antagonistische Effekte an den ERs. Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren, wie Raloxifen und Tamoxifen, zeigen in Abhängigkeit vom Gewebe agonistische oder antagonistische Effekte.

##### **1.4.4.1 Estrogenrezeptorantagonisten**

Allgemein wird angenommen, dass Estrogenrezeptorantagonisten über einen kompetitiven Mechanismus die Wirkung der physiologischen Estrogene hemmen. Allerdings sind die tatsächlichen Wirkmechanismen dieser Antagonisten und insbesondere der partiellen Agonisten noch nicht vollständig aufgeklärt. So werden beispielsweise auch für ICI 182,780 und RU 58668 (Abb. 6), die als reine Antiestrogene bezeichnet werden, verschiedene Wirkmechanismen beschrieben. Für die Wirkung von ICI 182,780 werden unter anderem folgende Mechanismen diskutiert: Ligandenbindung führt zu einer konformatorischen Veränderung des Rezeptors, vermindert die Rezeptordimerisierung, hemmt die transkriptionelle Aktivität beider Aktivierungsfunktionen der ER (AF-1 und AF-2), vermindert die Lokalisierung des Rezeptors in den Zellkern (Leclercq et al., 2006) und steigert den proteasomalen Abbau von ER $\alpha$  (Ameller et

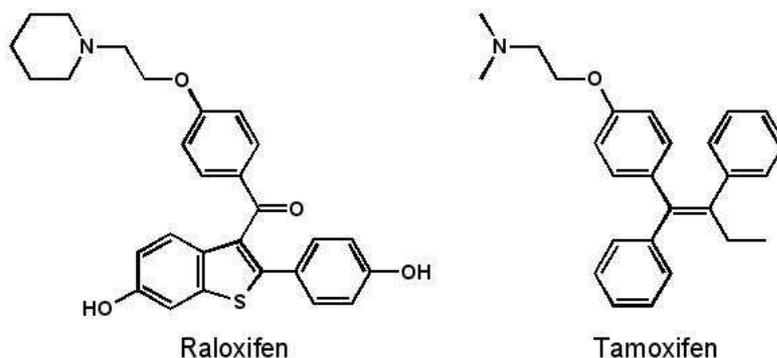
al., 2004, Pearce und Jordan, 2004). Insgesamt gilt es als sicher, dass lediglich die Expression von ER $\alpha$  vermindert wird (Oliveira et al., 2003).



**Abb. 6.** Strukturformeln von ICI 182,780 und RU 58668.

#### 1.4.4.2 Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs)

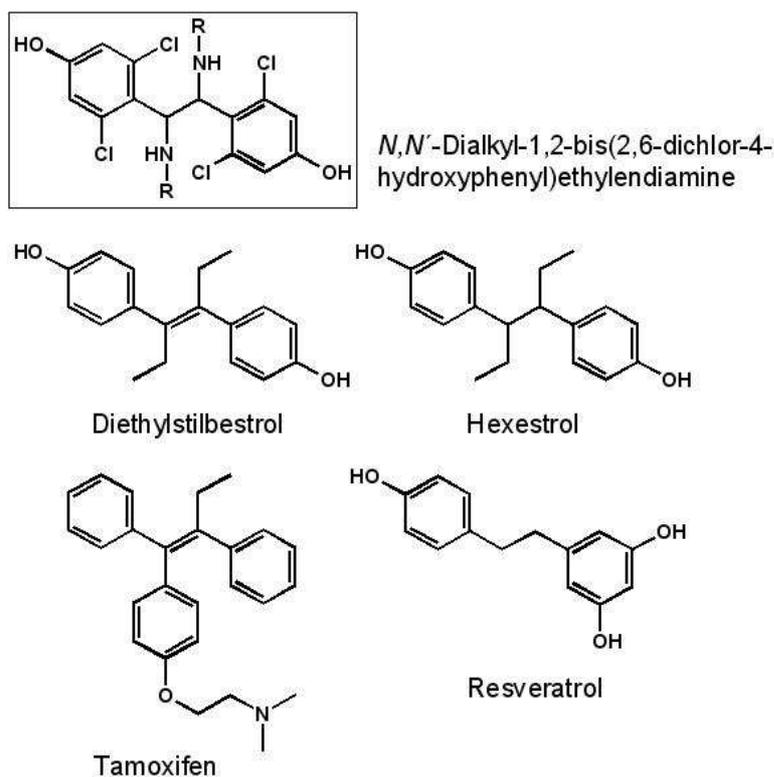
Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs), wie z.B. Tamoxifen und Raloxifen (Abb. 7), sind Substanzen, die gewebespezifisch estrogene oder antiestrogene Wirkung zeigen. Tamoxifen wirkt beispielsweise agonistisch an Knochen und Uterus, aber antagonistisch im Brustgewebe. Therapeutisch angewendet wird es aus diesem Grund in der adjuvanten Therapie des estrogenabhängigen Mammakarzinoms. Ein ähnliches gewebespezifisches Profil zeigt Raloxifen. Allerdings weist es eine höhere agonistische Aktivität im Knochengewebe und eine geringere Aktivität im Uterusgewebe auf. Folglich wird es angewendet in der Osteoporosetherapie.



**Abb. 7.** Strukturformeln von Raloxifen und Tamoxifen.

Ob ein SERM in einem bestimmten Gewebe agonistisch oder antagonistisch wirkt, hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. Die Bindung des SERMs an den ER bewirkt eine spezifische, konformatorische Änderung des Rezeptors, die lediglich zu einer Blockade der AF-2 führt. Die resultierende dreidimensionale Struktur legt fest, welche Koaktivatoren oder Korepressoren gebunden werden können. Damit ist das Vorhandensein bzw. das Verhältnis der Koaktivatoren oder Korepressoren in dem entsprechenden Gewebe ein bestimmender Faktor für die agonistische oder antagonistische Wirkung. Beispielsweise rekrutiert Tamoxifen einen Koaktivator-Komplex in Endometriumzellen, aber einen Korepressor-Komplex in Brustkrebszellen (Shang und Brown, 2002). Des Weiteren ist die Rekrutierung spezifischer Kofaktoren auch abhängig von den regulatorischen Sequenzen (wie z.B. dem ERE oder den Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren) der entsprechenden Promoterregion. Entscheidend für die Wirkqualität der SERMs ist außerdem das Verhältnis der Estrogenrezeptorisoformen zueinander (Deroo und Korach, 2006).

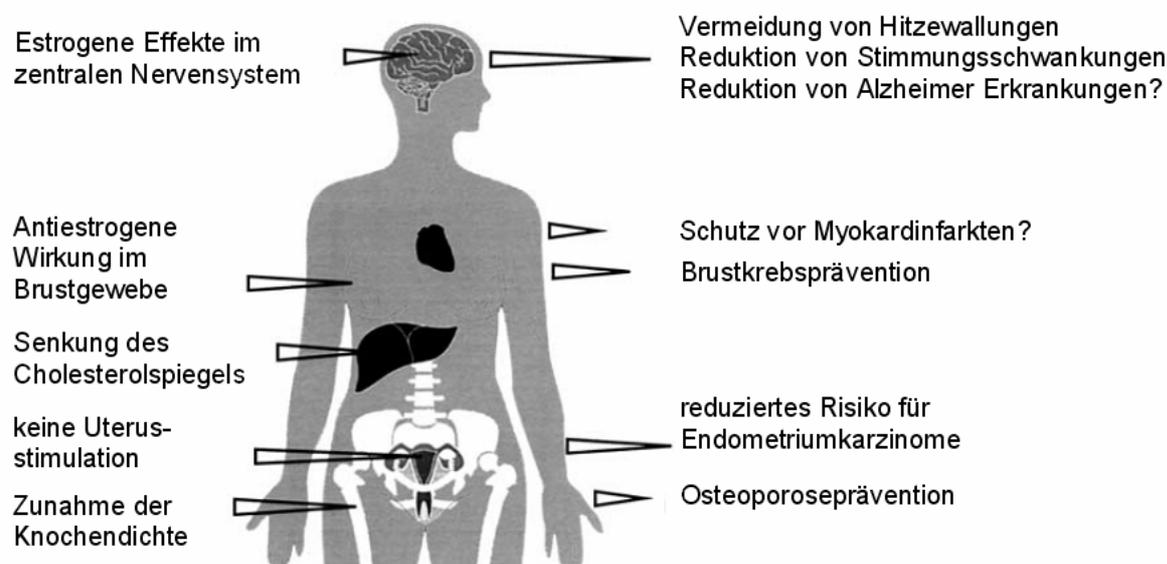
Die getesteten Verbindungen aus der Reihe der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollen, sind aus struktureller Sicht dem SERM Tamoxifen und Resveratrol, aber auch den synthetischen Estrogenen Diethylstilbestrol (DES) und Hexestrol (HEX) sehr ähnlich (Abb. 8).



**Abb. 8.** Strukturformeln von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Tamoxifen und Resveratrol (R: siehe Tabelle 3).

Für einige dieser Ethylendiamine ist eine ausgeprägte ER-Affinität nachgewiesen worden, wobei die meso-Isomere eine höhere Affinität als die d,l-Isomere aufwiesen. Außerdem konnte ein inhibierender Effekt auf 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA)-induzierte, hormonabhängige Mammakarzinome in Ratten und ein deutlicher Effekt im Gewichtstest am Mausuterus nachgewiesen werden (Gust et al., 1995; von Angerer, 1982). Es ließ sich daraus schlussfolgern, dass *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine estrogene Eigenschaften besitzen und sie darüber hinaus in Abhängigkeit des Gewebes pharmakologische Charakteristika von SERMs aufweisen könnten (Lonard und Smith, 2002).

Ein therapeutisch optimales SERM darf keine stimulierende Aktivität in Brust und Uterus aufweisen, muss aber agonistisch in Knochen, Leber, Herz-Kreislauf-System und zentralem Nervensystem wirken (Bian et al., 2001; Katzenellenbogen und Katzenellenbogen, 2000) (Abb. 9). Folglich haben SERMs das Potential, die vorteilhaften Effekte der Estrogene ohne deren potentielle Nebenwirkungen zu erzielen (Riggs und Hartmann, 2003; Vogelvang et al., 2006).



**Abb. 9.** Profil eines optimalen SERMs, das antiestrogene Wirkung in Brust- und Uterusgewebe, aber estrogene Wirkung in Knochen, Leber, Zentralnervensystem und Herz-Kreislaufsystem aufweist (nach Jordan et al., 2001).

---

## 1.5 Einfluss der Estrogene auf die Gefäßkontraktilität

Estrogene können auf unterschiedlichen Wegen Einfluss auf die Gefäßkontraktilität ausüben. Zum einen kann es zu einer direkten Interaktion der Estrogene mit der glatten Muskulatur der Gefäße kommen. Zum anderen ist auch eine indirekte Modulation des Gefäßtonus über Interaktionen mit dem Endothel und die Freisetzung von vasorelaxierenden (z.B. NO, Prostaglandine und EDHF) und vasokonstriktorisches (z.B. Endothelin) Faktoren bekannt. Welcher Mechanismus der Modulation zugrunde liegt, ist abhängig vom Zeitpunkt des Effekteintritts nach Estrogeneinwirkung auf das Organ. Man unterscheidet deshalb die estrogenen Effekte in genomische und nicht-genomische Effekte (siehe 1.4.3).

### 1.5.1 Vorkommen von Estrogenrezeptoren in Blutgefäßen

Obwohl sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  in Endothelzellen wie auch in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (VSMCs) nachgewiesen werden konnten (Iafraiti et al., 1997; Karas et al., 1994; Kim-Schulze et al., 1996; Venkov et al., 1996; Losordo et al., 1994; Register und Adams, 1998; Han et al., 2006), ist deren physiologische Bedeutung noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch werden zahlreiche vaskuläre Effekte der Estrogene auf deren Wirkung am Estrogenrezeptor zurückgeführt (Thompson und Khalil, 2003). Auch die potentiell gefäßprotektiven Wirkungen der Estrogene konnten noch nicht abschließend aufgeklärt werden. Dazu gehören: (i) die Modifikation der Zusammensetzung der zirkulierenden Lipoproteine, was zu einer Abnahme des LDL- und einem Anstieg des HDL-Spiegels führt (Godsland, 2001); (ii) die Hemmung der Lipoprotein-Oxidation (Rifici und Khachadurian, 1992); (iii) die verminderte Entstehung arteriosklerotischer Läsionen und die günstige Veränderung des Homocystein-Spiegels (Adams et al., 1990; van der Mooren et al., 1998); (iv) die Veränderung der Gerinnungseigenschaften durch einen Anstieg der aggregationshemmenden Faktoren und eine Hemmung der Plättchen- und Monozytenadhäsion (Gerhard und Ganz, 1995); (v) die Hemmung einer intravaskulären Akkumulation von Kollagen (Beldekas et al., 1981); (vi) antiproliferative Effekte auf die glatten Gefäßmuskulatur (VSM) (Khalil, 2005) und (vii) direkte Effekte auf die vaskuläre Reaktivität (Wellman et al., 1996).

Einige Studien zeigen, dass insbesondere ER $\alpha$  für protektive Effekte von Estrogenen nach einer künstlichen Verletzung von Blutgefäßen verantwortlich ist (Pare et al.,

2002). Allerdings ist ER $\beta$  im Körper weiter verbreitet als ER $\alpha$ , und auch in humanen Gefäßmuskelzellen, insbesondere bei Frauen, dominiert die Expression des ER $\beta$  (Orshal und Khalil, 2004; Thompson und Khalil, 2003).

Entscheidend für die Beurteilung der Ansprechbarkeit eines Gefäßes auf Estrogene ist der arteriosklerotische Zustand des Gefäßes. Sowohl funktionelle als auch klinische Studien weisen darauf hin, dass arteriosklerotisch veränderte Gefäße eine verminderte oder keine Expression von Estrogenrezeptoren aufweisen (Losordo et al., 1994; Post et al., 1999; Ouyang et al., 2006).

### **1.5.2 Genomische, kardiovaskuläre Effekte von Estrogenen**

Allgemein verändern Sexualhormone die Expression einer Vielzahl von regulatorischen und signalgebenden Proteinen in Endothel- und Gefäßmuskelzellen. Die Interaktion von Estrogenen mit ihren nukleären/zytosolischen Rezeptoren triggert eine Reihe von genomischen Effekten, die letztendlich zu einem Wachstum von Endothelzellen führen. Dieser Effekt scheint u.a. durch die Aktivierung von mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) vermittelt zu werden. Belegt ist dafür eine E<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung der MAPK p38 und p42/44, die die Proliferation und Migration von Endothelzellen der Schweineaorta fördert (Geraldes et al., 2002). Im Gegensatz dazu hemmt E<sub>2</sub> sowohl Proliferation als auch Migration von glatten Muskelzellen des Schweins (Geraldes et al., 2002). Analog dazu konnte in glatten Muskelzellen der humanen Aorta ein hemmender Effekt von E<sub>2</sub> auf die MAPK-Aktivität nachgewiesen werden (Dubey et al., 1999). Ferner scheinen Estrogene den wachstumsfördernden Effekt von Angiotensin II auf die Gefäßmuskulatur via Induktion und Aktivierung von Proteinphosphatasen auf genomischem und nicht-genomischem Wege zu antagonisieren (Takeda-Matsubara et al., 2002). Von Bedeutung ist außerdem die Steigerung der NO-Produktion durch eine verstärkte eNOS-Expression (Kleinert et al., 1998; Chambliss und Shaul, 2002). Außerdem scheint E<sub>2</sub> die TNF- $\alpha$ -induzierte Destabilisierung der eNOS-mRNA zu verhindern (Sumi et al., 2001). Interessanterweise konnte auch für NO ein hemmender Effekt auf Wachstum und Proliferation der Gefäßmuskulatur nachgewiesen werden (Moncada und Higgs, 2006).

---

### 1.5.3 Genomische, kardiovaskuläre Effekte von SERMs

Auch für die Familie der SERMs sind mittlerweile zahlreiche genomische, kardiovaskuläre Effekte nachgewiesen worden. So konnte ein günstiger Einfluss von SERMs auf das Lipid-Lipoprotein-Profil gezeigt werden (Christodoulakos et al., 2006). Belegt ist die Reduktion des Cholesterolgehalts im Rattenserum (Black et al., 1994; Kauffman et al., 1997), Kaninchenserum (Bjarnason et al., 2001) und auch im humanen Serum (Dayspring et al., 2006; Delmas et al., 1997) durch Raloxifen. Des Weiteren konnte in klinischen Studien belegt werden, dass Raloxifen und Tamoxifen zu einer Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie dem humanen LDL-Cholesterolgehalt, dem Fibrinogen- (Dayspring et al., 2006; de Valk-de Roo et al., 1999; Love et al., 1994; Saarto, et al., 1996; Walsh et al., 1998) und dem Homocysteinspiegel (Cattaneo et al., 1998; Walsh et al., 2000), führen. Im Gegensatz zu allen anderen SERMs führte Toremifen zu einem Anstieg des HDL-Cholesterolgehalts (Saarto et al., 1996). Allerdings zeigte Raloxifen eine Zunahme der Subfraktion des HDL2-Cholesterols, die insbesondere als atheroprotektiv gilt (Walsh et al., 1998). Sowohl Raloxifen als auch Tamoxifen führten daneben zu einer Reduktion des C-reaktiven Proteins (Christodoulakos et al., 2006). Für Raloxifen wurde ein Anstieg des NO-Endothelin-1-Verhältnisses nachgewiesen (Saitta et al., 2001). Ferner konnte eine verminderte Expression von *vascular cell adhesion molecules* durch Raloxifen nachgewiesen werden (Colacurci et al., 2003).

### 1.5.4 Nicht-genomische, kardiovaskuläre Effekte von Estrogenen

Im Zusammenhang mit Erkrankungen des kardiovaskulären Systems steht insbesondere die Vasodilatation als nicht-genomischer Effekt der Estrogene im Mittelpunkt des Interesses (Teoh et al., 1999; Diaz et al., 2004; Shaw et al., 2000). Für die Interaktion von Sexualhormonen mit membranständigen Rezeptoren in Endothel- und Gefäßmuskelzellen werden verschiedene Mechanismen für die Vasodilatation verantwortlich gemacht. Für diese akuten Effekte sind sowohl Endothel-abhängige als auch direkt auf die Gefäßmuskulatur bezogene Endothel-unabhängige Mechanismen beschrieben worden (Orshal und Khalil, 2004). Intensiv untersucht wird insbesondere die Hemmung der Gefäßkontraktion (Thompson und Khalil, 2003). Es ist bekannt, dass das Gefäßendothel relaxierende Faktoren wie NO, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und EDHF, aber auch kontrahierende Faktoren wie Endothelin (ET-1) und Thromboxan A<sub>2</sub> freisetzen kann. Estrogene, wie auch Progesteron und Testosteron, sind in der

Lage, eine Vasorelaxation durch die Modifikation von Synthese, Freisetzung und Bioaktivität verschiedener Faktoren zu induzieren (Orshal und Khalil, 2004).

NO wird mittels des Enzyms NO-Synthase (NOS) durch Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet und ist ein potenter Vasodilatator. Neben der endothelialen (eNOS) sind auch neuronale (nNOS) und induzierbare (iNOS) NO-Synthasen bekannt. Eine schnelle, rezeptorvermittelte Aktivierung der eNOS, gefolgt von einer Freisetzung von NO, ist nicht nur durch klassische eNOS-Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin oder Substanz P möglich, sondern auch für E2 beschrieben (Bucci et al., 2002; Chen et al., 1999; Michel, 1999). Daneben ist auch die Endothel-unabhängige Aktivierung der nNOS (Han et al., 2007; White et al., 2005) beschrieben. Estrogene regulieren die NOS-Aktivität und damit die NO-Produktion und den Gefäßtonus durch Interaktion mit estrogenbindenden Strukturen in der endothelialen Zellmembran und Aktivierung nicht-genomischer Signalwege (Chambliss und Shaul, 2002; Haynes et al., 2003). Hierfür werden unterschiedliche membranständige ERs  $\alpha$  und  $\beta$  verantwortlich gemacht (Chambliss und Shaul, 2002; Hisamoto und Bender, 2005). Beteiligt an der eNOS-Aktivierung sind vermutlich G-Proteine (Chambliss und Shaul, 2002), Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Orshal und Khalil, 2004) und Signalprozesse wie die Aktivierung von *non-receptor tyrosine kinase* (c-Src), Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-Kinase), Serin/Threonin-Kinase Akt und MAP-Kinasen (Haynes et al., 2003). Freigesetztes NO aktiviert die Guanylylcyclase in glatten Muskelzellen. Dieses führt zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels in den Zellen und nachfolgend zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG). Die PKG wiederum führt durch Stimulation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Extrusionspumpen in der Plasmamembran und  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums zu einer Abnahme des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels. Daneben kommt es vermutlich zu einer Verminderung der Sensitivität der kontraktile Myofilamente auf  $\text{Ca}^{2+}$ , was ebenfalls zu einer Vasorelaxation führt (Orshal und Khalil, 2004).

Neben NO ist auch  $\text{PGI}_2$  ein vom Endothel freigesetzter vasorelaxierender Faktor. Es wird vom Enzym Cyclooxygenase (COX) durch die Metabolisierung der Arachidonsäure gebildet. Neben einer genomisch verstärkten Expression der COX-1 (Jun et al., 1998) ist auch eine nicht-genomische,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, ER $\beta$ -vermittelte Steigerung der  $\text{PGI}_2$ -Synthese beschrieben worden (Sherman et al., 2002).

*Endothelium derived hyperpolarising factor* (EDHF) wird ebenfalls von Endothelzellen gebildet und führt auch bei vollständiger Hemmung der NO-cGMP- und  $\text{PGI}_2$ -cAMP-

---

Signalwege zu einer Relaxation der Blutgefäße. EDHF führt zur Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) und damit zu einer Hyperpolarisation, gefolgt von einer Relaxation glatter Muskulatur (Orshal und Khalil, 2004).

Wahrscheinlich ist außerdem die E2-induzierte Aktivierung der Adenylylcyclase, gefolgt von einer gesteigerten cAMP-Produktion. Die Aktivierung des cAMP-Adenosin-Weges führt in Folge zu einer gesteigerten Konversion von cAMP zu AMP mittels PDE und dies zu einem Anstieg der Adenosinkonzentration mittels Nukleotidase. Damit erhöht sich die Adenosinkonzentration am Adenosin-Rezeptor 2, was zum antimitogenen Effekt von E2 beiträgt (Dubey et al., 2000). Neben dem üblichen Weg cAMP-vermittelter Signalkaskaden ist auch die E2-induzierte Adenylylcyclaseaktivierung beschrieben, bei der der Anstieg des cAMP-Levels zu einer *cross*-Aktivierung der Proteinkinase G führt (Keung et al., 2005).

Geschlechtsspezifische, kardiovaskuläre Divergenzen werden unter anderem auf Unterschiede in der Expression von Estrogenrezeptoren sowie auf Unterschiede der Regulationsmechanismen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der eNOS, der Reaktivität der glatten Muskulatur auf NO, ferner auf Unterschiede in der Zusammensetzung der COX-Produkte, der Endothel-abhängigen Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur (VSM) sowie auf eine hormonelle Regulation der PKG zurückgeführt. Daneben werden aber auch eine Hemmung der ET-1-Expression und -Freisetzung durch E2 und eine gesteigerte Freisetzung von ET-1 und Thromboxan A2 durch Testosteron für geschlechtsabhängige Unterschiede des Gefäßtonus verantwortlich gemacht (Orshal und Khalil, 2004).

Neben nicht-genomischen, estrogenen Effekten auf das Endothel sind auch solche auf die Gefäßmuskulatur direkt beschrieben worden. Weil Estrogene auch an Blutgefäßen ohne Endothel eine Relaxation verursachen, muss es neben Endothel-abhängigen Mechanismen auch Endothel-unabhängige Mechanismen der Vasorelaxation geben. Diese müssen folglich direkt die Gefäßmuskelzellen betreffen (Crews und Khalil, 1999; Jiang et al., 1991; Mügge et al., 1993; Murphy und Khalil, 1999). Beispielsweise konnte an vorkontrahierten ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ , KCl und U46619) Koronargefäßen von Kaninchen, Schwein und Mensch ohne Endothel eine Vasorelaxation mit Estrogenen gezeigt werden (Jiang et al., 1991; Crews und Khalil, 1999; Chester et al., 1995).

Bekanntermaßen wird die Kontraktion der Gefäßmuskulatur durch einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration getriggert. Des Weiteren kann aber auch die Akti-

vierung verschiedener Proteinkinasen, wie der MLC-Kinase (*myosin light chain*), der Rho-Kinase und unterschiedlicher MAP-Kinasen, aber auch die Hemmung der MLC-Phosphatase zu einer Kontraktion glatter Muskelzellen führen (Orshal und Khalil, 2004). An humanen Endometriumzellen konnte daneben auch die Aktivierung der MAPK p38 durch membranständige Estrogenrezeptoren nachgewiesen werden (Seval et al., 2006).

Für geschlechtsabhängige Unterschiede in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation können zahlreiche Effekte der Estrogene verantwortlich sein. In den letzten Jahren mehren sich die Studien, die darauf hinweisen, dass  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Estrogen-induzierten Relaxation verschiedener Gefäßsysteme spielen. Dabei scheint weniger die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern eine Rolle zu spielen (Mermelstein et al., 1996), sondern vor allem die Hemmung des Eintritts von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum (Bucci et al., 2002; Crews und Khalil, 1999; Diaz et al., 2004; Freay et al., 1997; Han et al., 1995; Kitazawa et al., 1997; Murphy und Khalil, 1999; Nakajima et al., 1995). In anderen Geweben dagegen konnte aber auch eine schnelle Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nachgewiesen werden (Armen und Gay, 2000). Für die Hemmung plasmalemmaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden zum Teil direkte Mechanismen verantwortlich gemacht (Salom et al., 2001; Zhang et al., 1994). Neben der Hemmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, ist auch eine Aktivierung von  $\text{K}^+$ -Kanälen gezeigt worden, die ebenfalls zu einer Vasodilatation von Blutgefäßen führt (Diaz et al., 2004). Auch die Estrogen-induzierte Aktivierung von  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Kanälen, die infolge einer Hyperpolarisation zu einer indirekten Hemmung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen führt, ist beschrieben worden (White et al., 2002).

Neben physiologischen Estrogenen sind auch relaxierende Effekte für synthetische Estrogene beschrieben worden. Am Papillarmuskel des Hundes wie auch am Meerschweinchenileum konnte Hexestrol eine Hemmung der Kontraktion durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistischen Effekt induzieren (Himori, 1977). Auch für Diethylstilbestrol konnte eine Vasorelaxation der isolierten Rattenaorta nachgewiesen werden (Martinez et al., 2003). Diethylstilbestrol führte zur Blockade von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und damit zur Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxes an verschiedenen Zelltypen (Zakharov et al., 2004).

---

### 1.5.5 Nicht-genomische, kardiovaskuläre Effekte von SERMs

Auch für SERMs sind mittlerweile zahlreiche nicht-genomische, kardiovaskuläre Effekte beschrieben worden. Insbesondere die Vasorelaxation glatter Muskulatur spielt dabei eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Tamoxifen eine schnelle, Endothel-abhängige (Figtree et al., 2000) wie auch Endothel-unabhängige (Hutchinson et al., 2001), Estrogenrezeptor-abhängige Vasorelaxation an Koronararterien des Schweins und des Kaninchens bewirkt. An der Aorta der Ratte führte Tamoxifen zu einer Endothel- und Rezeptor-unabhängigen Relaxation, die neben der Hemmung von L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen auch auf eine Hemmung von MAPK p38 und ERK1/2 zurückzuführen war (Park et al., 2003). An humanen Endometriumzellen dagegen konnte eine Aktivierung der MAPK p38 sowohl durch Tamoxifen als auch durch Raloxifen nachgewiesen werden (Seval et al., 2006). In isolierten VSMC der Ratte führte Tamoxifen zu einer Hemmung von L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (Song et al., 1996). Ebenso konnte am Duodenum der Maus eine Tamoxifen-induzierte Relaxation durch eine Blockade von L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen festgestellt werden (Diaz, 2002). Auch für Raloxifen ist eine schnelle, ER- und Endothel-abhängige Vasorelaxation der Koronararterien von Kaninchen beobachtet worden (Figtree et al., 1999). An der Koronararterie des Hundes verbesserte Raloxifen die koronare Durchblutung und die Kontraktilität des Herzmuskels durch die Freisetzung von NO und die Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanälen. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von NO über den Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt-Signalweg vermittelt wurde (Ogita et al., 2004). Auch an der humanen Nabelschnurvene wurde nachgewiesen, dass Raloxifen durch die Interaktion mit ER $\alpha$  und der PI3K zu einer nicht-genomischen Aktivierung der eNOS und damit zu einer vermehrten NO-Synthese in Endothelzellen führt (Simoncini et al., 2002). An Pulmonalarterien, intralobären Nierenarterien und Zerebralarterien von Ratten bewirkte Raloxifen eine Endothel- und ER-unabhängige Vasorelaxation durch die Hemmung von L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (Chan et al., 2005; Leung et al., 2005, Tsang et al., 2004). Auch an isolierten ventrikulären Myozyten des Meeresschweinchens ließ sich die Hemmung der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle durch Raloxifen bestätigen (Liew et al., 2004). An der Koronararterie des Schweins konnte neben der Endothel-unabhängigen Relaxation durch die Hemmung der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle auch eine Aktivierung der BK<sub>Ca</sub>-Kanäle durch Raloxifen gezeigt werden (Leung et al., 2007; White et al., 1995).

Für das Polyphenol Resveratrol wurde sowohl eine Endothel-abhängige, NO-vermittelte (Rakici et al., 2005) als auch eine Endothel-unabhängige, K<sup>+</sup>-Kanal-vermittelte (Novakovic et al., 2006) Vasorelaxation der humanen Brustwandarterie und der Saphenavene nachgewiesen. An der Koronararterie des Schweins konnte eine Resveratrol-induzierte, ER-unabhängige Relaxation mit einer Endothel-abhängigen Komponente (Freisetzung von NO) und eine Endothel-unabhängigen Komponente (Hemmung von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen) gezeigt werden (Li et al., 2006). An Herzen von Ratten aktivierte Resveratrol sowohl die MAPK p38 wie auch die ERK1/2 (Das et al., 2006). Ob auch die potentiell SERM-Charakteristika aufweisende Reihe der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine vasodilatatorische Effekte ausüben kann, ist bisher nicht untersucht worden.

## 1.6 Zielsetzung

Da zu den therapeutischen Zielen eines optimalen SERMs neben der Linderung klimakterischer Beschwerden und der Vermeidung von Osteoporose-bedingten Knochenbrüchen auch ein möglichst protektiver Einfluss auf das kardiovaskuläre System gehört, sollten die vasorelaxierenden Eigenschaften dieser Substanzklasse am Modell der Schweinekoronararterie untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die vasodilatatorischen Effekte des physiologischen Estrogens E<sub>2</sub>, der SERMs Raloxifen und Tamoxifen und einer Reihe der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine mit SERM-Eigenschaften funktionell an der porcinen Koronararterie charakterisiert und Estrogen- bzw. SERM-bindende Strukturen erkannt werden. Darüber hinaus sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der vasorelaxierenden Wirkung von Estrogenen und SERMs identifiziert werden. Außerdem galt es zu bestimmen, ob alle SERMs diese Wirkung über einen einheitlichen Mechanismus ausüben, oder aber ob Unterschiede innerhalb dieser Gruppe bestehen.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte

Bandelin Sonorex TK52 Einkammer-Organbäder, 20 ml, temperierbar	Bandelin electronics, Berlin TSE, Bad Homburg
Einkanalpipetten, Discovery (Volumenbereich 2–5000 µl)	Abimed, Langenfeld
Elektromechanischer Druckwandler, Transducer TF6V5	Fleck, Mainz
Elektrophoresekammer Multigel Long Entwicklungskassette	Biometra, Göttingen Kodak, München
Eppendorf-Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Faden Mersilene <sup>®</sup> EH 451	Ethicon, Norderstedt
Gefrierschrank Hera Freeze, –80°C	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Magnetrührer IKA Kombimag <sup>®</sup> RCT	Jahnke und Kunkel GmbH & Co. KG IKA Labortechnik, Staufen
Megafuge 1.0 R, max. 2800 rpm	Heraeus Sepatech, Osterode
Kugelmühle, Mikro-Dismembrator <sup>®</sup> U	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Organhäkchen, Edelstahl, d=0.3 mm	Eigenanfertigung
pH-Meter 766 Calimatec	Knick, Nürnberg
UV-Photometer Gene-Ray	Biometra, Göttingen
Pump Easyload Masterflex	Microgon, Laguna Hills, CA
Reagenzglasschüttler, IKA Lab Dancer	Carl Roth, Karlsruhe
Rocking Platform WT16	Biometra, Göttingen
Rotary shaker KS10 Swip + TH10	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Shaker IKA <sup>®</sup> MTS 2	Jahnke und Kunkel GmbH & Co. KG IKA Labortechnik, Staufen
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Tankblot-System	Biometra, Göttingen
Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Verstärker, Transducer Coupler 4711	TSE, Bad Homburg
Vierkanal-x-t-Kompensationsschreiber, Kompensograph C1016	Siemens, München
Vortex mixer REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cryotube <sup>™</sup> vials	Nunc, Wiesbaden
Einmal-Küvetten, Polystyrol, Lichtweg 10 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegpipettenspitzen, unsteril (2–5000 µl)	Abimed, Langenfeld
Film Kodak X-OMAT, XAR-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immobilon <sup>™</sup> -Transfermembran, Polyvinylidendifluorid	Millipore, Schwalbach
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll, Dassel
Pipette, serologisch, 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht

Spritze mit Kanüle (0.9 x 40 mm, 20G x 1 1/2")	B/Braun, Melsungen
Spritze mit Kanüle (Omnifix® 0.5 x 16 mm, 25G x 5/8")	B/Braun, Melsungen
UV-Küvetten Plastibrand, halbmikro	Brand, Wertheim
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

17 $\alpha$ -Estradiol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
17 $\beta$ -Estradiol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
17 $\beta$ -Estradiol, wasserlöslich	Sigma Aldrich, Taufkirchen
4-Aminopyridin	Tocris, Bristol, Großbritannien
4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid-hydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-mouse-Antikörper, IgG, HRP-konjugiert	Cell Signalling Technology, Beverly, MA
Anti-rabbit-Antikörper, goat-IgG, HRP-konjugiert	Calbiochem, Darmstadt
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BAPTA-AM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\beta$ -Catenin-Antikörper, mouse-IgG, monoklonal	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Calciumchloriddihydrat	Merck, Darmstadt
Carbogen	Air Liquide, Düsseldorf
Cimetidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Clozapin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Glucosemonohydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (99 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinoprost-Tromethamin (Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub> )	Upjohn, Kalamazoo, MI
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Entwickler und Fixierer, GBX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiaminetetraessigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glibenclamid	Tocris, Bristol, Großbritannien
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GPR30-Antikörper, rabbit-IgG, polyklonal	MBL, Woburn, MA
ICI 182,780	Tocris, Bristol, Großbritannien
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Koffein	Roth, Karlsruhe

KT 5720	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KT 5823	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LumiGlo <sup>®</sup> Kit	New England Biolabs, Beverly, MA
Magnesiumsulfatheptahydrat	Merck, Darmstadt
Mesulerginhydrogenmaleat	Novartis, Basel, Schweiz
N <sup>G</sup> -Nitro-L-argininmethylester	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat-Probenpuffer	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Natriumdodecylsulfat (98.5 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-β-glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumnitroprussid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>N,N'</i> -Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine und verwandte Strukturen	von Angerer, 1982; Karl et al., 1988; Gust et al., 1995
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ODQ	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
p38-MAPK-Antikörper, rabbit-IgG, monoklonal	Calbiochem, Darmstadt
PD 98059	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pertussistoxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phospho-p38-MAPK-Antikörper, rabbit-IgG, monoklonal	Calbiochem, Darmstadt
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propranololhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein-Größenmarker	Calbiochem, Darmstadt
Raloxifenhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
(S)-(-)-Bay K 8644	Tocris, Bristol, Großbritannien
Salzsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SB 203580	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
(Coomassie-Brillantblau G-250)	
SQ 22536	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stickstoff, flüssig	Praxair, Düsseldorf
Substanz P	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tamoxifencitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetraethylammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Base (99.9 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-HCl (99 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trockenmilchpulver Sucofin	TSI, Zeven
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Verapamilhydrochlorid	Synopharm, Barsbüttel

### 2.1.4 Zubereitung der Testsubstanzen

Von allen verwendeten Substanzen wurden Stammlösungen von 1–100 mmol/l hergestellt. Wenn möglich, erfolgte die Lösung in demineralisiertem Wasser. Um eine bessere Löslichkeit zu erzielen, wurden abweichend davon auch andere Lösungsmittel verwendet. Indomethacin und Raloxifen wurden in Ethanol (50 % V/V) gelöst, (S)-(-)-Bay K 8644 in Ethanol (96 % V/V). E2, Glibenclamid, KT 5823, KT 5720 und ODQ wurden in DMSO, *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine unter Zusatz einer äquimolaren Menge 1 N HCl in DMSO (50 % V/V) gelöst. Stammlösungen wurden mit demineralisiertem Wasser zur benötigten Endkonzentration verdünnt. Kontrollversuche wurden mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Vehikel) durchgeführt. In den Organbädern erreichte die DMSO-Konzentration maximal 0.2 % (Ausnahmen: Glibenclamid 1 %, ODQ 0.3 %). Die Ethanolkonzentration betrug maximal 0.05 %.

Alle Stammlösungen konnten bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert werden (Ausnahme: Pertussistoxin-Stammlösung, 50  $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuche an isolierten Organen

#### 2.2.1.1 Isolierte Koronararterie des Schweins

Herzen weiblicher und kastrierter männlicher zur Fleischverarbeitung verwendeter Schlachtschweine mit einem Gewicht von 100–120 kg (Alter  $\geq 6$  Monate) wurden von der Lehr- und Versuchstieranstalt Teltow-Ruhlsdorf zur Verfügung gestellt. Die Betäubung der Schweine erfolgte elektrisch, die Tötung durch Entbluten nach Eröffnung der vorderen Hauptschlagader und der vorderen Hohlvene. Die Organe wurden nach Entnahme in eisgekühlte, mit  $\text{O}_2 / \text{CO}_2$  (95 % / 5 %) gesättigte Krebs-Henseleit-Lösung überführt und transportiert. Anschließend wurden der absteigende Ast der linken Koronararterie (*Ramus interventricularis anterior*) und die rechte Koronararterie (*Arteria coronaria dextra*) entnommen und vom umgebenden Gewebe befreit. Die auf diese Weise vorbereiteten Gefäße konnten bei Lagerung in begaster Krebs-Henseleit-Lösung ( $4^{\circ}\text{C}$ ) über eine Dauer von vier Tagen für Versuche verwendet werden (Hussain und Mustafa, 1993).

---

### 2.2.1.2 Verwendete Pufferlösungen

#### Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (mM, pH 7.4)

118	NaCl
4.7	KCl
1.6	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
1.2	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
1.2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
25	NaHCO <sub>3</sub>
11	D-Glucose · H <sub>2</sub> O

#### Ca<sup>2+</sup>-freie Krebs-Henseleit-Lösung (mM, pH 7.4)

62.7	NaCl
60	KCl
1.2	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
1.2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
50	Tris
0.03	EDTA
11	D-Glucose · H <sub>2</sub> O

### 2.2.1.3 Allgemeine Versuchsdurchführung

Für die Versuche wurden die Arterien (d=2–3 mm) in Ringe mit jeweils 3–4 mm Länge geschnitten. Wenn nötig, konnte das Endothel durch vorsichtiges Rollen mittels einer eingeführten Pinzette entfernt werden. Die Arteriensegmente wurden auf zwei horizontal in das Gefäßlumen eingeführte Edelstahlhäkchen (d=0.3 mm) positioniert und in Organbäder von 20 ml Fassungsvermögen eingehängt, die eine der beschriebenen Krebs-Henseleit-Lösungen enthielten.

Diese Lösung wurde kontinuierlich mit O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (95 % / 5 %) begast und auf 37°C temperiert. Zur isometrischen Messung der Druckentwicklung wurden die eingehängten Segmente mit elektromechanischen Druckwandlern (Transducer TF6V5), Verstärkern (TSE Transducer Coupler 4711) sowie Schreibern (Siemens Kompensograph C1016) verbunden. Die Ruhekraft zu Beginn aller Experimente betrug 20 mN. Während einer Äquilibrationsphase von 60 min wurde die Pufferlösung nach jeweils 30 min ausgetauscht und die Ruhekraft von 20 mN durch mehrmaliges Nach-

spannen wiederhergestellt. Im Anschluss wurde eine Kontraktion der Arterien-segmente durch die Zugabe von KCl (30 mM) ausgelöst. Darauf folgten je nach Versuchsaufbau zwei Kontraktionen mittels KCl (30 mM) oder  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ). Die ersten beiden Kontraktionen wurden durch eine 5-minütige Waschphase beendet, gefolgt von einer Stabilisierungsphase (15 min), einer erneuten Waschphase (3 min) und weiteren 15 min Stabilisierungsphase. Die Intaktheit des Endothels wurde während der dritten Kontraktion durch das Ausmaß der Endothel-abhängigen Relaxation nach Zugabe von Substanz P (10 nM) zum Zeitpunkt der maximalen Kontraktion funktionell bestimmt. Eine vollständige Entfernung des Endothels wurde durch das Ausbleiben der Vasorelaxation angezeigt. Die dritte Kontraktion wurde durch eine 10-minütige Waschphase, eine Stabilisierungsphase (15 min) und eine weitere Waschung (3 min) beendet. Alle Experimente wurden in Anwesenheit von Indomethacin (6  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt, um eine COX-abhängige Bildung von Eicosanoiden und deren Einfluss auszuschließen.

#### **2.2.1.4 Untersuchung von vasorelaxierenden Effekten**

Nachdem durch die Vorstimulationen eine konstante Kontraktilität der Organe erreicht war, wurden die Arterien-segmente erneut mit KCl (30 mM) oder  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ) kontrahiert. Bei Erreichen einer stabilen Kontraktion (Plateau) wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve oder eine Relaxation in nichtkumulativer Technik für unterschiedliche Agonisten durchgeführt. Bei Verwendung der kumulativen Technik wurde die Agonistenkonzentration unmittelbar nach Erreichen eines Plateau-effektes in halb-logarithmischen Schritten bis zum Erreichen eines Maximal-effektes erhöht. Bei Verwendung der nichtkumulativen Technik wurde an jedem Arterien-segment nur jeweils eine einzige Konzentration eines Agonisten appliziert. Um dabei auch die Zeit-abhängigkeit der Vasorelaxation zu untersuchen, wurde die Relaxation in separaten Versuchen nach 15, 30, 60, 90 und 120 min (E2) bzw. 3, 5, 7, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min (Tamoxifen) unterbrochen und das Ausmaß der Dilatation ausgewertet. Da die Tamoxifen (10  $\mu\text{M}$ )-induzierte Relaxation eine ausgeprägte Endothel-Abhängigkeit zeigte, wurde die Beteiligung der eNOS durch Inkubation (10 min) der Arterien-segmente mit L-NAME (200  $\mu\text{M}$ ) vor der  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ )-induzierten Kontraktion untersucht.

---

### **2.2.1.5 Pharmakologische Charakterisierung vasorelaxierender Effekte mittels Antagonisten**

Zur pharmakologischen Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte verschiedener Agonisten wurden die Relaxationen in Anwesenheit von Antagonisten diverser Zielstrukturen durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen der Agonisten verwendet, um submaximal relaxierende Effekte herbeizuführen. Bei diesen Versuchen wurden die Arteriensegmente 30 bis 120 min vor der Kontraktion mit KCl (30 mM) oder PGF<sub>2α</sub> (3 μM) mit entsprechenden Antagonisten inkubiert. Alternativ wurden die Antagonisten in die Bäder gegeben, wenn das Plateau der Kontraktion erreicht war.

#### **2.2.1.5.1 Beteiligung klassischer Estrogenrezeptoren**

Um eine Beteiligung klassischer Estrogenrezeptoren an der Estrogen- oder SERM-induzierten Relaxation der Koronararterie des Schweins zu untersuchen, wurden die Organe vor der Kontraktion 60 min mit ICI 182,780 (1–10 μM) inkubiert. Anschließend wurde eine Kontraktion mit KCl [30 mM; d,l-N,N'-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin (Verbindung **8**)] oder PGF<sub>2α</sub> (3 μM; Raloxifen) induziert. ICI 182,780 hatte dabei keinen Einfluss auf die Kontraktilität. Anschließend konnte eine Konzentrations-Wirkungskurve (Verbindung **8**) oder eine Relaxation in nicht-kumulativer Technik (Raloxifen, 1 μM; Tamoxifen, 10 μM) aufgenommen werden. In separaten Versuchen wurde eine Beteiligung klassischer Estrogenrezeptoren im Calcium-freien Medium untersucht (siehe 2.2.1.7).

#### **2.2.1.5.2 Beteiligung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPR30**

Da in zunehmendem Maße der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR30 für nicht-genomische, membranvermittelte Effekte von Estrogenen verantwortlich gemacht wird, wurde dessen Beteiligung an der Estrogen- oder SERM-induzierten Relaxation der porcinen Koronararterie untersucht. Dafür wurden die Organe zunächst 90 min mit Pertussistoxin (PTX, 100–200 ng/ml), einem Inhibitor G<sub>i</sub>-gekoppelter Proteine, inkubiert. Anschließend wurde eine Kontraktion mit KCl (30 mM) induziert. PTX hatte dabei keinen Einfluss auf die Kontraktilität. Anschließend wurden Konzentrations-Wirkungskurven mit E2 (PTX: 200 ng/ml) und Verbindung **8** (PTX: 100–200 ng/ml) aufgenommen.

### 2.2.1.5.3 Beteiligung von Kalium-Kanälen

Um zu untersuchen, ob Kalium-Kanäle bei der SERM-vermittelten Vasorelaxation eine Rolle spielen, wurden Arteriensegmente mit Endothel mit Inhibitoren unterschiedlicher K<sup>+</sup>-Kanäle inkubiert. Verwendet wurden TEA (1 mM), ein Inhibitor Ca<sup>2+</sup>-aktivierter und spannungsabhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle (BK<sub>Ca</sub>) hoher Leitfähigkeit, Glibenclamid (100 µM), das ATP-sensitive K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>ATP</sub>) inhibiert, und 4-AP (1 mM), ein Inhibitor spannungsabhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>V</sub>).

Nach einer Inkubationsphase von 30 min wurde eine Kontraktion mit KCl (30 mM) induziert. Bei Erreichen stabiler Kontraktionen (Plateau) wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven mit Verbindung **8** (10 nM – 30 µM) aufgenommen. TEA und 4-AP hatten dabei keinen Einfluss auf die Kontraktilität der Organe. Glibenclamid dagegen reduzierte die KCl-induzierte Kontraktion von 114 ± 5 % (Vehikel) auf 45 ± 4 % (*n*=7) im Verhältnis zur dritten KCl-Kontraktion.

### 2.2.1.5.4 Untersuchung beteiligter Signalkaskaden

Um zu untersuchen, ob die Adenylyl- oder Guanylylcyclase oder die Proteinkinasen A oder G für die SERM-induzierte Vasorelaxation eine Rolle spielen, wurden Arteriensegmente mit Endothel 30 min vor der Zugabe von KCl (30 mM) mit entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Verwendet wurden der Adenylylcyclase-Inhibitor SQ 22536 (100 µM), der Guanylylcyclase-Inhibitor ODQ (30 µM), der Proteinkinase A-Inhibitor KT 5720 (300 nM) und der Proteinkinase G-Inhibitor KT 5823 (1 µM). Zum Zeitpunkt stabiler Kontraktionen wurden jeweils Konzentrations-Wirkungskurven mit Verbindung **8** (10 nM – 30 µM) aufgenommen.

Um darüber hinaus die Beteiligung der MAPK-Kaskade, insbesondere eine Aktivierung der MAPK p38 und der extrazellulär-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2), zu untersuchen, wurden vasorelaxierende Effekte von E2, Raloxifen, Tamoxifen und Verbindung **8** an Arteriensegmenten mit und ohne Endothel in Gegenwart des p38-MAPKinase-Inhibitors SB 203580 (10 µM) bzw. des ERK1/2-Kinase-Inhibitors PD 98059 (10 µM) durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Organe mittels PGF<sub>2α</sub> (3 µM) kontrahiert. E2 (10 µM), Raloxifen (3 µM), Tamoxifen (10 µM) und Verbindung **8** (10 µM) wurden zum Zeitpunkt der maximalen Kontraktion appliziert. Der vasorelaxierende Effekt dieser Verbindungen wurde in An- bzw. Abwesenheit der Inhibitoren kontinuierlich gemessen und nach 120 min ausgewertet.

---

#### **2.2.1.5.5 Beteiligung intrazellulären Calciums**

Um in Relaxationsversuchen eine Beteiligung intrazellulären Calciums zu untersuchen, wurde der intrazellulär wirkende  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM (10–20  $\mu\text{M}$ ) zum Zeitpunkt einer stabilen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ )-induzierten Kontraktion in die Organbäder gegeben. BAPTA-AM hatte dabei keinen Einfluss auf die Kontraktion. Nach einer Inkubationsphase von 30 min wurden die Gefäßringe mit Raloxifen (3  $\mu\text{M}$ ) relaxiert. Nach 120 min wurde das Ausmaß der Relaxation ausgewertet.

#### **2.2.1.6 Untersuchung der Reversibilität vasorelaxierender Effekte**

Um die Reversibilität vasorelaxierender Effekte von Estrogenen und SERMs zu untersuchen, wurden KCl (30 mM)-vorkontrahierte Arteriensegmente mit Endothel in nichtkumulativer Technik mit E2 (10  $\mu\text{M}$ ), Raloxifen (10  $\mu\text{M}$ ) oder Verbindung **8** (10  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 120 min relaxiert. Anschließend wurden die Organe ein-, drei-, fünf-, sieben- oder neunmal einer jeweils zehnminütigen Waschphase unterzogen. Jeder Waschphase folgte eine fünfminütige Ruhephase. Nach der letzten Waschung folgte entsprechend der jeweiligen Gruppe eine Stabilisierungsphase von 120, 90, 60, 30 oder null min. Innerhalb eines Zeitraums von 45 min erfolgte eine letzte KCl (30 mM)-induzierte Kontraktion. Das Ausmaß dieser Kontraktion wurde ins Verhältnis zur vorhergehenden Kontraktion gesetzt.

#### **2.2.1.7 Untersuchungen im Calcium-freien Medium**

Da sich in ersten Versuchen kein Unterschied zwischen Organen mit und ohne Endothel ergab, wurden diese Versuche im Folgenden nur noch ohne Endothel durchgeführt. Für Untersuchungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien, depolarisierenden Medium ( $\text{K}^+$ : 60 mM) wurden die Arteriensegmente eingangs mit KCl (30 mM) und anschließend zweimal mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ) in der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung kontrahiert. Im Anschluss daran erfolgte in den Organbädern der Austausch der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung gegen das  $\text{Ca}^{2+}$ -freie, depolarisierende Medium. Dieser Mediumwechsel wurde über einen Zeitraum von 7 min durchgeführt. Die dabei nur vorübergehend auftretende spontane Kontraktion der Arteriensegmente wurde auf eine Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher zurückgeführt. Nach einer Stabilisierungsphase von 30 min wurde eine Kontraktion durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  (3 mM) induziert. Beendet wurde die Kontraktion durch eine Waschphase von 5 min. Nach einer 15-

minütigen Ruhephase folgte eine weitere dreiminütige Spülung. Anschließend erfolgte eine Äquilibrationsphase von 60 min in An- oder Abwesenheit von E2 (1–10  $\mu\text{M}$ ), Verbindung **8** (0.3–10  $\mu\text{M}$ ), Raloxifen (0.3–3  $\mu\text{M}$ ) oder Verapamil (0.3  $\mu\text{M}$ ). Weitere Experimente wurden in gleichzeitiger Anwesenheit von E2 (10  $\mu\text{M}$ ), Verbindung **8** (0.3–10  $\mu\text{M}$ ) oder Raloxifen (0.3–1  $\mu\text{M}$ ) und dem Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 (1–10  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungskurve durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  in halblogarithmischen Schritten (10  $\mu\text{M}$  – 20 mM). In anderen Versuchen wurde die Konzentrations-Wirkungskurve in Anwesenheit des L-Typ-Calcium-Kanal-Aktivators (S)-(-)-Bay K 8644 (0.1  $\mu\text{M}$ ) nach einer Inkubationszeit von 60 min aufgenommen. Auch dieses wurde in An- und Abwesenheit von E2 (10  $\mu\text{M}$ ), Verbindung **8** (0.3–10) oder Raloxifen (0.3–3  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt.

#### **2.2.1.8 Untersuchung zur Beteiligung von intrazellulären Calcium-Speichern mit Hilfe einer Koffein-induzierten Kontraktion**

Für diese Untersuchungen wurden Arteriensegmente mit und ohne Endothel eingangs mit KCl (30 mM) und anschließend zweimal mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ) in der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung kontrahiert. Nach einer 30-minütigen Stabilisierungsphase wurde mittels Koffein (10 mM) eine transiente Kontraktion ausgelöst. Nach einer Waschphase von 5 min folgte eine Ruhephase von 3 min. Im Anschluss an eine Äquilibrationsphase von 30 min wurde eine zweite Kontraktion in An- und Abwesenheit von Raloxifen (3  $\mu\text{M}$ ) mit Koffein (10 mM) ausgelöst. Das Ausmaß dieser Kontraktion bezogen auf die vorausgegangene Koffein-Kontraktion wurde bestimmt.

---

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Extraktion zellulärer Proteine

Für die Isolierung aller zellulären Proteine wurde ein Lysepuffer folgender Zusammensetzung verwendet:

#### Lysepuffer 1

50 mM	Tris
138 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
0.05 %	Tween 20
0.1 %	Triton X-100
0.1 %	SDS

Unmittelbar vor Gebrauch wurden folgende Bestandteile zugesetzt:

80 mM	Natrium- $\beta$ -glycerolphosphat
20 mM	Imidazol
1 mM	DTT
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
1 mM	NaF
10 $\mu$ g/ml	Aprotinin
1 $\mu$ M	Leupeptin
500 $\mu$ M	AEBSF
1 mM	EDTA

Für die Extraktion der Membranproteine wurde ein Lysepuffer folgender Zusammensetzung verwendet:

#### Lysepuffer 2

20 mM	Tris-HCl
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	EDTA
0.6 mM	EGTA

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde der Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt:

---

50 mM	NaF
1 mM	PMSF
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
1 µg/ml	Leupeptin
1 µg/ml	Aprotinin
1 µg/ml	Pepstatin

Die Extraktion zellulärer Proteine wurde durchgeführt, um eine Aktivierung der intrazellulären MAPK p38 und die Anwesenheit des membranständigen GPR30 zu untersuchen.

Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Aktivierung der MAPK-Kaskade erfolgten nach einer Vorbehandlung von Arteriensegmenten im Organbad. Dafür wurden die Organe mit PGF<sub>2α</sub> (3 µM), Verbindung **8** (10 µM), Raloxifen (3 µM), Tamoxifen (10 µM) oder E2 (10 µM) behandelt, oder sie wurden zunächst mit PGF<sub>2α</sub> (3 µM) kontrahiert und anschließend mit Verbindung **8** (10 µM), Raloxifen (3 µM), Tamoxifen (10 µM) oder E2 (10 µM) behandelt. Kontrollsegmente wurden gleichzeitig unbehandelt belassen. Nach 120 min wurden die Gefäßringe aus den Organbädern entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Segmente wurden in einem 2 ml-Kryoröhrchen mit 200 µl eisgekühltem Lysepuffer 1 im Mikro-Dismembrator U (Wolframcarbidgeugel, d=5 mm) 60 s bei 2000 min<sup>-1</sup> homogenisiert und nachfolgend 30 min eisgekühlt. Daraufhin wurde das Homogenat bei 10.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend weiterbearbeitet.

Für die Membranfraktionierung zur Untersuchung des membranständigen GPR30 wurden unbehandelte, tiefgekühlte Arteriensegmente verwendet. Die Homogenisierung erfolgte unter Verwendung von Lysepuffer 2 wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Kryoröhrchen dreimal für jeweils 10 s mit Ultraschall behandelt. Der gesamte Inhalt wurde in Eppendorf-Tubes überführt und in diesen sehr kurz mit wenigen Umdrehungen zentrifugiert, um große Organbestandteile abzutrennen. Um den Aufschluss der Zellen zu unterstützen, wurde der Überstand in einem weiteren Eppendorf-Tube jeweils zehnmal durch Kanülen von 0.9 und 0.5 mm Durchmesser aufgezogen. Um größere Zellorganellen abzutrennen, erfolgte eine Zentrifugation mit 400 g bei 4°C für 5 min. Zur Abtrennung der Membranproteine von der löslichen Fraktion erfolgte nun eine Zentrifugation mit 30.000 g bei 4°C für 90 min. Das Pellet

---

wurde mit 50 µl Lysepuffer 2 aufgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode bestimmt (siehe 2.2.2.2). Die für die Kontrolle verwendeten Lysate von GPR30-negativen MDA-MB-231-Zellen wurden freundlicherweise vom Arbeitskreis Prof. Dr. B. Kleuser, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, zu Verfügung gestellt.

### **2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Damit bei der nachfolgenden Gelelektrophorese einander entsprechende Proteinmengen eingesetzt werden konnten, war eine Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben erforderlich. Diese Bestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Diese Methode basiert auf dem Gleichgewicht zwischen drei Zuständen des Coomassie Blau-Farbstoffes. Unter stark sauren Bedingungen ist die rote, doppelt-protonierte Form (Absorptionsmaximum: 470 nm) am stabilsten. Nach Bindung an ein Protein ist die blaue, unprotonierte Form (Absorptionsmaximum: 595 nm) stabiler. Die einfach-protonierte, grüne Form (Absorptionsmaximum: 650 nm) stellt die am wenigsten stabile Form dar.

Durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm kann die Konzentration einer unbekannt Proteinlösung bestimmt werden. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe der Steigung einer Eichgeraden. Bovines Serumalbumin (BSA) hat sich als international anerkannter Standard für die Eichung durchgesetzt und wurde deshalb verwendet.

#### **Bradford-Reagenz (5-fach)**

125 mg	Coomassie-Brillantblau G-250
125 ml	Ethanol (96 %)
250 ml	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %)
125 ml	Aqua bidest.

Unmittelbar vor der Durchführung der Proteinbestimmung wurde das Bradford-Reagenz 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Zur Ermittlung der Eichgeraden wurde aus einer wässrigen Stammlösung (50 µg/100 µl) des bovinen Serum-Albumins (BSA) eine Verdünnungsreihe erstellt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der eigentlichen Proben wurden diese mit Aqua bidest. verdünnt und das verdünnte Bradford-Reagenz zugesetzt. Die Proben wurden wie folgt erstellt (Tabelle 2):

**Tabelle 2 .** Schema der Proteinbestimmung nach Bradford

BSA-Stamm- lösung [ $\mu$ l]	BSA-Kon- zentration [ $\mu$ g]	Lysepuffer 2 [ $\mu$ l]	Aqua bidest. [ $\mu$ l]	Bradford- Reagenz [ml]
0	0	5	95	1
5	2.5	5	90	1
10	5.0	5	85	1
15	7.5	5	80	1
20	10.0	5	75	1
Zelllysate [ $\mu$ l]		5	95	1

Die Absorptionen wurden mittels Photometer 922 bei 595 nm gemessen. Die Ergebnisse der Vermessung der BSA-Verdünnungsreihe wurden einer linearen Regression unterzogen. Um die Proteinkonzentration der eigentlichen Proben zu bestimmen, wurde folgende Gleichung verwendet:

$$A_{St} = x \cdot \mu\text{g BSA}$$

$$\text{Protein } [\mu\text{g}/100 \mu\text{l}] = A / x \cdot 20$$

$A_{St}$ : Absorption des BSA-Standards bei 595 nm

A: Absorption der Probe bei 595 nm

### 2.2.2.3 Proteinbestimmung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

#### 2.2.2.3.1 Lösungen für die Gelelektrophorese und Western Blot-Experimente

**Probenpuffer** (zum Auftragen des Proteins auf das Gel)

500 $\mu$ M	Tris-HCl
25 %	Glycerol
2 %	SDS
0.05 %	Bromphenolblau
in	Aqua bidest.

---

**Laufpuffer (10-fach, pH 8.3)**

144 g/l	Glycin
30.2 g/l	Tris-Base
10 g/l	SDS
in	Aqua bidest.

**Sammelgelpuffer (pH 6.8)**

60 g/l	Tris-HCl
in	Aqua bidest.

**Trenngelpuffer (pH 8.8)**

224.8 g/l	Tris-Base
in	Aqua bidest.

**Phosphathaltiger Puffer (PBS)**

0.2 g/l	KCl
8.0 g/l	NaCl
0.2 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
1.44 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
in	Aqua bidest.

**SDS-Polyacrylamidgel (Trenngel, 10 %)**

5.4 ml	Aqua bidest.
1.2 ml	SDS (1 % in Aqua bidest.)
2.4 ml	Trenngelpuffer
10 $\mu\text{l}$	TEMED
60 $\mu\text{l}$	Ammoniumpersulfat (0.1 g/ml in Aqua bidest.)
3.0 ml	Acrylamid Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40

**Sammelgel (5 %)**

2.3 ml	Aqua bidest.
0.4 ml	SDS (1 % in Aqua bidest.)
0.8 ml	Sammelgelpuffer
4 µl	TEMED
20 µl	Ammoniumpersulfat (0.1 g/ml in Aqua bidest.)
0.5 ml	Acrylamid Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40

**TBS-Puffer (10-fach)**

12.14 g/l	Tris-HCl
87.66 g/l	NaCl
in	Aqua bidest.

Zur Herstellung von TBST-Puffer wurden 0.1 % Tween 20 zugesetzt und der pH-Wert auf 8 eingestellt.

**Blotpuffer (10-fach)**

144 g/l	Glycin
30 g/l	Tris-Base
in	Aqua bidest.

**Blocklösung**

5 %	Trockenmilchpulver Sucofin (fettarm)
in	TBST

**2.2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Molekulargewichte:

p38 MAPK	~ 38 kDa
phospho-p38 MAPK	~ 38 kDa
GPR30	~ 38 kDa
β-Catenin	~ 92 kDa

Die elektrophoretische Auftrennung zur Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe eines 5 %igen Polyacrylamid-Sammelgels und eines 10 %igen Polyacrylamid-Trenngels

---

zwischen Glasplatten. Zwei Glasplatten, voneinander getrennt durch Spacer und Dichtungen, wurden dafür mittels Klammern aneinander befestigt. Die Bestandteile des Sammelgels wurden in der oben angegebenen Reihenfolge gemischt. Davon wurden 9.5 ml zwischen die Glasplatten gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten und Austrocknung zu verhindern. Nach der Aushärtung dieser Gelschicht wurde der Isopropanol abgegossen. Die Bestandteile des Sammelgels wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt und anschließend auf das Trenngel gegossen. Sofort wurde ein Kamm zur Formung der Probestaschen eingesetzt. Nach der Aushärtung wurden jeweils zwei dieser Glas-kammern in eine Elektrophorese-Kammer gestellt. Mit Aqua bidest. verdünnter Laufpuffer wurde in den oberen und unteren Tank der Elektrophoresekammer gegeben. Nach der Entfernung der Käme wurden die Probestaschen mit den Proteinproben beladen. Als Größenmarker wurde ein kommerziell erhältliches Standard-Proteingemisch verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 35 mA im Sammelgel und 55 mA im Trenngel.

#### **2.2.2.3.3 Western Blot**

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Tank-Blot-Systems von den Polyacrylamidgelen auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)- bzw. Nitrocellulosemembranen übertragen. Nach abgeschlossener Auftrennung der Proteine in den Gelen wurden die Glasplatten und die Sammelgele vorsichtig entfernt und die Trenngele für 15 min im Blotpuffer inkubiert. Zur Vorbereitung des Proteintransfers wurden die PVDF-Membranen zur Benetzung für 15 s mit Methanol aktiviert, danach 2 min mit Wasser gewaschen und für 5 min im Blockpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran unter Vermeidung von Luftblasen auf das Trenngel gelegt. Von beiden Seiten wurden zahlreiche, mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere, nach außen durch getränkte Schwämme begrenzt, geschichtet. Mit Hilfe eines Fixierrahmens wurde das System in eine mit Blotpuffer (verdünnt mit Aqua bidest.) gefüllte Tank-Blot-Kammer eingebracht. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte über Nacht bei einer Stromstärke von 100 mA. Anschließend wurde die Membran entnommen. Zur Visualisierung der entsprechenden Proteine diente die indirekte Immunodetektion. Zunächst wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungen 1 h in 50 ml Blocklösung bei 37°C vorsichtig geschwenkt. Weil der GPR30-Antikörper nur in sehr kleinen Mengen erhältlich ist, wurden diese Membranen dicht ober- und unterhalb

der 38 kDa-Bande geschnitten, um das Volumen der Antikörperlösung so gering wie möglich zu halten. Der obere Teil Membran wurde mit anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper behandelt. Die Membranen für die Bestimmung der MAPK p38 und phospho-p38 konnten dagegen als ganzes inkubiert werden. Die Blocklösung wurde durch dreimaliges Waschen der Membranen mit TBST-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Zielproteine mit den primären Antikörpern markiert, indem die Membranen in den Antikörperlösungen vorsichtig geschwenkt wurden (2 h bei Raumtemperatur für die  $\beta$ -Catenin- und MAPK-Antikörper oder über Nacht bei 4°C für den GPR30-Antikörper). Die Antikörper wurden dafür entweder in Aqua bidest. (20 ml pro Membran; p38, phospho-p38,  $\beta$ -Catenin) oder in 0.4 % BSA in phosphathaltigem Puffer (PBS; 2 ml pro Membran; GPR30) 1:1000 verdünnt. Anschließend wurden die Membranen dreimal für jeweils 5 min mit TBST gewaschen, um eine Inkubation mit den signalgebenden, Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern zu ermöglichen. Dafür wurden die entsprechenden Antikörper 1:1000 mit Blocklösung verdünnt und die Membranen in dieser Lösung 1 h bei Raumtemperatur und vorsichtigem Schwenken inkubiert. Nach drei weiteren Waschungen mit TBST-Puffer konnte der Proteinnachweis mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des LumiGlo®-Kits angeschlossen werden. Dafür wurden die Peroxidase und das Luminol-Reagenz 1:1 gemischt und anschließend 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. In dieser Lösung wurden die Membranen 1 min lang vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden sie luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. In einer Entwicklungskassette wurden Röntgenfilme durch Exposition auf den Membranen belichtet. Die durch den Umsatz des Reagenzes freiwerdende Photoenergie – in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und des Enzyms HRP bildet sich aus Luminol das entsprechende Dianion, welches Licht emittiert – wurde dabei durch Auflegen der photoempfindlichen Schicht sichtbar und beständig gemacht. Die Expositionszeit war abhängig von den jeweiligen Antikörpern und dem entsprechenden Test und richtete sich nach der Intensität des zu erwartenden Signals. Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgte anschließend durch Behandlung des Films mit Entwickler und Fixierer. Schließlich erfolgte die densitometrische Quantifizierung der erhaltenen Banden.

### **2.2.3 Datenanalyse und Statistik**

Alle Daten sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M) angegeben. Der Stichprobenumfang für jeden Versuch ist mit  $n$  für die An-

---

zahl der Tiere angegeben. Die Potenz der Agonisten wurde als  $pEC_{50}$ -Wert angegeben. Dieser Wert gibt den negativen dekadischen Logarithmus der Stoffmengenkonzentration eines Agonisten an, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. Der durch einen Agonisten vermittelte Maximaleffekt wurde als  $E_{max}$ -Wert angegeben. Dieser Wert gibt den maximal beobachteten Effekt im Verhältnis zur Kontraktion durch KCl,  $PGF_{2\alpha}$  oder  $CaCl_2$  in Prozent an.

Wurden mehrere Mittelwerte miteinander verglichen, kam eine Varianzanalyse (ANOVA) in Verbindung mit einem geeigneten *Post-hoc* Test (*Tukey-Test*) zur Anwendung. Zur Auswertung aller anderen Daten wurde der *t-Test* nach *Student* angewendet, ungepaart für den Vergleich von voneinander unabhängigen Werten, gepaart für den Vergleich von Experiment und Kontrollversuch. Vorangestellt werden musste die Untersuchung auf Normalverteilung (*Shapiro-Wilk-Test*) und die Untersuchung auf Homogenität der Varianzen (*F-Test*). Unterschiede der Mittelwerte wurden als signifikant angesehen, wenn die *P*-Werte  $\leq 0.05$  waren.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Validierung des pharmakologischen Modells der Koronararterie des Schweins

Die Charakterisierung vasorelaxierender Effekte von SERMs sollte mittels Organbadversuchen durchgeführt werden. Für diese Untersuchung existieren bereits verschiedene Organmodelle. Allerdings bestehen große Unterschiede in den pharmakologischen Charakteristika verschiedener Gefäßsysteme. Weiterhin weisen gleiche Gefäße unterschiedlicher Spezies grundlegende Differenzen im Ausmaß ihrer Innervation auf. Außerdem unterscheiden sie sich in der Verwendung von intra- und extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  bei Kontraktionen der glatten Gefäßmuskulatur und in ihrem Rezeptorexpressionsprofil (Blaylock und Wilson, 1995). In diesem Zusammenhang ist zu betonen, dass Menschen und Schweine anatomische, physiologische, histologische und biochemische Gemeinsamkeiten aufweisen (Pound und Houpt, 1978). Da aus diesem Grund Schweine das bevorzugte Modell für koronare Herzerkrankungen sind (Nikol et al., 2001), wurden für alle Experimente isolierte Koronararterien des Schweins verwendet.

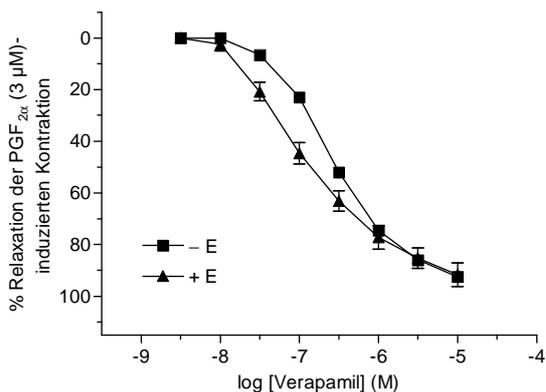
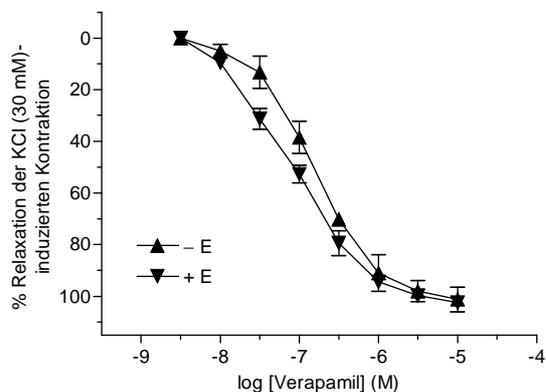
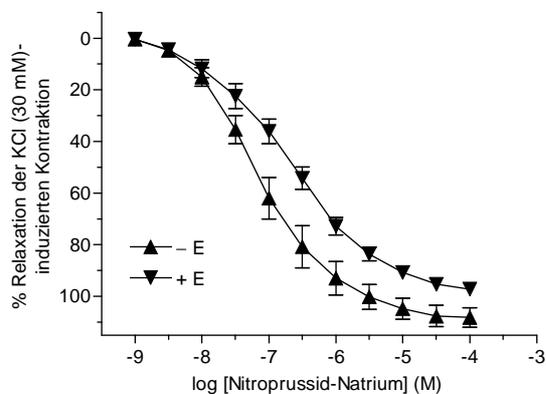
Um die Eignung dieser Arterien zur Testung vasorelaxierender Substanzen zu bestätigen, wurden Relaxationsversuche mit dem Endothel-unabhängigen NO-Donator Nitroprussid-Natrium und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker Verapamil durchgeführt. Anschließend wurde in zahlreichen Experimenten die Wirkung von E2 untersucht. Alle Ergebnisse wurden mit Literaturdaten verglichen.

Zunächst wurden Arteriensegmente der Koronararterien mit oder ohne Endothel mittels KCl bzw.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vorkontrahiert. Innerhalb von etwa 10 bis 20 min erreichte die Kontraktion der Gefäßringe unabhängig vom kontrahierenden Agens eine Plateauphase. Nach Zugabe von KCl (30 mM) erzielten Ringe mit intaktem Endothel eine Kontraktionskraft von  $3.3 \pm 0.4$  g ( $n=6$ ), Ringe ohne Endothel  $3.3 \pm 0.3$  g ( $n=6$ ). Nach Zugabe von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ) wurde eine Kontraktionskraft von  $2.7 \pm 0.3$  g ( $n=6$ ) in Ringen mit intaktem Endothel erreicht. Ringe ohne Endothel entwickelten eine Kontraktionskraft von  $3.0 \pm 0.5$  g ( $n=6$ ).

Experimente mit Nitroprussid-Natrium lieferten in KCl-vorkontrahierten Arteriensegmenten mit Endothel einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $6.65 \pm 0.13$  ( $n=5$ ), in Arteriensegmenten ohne Endothel einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $7.09 \pm 0.16$  ( $n=5$ ) (Abb. 10, oben). Vergleichba-

re Werte sind an verschiedenen Organen in der Literatur beschrieben worden (siehe 4.2).

Experimente mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker Verapamil lieferten in KCl-vorkontrahierten Arteriensegmenten mit Endothel einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $7.04 \pm 0.08$  ( $n=4$ ), an Arteriensegmenten ohne Endothel einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $6.82 \pm 0.07$  ( $n=4$ ) (Abb. 10, Mitte). Vorkontraktion mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ ) lieferte vergleichbare Werte. Organe mit Endothel ergaben einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $6.93 \pm 0.06$  ( $n=6$ ). Ohne Endothel ergab sich ein Wert von  $6.58 \pm 0.01$  ( $n=2$ ) (Abb. 10, unten). Auch diese Werte entsprachen den in der Literatur gefundenen Daten (siehe 4.2).



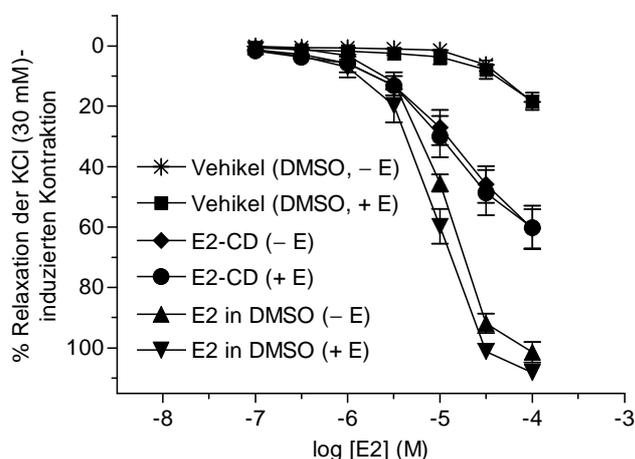
**Abb. 10.** Vasorelaxierende Effekte von Nitroprussid-Natrium und Verapamil an Schweinekoronararterien mit (+E) und ohne (-E) Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM, oben und Mitte)- bzw. der  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ , unten)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=2-6$  Tiere).

## 3.2 Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von 17 $\beta$ -Estradiol

### 3.2.1 Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins

#### 3.2.1.1 Verwendung unterschiedlicher 17 $\beta$ -Estradiol-Lösungen; Einfluss des Endothels auf die Relaxation durch 17 $\beta$ -Estradiol

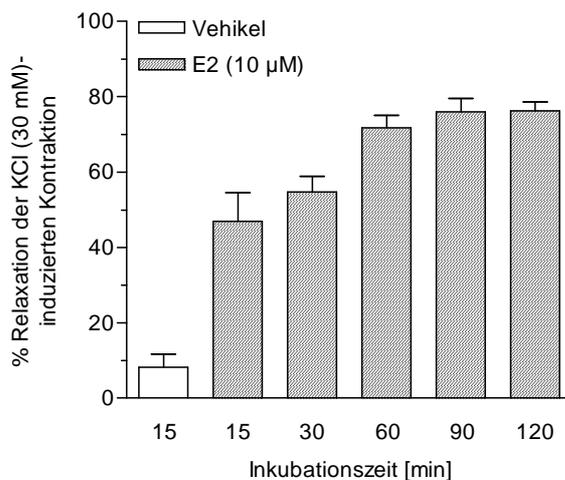
Um die vasodilatatorischen Eigenschaften von 17 $\beta$ -Estradiol (E2) zu untersuchen, wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven an der Koronararterie des Schweins aufgenommen. Zunächst sollte die Eignung von reinem E2 oder der E2-Cyclodextrin-Einschlussverbindung für die weitere Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von E2 bestimmt werden. Dabei zeigte die wasserlösliche E2-Cyclodextrin-Einschlussverbindung (45 mg E2 pro Gramm Feststoff; in 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) eine geringere Vasorelaxation [ $P < 0.05$ ; ohne Endothel:  $pEC_{50} = 4.68 \pm 0.08$  und  $E_{max} = 75 \pm 11 \%$  ( $n=6$ ); mit Endothel:  $pEC_{50} = 4.80 \pm 0.07$  und  $E_{max} = 67 \pm 10 \%$  ( $n=6$ )] als eine Lösung von E2 in DMSO [ohne Endothel:  $pEC_{50} = 4.94 \pm 0.01$  und  $E_{max} = 108 \pm 3 \%$  ( $n=5$ ); mit Endothel:  $pEC_{50} = 5.00 \pm 0.03$  und  $E_{max} = 111 \pm 2 \%$  ( $n=5$ )]. Wie Abb. 11 zeigt, ist die stärkere Relaxation der E2-DMSO-Lösung nur zu einem geringen Teil ein DMSO-Effekt. Aus diesem Grund wurde die E2-DMSO-Lösung für alle weiteren Experimente verwendet. In beiden oben genannten Lösungen verursachte E2 (0.1–100  $\mu$ M) eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation der vorkontrahierten Gefäßringe. Die agonistischen Potenzen ( $pEC_{50}$ ) und die maximalen agonistischen Effekte ( $E_{max}$ ) waren identisch in Segmenten mit und ohne Endothel (Abb. 11). Im Gegensatz zu E2 zeigte 17 $\alpha$ -Estradiol keine Vasorelaxation der porcinen Koronararterie (ohne Abb.).



**Abb. 11.** Vasorelaxierende Effekte von E2 in DMSO und der E2-Cyclodextrin (CD)-Einschlussverbindung an Schweinekronararterien mit (+E) und ohne (-E) Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$  Tiere).

### 3.2.1.2 Zeitabhängigkeit der Relaxation

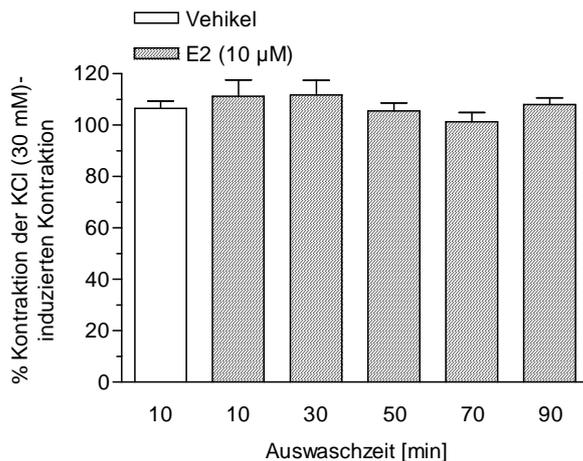
Um die vasorelaxierenden Effekte einheitlich auswerten zu können, wurde die Zeitabhängigkeit der E2-induzierten Vasorelaxation untersucht. Dabei erwies sich ein Endpunkt der Inkubation nach 120 min als optimal, um die entsprechende Plateauphase der Relaxation auszuwerten (Abb. 12). Für alle Versuche, in denen nur eine Konzentration von E2 und SERMs verwendet wurde, wurde dieser Zeitpunkt für die Auswertung übernommen.



**Abb. 12.** Zeitabhängigkeit der vasorelaxierenden Effekte von E2 in DMSO (10 µM) an Schweinekoronararterien mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

### 3.2.2 Reversibilität der Relaxation durch 17 $\beta$ -Estradiol

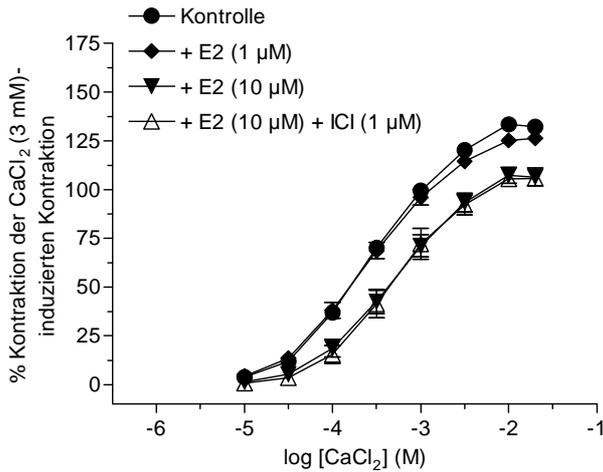
Um die Reversibilität des E2-Effekts in Arteriensegmenten mit Endothel zu untersuchen, wurde die kontraktile Wirkung von KCl (30 mM) zu Versuchsbeginn mit der am Versuchsende nach wiederholten Auswaschungen und einer Gesamtversuchsdauer von 130 min verglichen. Die Behandlung der Gefäßringe mit E2 (10 µM; 120 min Inkubation) führte nicht zu einer Hemmung der KCl-induzierten Kontraktion am Versuchsende, sondern zeigte eine vollständige Reversibilität des relaxierenden Effekts. In Kontrollexperimenten erreichten die Gefäßringe bei KCl-Zugabe eine Kontraktionskraft von  $107 \pm 3$  %. Nach E2-Inkubation (10 µM) und Auswaschzeiten von 10, 30, 50, 70 oder 90 min ( $n=4$ ) erreichten die Arteriensegmente Kontraktionskräfte von  $111 \pm 6$ ,  $112 \pm 6$ ,  $106 \pm 3$ ,  $101 \pm 4$  und  $108 \pm 3$  % (Abb. 13).



**Abb. 13.** Kontraktion (KCl 30 mM) der Schweinekoronararterie mit Endothel nach E2-induzierter Relaxation und anschließenden Auswaschphasen von 10, 30, 50, 70 oder 90 min  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

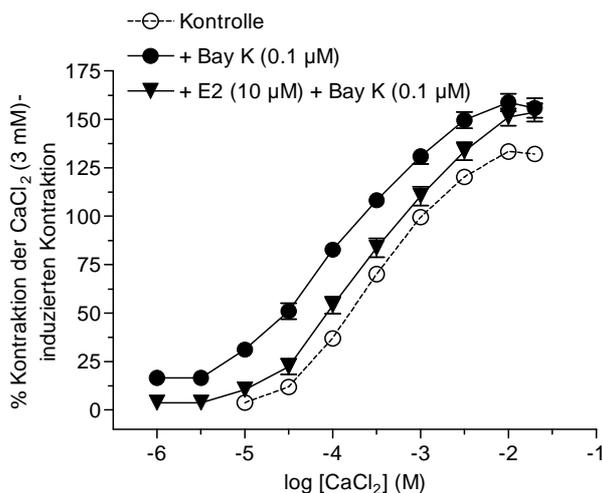
### 3.2.3 Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf Calcium-Kanäle

Im depolarisierenden Medium ( $K^+$ : 60 mM) konnte eine kumulative  $Ca^{2+}$ -Konzentrations-Wirkungskurve ( $pEC_{50} = 3.51 \pm 0.04$ ,  $E_{max} = 136 \pm 3 \%$ ,  $n=10$ ) an Arterienringen ohne Endothel durch E2 (10  $\mu$ M) konzentrationsabhängig nach rechts verschoben werden ( $pEC_{50} = 3.27 \pm 0.07$ ,  $E_{max} = 110 \pm 4 \%$ ,  $n=9$ ). In einer Konzentration von 1  $\mu$ M bewirkte E2 keine Rechtsverschiebung ( $pEC_{50} = 3.55 \pm 0.06$ ,  $E_{max} = 128 \pm 2 \%$ ,  $n=6$ ). Außerdem verminderte sich konzentrationsabhängig der maximale kontraktile Effekt. Die Hemmung durch E2 (10  $\mu$ M) konnte dabei nicht mit dem ER-Antagonisten ICI 182,780 (1  $\mu$ M) beeinflusst werden ( $pEC_{50} = 3.25 \pm 0.10$ ,  $E_{max} = 110 \pm 3 \%$ ,  $n=3$ ) (Abb. 14). Die Hemmung von L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanälen konnte durch eine Rechtsverschiebung der Kontrollkurve mit Verapamil (0.3  $\mu$ M) bestätigt werden ( $-E$ :  $pEC_{50} = 2.53 \pm 0.14$ ,  $E_{max} = 99 \pm 8 \%$ ,  $n=6$ ;  $+E$ :  $pEC_{50} = 2.62 \pm 0.03$ ,  $E_{max} = 110 \pm 5 \%$ ,  $n=6$ ) (ohne Abb.). Die  $pEC_{50}$ - und  $E_{max}$ -Werte an Arteriensegmenten mit oder ohne Endothel unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ohne Abb.).



**Abb. 14.** Hemmung des kontraktiven Effekts von  $\text{CaCl}_2$  durch E2 in An- und Abwesenheit von ICI 182,780 an Koronararterien des Schweins ohne Endothel. Dargestellt sind die kontraktiven Effekte der  $\text{CaCl}_2$  (3 mM)-induzierten Kontraktion in Prozent  $\pm$  S.E.M. ( $n=3-10$  Tiere).

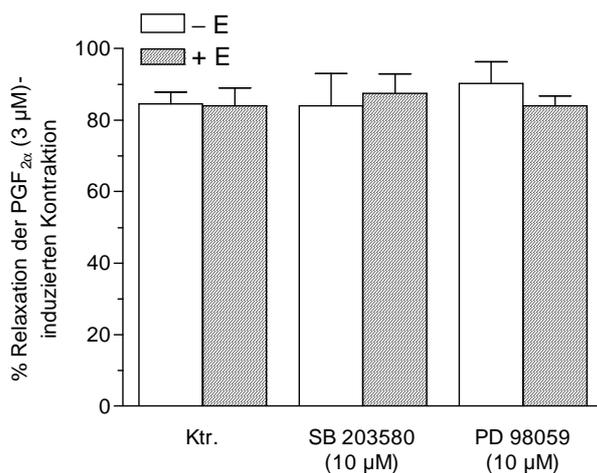
Arteriensegmente, die vor der Kontraktion mit dem L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivator (S)-(-)-Bay K 8644 (0.1  $\mu\text{M}$ ) inkubiert wurden, zeigten in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kontrollkurve eine Linksverschiebung ( $\text{pEC}_{50} = 3.96 \pm 0.07$ ,  $E_{\text{max}} = 168 \pm 5 \%$ ,  $n=9$ ). E2 (10  $\mu\text{M}$ ) konnte den Effekt von (S)-(-)-Bay K 8644 konzentrationsabhängig hemmen ( $\text{pEC}_{50} = 3.50 \pm 0.07$ ,  $E_{\text{max}} = 163 \pm 5 \%$ ,  $n=6$ ) (Abb. 15).



**Abb. 15.** Einfluss von (S)-(-)-Bay K 8644 auf die  $\text{CaCl}_2$ -induzierte Kontraktion in An- und Abwesenheit von E2 an Schweinekoronararterien ohne Endothel. Dargestellt sind die kontraktiven Effekte der  $\text{CaCl}_2$  (3 mM)-induzierten Kontraktion in Prozent  $\pm$  S.E.M. ( $n=6-10$  Tiere).

### 3.2.4 Beteiligung von Signalkaskaden an der Relaxation durch 17 $\beta$ -Estradiol

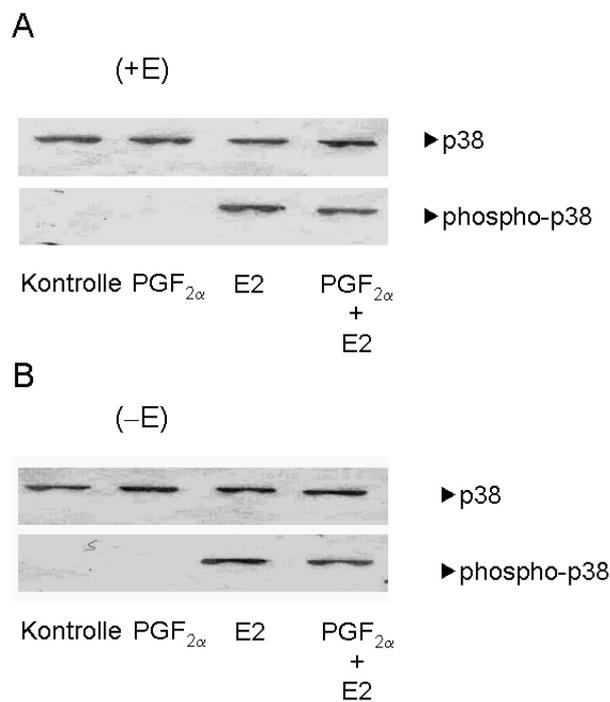
Da in der Literatur die Aktivierung der MAPK p38 mit einer Vasorelaxation der Koronararterien vom Schwein in Verbindung gebracht werden konnte, sollte auch die Beteiligung dieser Signalkaskade durch E2 (10  $\mu$ M) untersucht werden. Funktionelle Untersuchungen zeigten allerdings keinen Einfluss des MAPK-p38-Inhibitors SB 203580 (10  $\mu$ M) auf die E2-induzierte Relaxation [ $E_{\max}$  (Kontrolle): 85  $\pm$  3 % (-E); 84  $\pm$  5 % (+E);  $n=4$ ;  $E_{\max}$  in Anwesenheit von SB 203580: 84  $\pm$  9 % (-E); 88  $\pm$  5 % (+E);  $n=4$ ;  $P>0.05$ ]. Auch der ERK1/2-Kinase-Inhibitor PD 98059 (10  $\mu$ M) zeigte in separaten Experimenten keinen Einfluss auf diese Vasorelaxation [ $E_{\max}$  in Anwesenheit von PD 98059: 90  $\pm$  6 % (-E); 84  $\pm$  3 % (+E);  $n=4$ ;  $P>0.05$ ] (Abb. 16). SB 203580 veränderte dabei die PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (3  $\mu$ M)-induzierte Kontraktion nicht, wohingegen PD 98059 diese reduzierte ( $P<0.05$ ; ohne Abb.).



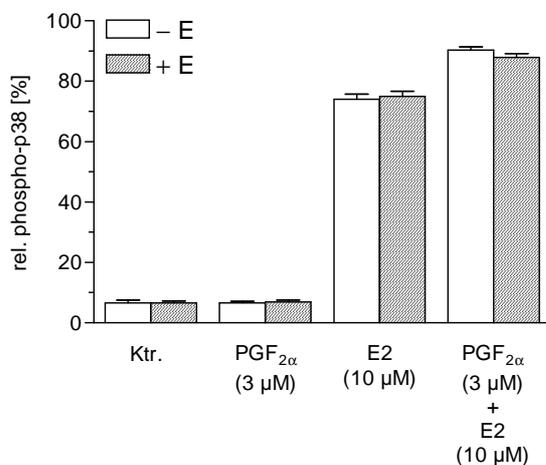
**Abb. 16.** Einfluss der Inkubation (30 min) der Arteriensegmente der Schweinekoronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E) mit SB 203580 (10  $\mu$ M) und PD 98059 (10  $\mu$ M) auf die E2 (10  $\mu$ M)-induzierte Relaxation nach 120 min. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (3  $\mu$ M)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

Ergänzend wurde mittels Western Blot-Analyse die Phosphorylierung der MAPK p38 durch E2 untersucht. Arteriensegmente, die ausschließlich mit E2 (10  $\mu$ M, 120 min) behandelt wurden, zeigten wie auch Gefäßringe, die zunächst mittels PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (3  $\mu$ M) vorkontrahiert wurden und anschließend durch Zugabe von E2 (10  $\mu$ M, 120 min) relaxiert wurden, eine signifikante Zunahme der phosphorylierten MAPK p38. In unbehandelten Kontrollsegmenten konnte keine Phosphorylierung beobachtet werden.

Diese Versuche wurden jeweils an Arteriensegmenten mit und ohne Endothel durchgeführt. In  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ )-vokontrahierten Gefäßringen konnte nach 120 min kein Anstieg der phosphorylierten Form der MAPK p38 nachgewiesen werden (Abb. 17, Abb. 18). Der Einfluss von E2 und anderen Verbindungen auf den Grad der Phosphorylierung der MAPK p38 wurde nach 120 min ausgewertet, weil die Relaxation in funktionellen Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt als Maximaleffekt ausgewertet wurde.



**Abb. 17.** Immunoblot von Proteinen der Schweinekoronararterie, aufgetrennt mittels SDS-PAGE, übertragen auf Nitrocellulosemembranen und inkubiert mit einem primären Antikörper gegen die nicht-phosphorylierte (p38) und die phosphorylierte MAPK p38 (phospho-p38). Ringe der Schweinekoronararterie mit (+E; A) oder ohne Endothel (-E; B) wurden im Organbad verschiedenen Behandlungen ausgesetzt: keine Inkubation (basale Bedingungen),  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ ), E2 ( $10 \mu\text{M}$ ), und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ ) + E2 ( $10 \mu\text{M}$ ). Nach 120 min wurden die Ringe unmittelbar eingefroren, homogenisiert und dann der SDS-PAGE unterzogen. Dieser Blot steht repräsentativ für vier verschiedene Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

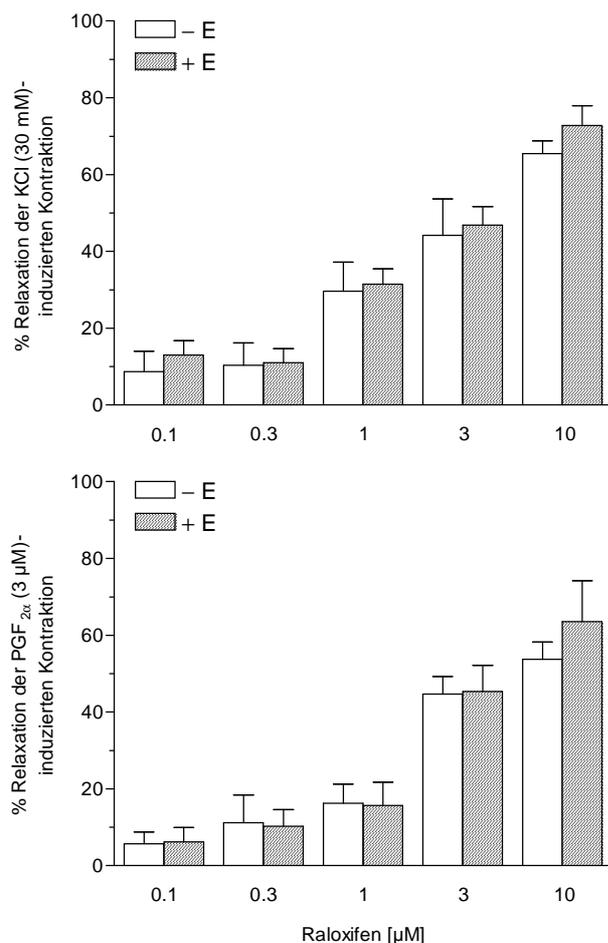


**Abb. 18.** Das Balkendiagramm zeigt Veränderungen des Phosphorylierungsgrads der MAPK p38 in Ringen der Schweinekoronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E). Durchführung der Experimente siehe Legende von Abb. 17. Dargestellt ist der durch densitometrische Auswertung bestimmte relative Anteil von phospho-p38 ( $\text{phospho-p38/p38} \times 100$ )  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

### 3.3 Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von Raloxifen

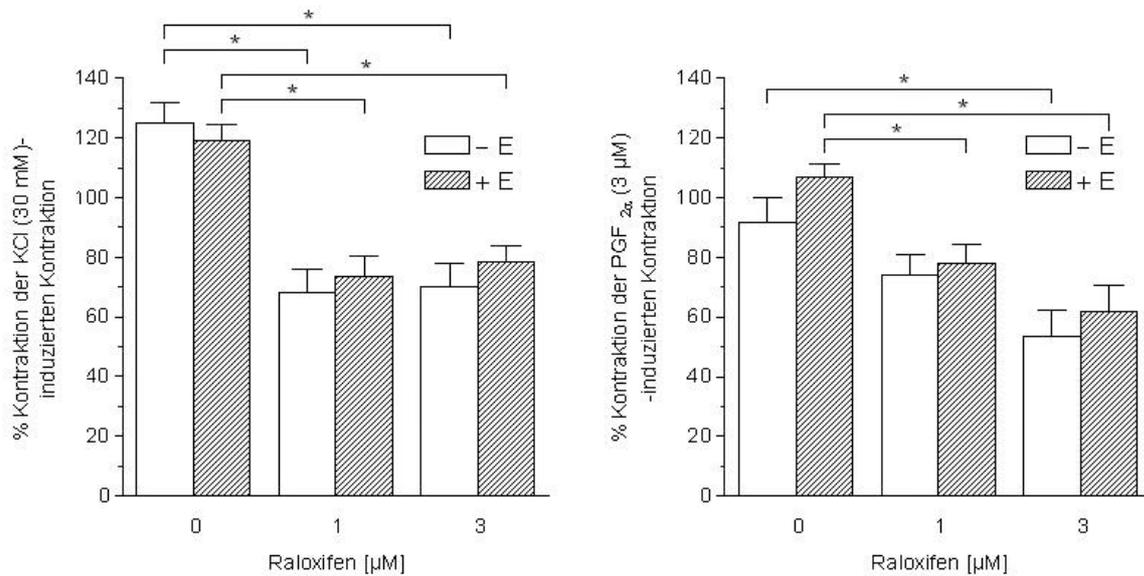
#### 3.3.1 Einfluss von Raloxifen auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins

Raloxifen (0.1–10  $\mu\text{M}$ ) verursachte eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation vorkontrahierter Gefäßringe mit und ohne Endothel. Die Relaxationen wurden über einen Zeitraum von 120 min beobachtet. Sowohl nach KCl- als auch nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierter Kontraktion setzte die Relaxation unmittelbar nach Zugabe von Raloxifen ein. Dies stimmte mit dem vasorelaxierenden Effekt von E2 überein. Allerdings wurde durch Raloxifen im Gegensatz zu der E2-induzierten Relaxation normalerweise innerhalb von 120 min kein Plateau erreicht. Das Ausmaß der Relaxation durch Raloxifen war unabhängig vom kontrahierenden Agens ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  oder KCl), ebenso wie von der An- bzw. Abwesenheit eines intakten Endothels (Abb. 19).



**Abb. 19.** Relaxierende Effekte von Raloxifen (0.1–10  $\mu\text{M}$ ) nach Vorkontraktion mit KCl (30 mM; oben) oder  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ; unten) nach 120 min an Ringen der Schweinekronararterie mit (+E) und ohne Endothel (–E). Die relaxierenden Effekte von Raloxifen wurden individuell um das Abschlagen der entsprechenden Kontrollsegmente korrigiert. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)- oder  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ )-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=5-6$  Tiere).

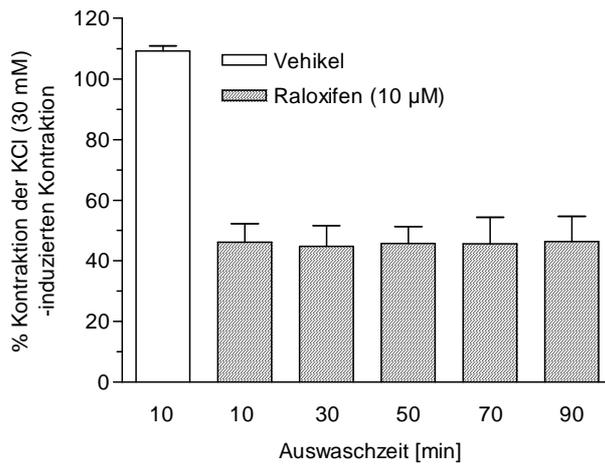
In separaten Versuchen wurden die Arteriensegmente mit Raloxifen (1–3  $\mu\text{M}$ ) 60 min inkubiert, bevor eine Kontraktion mit KCl (30 mM) oder  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ) ausgelöst wurde. Dabei verminderte Raloxifen den kontraktile Effekt von KCl oder  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Abb. 20).



**Abb. 20.** Hemmung des kontraktileffekts von KCl (30 mM, oben) und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ , unten) durch Raloxifen (Inkubationszeit: 60 min) an Ringen der Schweinekoronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E). Dargestellt sind die kontraktileffekte von KCl (30 mM) und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ) bezogen auf die vorangehende Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=4-10$  Tiere),  $*P<0.05$ .

### 3.3.2 Reversibilität der Raloxifen-induzierten Relaxation

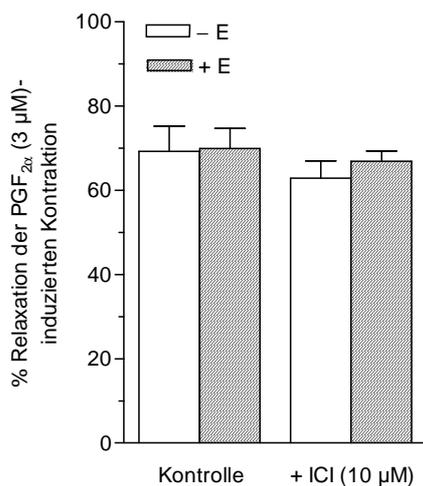
Um die Reversibilität des Raloxifen-Effekts in Arteriensegmenten mit Endothel zu untersuchen, wurden die kontraktileffekte von KCl (30 mM) zu Beginn des Versuches mit den kontraktileffekten von KCl am Ende des Versuches nach wiederholten Auswaschungen und einer Gesamtversuchsdauer von 130 min verglichen. Behandlung der Gefäßringe mit Raloxifen (10  $\mu\text{M}$ ; 120 min Inkubation) führte zu einer Hemmung der abschließenden KCl-induzierten Kontraktion. In Kontrollexperimenten erreichten die Gefäßringe bei KCl-Zugabe eine Kontraktionskraft von  $109 \pm 2$  %. Durch Raloxifeninkubation (10  $\mu\text{M}$ ) wurde diese auf  $46 \pm 6$ ,  $45 \pm 7$ ,  $46 \pm 6$ ,  $46 \pm 9$  und  $46 \pm 8$  % nach Auswaschzeiten von 10, 30, 50, 70 oder 90 min reduziert ( $n=5$ ) (Abb. 21). Dies steht im Gegensatz zur vollständigen Reversibilität des E2-induzierten Effekts (siehe 3.2.2).



**Abb. 21.** Kontraktion (KCl 30 mM) der Schweinekoronararterie mit Endothel nach Raloxifen-induzierter Relaxation und anschließenden Auswaschphasen von 10, 30, 50, 70 oder 90 min  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$  Tiere).

### 3.3.3 Einfluss von ICI 182,780 auf die Raloxifen-induzierte Relaxation

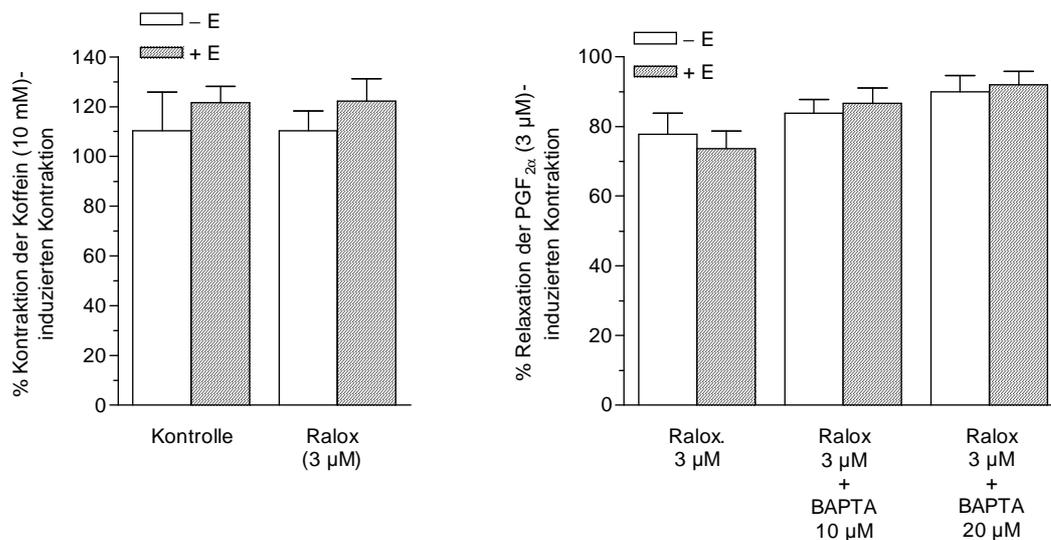
Eine 60-minütige Vorinkubation mit dem spezifischen ER-Antagonisten ICI 182,780 (10  $\mu$ M) führte nicht zu einer Hemmung der Raloxifen (1  $\mu$ M)-induzierten Relaxation in PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -vorkontrahierten Gefäßringen mit und ohne Endothel (Abb. 22).



**Abb. 22.** Einfluss der Inkubation der Arteriensegmente der Schweinekoronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E) mit ICI 182,780 (10  $\mu$ M, 60 min) auf die Raloxifen (1  $\mu$ M)-induzierte Relaxation nach 120 min. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (3  $\mu$ M)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

### 3.3.4 Einfluss von Raloxifen auf intrazelluläre Calcium-Kanäle

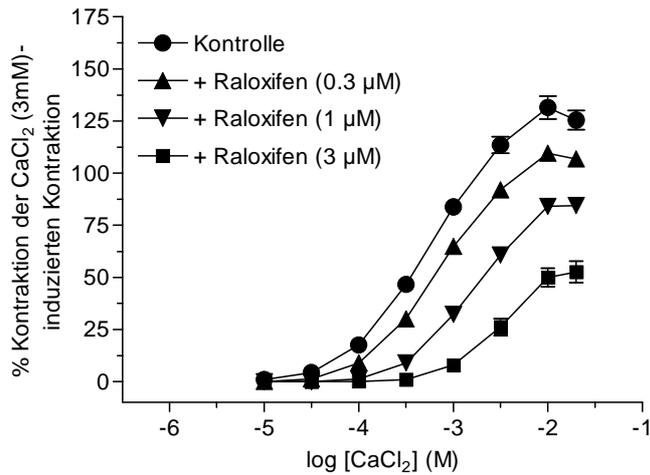
In Arteriensegmenten mit und ohne Endothel wurde mittels Koffein (10 mM), das zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern führt, eine transiente Kontraktion ausgelöst. Diese konnte nicht durch Raloxifen (3  $\mu\text{M}$ ) gehemmt werden (Abb. 23, links). Darüber hinaus wurde die Raloxifen (3  $\mu\text{M}$ )-induzierte Relaxation nicht durch den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM (10–20  $\mu\text{M}$ ) beeinflusst (Abb. 23, rechts).



**Abb. 23.** Einfluss von Raloxifen auf intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Arteriensegmenten der Schweinekronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E). Links: Koffein-induzierte, transiente Kontraktion in Ab- und Anwesenheit von Raloxifen. Dargestellt sind die kontraktile Effekte von Koffein (10 mM) bezogen auf die vorangegangene Koffein-Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere). Rechts: Relaxierende Effekte von Raloxifen in Ab- und Anwesenheit von BAPTA-AM (10 und 20  $\mu\text{M}$ ). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ )-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=6$  Tiere).

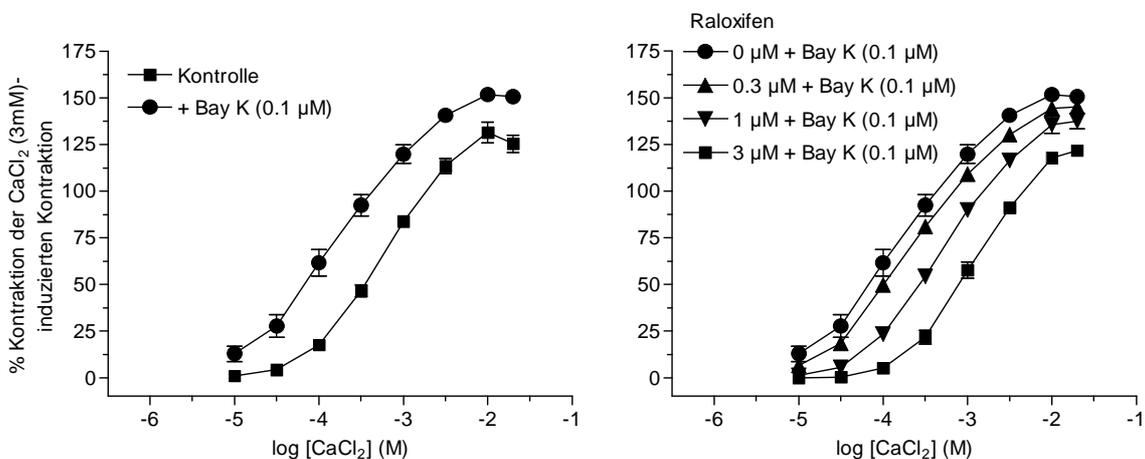
### 3.3.5 Einfluss von Raloxifen auf L-Typ-Calcium-Kanäle

In Arterienringen ohne Endothel konnte im depolarisierenden Medium ( $\text{K}^+$ : 60 mM) eine kumulative  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations-Wirkungskurve ( $\text{pEC}_{50} = 3.29 \pm 0.05$ ,  $n=6$ ) durch Raloxifen (0.3–3  $\mu\text{M}$ ) konzentrationsabhängig nach rechts verschoben werden. Außerdem verminderte sich konzentrationsabhängig der maximale kontraktile Effekt (Abb. 24). Die Hemmung durch Raloxifen (1–3  $\mu\text{M}$ ) konnte dabei nicht durch ICI 182,780 (1–10  $\mu\text{M}$ ) beeinflusst werden (ohne Abb.).



**Abb. 24.** Hemmung des kontraktiven Effekts von  $\text{CaCl}_2$  durch Raloxifen in Arteriensegmenten der Schweinekoronararterie ohne Endothel. Dargestellt sind die kontraktiven Effekte von  $\text{CaCl}_2$  bezogen auf eine vorangegangene  $\text{CaCl}_2$  (3 mM)-induzierte Kontraktion in Prozent  $\pm$  S.E.M. ( $n=3-6$  Tiere).

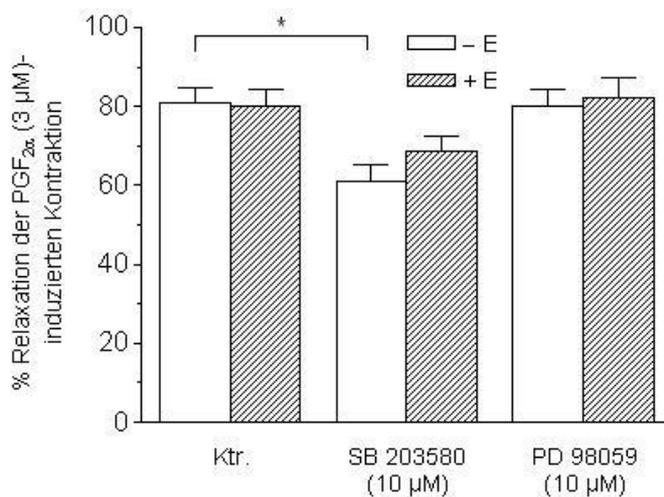
Arteriensegmente, die vor der Kontraktion mit dem L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalaktivator (S)-(-)-Bay K 8644 (0.1  $\mu\text{M}$ ) inkubiert wurden, zeigten in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kontrollkurve eine Linksverschiebung ( $p\text{EC}_{50}$ :  $3.77 \pm 0.09$ ,  $n=3$ ; Abb. 25, links). Raloxifen (0.3–3 mM) konnte den Effekt von (S)-(-)-Bay K 8644 konzentrationsabhängig hemmen (Abb. 25, rechts).



**Abb. 25.** Einfluss von (S)-(-)-BayK 8644 auf die  $\text{CaCl}_2$ -induzierte Kontraktion in Ab- und Anwesenheit von Raloxifen in Arteriensegmenten der Schweinekoronararterie ohne Endothel. Links: Kumulative Konzentrations-Wirkungskurven von  $\text{CaCl}_2$  in An- und Abwesenheit von (S)-(-)-Bay K 8644. Rechts: Kumulative Konzentrations-Wirkungskurven von  $\text{CaCl}_2$  in Anwesenheit von (S)-(-)-Bay K 8644 und in An- und Abwesenheit von Raloxifen (0.3 – 3  $\mu\text{M}$ ). Dargestellt sind die kontraktiven Effekte von  $\text{CaCl}_2$  bezogen auf eine vorangegangene  $\text{CaCl}_2$  (3 mM)-induzierte Kontraktion in Prozent  $\pm$  S.E.M. ( $n=3-6$  Tiere).

### 3.3.6 Beteiligung von Signalkaskaden an der Raloxifen-induzierten Relaxation

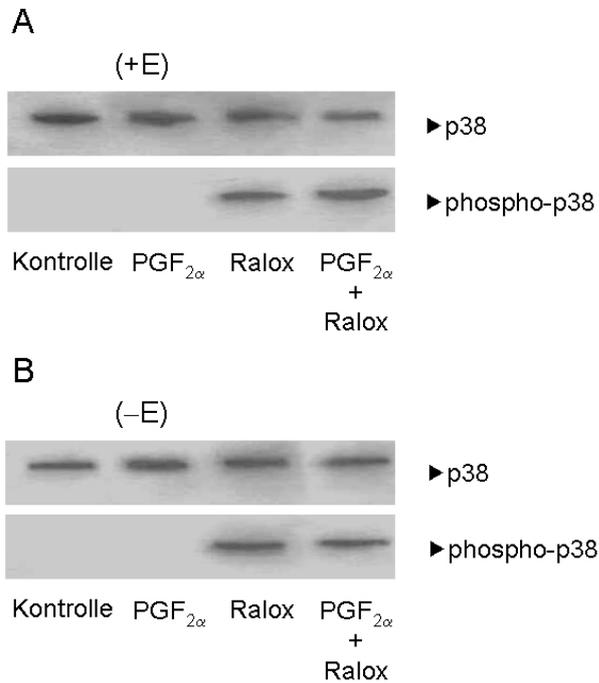
Der MAPK-p38-Inhibitor SB 203580 (10  $\mu$ M) verminderte die Raloxifen (3  $\mu$ M)-induzierte Relaxation in Arterienringen mit Endothel ( $n=6$ ;  $P>0.05$ ) von  $80 \pm 4$  % (Kontrolle) auf  $69 \pm 4$  % und in Arterienringen ohne Endothel ( $n=6$ ;  $P<0.05$ ) von  $81 \pm 4$  % (Kontrolle) auf  $61 \pm 4$  %, ohne dabei die  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu$ M)-induzierte Kontraktion zu beeinflussen (Abb. 26). Im Gegensatz dazu zeigte der ERK1/2-Kinase-Inhibitor PD 98059 (10  $\mu$ M) weder in Ringen mit noch in Ringen ohne Endothel einen Einfluss auf die Raloxifen (3  $\mu$ M)-induzierte Relaxation (Abb. 26).



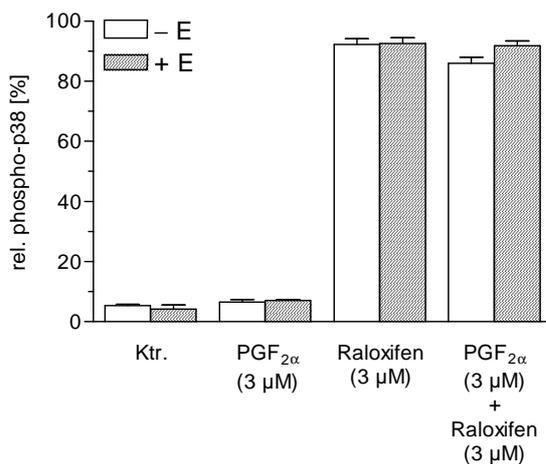
**Abb. 26.** Einfluss der Inkubation (30 min) der Arteriensegmente der Schweinekoronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E) mit SB 203580 (10  $\mu$ M) und PD 98059 (10  $\mu$ M) auf die Raloxifen (3  $\mu$ M)-induzierte Relaxation nach 120 min. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu$ M)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=6$  Tiere).

Da SB 203580 die Raloxifen-induzierte Relaxation hemmte, wurde ergänzend mittels Western Blot-Analyse das Ausmaß der phosphorylierten und unphosphorylierten MAPK p38 bestimmt. Arteriensegmente, die ausschließlich mit Raloxifen (3  $\mu$ M, 120 min) behandelt wurden, zeigten wie auch Gefäßringe, die zunächst mittels  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu$ M) vorkontrahiert wurden und anschließend durch Zugabe von Raloxifen (3  $\mu$ M, 120 min) relaxiert wurden, eine signifikante Zunahme der phosphorylierten MAPK p38. In unbehandelten Kontrollsegmenten konnte keine Phosphorylierung beobachtet werden. Auch in  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu$ M)-vorkontrahierten Gefäßringen konnte nach 120 min kein Anstieg der phosphorylierten Form der MAPK p38 nachgewiesen werden. (Abb. 27,

Abb. 28). Diese Versuche wurden jeweils an Arteriensegmenten mit und ohne Endothel durchgeführt.



**Abb. 27.** Immunoblot von Proteinen der Schweinekoronararterie, aufgetrennt mittels SDS-PAGE, übertragen auf Nitrocellulosemembranen und inkubiert mit einem primären Antikörper gegen die nicht-phosphorylierte (p38) und die phosphorylierte MAPK p38 (phospho-p38). Ringe der Schweinekoronararterie mit (+E; A) oder ohne Endothel (-E; B) wurden im Organbad verschiedenen Behandlungen ausgesetzt: keine Inkubation (basale Bedingungen), PGF<sub>2α</sub> (3 μM), Raloxifen (3 μM), und PGF<sub>2α</sub> (3 μM) + Raloxifen (3 μM). Nach 120 min wurden die Ringe unmittelbar eingefroren, homogenisiert und dann der SDS-PAGE unterzogen. Dieser Blot steht repräsentativ für vier verschiedene Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

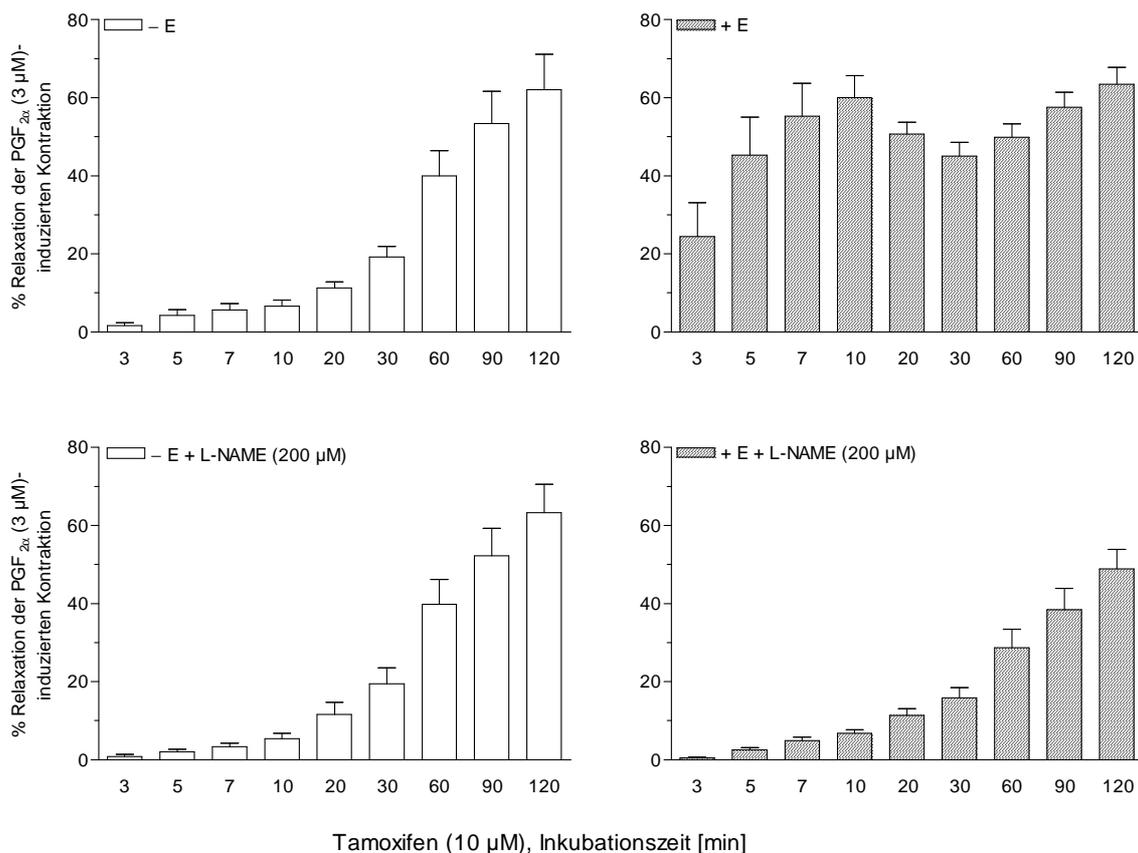


**Abb. 28.** Das Balkendiagramm zeigt Veränderungen des Phosphorylierungsgrads der MAPK p38 in Ringen der Schweinekoronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E). Durchführung der Experimente siehe Legende von Abb. 27. Dargestellt ist der durch densitometrische Auswertung bestimmte relative Anteil von phospho-p38 (phospho-p38/p38×100) ± S.E.M. (n=4 Tiere).

### 3.4 Aspekte der Tamoxifen-induzierten Vasorelaxation

#### 3.4.1 Einfluss von Tamoxifen auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins

Tamoxifen verursachte eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation vorkontrahierter Gefäßringe mit und ohne Endothel (ohne Abb.). Die Relaxationen wurden über einen Zeitraum von 120 min durchgeführt. Nach  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierter Kontraktion setzte die Relaxation unmittelbar nach Zugabe von Tamoxifen ( $10 \mu\text{M}$ ) ein. Dies steht in Übereinstimmung mit den vasorelaxierenden Effekten von E2 und Raloxifen. Allerdings erreichte die Tamoxifen-induzierte Relaxation verglichen mit der E2-induzierten Relaxation innerhalb von 120 min kein Plateau. Im Gegensatz zu der E2- oder Raloxifen-induzierten Dilatation ist die Relaxation durch Tamoxifen zumindest teilweise abhängig von der Anwesenheit eines intakten Endothels (Abb. 29).



**Abb. 29.** Zeitabhängigkeit der vasorelaxierenden Effekte von Tamoxifen ( $10 \mu\text{M}$ ) an Schweinekoronararterien mit (+E) und ohne (-E) Endothel (oben). Vasorelaxation in Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME ( $200 \mu\text{M}$ , unten). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl ( $30 \text{ mM}$ )-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

An Arteriensegmenten mit Endothel setzte die Relaxation nach Tamoxifen-Applikation sofort ein, erreichte nach 10 min ein vorläufiges Plateau, verringerte sich zwischen 10 und 30 min wieder und nahm nach 30 min allmählich wieder zu. Die Phase der schnellen Relaxation war an Arteriensegmenten ohne Endothel nicht zu beobachten. Hier zeigte sich ausschließlich die langsame Relaxation.

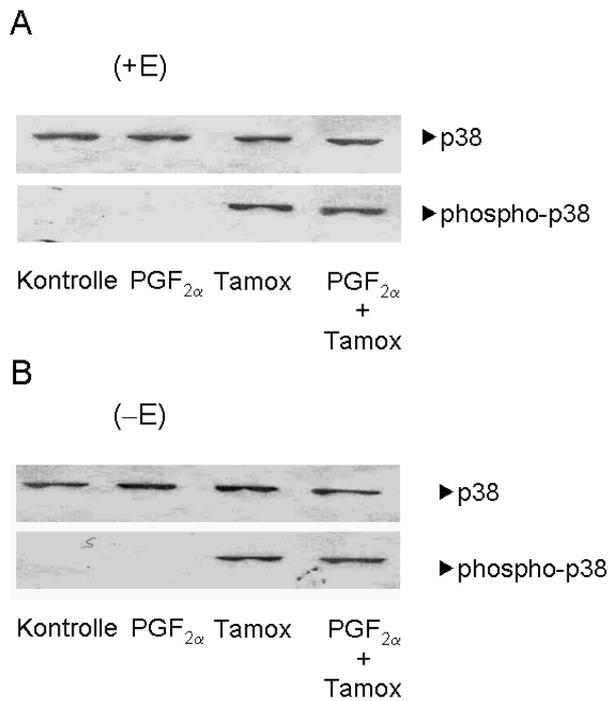
Die Hemmung der Endothel-abhängigen Relaxation durch den NOS-Inhibitor L-NAME (200  $\mu\text{M}$ , 10 min Inkubation) bestätigte die Beteiligung der eNOS (Abb. 29).

### **3.4.2 Einfluss von ICI 182,780 auf die Tamoxifen-induzierte Relaxation**

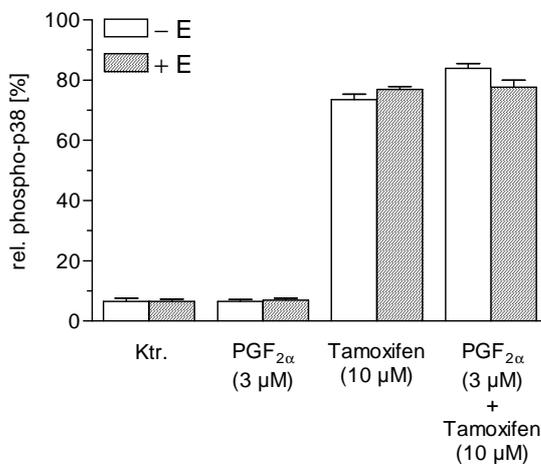
Eine Inkubation mit dem spezifischen ER-Antagonisten ICI 182,780 (10  $\mu\text{M}$ ) für 60 min führte nicht zu einer Hemmung der Tamoxifen (10  $\mu\text{M}$ )-induzierten Relaxation in  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Gefäßringen mit und ohne Endothel (ohne Abb.).

### **3.4.3 Beteiligung von Signalkaskaden an der Tamoxifen-induzierten Relaxation**

Wie in der Literatur beschrieben und in den vorhergehenden Versuchen demonstriert, weist Tamoxifen in bezug auf die vasorelaxierenden Eigenschaften sowohl pharmakologische Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zu E2 und Raloxifen auf. Im Gegensatz zur Relaxation durch Raloxifen, aber in Analogie zur E2-induzierten Relaxation, ließ sich die Tamoxifen (10  $\mu\text{M}$ )-induzierte Dilatation nicht durch den MAPK-p38-Inhibitor SB 203580 (10  $\mu\text{M}$ ) hemmen. Übereinstimmend ließen sich die Relaxationen von E2, Raloxifen und Tamoxifen nicht durch den ERK1/2-Kinase-Inhibitor PD 98059 hemmen (ohne Abb.). Da aber dennoch sowohl E2 (10  $\mu\text{M}$ ) als auch Raloxifen (3  $\mu\text{M}$ ) zu einer Aktivierung der MAPK p38 führten, wurde ebenfalls die Phosphorylierung der MAPK p38 durch Tamoxifen mittels Western Blot-Analyse überprüft. Tamoxifen (10  $\mu\text{M}$ ) zeigte an Gefäßringen mit und ohne Endothel einen Anstieg der phosphorylierten Form der MAPK p38 im Vergleich zu Kontrollversuchen. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Gefäße zuvor mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3  $\mu\text{M}$ ) vorkontrahiert wurden oder nicht (Abb. 30, Abb. 31).



**Abb. 30.** Immunoblot von Proteinen der Schweinekronararterie, aufgetrennt mittels SDS-PAGE, übertragen auf Nitrocellulosemembranen und inkubiert mit einem primären Antikörper gegen die nicht-phosphorylierte (p38) und die phosphorylierte MAPK p38 (phospho-p38). Ringe der Schweinekronararterie mit (+E; A) oder ohne Endothel (-E; B) wurden im Organbad verschiedenen Behandlungen ausgesetzt: keine Inkubation (basale Bedingungen), PGF<sub>2α</sub> (3 μM), Tamoxifen (10 μM), und PGF<sub>2α</sub> (3 μM) + Tamoxifen (10 μM). Nach 120 min wurden die Ringe unmittelbar eingefroren, homogenisiert und dann der SDS-PAGE unterzogen. Dieser Blot steht repräsentativ für vier verschiedene Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.



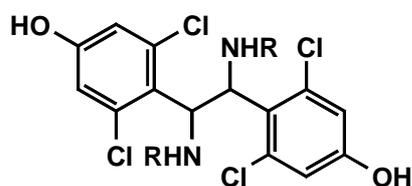
**Abb. 31.** Das Balkendiagramm zeigt Veränderungen des Phosphorylierungsgrads der MAPK p38 in Ringen der Schweinekronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E). Durchführung der Experimente siehe Legende von Abb. 30. Dargestellt ist der durch densitometrische Auswertung bestimmte relative Anteil von phospho-p38 (phospho-p38/p38×100) ± S.E.M. (n=4 Tiere).

### 3.5 Charakterisierung der relaxierenden Effekte von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis-(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen

#### 3.5.1 Vergleich der relaxierenden Effekte von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins

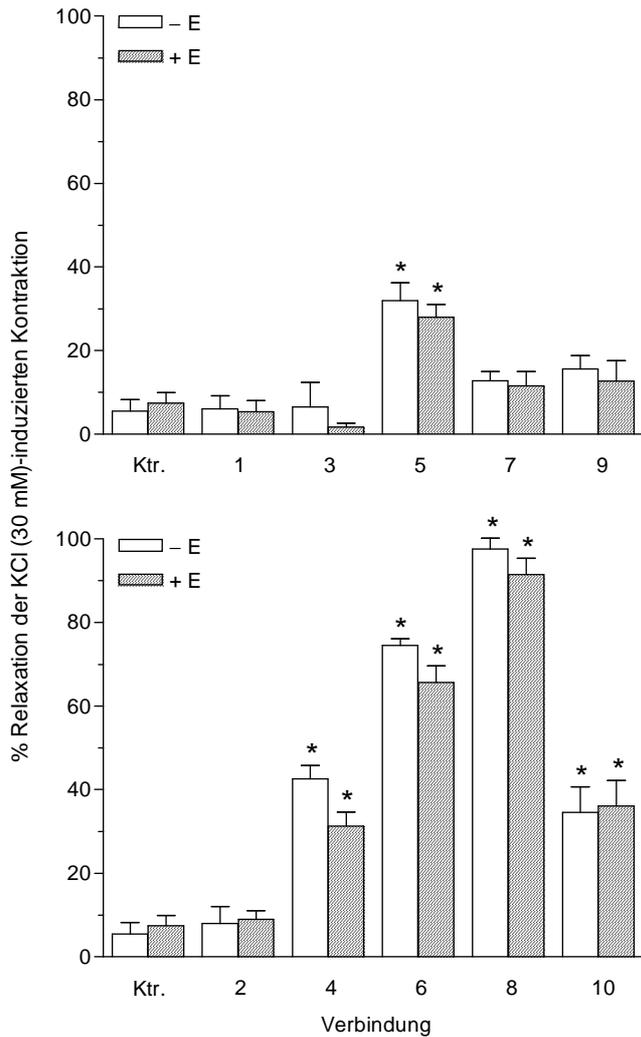
Aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine mit den synthetischen Estrogenen HEX und DES wie auch mit dem SERM Tamoxifen und Resveratrol, pharmakologisch nachgewiesenen estrogenen Eigenschaften und potentiellen SERM-Charakteristika (siehe 1.4.4.2) wurden die vasorelaxierenden Eigenschaften dieser Verbindungen untersucht. Innerhalb der getesteten Verbindungen der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine (**1–10**; Nummerierung siehe Tabelle 3) führten nur die Verbindungen **4**, **5**, **6**, **8** und **10** zu einer signifikanten Relaxation vorkontrahierter Arteriensegmente mit und ohne Endothel (Abb. 32). Die Vasorelaxation setzte unmittelbar nach Zugabe der entsprechenden Substanzen ein. Dies war vergleichbar mit dem vasorelaxierenden Effekt von E2. Das Ausmaß der Relaxationen nach Zugabe der Verbindungen **4**, **5**, **6**, **8** und **10** war dabei unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Endothels. Die d,l-Verbindungen erwiesen sich als potenter als die entsprechenden meso-Verbindungen (Abb. 32).

**Tabelle 3.** Chemische Strukturen der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine



Verbindung	R
<b>1<sup>a</sup></b> , <b>2<sup>b</sup></b>	H
<b>3<sup>a</sup></b> , <b>4<sup>b</sup></b>	CH <sub>3</sub>
<b>5<sup>a</sup></b> , <b>6<sup>b</sup></b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
<b>7<sup>a</sup></b> , <b>8<sup>b</sup></b>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
<b>9<sup>a</sup></b> , <b>10<sup>b</sup></b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>

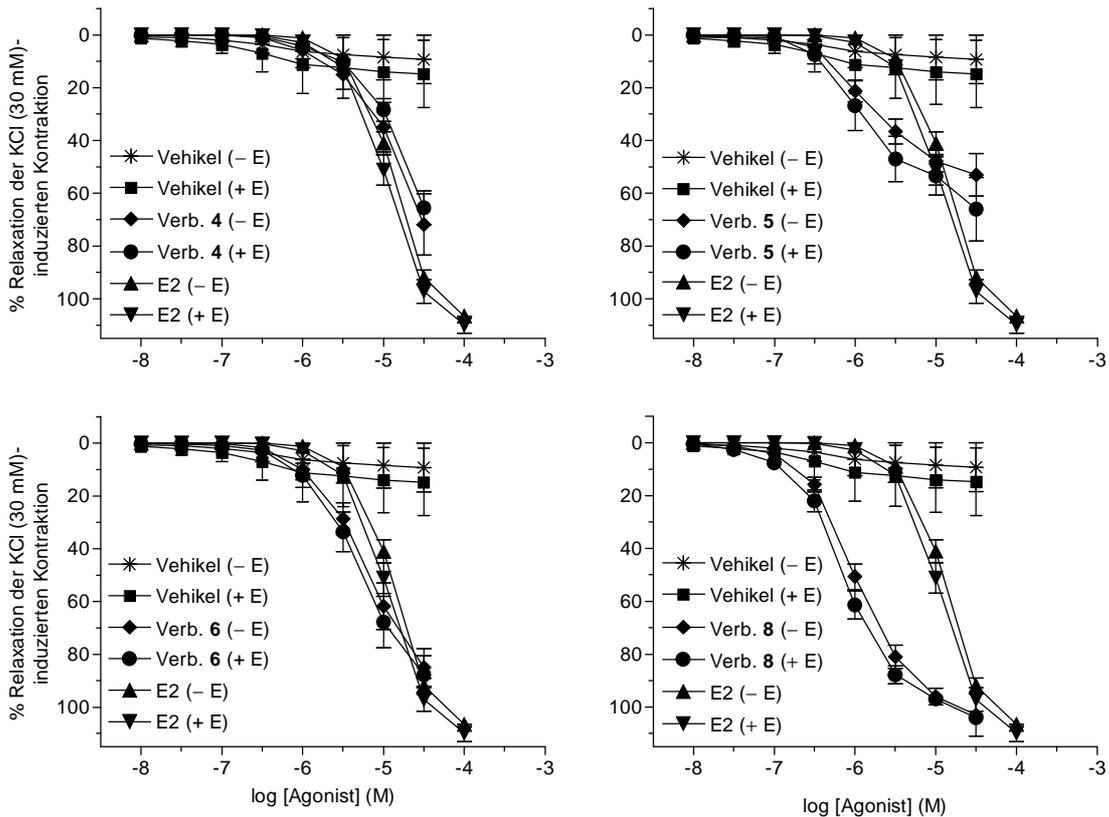
<sup>a</sup>meso, <sup>b</sup>d,l



**Abb. 32.** Vergleich der relaxierenden Effekte der meso-*N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine **1**, **3**, **5**, **7** und **9** (jeweils 10  $\mu$ M; oben) und der d,l-*N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine **2**, **4**, **6**, **8** und **10** (jeweils 10  $\mu$ M; unten) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit (+E) und ohne (-E) Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=4-9$  Tiere), \* $P<0.05$  (bezogen auf die Kontrolle).

### 3.5.2 Kumulative Konzentrations-Wirkungskurven ausgewählter *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine

Da sich die Verbindungen **4**, **5**, **6** und **8** als besonders potente Vasodilatoren der Koronararterie des Schweins erwiesen haben, wurden für diese kumulative Konzentrations-Wirkungskurven aufgenommen (Abb. 33).



**Abb. 33.** Vasorelaxierende Effekte von ausgewählten Ethylendiaminen (Verbindungen **4**, **5**, **6** und **8**) an Schweinekronararterien mit (+E) und ohne (-E) Endothel. Alle Verbindungen wurden gleichzeitig in einem Versuchsdurchgang mit E2 und Vehikel als Vergleiche vermessen. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=5-7$  Tiere).

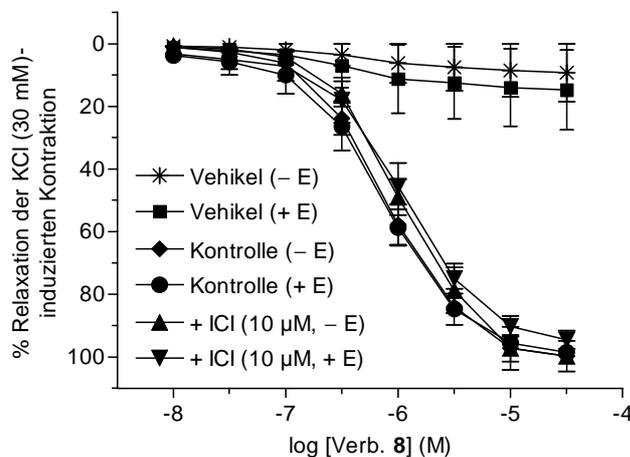
Die vasorelaxierenden Effekte waren in Segmenten mit und ohne Endothel identisch. Verbindung **8** erwies sich als potentester Vasodilatator dieser Reihe. Sie zeigte gegenüber E2 eine 12–15-fach höhere vasodilatatorische Wirkung. Die agonistischen Potenzen ( $pEC_{50}$ ) und die maximalen agonistischen Effekte ( $E_{max}$ ) sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4.** Relaxierende Effekte von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis-(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethyldiaminen

Verbindung	E	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>
			%
E2	–	4.88 ± 0.04 (7)	107 ± 2 (7)
E2	+	4.95 ± 0.05 (7)	110 ± 3 (7)
4	–	4.57 ± 0.12 (5)	72 ± 11 (5)
4	+	4.28 ± 0.16 (5)	60 ± 7 (5)
5	–	5.81 ± 0.10 (5)	49 ± 4 (5)
5	+	5.95 ± 0.11 (5)	54 ± 7 (5)
6	–	5.18 ± 0.09 (5)	85 ± 7 (5)
6	+	5.26 ± 0.09 (5)	88 ± 7 (5)
8	–	5.98 ± 0.06 (6)	98 ± 3 (6)
8	+	6.13 ± 0.07 (5)	97 ± 2 (5)

E Endothel; Anzahl der Versuche in Klammern

In Arteriensegmenten mit und ohne Endothel wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven mit *d,l-N,N'*-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylen-diamin (Verbindung **8**) in Abwesenheit (–E: pEC<sub>50</sub> = 6.08 ± 0.08, E<sub>max</sub> = 101 ± 3 %, n=4; +E: pEC<sub>50</sub> = 6.13 ± 0.08, E<sub>max</sub> = 101 ± 3 %, n=4) und Anwesenheit des Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 (–E: pEC<sub>50</sub> = 5.95 ± 0.06, E<sub>max</sub> = 102 ± 5 %, n=4; +E: pEC<sub>50</sub> = 5.97 ± 0.10, E<sub>max</sub> = 97 ± 4 %, n=4) durchgeführt. Die Vasorelaxation durch Verbindung **8** wurde durch ICI 182,780 (10 µM, 60 min) nicht inhibiert (Abb. 34).

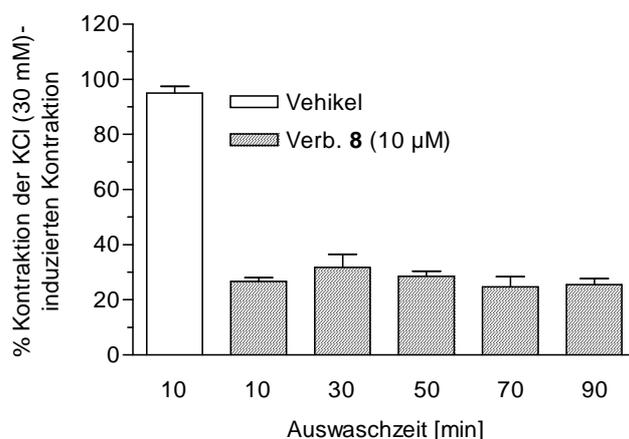


**Abb. 34.** Vasorelaxierende Effekte von Verbindung **8** in Ab- und Anwesenheit des Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 (10 µM, 60 min) an Schweinekoronararterien mit (+E) und ohne (–E) Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion ± S.E.M. (n=7 Tiere).

Um eine Beteiligung von  $\beta$ -Adrenozeptoren, 5-HT<sub>2</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-, H<sub>2</sub>- und Dopamin-Rezeptoren an der Vasorelaxation durch Verbindung **8** auszuschließen, wurden die Relaxationen in Gegenwart verschiedener Antagonisten durchgeführt. Allerdings zeigten Propranolol (10  $\mu$ M), Clozapin (1  $\mu$ M), Cimetidin (30  $\mu$ M) und Mesulergin (1  $\mu$ M) keinen Einfluss auf den vasorelaxierenden Effekt von Verbindung **8** (ohne Abb).

### 3.5.3 Reversibilität der Relaxation durch d,l-N,N'-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin

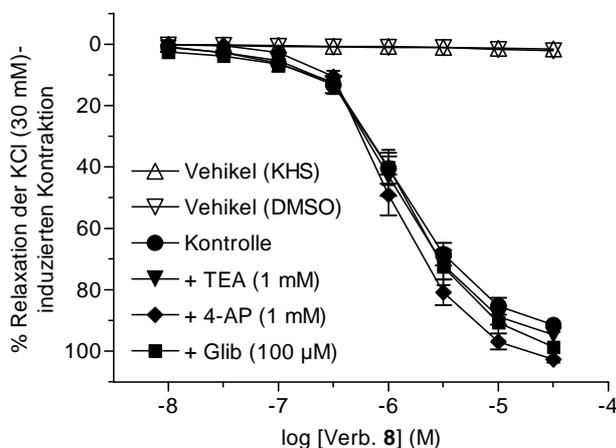
Um die Reversibilität der Relaxation durch Verbindung **8** in Arteriensegmenten mit Endothel zu untersuchen, wurden die kontraktile Effekte von KCl (30 mM) zu Beginn des Versuches mit den kontraktile Effekten von KCl am Versuchsende nach wiederholten Auswaschungen und einer Gesamtversuchsdauer von 130 min verglichen. Behandlung der Gefäßringe mit Verbindung **8** (10  $\mu$ M; 120 min Inkubation) führte zu einer Hemmung der abschließenden KCl-induzierten Kontraktion. In Kontrollexperimenten erreichten die Gefäßringe bei KCl-Zugabe eine Kontraktionskraft von  $95 \pm 2$  %. Durch Inkubation mit Verbindung **8** (10  $\mu$ M) wurde diese auf  $27 \pm 1$ ,  $32 \pm 5$ ,  $29 \pm 2$ ,  $25 \pm 4$  und  $26 \pm 2$  % nach Auswaschzeiten von 10, 30, 50, 70 oder 90 min reduziert ( $n=4$ ) (Abb. 35). Dies steht im Gegensatz zur vollständigen Reversibilität des E2-induzierten Effekts, aber in Übereinstimmung mit der teilweisen Reversibilität der Raloxifen-induzierten Relaxation (siehe 3.2.2 und 3.3.2).



**Abb. 35.** Kontraktion (KCl 30 mM) der Schweinekoronararterie mit Endothel nach Verbindung **8**-induzierter Relaxation und anschließenden Auswaschphasen von 10, 30, 50, 70 oder 90 min  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

### 3.5.4 Einfluss von d,l-N,N'-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-ethyldiamin auf Kalium-Kanäle

In Arteriensegmenten mit Endothel wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven mit Verbindung **8** in Abwesenheit (Vehikel, KHS;  $pEC_{50} = 5.89 \pm 0.08$ ;  $n=7$ ) und Anwesenheit verschiedener  $K^+$ -Kanal-Blocker durchgeführt. Die Relaxation durch Verbindung **8** konnte weder durch TEA (1 mM;  $pEC_{50} = 5.89 \pm 0.08$ ;  $n=7$ ) noch durch Glibenclamid (100  $\mu$ M;  $pEC_{50} = 5.82 \pm 0.07$ ;  $n=7$ ) oder 4-AP (1 mM;  $pEC_{50} = 5.93 \pm 0.06$ ;  $n=7$ ) gehemmt werden (Abb. 36)

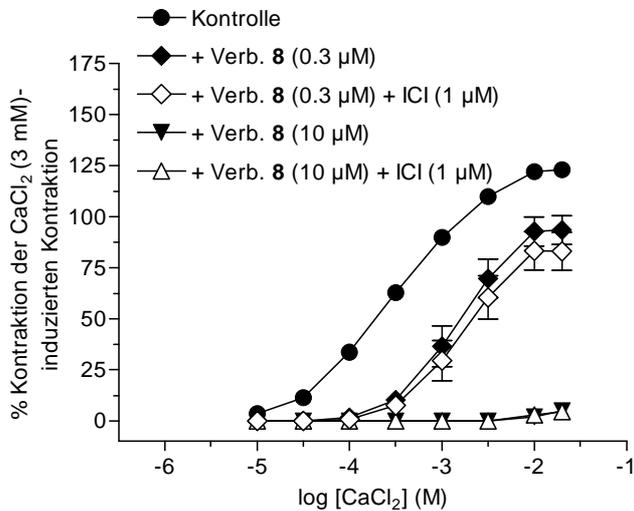


**Abb. 36.** Vasorelaxierende Effekte von Verbindung **8** in Ab- und Anwesenheit verschiedener  $K^+$ -Kanal-Inhibitoren an Schweinekoronararterien mit (+E) und ohne (-E) Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=7$  Tiere).

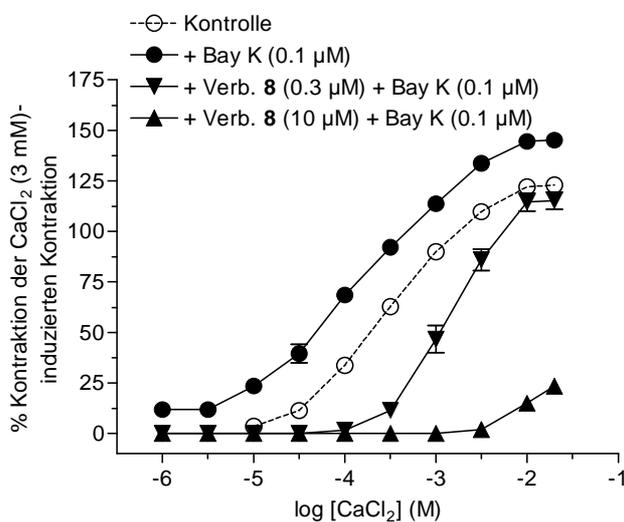
### 3.5.5 Einfluss von d,l-N,N'-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-ethyldiamin auf Calcium-Kanäle

In Arteriensegmenten ohne Endothel wurden im  $Ca^{2+}$ -freien, depolarisierenden Medium ( $K^+$ : 60 mM) kumulative Konzentrations-Wirkungskurven mit  $Ca^{2+}$  aufgenommen ( $pEC_{50}$ ,  $3.29 \pm 0.05$ ;  $n=6$ ). Diese wurden durch Verbindung **8** (0.3–10  $\mu$ M) konzentrationsabhängig nach rechts verschoben. Auch der maximale kontraktile Effekt wurde konzentrationsabhängig vermindert (Abb. 37). Die durch Verbindung **8** (0.3–10  $\mu$ M) vermittelte Hemmung der Kontraktion konnte durch ICI 182,780 (1  $\mu$ M) nicht beeinflusst werden. Durch Inkubation mit (S)-(-)-Bay K 8644 (0.1  $\mu$ M) konnte die  $Ca^{2+}$ -Kontrollkurve an Gefäßringen ohne Endothel nach links verschoben werden ( $pEC_{50} =$

$3.77 \pm 0.09$ ;  $n=3$ ). Verbindung **8** konnte den Effekt von (S)-(-)-Bay K 8644 konzentrationsabhängig hemmen (Abb. 38).



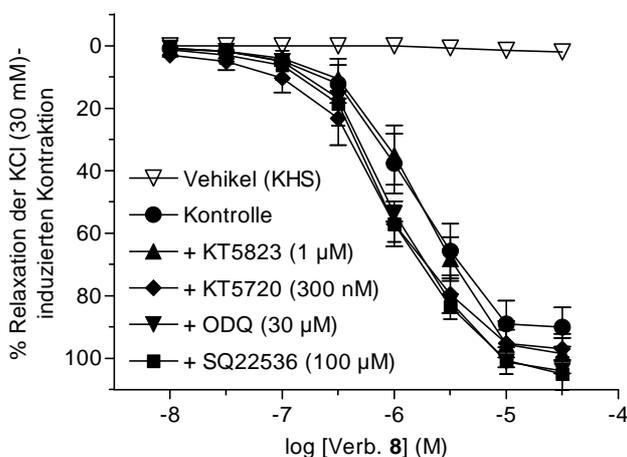
**Abb. 37.** Hemmung des kontraktileffekts von  $\text{CaCl}_2$  durch Verbindung **8** in An- und Abwesenheit von ICI 182,780 an Koronararterien des Schweins ohne Endothel. Dargestellt sind die kontraktileffekte der  $\text{CaCl}_2$  (3 mM)-induzierten Kontraktion in Prozent  $\pm$  S.E.M. ( $n=2-6$  Tiere).



**Abb. 38.** Einfluss von (S)-(-)-Bay K 8644 auf die  $\text{CaCl}_2$ -induzierte Kontraktion in An- und Abwesenheit von Verbindung **8** an Schweinekoronararterien ohne Endothel. Dargestellt sind die kontraktileffekte der  $\text{CaCl}_2$  (3 mM)-induzierten Kontraktion in Prozent  $\pm$  S.E.M. ( $n=2-6$  Tiere).

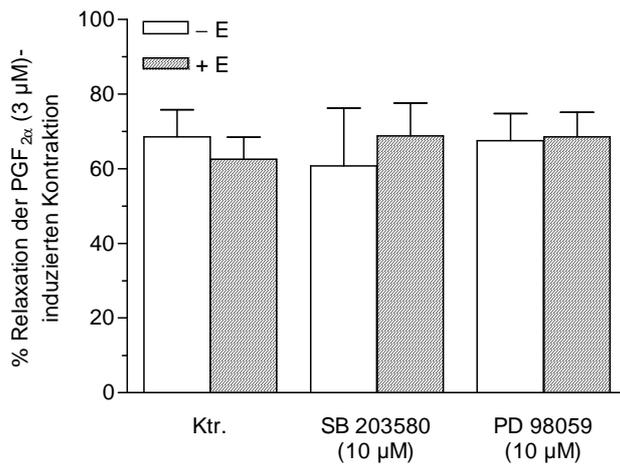
### 3.5.6 Beteiligung von Signalkaskaden an der Vasorelaxation durch d,l-N,N'-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethyldiamin

Ziel dieser Versuche war es, die Beteiligung verschiedener Signalkaskaden an der durch Verbindung **8** induzierten Vasorelaxation zu untersuchen. In Arteriensegmenten mit Endothel konnte die Vasorelaxation durch Verbindung **8** weder durch den Adenylylcyclase-Inhibitor SQ 22536 (100  $\mu$ M) noch durch den Guanylylcyclase-Inhibitor ODQ (30  $\mu$ M), den Proteinkinase A-Inhibitor KT 5720 (300 nM) oder den Proteinkinase G-Inhibitor KT 5823 (1  $\mu$ M) gehemmt werden (Abb. 39).



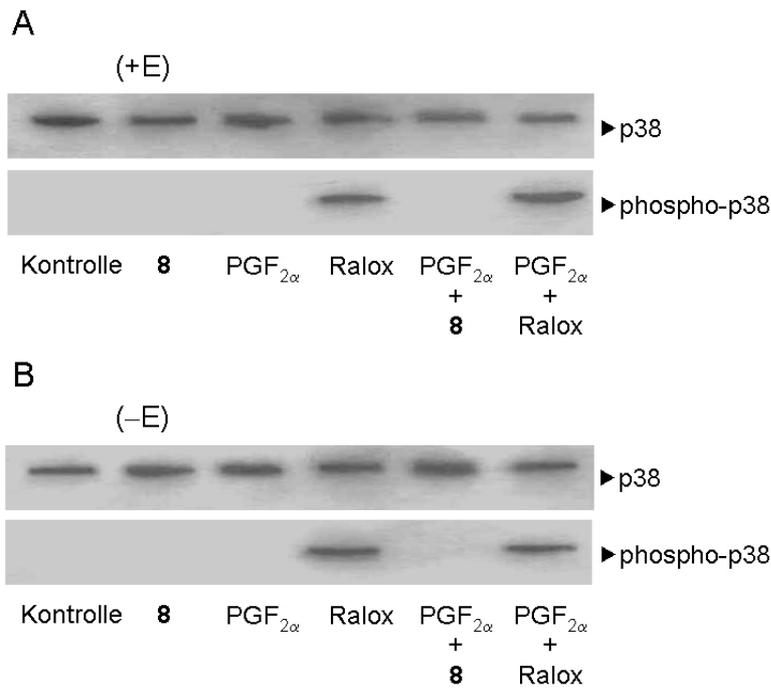
**Abb. 39.** Vasorelaxierende Effekte von Verbindung **8** in An- und Abwesenheit des Adenylylcyclase-Inhibitors SQ 22536 (100  $\mu$ M), des Guanylylcyclase-Inhibitors ODQ (30  $\mu$ M), des Proteinkinase A-Inhibitors KT 5720 (300 nM) und des Proteinkinase G-Inhibitors KT 5823 (1  $\mu$ M) an Schweinekoronararterien mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion in Prozent  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

Darüber hinaus waren auch SB 203580 (10  $\mu$ M) und PD 98059 (10  $\mu$ M) nicht in der Lage, die Relaxation PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (3  $\mu$ M)-vorkontrahierter Gefäßringe durch Verbindung **8** (10  $\mu$ M) zu inhibieren (Abb. 40). In Arteriensegmenten ohne Endothel erreichte die Relaxation durch Verbindung **8** einen Maximaleffekt von  $69 \pm 7$  %. In Ringen mit Endothel ergab sich ein Wert von  $63 \pm 6$  %. In Anwesenheit von SB 203580 wurde eine Relaxation von  $61 \pm 15$  % in Ringen ohne Endothel und  $69 \pm 9$  % in Ringen mit Endothel erreicht ( $n=4$ ;  $P>0.05$ ). In Anwesenheit von PD 98059 erreichte die Relaxation durch Verbindung **8** einen Maximaleffekt von  $68 \pm 7$  % in Arteriensegmenten ohne Endothel und  $69 \pm 7$  % in Segmenten mit Endothel ( $n=4$ ;  $P>0.05$ ).

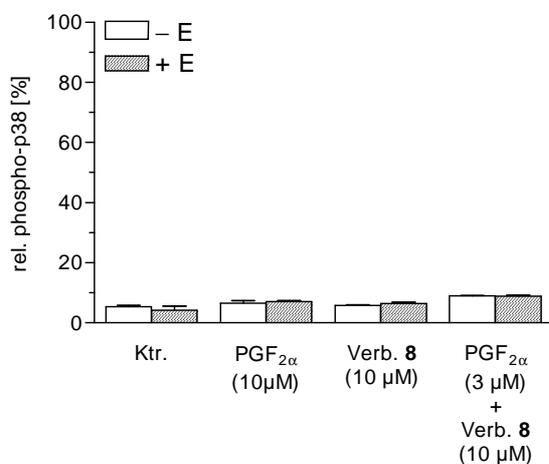


**Abb. 40.** Einfluss der Inkubation (30 min) der Arteriensegmente der Schweinekoronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E) mit SB 203580 (10 μM) und PD 98059 (10 μM) auf die Relaxation durch Verbindung **8** (3 μM) nach 120 min. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der PGF<sub>2α</sub> (3 μM)-induzierten Kontraktion ± S.E.M. (*n*=4 Tiere).

E2, Raloxifen und Tamoxifen zeigen vasorelaxierende Eigenschaften, die auch bei Verbindung **8** nachgewiesen wurden. Darüber hinaus führten sowohl E2 als auch Raloxifen und Tamoxifen zu einer Aktivierung der MAPK p38. Deshalb wurde auch die Phosphorylierung der MAPK p38 durch Verbindung **8** mittels Western Blot-Analyse untersucht. Im Gegensatz zu Arteriensegmenten, die mit Raloxifen (3 μM), Tamoxifen (10 μM) oder E2 (10 μM) behandelt wurden, zeigte Verbindung **8** (10 μM) weder in Gefäßringen ohne noch mit Endothel einen Anstieg der phosphorylierten Form der MAPK p38. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Gefäße zuvor mit PGF<sub>2α</sub> (3 μM) vorkontrahiert wurden oder nicht (Abb. 41, Abb. 42).



**Abb. 41.** Immunoblot von Proteinen der Schweinekronararterie, aufgetrennt mittels SDS-PAGE, übertragen auf Nitrocellulosemembranen und inkubiert mit einem primären Antikörper gegen die nicht-phosphorylierte (p38) und die phosphorylierte MAPK p38 (phospho-p38). Ringe der Schweinekronararterie mit (+E; A) oder ohne Endothel (-E; B) wurden im Organbad verschiedenen Behandlungen ausgesetzt: keine Inkubation (basale Bedingungen), Verbindung **8** (10  $\mu$ M), PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (3  $\mu$ M), Raloxifen (3  $\mu$ M, als Positivkontrolle), PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (3  $\mu$ M) + Verbindung **8** (10  $\mu$ M) und PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (3  $\mu$ M) + Raloxifen (3  $\mu$ M, als Positivkontrolle). Nach 120 min wurden die Ringe unmittelbar eingefroren, homogenisiert und dann der SDS-PAGE unterzogen. Dieser Blot steht repräsentativ für vier verschiedene Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

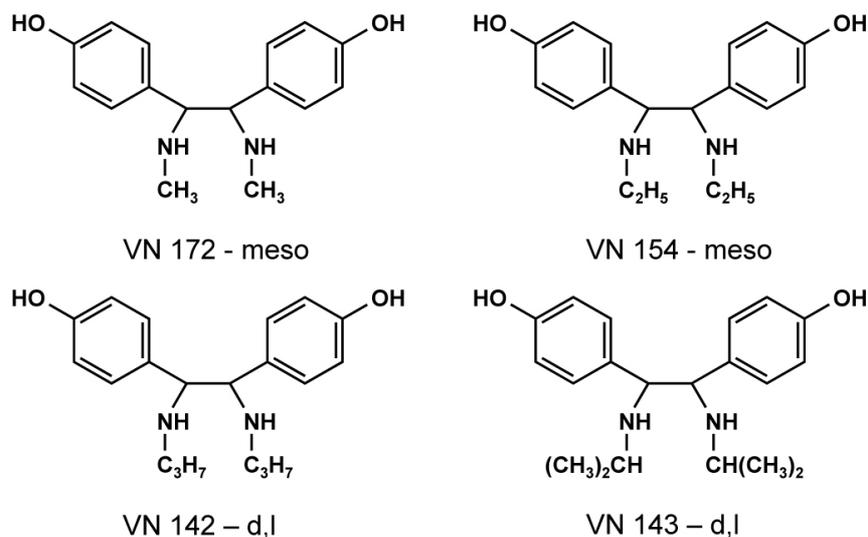


**Abb. 42.** Das Balkendiagramm zeigt Veränderungen des Phosphorylierungsgrads der MAPK p38 in Ringen der Schweinekronararterie mit (+E) und ohne Endothel (-E). Durchführung der Experimente siehe Legende von Abb. 41. Dargestellt ist der durch densitometrische Auswertung bestimmte relative Anteil von phospho-p38 (phospho-p38/p38 $\times$ 100)  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  Tiere).

### 3.6 Relaxierende Effekte von weiteren 1,2-Diarylethylendiaminen und *N*-Alkyl-2,6-dichlor-4-hydroxybenzylaminen

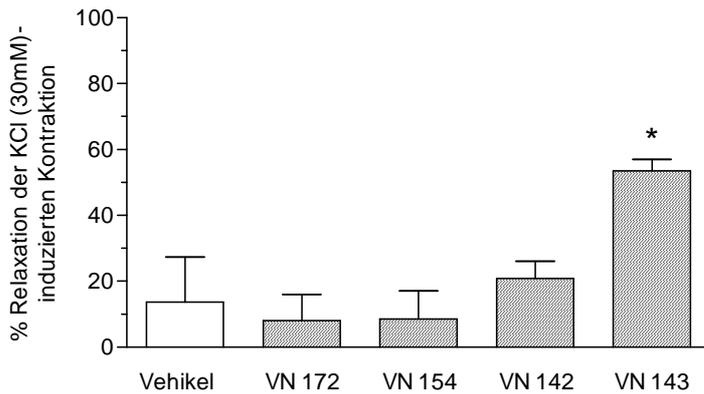
#### 3.6.1 Untersuchung der relaxierenden Effekte von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen

Im Folgenden sollte mit Hilfe von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen (Abb. 43) der Einfluss der Chlorsubstituenten auf das vasorelaxierende Potential der zuvor beschriebenen Ethylendiamine untersucht werden.



**Abb. 43.** Strukturformeln von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen.

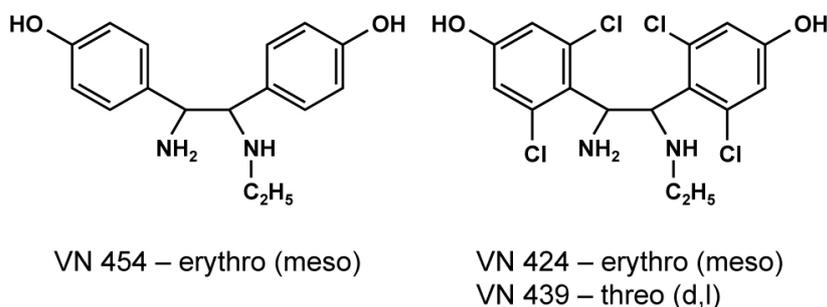
In der Reihe der getesteten Verbindungen der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamine führte nur die Verbindung VN 143 – d,l zu einer signifikanten Relaxation vorkontrahierter Arteriensegmente mit Endothel (Abb. 44). Die Vasorelaxation setzte unmittelbar nach Zugabe der entsprechenden Substanz ein. Dies war vergleichbar mit dem vasorelaxierenden Effekt von E2.



**Abb. 44.** Vergleich der relaxierenden Effekte von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen (10  $\mu$ M) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=2-3$  Tiere), \* $P<0.05$ .

### 3.6.2 Untersuchung der relaxierenden Effekte von *N*-Ethyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)- und *N*-Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen

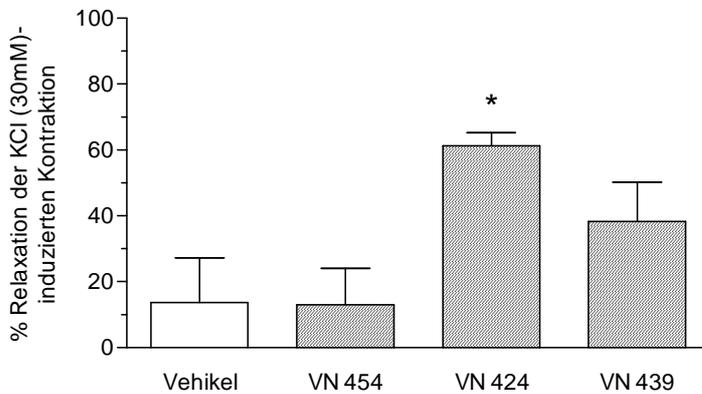
Im Zuge dieser Versuchsreihe wurde mit Hilfe monosubstituierter erythro- und threo-*N*-Ethyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine und des erythro-*N*-Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamins (Abb. 45) untersucht, ob die Substitution beider Stickstoffatome der Ethylendiamine eine Voraussetzung für die Vasorelaxation der Koronararterie des Schweins darstellt.



**Abb. 45.** Strukturformeln von erythro-*N*-Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamins (VN 454) und erythro- und threo-*N*-Ethyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine (VN 424 und VN 439).

Von den getesteten *N*-Alkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)- und *N*-Alkyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen führte nur die vierfach chlorierte Verbindung

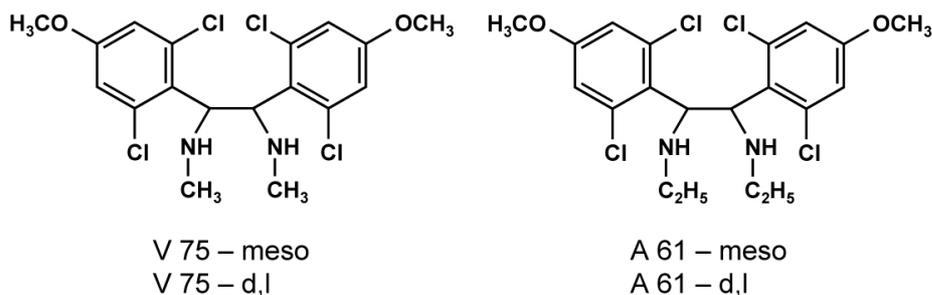
VN 424 zu einer signifikanten Relaxation vorkontrahierter Arteriensegmente mit Endothel (Abb. 46). Die Vasorelaxation setzte unmittelbar nach Zugabe der entsprechenden Substanz ein. Dies war vergleichbar mit dem vasorelaxierenden Effekt von E2.



**Abb. 46.** Vergleich der relaxierenden Effekte des *N*-Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamins VN 454 (10  $\mu$ M) und der *N*-Ethyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine VN 424 (10  $\mu$ M) und 439 (10  $\mu$ M) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=2-3$  Tiere), \* $P<0.05$ .

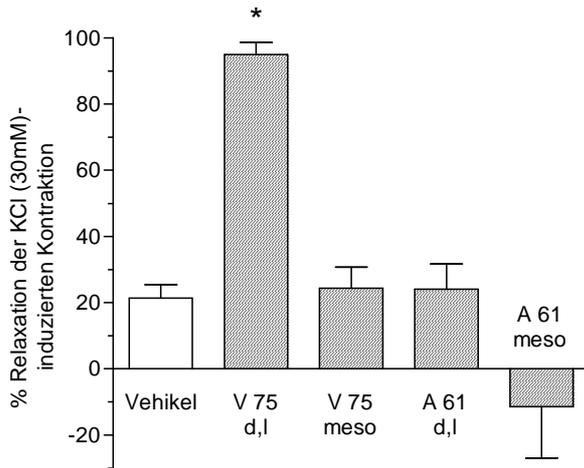
### 3.6.3 Untersuchung der relaxierenden Effekte von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamine

Da für die Wirkung von Estrogenen und SERMs am ER die Stellung der Hydroxylfunktionen in den Verbindungen maßgeblich verantwortlich gemacht wird, sollte im Folgenden die Bedeutung der OH-Gruppe der Ethylendiamine untersucht werden. Verwendet wurden methoxylierte, *N,N'*-disubstituierte Tetrachlor-Verbindungen (*N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamine) (Abb. 47).



**Abb. 47.** Strukturformeln der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamine.

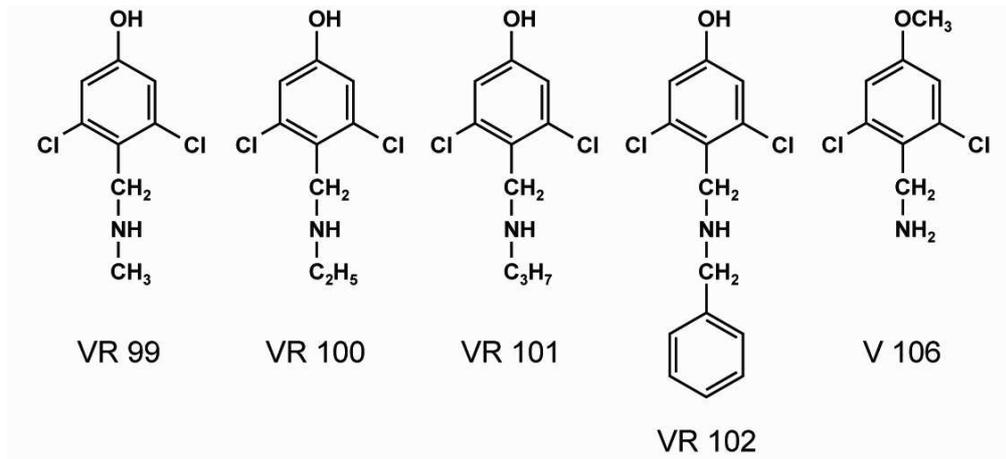
Von den getesteten *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethylendiaminen V 75 – meso, V 75 – d,l, V 61 – meso und V 61 – d,l führte nur die Verbindung V 75 – d,l zu einer signifikanten Relaxation vorkontrahierter Arteriensegmente der Schweinekoronararterie mit Endothel (Abb. 48). Die Vasorelaxation setzte unmittelbar nach Zugabe der entsprechenden Substanz ein. Dies war vergleichbar mit dem vasorelaxierenden Effekt von E2.



**Abb. 48.** Vergleich der relaxierenden Effekte von *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)-ethylendiaminen (10  $\mu$ M) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$  Tiere), \* $P<0.05$ .

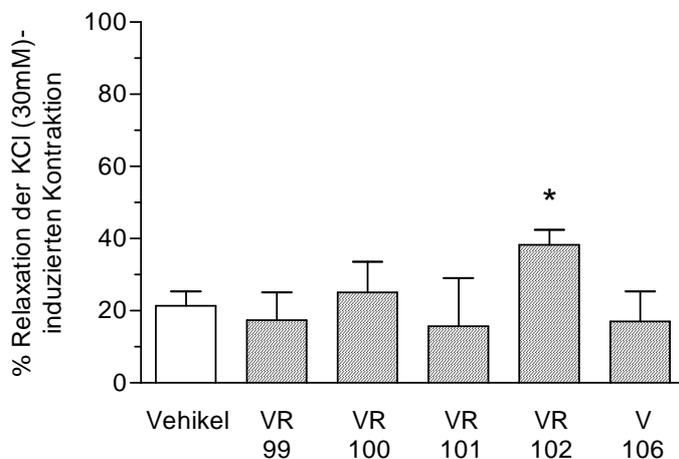
### 3.6.4 Untersuchung der relaxierenden Effekte von *N*-Alkyl-2,6-dichlor-4-hydroxybenzylaminen als strukturelle Bestandteile der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine

Als strukturelle Bausteine der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine sollten auch die folgenden *N*-Alkyl-2,6-dichlor-4-hydroxybenzylamine (Abb. 49) auf ihre vasorelaxierenden Eigenschaften hin untersucht werden.



**Abb. 49.** Strukturformeln der *N*-Alkyl-2,6-dichlor-4-hydroxybenzylamine.

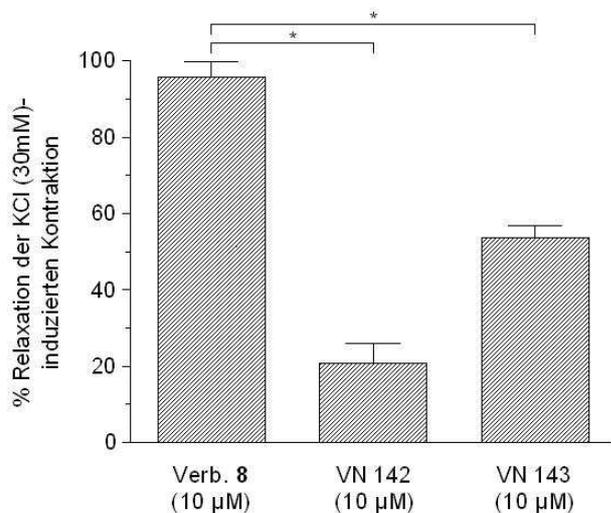
Von den getesteten Verbindungen der *N*-Alkyl-2,6-dichlor-4-hydroxybenzylamine führte nur die Verbindung VR 102 zu einer signifikanten Relaxation vorkontrahierter Arteriensegmente der Koronararterie des Schweins mit Endothel (Abb. 50). Die Vasorelaxation setzte unmittelbar nach Zugabe der entsprechenden Substanz ein. Dies war vergleichbar mit dem vasorelaxierenden Effekt von E2.



**Abb. 50.** Vergleich der relaxierenden Effekte von *N*-Alkyl 2,6-dichlor-4-hydroxybenzylaminen (10  $\mu$ M) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$  Tiere), \* $P<0.05$ .

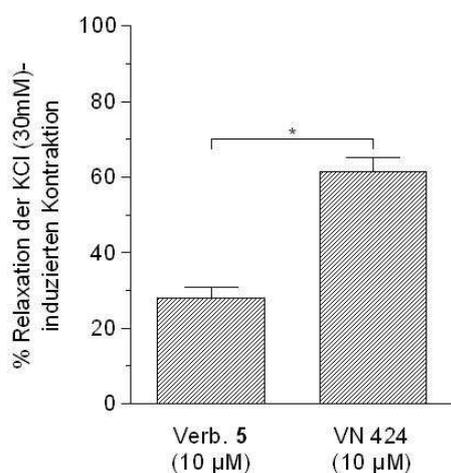
### 3.6.5 Vergleich der vasorelaxierenden Effekte ausgewählter Verbindungen

Der Vergleich strukturell abgewandelter Ethylendiamine mit den eingangs beschriebenen *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen zeigte ein uneinheitliches Bild. So zeigte das nichtchlorierte Derivat (VN 142) von Verbindung **8** keinerlei vasorelaxierenden Effekt. Das nicht-chlorierte, zweifach mit Isopropylgruppen substituierte Ethylendiamin (VN 143) dagegen zeigte eine Vasorelaxation (Abb. 51).



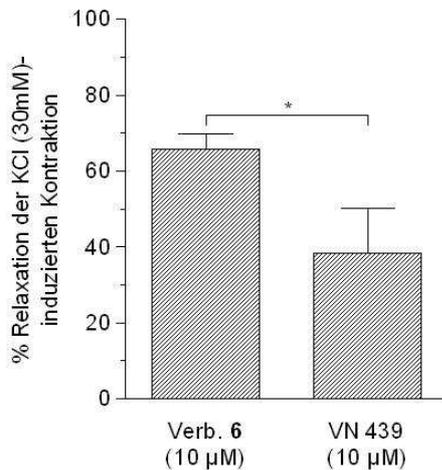
**Abb. 51.** Vergleich der relaxierenden Effekte von Verbindung **8** (10 µM) mit den nicht-chlorierten Derivaten VN 142 (10 µM) und VN 143 (10 µM) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion ± S.E.M. ( $n=2-3$  Tiere),  $*P<0.05$ . Verb. **8** und VN 143 vs. Kontrolle  $P<0.05$ ; VN 142 vs. Kontrolle  $P>0.05$ .

Auch die Bedeutung der Anzahl der Alkylketten lieferte in Bezug auf die vasorelaxierende Potenz ein uneinheitliches Ergebnis. So erwies sich das monosubstituierte Derivat (VN 424) der Verbindung **5** als signifikant potenterer Vasodilatator (Abb. 52).



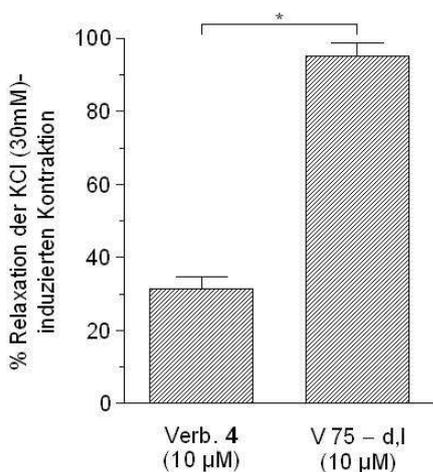
**Abb. 52.** Vergleich der relaxierenden Effekte von Verbindung **5** (10 µM) mit dem monosubstituierten Derivat VN 424 (10 µM) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion ± S.E.M. ( $n=2-3$  Tiere),  $*P<0.05$ . Verb. **5** und VN 424 vs. Kontrolle  $P<0.05$ .

Dagegen zeigte das monosubstituierte Derivat (VN 439) von Verbindung **6** eine geringere, im Vergleich zum Vehikel (siehe Abb. 46) nicht signifikante, Vasorelaxation (Abb. 53).



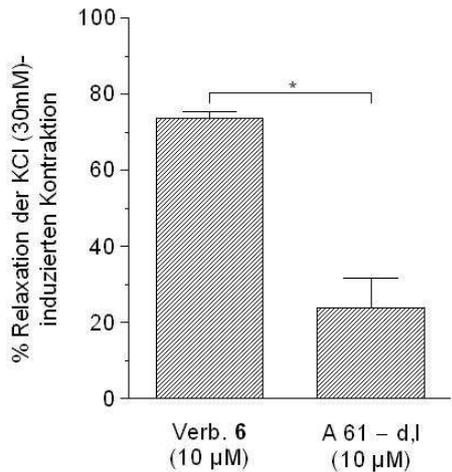
**Abb. 53.** Vergleich der relaxierenden Effekte von Verbindung **6** (10 µM) mit dem monosubstituierten Derivat VN 439 (10 µM) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion ± S.E.M. ( $n=2-3$  Tiere), \* $P<0.05$ . Verb. **6** und VN 439 vs. Kontrolle  $P<0.05$ .

Auch die Ergebnisse der Untersuchung O-methylierter Verbindungen sind widersprüchlich. Die Methylierung beider phenolischer Hydroxylgruppen von Verbindung **4** führte zu einer erheblichen Zunahme der vasorelaxierenden Potenz. Durch diese Derivatisierung entsteht mit Verbindung V 75 – d,l ein besonders potenter Vasodilatator (Abb. 54).



**Abb. 54.** Vergleich der relaxierenden Effekte von Verbindung **4** (10 µM) mit dem methoxylierten Derivat V 75 – d,l (10 µM) nach 120 min auf vorkontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion ± S.E.M. ( $n=2-3$  Tiere), \* $P<0.05$ . Verb. **4** und V75 – d,l vs. Kontrolle  $P<0.05$ .

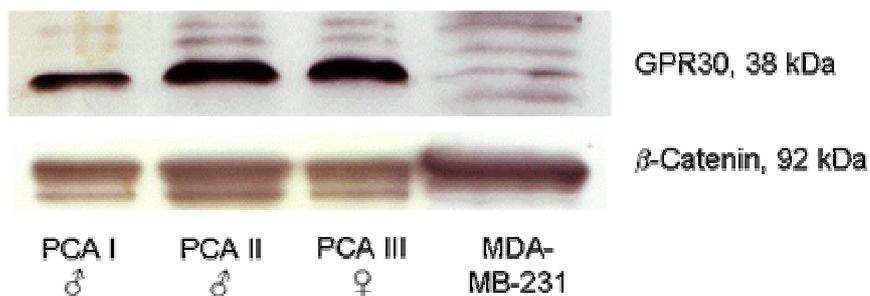
Dagegen verursacht die Einführung von Methylgruppen an die phenolischen Hydroxylfunktionen (A 61 – d,l) der potenten Verbindung **6** einen vollständigen Verlust der vasorelaxierenden Potenz (Abb. 55).



**Abb. 55.** Vergleich der relaxierenden Effekte von Verbindung **6** (10 µM) mit dem methoxylierten Derivat A 61 - d,I (10 µM) nach 120 min auf vor-kontrahierte Koronararterien des Schweins mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion ± S.E.M. ( $n=2-3$  Tiere), \* $P<0.05$ . Verb. **6** vs. Kontrolle  $P<0.05$ ; A 61 - d,I vs. Kontrolle  $P>0.05$ .

### 3.7 Expression von GPR30 in der Koronararterie des Schweins

Da in der Literatur nicht-genomische Effekte von Estrogenen und SERMs immer häufiger auf eine Beteiligung des  $G_i$ -Protein-gekoppelten Rezeptors GPR30 zurückgeführt werden, sollte mittels Western Blot-Experimenten auch die Expression dieses membranständigen ERs in der porcinen Koronararterie untersucht werden. Der Nachweis dieses Proteins konnte unter Verwendung der Membranfraktion lysierter Schweinekoronararterien erbracht werden (Abb. 56).



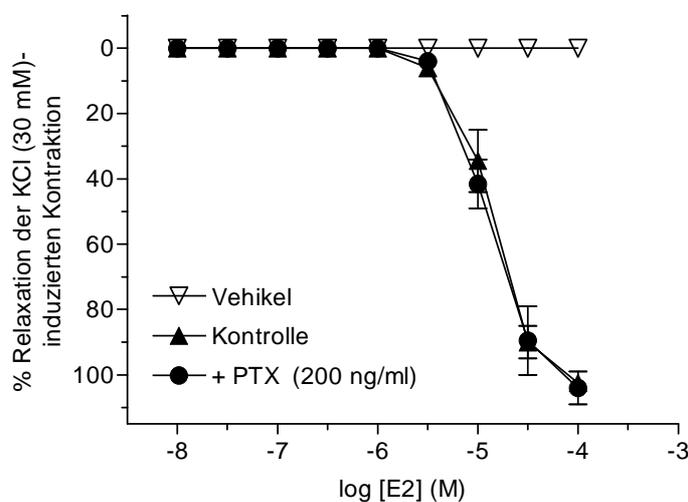
**Abb. 56.** Immunoblot von Membranproteinen der porcinen Koronararterie (PCA), aufgetrennt mittels SDS-PAGE, übertragen auf PVDF-Membranen und inkubiert mit einem primären Antikörper gegen GPR30 (oben) und  $\beta$ -Catenin (unten). Vergleich mit den GPR30-negativen Brustkrebszellen MDA-MB-231. Segmente der Schweinekoronararterie mit Endothel wurden lysiert, Membranproteine isoliert und diese einer SDS-PAGE unterzogen.

Die GPR30-negative humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 diente als Negativkontrolle. Laut Vergleich mit den Proteinmarkerbanden des Größenmarkers zeigten die Proteine in der SDS-PAGE eine Mobilität, die einer Molmasse von ca. 38

kDa entsprach. Um die gleichmäßige Isolation und Applikation von Membranproteinen zu bestätigen, wurde in den Proben gleichzeitig das membranassoziierte Protein  $\beta$ -Catenin nachgewiesen.

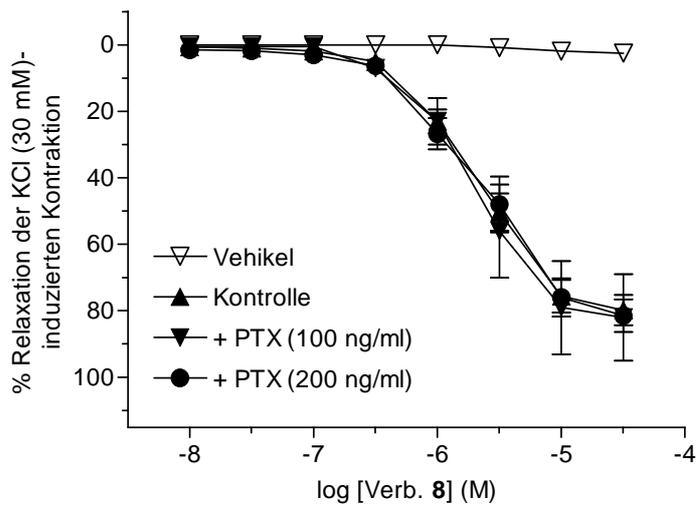
### 3.8 Einfluss von Pertussistoxin auf die Vasorelaxation durch Estrogene und SERMs

Um GPR30 als mögliche Zielstruktur von E2 und SERMs zu identifizieren und eine Beteiligung dessen an der Vasorelaxation zu bestimmen, wurde die Vasorelaxation durch Estrogene und SERMs in An- und Abwesenheit von Pertussistoxin (PTX), einem Inhibitor  $G_i$ -gekoppelter Proteine, untersucht. In Arteriensegmenten mit Endothel wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven mit E2 in Abwesenheit ( $pEC_{50} = 4.88 \pm 0.05$ ;  $E_{max} = 103 \pm 3 \%$ ;  $n=2$ ) und in Anwesenheit von PTX (200 ng/ml;  $pEC_{50} = 4.89 \pm 0.07$ ;  $E_{max} = 106 \pm 4 \%$ ;  $n=2$ ) durchgeführt. Die Relaxation durch E2 konnte nicht durch PTX gehemmt werden (Abb. 57).



**Abb. 57.** Vasorelaxierende Effekte von E2 in Ab- und Anwesenheit von Pertussistoxin (PTX, 200 ng/ml) an Schweinekoronararterien mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=2$  Tiere).

Ferner wurden an Arteriensegmenten mit Endothel kumulative Konzentrations-Wirkungskurven mit Verbindung **8** in Abwesenheit ( $pEC_{50} = 5.66 \pm 0.05$ ;  $E_{max} = 83 \pm 4 \%$ ;  $n=6$ ) und in Anwesenheit von Pertussistoxin (PTX, 100 ng/ml:  $pEC_{50} = 5.70 \pm 0.08$ ;  $E_{max} = 85 \pm 13 \%$ ;  $n=2$  und 200 ng/ml:  $pEC_{50} = 5.62 \pm 0.11$ ;  $E_{max} = 87 \pm 3 \%$ ;  $n=4$ ) bestimmt. Auch die Relaxation durch Verbindung **8** konnte nicht durch PTX gehemmt werden (Abb. 58).



**Abb. 58.** Vasorelaxierende Effekte von Verbindung **8** in Ab- und Anwesenheit von Pertussistoxin (PTX, 100 bzw. 200 ng/ml) an Schweinekoronararterien mit Endothel. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte in Prozent der KCl (30 mM)-induzierten Kontraktion  $\pm$  S.E.M. ( $n=2-4$  Tiere).

## 4 Diskussion

### 4.1 SERMs: Eine Alternative zur Hormonersatztherapie?

Die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse von Tierversuchen und Beobachtungsstudien, verglichen mit den Ergebnissen randomisierter, placebokontrollierter, klinischer Studien, wirft viele unbeantwortete Fragen zum Umgang mit der Hormonersatztherapie (HRT) auf. Nachdem in klinischen Studien zur klassischen HRT kein kardiovaskulärer Vorteil, dafür aber ein Anstieg der Brustkrebsrate gezeigt werden konnte, wurden im Juli 2001 von der *American Heart Association* (AHA) neue Richtlinien zur Behandlung von Herzerkrankungen in Kombination mit der Hormonersatztherapie herausgegeben (Mosca et al., 2001b). In diesen Richtlinien bekundet die AHA, dass die Hormonersatztherapie in den Wechseljahren - anders als bisher empfohlen - nicht zur Vorbeugung von kardiovaskulären Erkrankungen geeignet sei. In den USA führte dies bis zum Ende des Jahres 2002 zu einer Reduktion der Einnahme von HRT-Präparaten um 38 %. Als Folge der reduzierten Verschreibungen konnte dort seit Mitte 2002 eine signifikante Verminderung des Auftretens von Brustkrebs bei Frauen ab 50 Jahren verzeichnet werden (Ravdin et al., 2007).

Das Auftreten von Brust- und Endometriumkarzinomen und ein umstrittener Einfluss auf das Herzkreislaufsystem haben in den letzten zehn Jahren zu einem beachtlichen wissenschaftlichen, klinischen und öffentlichen Interesse an der Nutzen-Risiko-Bewertung der HRT geführt und gleichzeitig die Aufmerksamkeit auf die Anwendung von SERMs gerichtet (Stefanick, 2006). Die ehemals weit verbreitete Annahme, dass die HRT kardioprotektive Wirkung habe, führte zu der Hoffnung, dass auch SERMs prophylaktisch gegen KHK wirken könnten. Allerdings zeigte die 1998 veröffentlichte Kohortenstudie *The Breast Cancer Prevention Trial (P-1)* (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*, USA, Fisher et al., 1998) zwar eine Reduktion des Risikos von invasivem Brustkrebs und Knochenbrüchen durch Tamoxifen, jedoch dagegen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Endometriumkarzinomen, Schlaganfällen, Lungenembolien und Thrombosen. Auch die randomisierte, placebokontrollierte *Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation* (MORE)-Studie (Barrett-Connor et al., 2002) konnte eine Senkung des Risikos invasiver Mammakarzinome und vertebraler Knochenbrüche durch Raloxifen bestätigen. Und obwohl Raloxifen zu einer Zunahme venöser Thromboembolien führte, konnte eine Abnahme kardiovaskulärer Ereignisse

---

bei Frauen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko belegt werden (Cummings et al., 1999; Barrett-Connor et al., 2002).

In die Reihe der bedeutsamen Studien auf dem Gebiet der SERMs fügt sich auch die internationale, randomisierte, placebokontrollierte Studie *Raloxifene Use for the Heart* (RUTH) ein. Eingeschlossen wurden mehr als 10.000 Frauen mit KHK oder multiplen Risikofaktoren für KHK. Die primäre Zielsetzung galt der Beurteilung, in wie weit die perorale Einnahme von Raloxifen zu einer Reduktion des Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse und invasive Mammakarzinome führte (Mosca et al., 2001a). Nach einer durchschnittlichen Raloxifen-Behandlung von 5,6 Jahren ergab sich bezüglich des Risikos für KHK (Tod aufgrund koronarer Ursachen, nichttödlicher Myokardinfarkt und Hospitalisierung durch ein akutes koronares Syndrom) kein Unterschied gegenüber der Placebogruppe. Dagegen konnte auch in dieser Studie die Reduktion des Risikos für invasive Mammakarzinome und Wirbelbrüche belegt werden. Allerdings zeigte sich ebenfalls ein gehäuftes Auftreten von venösen Thromboembolien und tödlichen Schlaganfällen (Barrett-Connor et al., 2006).

In Anbetracht der ungünstigen klinischen Studienergebnisse bezüglich einer Estrogentherapie und koronarer Herzerkrankungen ist es nicht überraschend, dass auch Raloxifen mit keinem reduzierten Risiko für koronare Ereignisse in Verbindung gebracht werden konnte. Da nach Raloxifenbehandlung verminderte LDL- und erhöhte HDL-Spiegel gezeigt wurden (Dayspring et al., 2006; Neven et al., 2005), sind folglich Änderungen im Lipidspiegel allein nicht mit einem verminderten koronaren Risiko gleichzusetzen (Stefanick, 2006).

Die ebenfalls erst kürzlich veröffentlichten Studie *Study of Tamoxifen and Raloxifene* (STAR, P-2) (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*, USA; Vogel et al., 2006), in die Frauen mit erhöhtem Risiko für Brustkrebs einbezogen wurden, belegte, dass Raloxifen ebenso effektiv in Bezug auf die Senkung des Risikos für invasive Mammakarzinome ist wie Tamoxifen. Dagegen zeigt Raloxifen ein geringeres Risiko für thromboembolische Ereignisse. Das Risiko für andere Krebsarten, Knochenbrüche, ischämische Herzerkrankungen und Schlaganfälle war für beide Arzneistoffe ähnlich (Vogel et al., 2006).

Obwohl Raloxifen die positiven Merkmale von E2 in sich vereint, ist es trotz zahlreicher klinischer Studien abschließend nicht möglich, eine Aussage über den kardiovaskulären Benefit der SERMs zu treffen. Alle Studien unterscheiden sich erheblich in ihren Einschlusskriterien. Der arteriosklerotische Zustand der Blutgefäße zu Be-

ginn der jeweiligen Therapie wird dadurch unterschiedlich berücksichtigt. Folglich muss das Nutzen-Risiko-Verhältnis zwischen einer Reduktion des Risikos invasiver Mammakarzinome und vertebraler Knochenbrüchen einerseits und der Zunahme von venösen Thromboembolien und Schlaganfällen andererseits insbesondere unter Berücksichtigung des Therapiebeginns abgewägt werden.

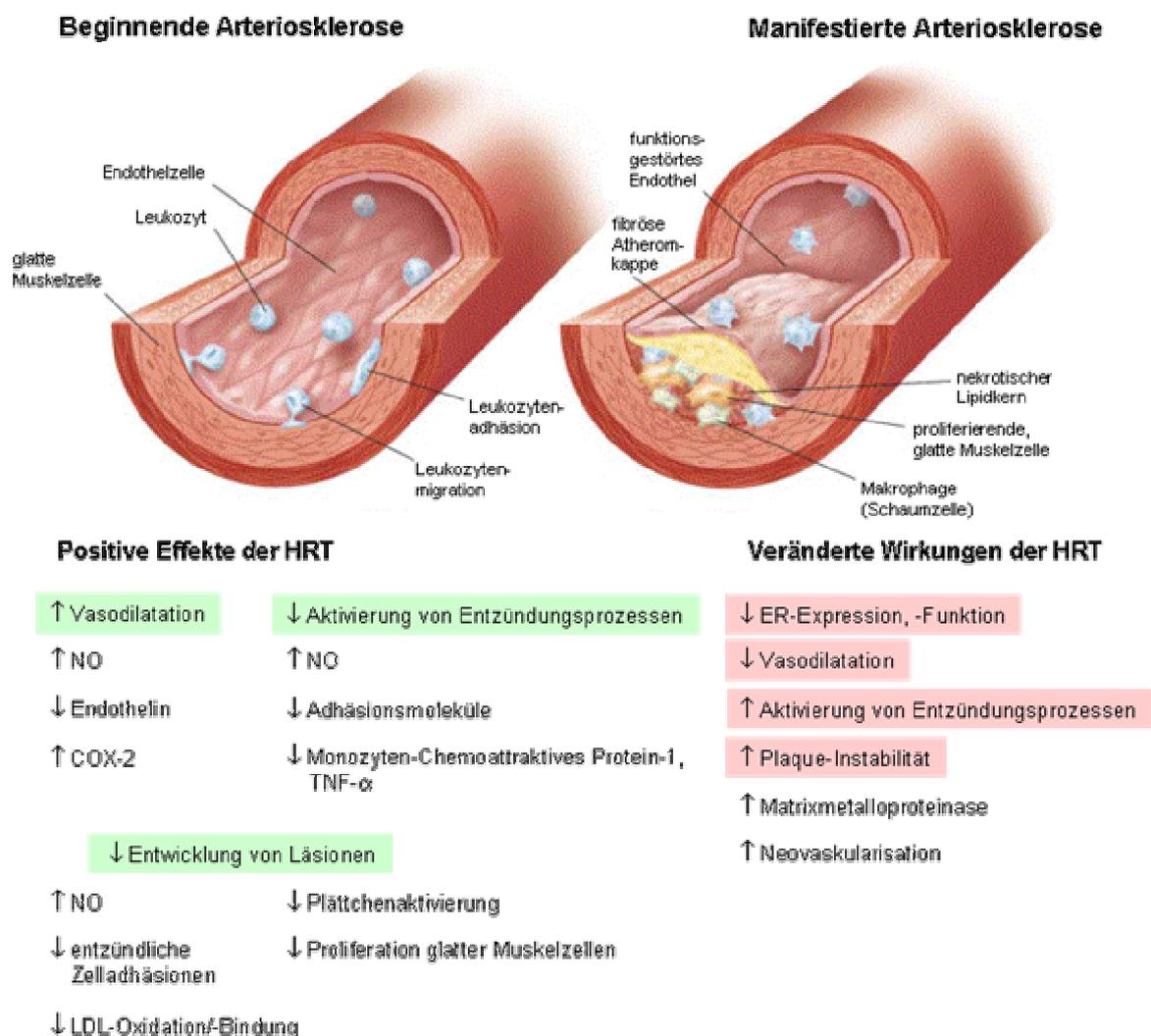
#### **4.1.1 Einfluss des arteriosklerotischen Zustands der Gefäße auf die Vasorelaxation**

Estrogene zeigen sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System (Abb. 59). Tierversuche und Beobachtungsstudien wie die *Nurses' Health Study* (Grodstein et al., 1996) haben einen positiven, kardiovaskulären Einfluss der HRT gezeigt, sofern diese frühzeitig zu Beginn der Perimenopause oder allgemein vor der Entwicklung einer signifikanten Arteriosklerose begonnen wurde. Dagegen zeigten randomisierte, placebokontrollierte, klinische Studien an postmenopausalen Frauen weder in der primären noch in der sekundären Prävention von kardiovaskulären Ereignissen einen Benefit, sondern einen gegensätzlichen Trend hin zur Erhöhung dieses Risikos.

Die Arteriosklerose wird als eine Entzündung in der Intima großer Arterien verstanden, die von einem erhöhten Serum-Cholesterol-Spiegel getriggert wird und in der verschiedene Zelltypen, wie Makrophagen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, T-Zellen und Thrombozyten eine komplexe Aneinanderreihung von Interaktionen bewirken (Ross, 1999). Eine Vielzahl von Substanzen wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren scheinen diese inflammatorischen Prozesse zu induzieren, zu verstärken oder zu modulieren (Kobayashi et al., 2004).

Es gibt zunehmend Anzeichen dafür, dass die Wirkung von Estrogenen auf das Gefäßsystem teilweise davon abhängig ist, in welchem Ausmaß eine Arteriosklerose manifestiert ist. Beispielsweise ist die Estrogenrezeptor-Expression in arteriosklerotischen Arterien deutlich verringert (Losordo et al., 1994; Post et al., 1999). Folglich sind in erkrankten Arterien all jene estrogenen Effekte in dem Ausmaß, in dem direkte, Rezeptor-abhängige Effekte zu der anti-arteriosklerotischen Wirkung beitragen, verringert oder gänzlich fehlend (Ouyang et al., 2006). Darüber hinaus können estrogenen Effekte in Abhängigkeit des arteriosklerotischen Zustandes der Gefäße unterschiedliche Auswirkungen haben. Beispielsweise kann die Hochregulation der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) durch Estrogene im erkrankten Gefäß zu einer

Ruptur der Plaques, gefolgt von akuten koronaren Ereignissen, führen (Karas und Clarkson, 2003). Auch die Estrogenrezeptor-vermittelte Aktivierung der COX-2, die gefolgt ist von einer vermehrten Bildung von Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), spielt im gesunden Gewebe eine wichtige Rolle in der Prophylaxe der Arteriosklerose (Egan et al., 2004). PGI<sub>2</sub> hemmt die Thrombozytenaggregation, die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und deren Proliferation (Cheng et al., 2002). Ferner wird die Interaktion der Leukozyten mit Endothelzellen und die Cholesterolesterhydrolase gehemmt (Kobayashi et al., 2004).



**Abb. 59.** Zeitabhängige Veränderungen des Wirkprofils der HRT in Abhängigkeit vom arteriosklerotischen Zustand der Gefäße – protektive und thrombogene Effekte der Estrogene auf das Früh- bzw. Spätstadium der Arteriosklerose. Die Arteriosklerose ist gekennzeichnet durch den sukzessiven Verlust vaskulärer, protektiver Mechanismen und die Entstehung von fortgeschrittenen, instabilen Läsionen (Mendelsohn und Karas, 2005).

Einen Beleg für die Bedeutung des Therapiebeginns mit Estrogenen konnten Versuche am Affenmodell erbringen. Oral applizierte Estrogene wirkten nur bei Affen mit minimalen, nicht aber mit manifesten arteriosklerotischen Erscheinungen protektiv (Karas und Clarkson, 2003). Es ist anzunehmen, dass dieses auch für die Wirkstoffklasse der SERMs zutrifft. Neben funktionellen Gemeinsamkeiten bezüglich der Vasorelaxation zeigen Estrogene und SERMs auch übereinstimmende Wirkungen bezüglich der Entwicklung einer Arteriosklerose. Am Beginn der Entstehung der Arteriosklerose steht die vermehrte Rekrutierung von Makrophagen und Lymphozyten in die arterielle Intima. In Gegenwart von überschüssigem Cholesterol entstehen aus den Makrophagen sogenannte Schaumzellen. Schaumzellen formen fetthaltige Bereiche, die im Verlaufe des Geschehens in arteriosklerotische Plaques übergehen (Stary et al., 1995). Das Monozyten-Chemoattraktive Protein-1 (MCP-1) gehört zur Subfamilie CC der Zytokine und ist das bedeutendste *chemoattractant* für Monozyten. Sowohl E2 als auch Raloxifen sind in der Lage, die MCP-1-induzierte Migration zu hemmen (Yada-Hashimoto et al., 2006).

#### **4.2 Verwendbarkeit des Modells isolierter Koronararterien des Schweins**

Vaskuläre Effekte von Estrogenen (Mendelsohn und Karas, 1999; Meyer et al., 2006) werden in nicht-genomische und genomische Wirkungen eingeteilt (siehe 1.4.3).

Übereinstimmend wurde publiziert, dass E2 und SERMs in verschiedenen Gefäßsystemen direkt zu einer Vasorelaxation führen. Allerdings werden die verantwortlichen Mechanismen weiterhin kontrovers diskutiert. So ist auch umstritten, ob die Relaxation Endothel-abhängig oder -unabhängig verläuft (White, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, die Vasorelaxation von auf dem Markt befindlichen SERMs, insbesondere von Raloxifen, *in vitro* zu charakterisieren und Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu der E2-vermittelten Vasorelaxation zu beschreiben. Ferner sollte auch die Gruppe der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine auf ihre vasoaktive Potenz hin untersucht werden, da diese Substanzen in anderen Untersuchungen SERM-Charakteristika aufwiesen. Darüber hinaus wurden für diese Verbindungsklasse Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermittelt.

Da die Koronararterie des Schweins in der Forschung als bevorzugtes Modell für koronare Herzerkrankungen verwendet wird, wurden alle Experimente an diesem Organ durchgeführt. Für die Eignung dieses Gewebes wurden die Ergebnisse von Re-

---

laxationsversuchen mit dem Endothel-unabhängigen NO-Donator Nitroprussid-Natrium und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker Verapamil mit Literaturdaten verglichen.

An KCl-vorkontrahierten Gefäßen mit und ohne Endothel ließen sich für die Relaxation mit Nitroprussid-Natrium  $\text{pEC}_{50}$ -Werte von 6.7 bzw. 7.1 ermitteln. Vergleichbare Werte sind an verschiedenen Organen in der Literatur beschrieben worden: An Ringen der Rattenaorta mit Endothel konnte an KCl-vorkontrahierten Gefäßen ein  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7.5 für Nitroprussid-Natrium bestimmt werden (Lincoln und Fischer-Simpson, 1984). Am gleichen Gefäß erreichte die Relaxation durch Nitroprussid-Natrium nach Vorkontraktion mit Phenylephrin einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7.6 (Ajay et al., 2007). An der humanen *Arteria radialis* mit Endothel lieferte Nitroprussid-Natrium einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 6.7 nach Vorkontraktion mit U46619, 6.2 nach Vorkontraktion mit KCl und 6.8 nach Vorkontraktion mit ET-1 (He und Yang, 1999). Nach Vorkontraktion mit U46619 wurde an der humanen Nabelschnurvene ein  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 6.3 ermittelt (Lovren und Triggle, 2000). An der Gebärmutterarterie des Schafes mit Endothel wurde nach Phenylephrin-Kontraktion ein  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 6.9 bestimmt (Xiao et al., 2007). Schließlich konnte nach ET-1-Kontraktion an Koronararteriolen des Schweins mit Endothel ein  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von etwa 6.2 für Nitroprussid-Natrium ermittelt werden (Griffin et al., 2001).

Experimente mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker Verapamil lieferten in KCl-vorkontrahierten Arteriensegmenten mit und ohne Endothel  $\text{pEC}_{50}$ -Werte von 7.0 bzw. 6.8. Nach Vorkontraktion der Gefäßringe mit und ohne Endothel mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ergaben sich  $\text{pEC}_{50}$ -Werte von 7.1 bzw. 6.8. Auch diese Werte entsprachen den in der Literatur gefundenen Daten: An der Rattenaorta ergab sich für Verapamil nach Phenylephrin-Kontraktion ein  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 6.6 an Gefäßen ohne Endothel (Huang, 1998). An den gleichen Gefäßen mit Endothel konnte nach KCl-Kontraktion ein  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7.2 ermittelt werden (Becker et al., 2004). An der Koronararterie des Schweins mit Endothel ergab sich nach KCl-Kontraktion ein  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7.2 (Johnson und Fugman, 1983).

Da die Mechanismen der E2-induzierten Vasorelaxation nach wie vor widersprüchlich diskutiert werden, sollte zunächst dessen Verhalten an der Koronararterie des Schweins charakterisiert werden. Eine Lösung von E2 in DMSO lieferte für Vasorelaxationen Werte (ohne Endothel:  $\text{pEC}_{50} = 4.9$  und  $E_{\text{max}} = 108\%$ ; mit Endothel:  $\text{pEC}_{50} = 5.0$  und  $E_{\text{max}} = 111\%$ ), die mit denen anderer Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Tiermodellen vergleichbar waren: An der Mesenterialarterie der Ratte wurde an Ge-

fäßen ohne Endothel nach Vorkontraktion mit KCl für E2 ein pEC<sub>50</sub>-Wert von 5.0 ermittelt (Tsang et al., 2002). Versuche an der Intrarenalarterie von weiblichen Ratten zeigten ähnliche Ergebnisse. Nach Vorkontraktion mit U46619 ergaben sich pEC<sub>50</sub>-Werte von 5.5 (mit Endothel) bzw. 5.5 (ohne Endothel). Nach Vorkontraktion mit KCl ergab sich ein pEC<sub>50</sub>-Wert von 5.5 an dem gleichen Gefäß ohne Endothel. Keine Unterschiede zeigten sich zu männlichen Ratten (Leung et al., 2005). Auch an der Rattenaorta mit Endothel zeigte sich nach Vorkontraktion mit Phenylephrin ein pEC<sub>50</sub>-Wert von 5.4 (Bucci et al., 2002). Untersuchungen an der Koronararterie von Kaninchen ergaben nach Vorkontraktion von Gefäßen mit Endothel mit KCl einen pEC<sub>50</sub>-Wert von 5.2 und einen E<sub>max</sub>-Wert von 100 % (Lund et al., 2004). Auch an Koronararterien des Schweins ohne Endothel sind vergleichbare Ergebnisse publiziert worden. Nach Vorkontraktion mit U46619 wurde ein pEC<sub>50</sub>-Wert von 4.5 berechnet (Teoh et al., 1999), nach PGF<sub>2α</sub>-Kontraktion ergab sich ein pEC<sub>50</sub>-Wert von 5.0. Keinen Unterschied ergab dazu eine Vorkontraktion mit KCl (Crews und Khalil, 1999). Vorkontraktionen mit ET-1 ergaben Relaxationen mit pEC<sub>50</sub>-Werten von 4.7 mit Endothel und 4.5 ohne Endothel (Leung et al., 2006).

In Analogie dazu ist auch die Hemmung der Kontraktion von Gefäßsegmenten nach einer Vorinkubation mit E2 in der Literatur beschrieben. Vorinkubation der Koronararterie des Schweins mit E2 verringerte die U46619-induzierte Kontraktion (Traupe et al., 2007). Und auch die konzentrationsabhängige Hemmung der ET-1-, 5-HT- und U46619-induzierten Kontraktion durch E2 konnte gezeigt werden (Teoh et al., 2000). Analog dazu führte eine Inkubation mit E2 auch zur Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms durch Membrandepolarisation mittels KCl (Freay et al., 1997).

Aufgrund dieser Datenlage wurde das Modell der Koronararterien des Schweins zur Charakterisierung der Vasorelaxation durch E2 und SERMs verwendet.

### **4.3 Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von 17β-Estradiol**

Wie unter 2.2.1.3 beschrieben, wurde die Kontraktion der Gefäße in zahlreichen Versuchen durch eine Erhöhung der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration ausgelöst. Dieses führt zu einer Depolarisation der Plasmamembran und in Folge zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Dadurch wird ein Einstrom von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> hervorgerufen (Catterall et al., 2005; Katz, 1996; Moudgil et al., 2006). In anderen Experimenten wurde die Kontraktion durch Stimulation von Prostanoid-TP-Rezeptoren (Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptoren) durch den Vasokonstriktor PGF<sub>2α</sub> ausge-

---

löst. Es konnte gezeigt werden, dass die TP-Rezeptor-vermittelte Kontraktion auf einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beruht (Tosun et al., 1998). Die Applikation von E2 induzierte die Relaxation sowohl von Rezeptor-unabhängig KCl-kontrahierten als auch von Rezeptor-abhängig  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -kontrahierten Gefäßen. Darüber hinaus hemmte E2 die  $\text{CaCl}_2$ -induzierte Kontraktion nicht-kompetitiv. In Gegenwart des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivators (S)-(-)-Bay K 8644 wurde die Konzentrations-Wirkungskurve von  $\text{Ca}^{2+}$  nach links verschoben. Die Linksverschiebung dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Kurve konnte mittels E2 konzentrationsabhängig gehemmt werden. Wie vorausgegangene Studien an unterschiedlichen Blutgefäßen verschiedener Spezies zeigten, ließen auch die Beobachtungen an der Koronararterie des Schweins die Schlussfolgerung zu, dass E2 seine vasorelaxierende Wirkung über eine Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch Inhibition von L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vermittelt (Diaz et al., 2004; Han et al., 1995; Leung et al., 2005; Salom et al., 2002). An isolierten Muskelzellen der porcinen Koronararterie ließ sich ebenfalls die Hemmung des Einstroms von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum durch E2 bestätigen (Murphy und Khalil, 1999). Allerdings bleibt die vermittelnde Struktur weiterhin kontrovers diskutiert.

Darüber hinaus verläuft die E2-induzierte Relaxation der Koronararterie des Schweins Endothel-unabhängig (Moritz et al., 2007). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Studien an der Rattenaorta (Abou-Mohamed et al., 2003; Bucci et al., 2002; Woodman et al., 2004), aber in Übereinstimmung zu Studien an der Halsschlagader und der Aorta des Kaninchens (Figtree et al., 1999; Salom et al., 2002), an der Nierenarterie, der Koronararterie und der Mesenterialarterie der Ratte (Leung et al., 2005; Shaw et al., 2000) und an der humanen Koronararterie (Mügge et al., 1993). Folglich scheinen der E2-induzierten Vasorelaxation in Abhängigkeit von der Art des Blutgefäßes und der Spezies sowohl Endothel-abhängige als auch Endothel-unabhängige Mechanismen zugrunde zu liegen (Orshal und Khalil, 2004). Dabei ist zu beachten, dass pharmakologische Charakteristika bestimmter Blutgefäße nicht zwangsläufig übertragbar auf andere Blutgefäße in anderen Spezies sind.

Übereinstimmend mit den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen am Duodenum der Maus, an der Halsschlagader des Kaninchens, der Mesenterialarterie der Ratte und der porcinen Koronararterie (Diaz et al., 2004; Salom et al., 2002; Shaw et al., 2000; Teoh et al., 1999) zeigte der ER-Antagonist ICI 182,780 keinen Einfluss auf den vasorelaxierenden Effekt von E2 an Koronararterien des Schweins mit und ohne

Endothel. Dagegen konnte an der Rattenaorta eine Hemmung der E2-induzierten Relaxation durch ICI 182,780 und damit eine Beteiligung klassischer ERs gezeigt werden (Bucci et al., 2002).

In der Regel erreichte die Relaxation nach Applikation einer einzelnen E2-Konzentration nach spätestens 120 min eine Plateauphase, so dass an diesen Organen kumulative Konzentrations-Wirkungskurven aufgenommen werden konnten (Moritz et al., 2007). An der Koronararterie des Kaninchens erfolgte die Relaxation dagegen schneller, so dass kumulative Konzentrations-Wirkungskurven über einen Zeitraum von 10 bis 15 min aufgenommen werden konnten (Figtree et al., 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Relaxation durch E2 an Schweinekoronararterien schon nach einer Waschung von 10 min vollständige Reversibilität aufweist (Moritz et al., 2006). Eine vollständige Reversibilität konnte auch am Duodenum der Maus gezeigt werden (Diaz et al., 2004).

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Raloxifen-induzierte Relaxation der porcinen Koronararterie zumindest teilweise von der Aktivierung der MAPK p38 abhängig ist (Moritz et al., 2006), wurde auch für E2 die Beteiligung dieses Signalweges untersucht. In der Literatur ist die Aktivierung der MAPK p38 durch E2, Raloxifen, Tamoxifen und Resveratrol in isolierten, humanen Endometriumzellen und am isolierten Rattenherz beschrieben worden (Das et al., 2006; Seval et al., 2006). Der Einfluss von E2, Verbindung **8**, Raloxifen und Tamoxifen auf den Grad der Phosphorylierung der MAPK p38 wurde nach 120 min ausgewertet, weil die Relaxationen dieser Verbindungen in funktionellen Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt als Maximaleffekte definiert und ausgewertet wurden. Die Western Blot-Experimente zeigten 120 min nach der alleinigen Applikation von E2 oder der Applikation von E2 nach einer  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Kontraktion einen Anstieg der phosphorylierten Form der MAPK p38 an Koronararterien des Schweins mit und ohne Endothel (Moritz et al., 2007). Unter den gleichen experimentellen Bedingungen hatte die Kontraktion mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  alleine keinen Einfluss auf das Ausmaß phosphorylierter MAPK p38. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  an isolierten, glattmuskulären Zellen der Schweinekoronararterie zu einer schnellen Aktivierung der MAPK p38 führt. Maximalwerte werden spätestens nach 10 min erreicht, die Abnahme erfolgt innerhalb von 60 min (Teng et al., 2005). Das Unvermögen von  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , die MAPK p38 innerhalb von 120 min zu aktivieren, steht folglich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie. Unlängst konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der

---

MAPK p38 für eine Kardioprotektion während der ischämischen Präkonditionierung verantwortlich ist (Sanada et al., 2001). Unter ischämischer Präkonditionierung versteht man kurze ischämische Perioden, die der anhaltenden Ischämie vorausgehen und die die Infarktgröße limitieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass nicht die ERK, sondern die MAPK p38 an der Modulation der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur beteiligt ist (Yamboliev et al., 2000). In funktionellen Untersuchungen zeigten allerdings weder der MAPK p38-Inhibitor SB 203580 noch PD 98059, ein Inhibitor der ERK1/2, einen Einfluss auf die Relaxation der porcinen Koronararterien mit und ohne Endothel. Dagegen konnte eine Beteiligung der ERK1/2 an der Endothel-abhängigen Vasorelaxation der Gebärmutterarterie des Schafs belegt werden (Chen et al., 2004a). Auch eine Aktivierung mittels GPR30 durch E2 konnte in den humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und SKBR3 nachgewiesen werden (Filardo et al., 2000). Darüber hinaus wurde die Beteiligung der Phosphorylierung der ERK1/2 an der NO-Synthese in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene belegt (Joy et al., 2006). Ebenso führte E2 in der humanen Brustarterie zu einer Aktivierung der ERK1/2, wobei auch hier dessen Bedeutung noch nicht identifiziert werden konnte (Haas et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass E2 durch die Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über spannungs- oder Rezeptor-abhängige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu einer vollständig reversiblen Vasorelaxation von Koronararterien des Schweins führt. Dieser Effekt ist unabhängig von der Anwesenheit eines intakten Endothels. Ferner sind ICI 182,780-sensitive Estrogenrezeptoren nicht an der Vasorelaxation beteiligt. Eine Beteiligung von Pertussistoxin-sensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte auch eine direkte Beteiligung der MAPK p38 und der ERK1/2 an der Vasorelaxation nicht belegt werden. Allerdings zeigt E2 eine signifikante Aktivierung der MAPK p38 zum Zeitpunkt seines maximalen relaxierenden Effekts. Um allerdings den Mechanismus der Aktivierung der MAPK p38 und deren Rolle bei der Relaxation von Blutgefäßen zu untersuchen, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

#### **4.4 Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von Raloxifen**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der vasorelaxierende Effekt von Raloxifen an der vorkontrahierten Koronararterie des Schweins untersucht. Die Kontraktion der Gefäße wurde zum einen durch eine Erhöhung der extrazellulären  $\text{K}^{+}$ -Konzentration

mittels KCl und zum anderen durch Stimulation von Prostanoid-TP-Rezeptoren durch die Zugabe von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ausgelöst. Raloxifen war in der Lage, sowohl die Rezeptor-unabhängige als auch die Rezeptor-abhängige Kontraktion zu hemmen wie auch KCl- oder  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierte Gefäße zu relaxieren. Raloxifen erwies sich dabei 10-fach potenter als E2 (Moritz et al., 2006). In einer anderen Studie wurde darüber hinaus auch die Inhibition der Kontraktion durch U46619, 5-HT und Endothelin belegt (Leung et al., 2007). Des Weiteren konnte Raloxifen, wie auch E2, eine  $\text{CaCl}_2$ -induzierte Kontraktion nicht-kompetitiv hemmen. In Gegenwart des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivators (S)-(-)-Bay K 8644 wurde die Konzentrations-Wirkungskurve von  $\text{Ca}^{2+}$  nach links verschoben. Die Linksverschiebung dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Kurve konnte mittels Raloxifen konzentrationsabhängig gehemmt werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass Raloxifen als Inhibitor von L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen an Koronararterien des Schweins wirkt (Moritz et al., 2006). Die Ergebnisse stimmen mit denen vorausgegangener Studien an unterschiedlichen Blutgefäßen anderer Spezies, wie der Koronararterie des Kaninchens, Pulmonararterien und -venen und Zerebral- und Nierenarterien von Ratten, überein (Figtree et al., 1999; Chan et al., 2005; Tsang et al., 2004; Leung et al., 2005). Erst kürzlich bestätigte außerdem eine weitere Arbeitsgruppe diese Ergebnisse auch an der porcinen Koronararterie (Leung et al., 2007). Einen indirekten Beweis dafür, dass der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch Raloxifen in  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Gefäßen gehemmt wird, lieferten auch Experimente mit dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM. Die Raloxifen-induzierte Vasorelaxation nach Vorkontraktion mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  blieb in Gegenwart von BAPTA-AM unverändert. Ferner konnte gezeigt werden, dass Raloxifen nicht in der Lage war, die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern zu inhibieren. Raloxifen führte nicht zu einer Hemmung von Koffein-induzierten, transienten Kontraktionen. Analog dazu war Raloxifen nicht in der Lage, die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  im sarkoplasmatischen Retikulum nach Koffein-Applikation in ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens zu modifizieren (Liew et al., 2004). Folglich hat Raloxifen ebenso wie E2 keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern in der glatten Muskulatur der Blutgefäße (Kitazawa et al., 1997; Moritz et al., 2006). Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass Raloxifen seinen vasorelaxierenden Effekt überwiegend durch eine Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Zellmembran vermittelt.

---

Ferner sei erwähnt, dass die Raloxifen-induzierte Relaxation der Koronararterie des Schweins Endothel-unabhängig verläuft (Moritz et al., 2006). Dies steht im Gegensatz zu einer Studie an Koronararterien des Kaninchens (Figtree et al., 1999), aber in Übereinstimmung zu Studien an Pulmonal-, Zerebral- und Nierenarterien der Ratte (Chan et al., 2005; Tsang et al., 2004; Leung et al., 2005). Folglich scheinen der Raloxifen-induzierten Vasorelaxation – analog zur E2-induzierten Dilatation – in Abhängigkeit von der Art des Blutgefäßes und der Spezies sowohl Endothel-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen zugrunde zu liegen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass Tamoxifen neben einer langsamen Dilatation auch eine Endothel-abhängige Vasorelaxation an der Koronararterie des Schweins induziert. Dieser Effekt wurde auch an Koronararterien des Kaninchens belegt (Figtree et al., 2000).

Übereinstimmend mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Tier- und Gefäßmodellen (Bracamonte et al., 2002; Chan et al., 2005; Leung et al., 2005; Tsang et al., 2004) zeigte der Estrogenrezeptor-Antagonist ICI 182,780 keinen Einfluss auf den vasorelaxierenden Effekt von Raloxifen an Koronararterien des Schweins mit und ohne Endothel (Moritz et al., 2006). Interessanterweise erwies sich an der Koronararterie des Kaninchens nur die Endothel-abhängige, nicht aber die Endothel-unabhängige Vasorelaxation durch Raloxifen als ICI 182,780-sensitiv (Figtree et al., 1999). Dieser Effekt konnte auch bei E2 beobachtet werden (Bucci et al., 2002). Die Unterschiede zwischen den Effekten von Raloxifen auf die Koronararterien vom Schwein oder Kaninchen können vermutlich vor allem auf Speziesunterschiede zurückgeführt werden. Analog zur Raloxifen-induzierten Relaxation zeigte ICI 182,780 auch bei der Dilatation der porcinen Koronararterie durch Tamoxifen keinen Einfluss. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen an der Koronararterie des Kaninchens (Figtree et al., 2000).

An der Koronararterie des Schweins zeigten sich Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Relaxation durch Raloxifen verglichen mit der E2-induzierten Relaxation. In den meisten Fällen erreichte die Relaxation nach Applikation einer einzelnen Raloxifen-Konzentration auch nach 120 min keine Plateauphase (Moritz et al., 2006). Das gleiche Phänomen zeigte sich bei Tamoxifen. Aus diesem Grund war es nicht möglich, an der Koronararterie des Schweins Konzentrations-Wirkungskurven für Raloxifen bzw. Tamoxifen aufzunehmen. Eine andere Studie konnte dagegen an ET-1-vorkontrahierten Koronararterien des Schweins eine Relaxation durch Raloxifen zei-

gen, die bereits innerhalb weniger Minuten einen Maximaleffekt erzielte und damit die Aufnahme von Konzentrations-Wirkungskurven ermöglichte (Leung et al., 2007). Auch an der Kaninchenkoronararterie erfolgte die Vasorelaxation durch Raloxifen wesentlich schneller, so dass an diesen Organen ebenfalls kumulative Konzentrations-Wirkungskurven in einem Zeitraum von 90 min durchgeführt werden konnten (Figtree et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Relaxation durch Raloxifen an Schweine- (Moritz et al., 2006) wie auch an Kaninchen-Koronararterie (Figtree et al., 1999) selbst nach wiederholten Waschungen nicht vollständig reversibel ist. Eine langsame Diffusion von Arzneistoffen dieser Substanzklasse aus der Rezeptor-Biophase ist auch aus klinischer Sicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die Tamoxifen-Konzentration im Brustkrebsgewebe wesentlich höher als im Serum ist (Kisanga et al., 2004). Der langsame Anstieg und die lange Wirkdauer von Raloxifen, die sich an der Koronararterie des Schweins zeigten, könnten vorteilhaft für die Langzeittherapie von kardiovaskulären Erkrankungen sein. Dies müsste allerdings in ergänzenden Studien nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang sei nochmals betont, dass die E<sub>2</sub>-induzierte Relaxation im Gegensatz zu Raloxifen innerhalb von 120 min eine Plateauphase erreichte und darüber hinaus bereits nach einer Waschphase von 10 min vollständige Reversibilität zeigte.

Western Blot-Experimente zeigten 120 min nach der Applikation von Raloxifen oder der Applikation von Raloxifen nach PGF<sub>2α</sub>-Kontraktion einen Anstieg der phosphorylierten Form der MAPK p38 an Koronararterien des Schweins mit und ohne Endothel (Moritz et al., 2006). Zu den gleichen Ergebnissen führten Experimente mit Tamoxifen. Unter identischen experimentellen Bedingungen führte die Kontraktion mit PGF<sub>2α</sub> alleine zu keiner Aktivierung der MAPK p38. Unlängst wurde bewiesen, dass die Aktivierung dieser Kinase für eine Kardioprotektion während der ischämischen Präkonditionierung verantwortlich ist (Sanada et al., 2001). Mit Ausnahme der Beteiligung der MAPK p38 an der Adenosinrezeptor-vermittelten Relaxation der Schweinekoronararterie (Teng et al., 2005) gab es bisher keine Beweise für die Beteiligung der dieser Kinase an der Endothel-unabhängigen Vasodilatation. Allerdings konnte in Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass SB 203580 die Raloxifen-induzierte Relaxation an der Koronararterie des Schweins Endothel-unabhängig hemmt (Moritz et al., 2006). Die Beobachtung, dass SB 203580 nicht in der Lage war, die Raloxifen-induzierte Relaxation an Koronararterien des Schweins mit intaktem Endothel eben-

---

falls signifikant zu hemmen, lässt darauf schließen, dass weitere Signalwege an der Relaxation beteiligt sind. Erwähnenswert ist außerdem, dass die ERK1/2 weder an Schweinekoronararterien mit noch ohne Endothel an der Raloxifen-induzierten Relaxation beteiligt war. Die Tamoxifen-induzierte Relaxation dagegen wurde weder durch einen Inhibitor der MAPK p38 noch der ERK1/2 beeinflusst. Erst kürzlich konnte an ischämischen Herzen von Hunden gezeigt werden, dass Raloxifen die koronare Perfusion, die Kontraktilität des Herzmuskels und den myokardialen Metabolismus verbessert (Ogita et al., 2004). Auch die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Raloxifen bezüglich humaner kardiovaskulärer Erkrankungen protektiv wirken könnte. Es lässt sich zusammenfassen, dass Raloxifen in der Lage ist, Koronararterien des Schweins durch die Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch spannungs- oder Rezeptor-abhängige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu relaxieren. Dagegen vermag Raloxifen nicht, die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern zu hemmen. Dieser Effekt ist unabhängig von der Anwesenheit eines intakten Endothels. Ferner sind ICI 182,780-sensitive Estrogenrezeptoren nicht an der Vasorelaxation beteiligt. Darüber hinaus konnte erstmals bewiesen werden, dass die Raloxifen-induzierte Relaxation der Koronararterie des Schweins zumindest teilweise von der Aktivierung des MAPK-Signalwegs abhängig ist. Jüngst wurde gezeigt, dass Raloxifen an isolierten, humanen Endometriumzellen nicht-genomisch zu einer Aktivierung der MAPK p38 führt (Seval et al., 2006). Allerdings sind noch weiterführende Untersuchungen notwendig, um den Mechanismus der Aktivierung der MAPK p38 und die Rolle dieser Aktivierung an der Relaxation von Blutgefäßen aufzuklären.

#### **4.5 Charakterisierung der vasorelaxierenden Effekte von 1,2-Diaryl-ethylendiaminen**

*N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine stellen eine Verbindungsklasse dar, die strukturell mit Estrogenen und SERMs verwandt ist. Besonders hoch ist die strukturelle Ähnlichkeit zu HEX aufgrund des Fehlens der Styren-Doppelbindung und zu Tamoxifen durch die Anwesenheit des Diarylalkan-/Diarylalken-Grundgerüsts. Da sich in der Reihe der getesteten Verbindungen die vasodilatatorischen Potenzen der *d,l*-Verbindungen signifikant von denen ihrer korrespondierenden meso-Verbindungen an Ringen der Schweinekoronararterie unterscheiden, ist die Relaxation der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-ethylendiamine folglich abhängig von deren Stereochemie (Moritz et al., 2007).

Interessanterweise zeigen die d,l-Stereoisomere eine höhere agonistische Potenz als ihre korrespondierenden meso-Verbindungen in Bezug auf die Vasorelaxation der Blutgefäße. Dagegen weisen die meso-Verbindungen eine höhere ER-Affinität auf (Gust et al., 1995; von Angerer, 1982). Dies spricht folglich gegen eine Beteiligung klassischer ERs an der Vasorelaxation durch diese Verbindungen. Darüber hinaus zeigten nur solche Verbindungen der d,l-Reihe eine signifikante Vasorelaxation, deren basische Stickstoffe mit Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Butyl-Gruppen substituiert waren (Moritz et al., 2007). Keinen Einfluss auf die Vasorelaxation der Arterien-segmente der Schweinekoronararterie hatte die An- oder Abwesenheit eines intakten Endothels (Moritz et al., 2007). Dies steht damit in Übereinstimmung zu den vasorelaxierenden Effekten von E2, Tamoxifen und Raloxifen am gleichen Gefäß (Salas et al., 1994; Hutchison et al., 2001; Leung et al., 2007; Moritz et al., 2006). Als potenteste Verbindung erwies sich die Verbindung **8**, die an beiden basischen Stickstoffatomen mit Propyl-Gruppen substituiert ist. Die vasorelaxierende, agonistische Potenz von Verbindung **8** war etwa 12–15-fach höher als die von E2. Der vasorelaxierende Effekt von Verbindung **8** konnte nicht durch ICI 182,780 beeinflusst werden (Moritz et al., 2007). Klassische, ICI 182,780-sensitive Estrogenrezeptoren waren demnach nicht an der Vasorelaxation durch Verbindung **8** beteiligt. Eine Inkubation der Gefäßsegmente mit Verbindung **8** führte zu einer konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von  $\text{Ca}^{2+}$ . Daneben wurde außerdem der maximale kontraktile Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$  reduziert. Die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kontraktion konnte durch ICI 182,780 nicht beeinflusst werden (Moritz et al., 2007). Auch dies steht in Übereinstimmung zu den Beobachtungen der vasorelaxierenden Effekte von E2 und Raloxifen an der Koronararterie des Schweins (Teoh et al., 1999; Leung et al., 2007; Moritz et al., 2006). Wie im Falle der E2-induzierten Vasorelaxation, scheint auch der Vasorelaxation durch Verbindung **8** ein nicht-genomischer Signalmechanismus zugrunde zu liegen. Die Beobachtung, dass Verbindung **8** nicht-kompetitiv die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Kontraktion im depolarisierenden Medium inhibierte, lässt den Schluss zu, dass diese Verbindung ihren relaxierenden Effekt an Schweinekoronararterien ebenfalls über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistischen Mechanismus ausübt. Einen weiteren Beleg für eine Hemmung von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen lieferten Experimente mit dem L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivator (S)-(-)-Bay K 8644. Die von (S)-(-)-Bay K 8644 verursachte Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von  $\text{Ca}^{2+}$  konnte durch Verbindung **8** konzentrationsabhängig

---

gehemmt werden (Moritz et al., 2007). Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistischer Effekt konnte ebenfalls für E2 und Raloxifen an Koronararterien des Kaninchens und des Schweins nachgewiesen werden (Jiang et al., 1991; Figtree et al., 1999; Leung et al., 2007; Moritz et al., 2006). Um aber die  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistische Wirkung von Verbindung **8** eindeutig nachweisen zu können, sind in weiterführenden Studien elektrophysiologische Aufnahmen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle notwendig.

Verbindungen, die in der Lage sind, Blutgefäße zu relaxieren, die mit einer mäßigen Anhebung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration (z. B. 30 mM) vorkontrahiert wurden, werden als potentielle  $\text{K}^+$ -Kanal-Öffner betrachtet (Nelson und Quayle, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass auch  $\text{K}^+$ -Kanäle an den vasorelaxierenden Effekten der Estrogene an Koronararterien des Schweins beteiligt sind (White et al., 1995). In der glatten Muskulatur der Arterien existieren verschiedene  $\text{K}^+$ -Kanal-Subtypen. Beschrieben sind spannungsabhängige,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) und ATP-sensitive  $\text{K}^+$ -Kanäle (Hirst und Edwards, 1989; Nelson und Quayle, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Vasorelaxation durch Verbindung **8** nicht durch eine Zunahme des  $\text{K}^+$ -Effluxes durch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanäle hoher Leitfähigkeit ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ), durch ATP-sensitive  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) oder durch spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_{\text{V}}$ ) vermittelt wird. Experimente mit Inhibitoren zeigten, dass weder der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ - und  $\text{K}_{\text{V}}$ -Kanal-Inhibitor TEA noch der selektive  $\text{K}_{\text{V}}$ -Kanal-Inhibitor 4-AP noch der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Inhibitor Glibenclamid in der Lage sind, die Relaxation durch Verbindung **8** zu hemmen (Moritz et al., 2007). Die Tatsache, dass Glibenclamid die KCl-induzierte Vorkontraktion reduziert, ist darauf zurückzuführen, dass Glibenclamid selbst einen hemmenden Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle besitzt (Chan et al., 2000).

Der zeitliche Verlauf der Vasorelaxation der Koronararterie des Schweins durch *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine war vergleichbar mit dem Verlauf der Relaxation durch E2. In der Regel zeigten Relaxationen durch eine einzelne Konzentration der *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine das Erreichen einer Plateauphase innerhalb von 120 min. Allerdings waren Relaxationen durch *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamine im Gegensatz zu E2, aber in Übereinstimmung mit Raloxifen und Tamoxifen auch nach wiederholten Waschphasen der behandelten Arteriensegmente nicht reversibel (Moritz et al., 2007).

Experimente, die die Beteiligung von Signalwegen der Vasorelaxation durch Verbindung **8** untersuchten, zeigten, dass weder die Adenylylcyclase, die Guanylylcyclase, die Proteinkinase A noch die Proteinkinase G beteiligt sind (Moritz et al., 2007). Dies ist teilweise für den vasorelaxierenden Effekt von E2 an der Schweinekoronararterie beschrieben worden, der ebenfalls nicht durch die Inhibitoren der Guanylylcyclase und der Proteinkinase A beeinflusst werden konnte (Keung et al., 2005). Aber im Gegensatz zu der Vasorelaxation durch Verbindung **8** waren die Adenylylcyclase und die Proteinkinase G an der E2-induzierten Dilatation in diesem Gewebe beteiligt (Keung et al., 2005).

Da gezeigt werden konnte, dass die Raloxifen-induzierte Relaxation der Koronararterie des Schweins zumindest teilweise von der Aktivierung der MAPK p38 abhängig ist, wurde auch für die Verbindung **8** eine Beteiligung dieses Signalweges untersucht. Raloxifen wurde dabei als Referenz verwendet. In der Literatur ist die Aktivierung der MAPK p38 durch E2, Raloxifen, Tamoxifen und Resveratrol in isolierten, humanen Endometriumzellen und am isolierten Rattenherz beschrieben worden (Das et al., 2006; Seval et al., 2006). In diesem Zusammenhang wurde das Vermögen von E2 und Tamoxifen hinsichtlich der Aktivierung der MAPK p38 untersucht, weil vermutet wurde, dass die Wirkungsmechanismen dieser Verbindungen alle den gleichen zellulären Mechanismen an der Schweinekoronararterie unterliegen. Interessanterweise führte im Gegensatz zu Raloxifen, Tamoxifen und E2 die alleinige Inkubation mit Verbindung **8** oder Verbindung **8** appliziert nach Vorkontraktion mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nicht zu einer Aktivierung des p38-Signalweges (Moritz et al., 2007). Dementsprechend zeigten die Western Blot-Untersuchungen keinen Anstieg der phosphorylierten Form der MAPK p38 nach einer 120-minütigen Inkubation der Segmente der Schweinekoronararterie mit Verbindung **8** alleine oder nach Vorkontraktion der Gefäße mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Der Einfluss von Verbindung **8**, E2, Raloxifen und Tamoxifen auf den Grad der Phosphorylierung der MAPK p38 wurde nach 120 min ausgewertet, weil Relaxationsversuche dieser Verbindungen zu diesem Zeitpunkt ausgewertet wurden. Dieses Ergebnis war unabhängig von der An- oder Abwesenheit eines intakten Endothels. Übereinstimmende Resultate lieferten dazu auch funktionelle Untersuchungen: Weder der MAPK-p38-Inhibitor SB 203580 noch der ERK1/2-Kinase-Inhibitor PD 98059 konnten die Relaxation durch Verbindung **8** beeinflussen (Moritz et al., 2007).

Es lässt sich zusammenfassen, dass Verbindung **8** zu einer Vasorelaxation von Schweinekoronararterien führt. Die agonistische Potenz liegt dabei etwa um das

---

12–15-fache über der von E2. Die Relaxation der glatten Muskelzellen von Koronararterien wird dabei offensichtlich durch eine Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermittelt. Diese Wirkung ist nicht-genomisch, unabhängig von einem intakten Endothel und ICI 182,780-sensitiven Estrogenrezeptoren.  $\text{K}^{+}$ -Kanäle spielen bei der Vermittlung des vasorelaxierenden Effekts keine Rolle. Interessanterweise führt Verbindung **8** im Gegensatz zu E2, Raloxifen und Tamoxifen nicht zu einer Aktivierung der MAPK p38

Da Verbindungen, die zu einer Vasorelaxation der Koronararterien führen können, potentiell gegen kardiovaskuläre Erkrankungen eingesetzt werden könnten, wären weitere Studien erforderlich, die einen protektiven Effekt von Verbindung **8** untersuchen.

#### 4.5.1 Strukturelle Abwandlungen der 1,2-Diarylethylendiamine

Der Vergleich strukturell verwandter 1,2-Diarylethylendiamine und verschiedener *N*-Alkyl-2,6-dichlor-4-hydroxybenzylamine als strukturelle Bestandteile mit den eingangs beschriebenen *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiaminen zeigt ein uneinheitliches Bild. So führt beispielsweise die Entfernung der Chlorsubstituenten aus Verbindung **8** zur unwirksamen Verbindung VN 142. Substitution der Propylgruppen aus Verbindung VN 142 durch Isopropylgruppen bewirkt dagegen wiederum einen vasorelaxierenden Effekt der Verbindung VN 143.

Auch die Bedeutung der Anzahl der Alkylketten lieferte in Bezug auf die vasorelaxierende Potenz ein widersprüchliches Ergebnis. Während die Entfernung einer Alkylkette zu einem Anstieg der vasorelaxierenden Potenz der meso-Verbindung **5** führt (VN 424), wurde die von der d,l-Verbindung **6** vermindert (VN 439).

Die Methylierung beider phenolischer Hydroxylgruppen von Verbindung **4** zeigt interessanterweise eine besonders potente vasodilatatorische Wirkung (V 75 – d,l). Dagegen führt die Einführung von Methylgruppen in die potente Verbindung **6** zu einem vollständigen Verlust der vasorelaxierenden Potenz (A 61 – d,l).

Aufgrund dieser Widersprüchlichkeiten und des unvollständigen Vorliegens der getesteten Verbindungen lassen sich bei diesen Verbindungen keinerlei Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten. Die Synthese und Testung der fehlenden Verbindungen könnte an dieser Stelle aber weitere Erkenntnisse liefern. Insbesondere die Untersuchung des Wirkmechanismus der Vasorelaxation durch die methoxylierte

Verbindung V 75 – d,l ist dabei von Interesse, weil die für die Wirkung am ER verantwortlichen Hydroxylfunktionen nicht zur Verfügung stehen.

#### 4.6 Bedeutung des GPR30 für akute, estrogenere Effekte

Die Modelle für die Vermittlung akuter, estrogenere Effekte können in zwei große Gruppen von ERs eingeteilt werden. Die eine Gruppe favorisiert die klassischen ERs  $\alpha$  und  $\beta$  als Vermittler schneller, membranvermittelter Ereignisse. Zum einen wird die Lokalisierung klassischer ERs an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran durch Palmitoylierung (Acconcia et al., 2004; Li et al., 2003) bzw. Phosphorylierung (Balasenthil et al., 2004; Wang et al., 2002) beschrieben. Zum anderen wird die Beteiligung von Adapterproteinen wie Shc (Evinger und Levin, 2005) und MNAR (Boonyaratanakornkit und Edwards, 2004; Greger et al., 2007) beschrieben, die zur Rekrutierung des ER $\alpha$  an die Zellmembran und insbesondere an Caveolae führt. Postuliert wird die Einleitung von Signalkaskaden durch Assoziation mit Strukturen der Zellmembranen wie G-Proteine, Caveoline und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Hewitt et al., 2005). Darüber hinaus wird in der Literatur eine kontroverse Diskussion darüber geführt, welche Moleküle beteiligt sind und welche Signalkaskaden ablaufen. Im zweiten Modell wird angenommen, dass nicht die klassischen, nukleären ERs  $\alpha$  oder  $\beta$ , sondern andere membranständige, estrogenbindende Proteine an der Vermittlung dieser estrogenere Effekte beteiligt sind (Hewitt et al., 2005). In der Literatur werden dafür unter anderem Rezeptoren von Wachstumsfaktoren und auch der G-Proteingekoppelte Rezeptor GPR30 diskutiert (Prossnitz et al., 2007). Eine Phosphorylierung der ERK 1/2 durch die Aktivierung des GPR30 konnte für E2, Tamoxifen und ICI 182,780, nicht aber für 17 $\alpha$ -Estradiol nachgewiesen werden (Filardo et al., 2000). Dieser Effekt wird über Pertussistoxin (PTX)-sensitive Signalkaskaden vermittelt, was eine Beteiligung von G<sub>i/o</sub>-heterotrimeren G-Proteinen anzeigt. PTX hemmt ausschließlich G<sub>αi</sub>-Einheiten inhibitorischer G-Proteine, indem es die ADP-Ribosylierung eines Cystein-Restes an Position 4 des C-Terminus der meisten G<sub>α</sub>-Untereinheiten der G<sub>i</sub>-Familie katalysiert. Somit wird der Austausch von GDP durch GTP verhindert und eine Kopplung von Rezeptor und G-Protein unmöglich gemacht (Fields und Casey, 1997).

---

Neben nicht-genomischen Effekten konnten erst kürzlich auch genomische, das Zellwachstum von Mamma-, Endometrium-, Ovarial- und Schilddrüsentumoren fördernde Effekte durch den GPR30 beobachtet werden (Albanito et al., 2007).

Analog zu ihren estrogenen Eigenschaften weisen die physiologischen Estrogene entsprechende Affinitäten zum GPR30 auf. E2 besitzt eine hohe, Estriol und Estron eine geringere Affinität zu diesem Rezeptor. Darüber hinaus zeigen auch Tamoxifen und ICI 182,780 eine hohe Affinität (Thomas et al., 2005). Widersprüchlich diskutiert wird neben der Bedeutung dieses Rezeptors auch seine Lokalisierung. Sowohl in der Plasmamembran (Thomas et al., 2005) als auch in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Revankar et al., 2005) konnte der GPR30 nachgewiesen werden. Mit der Lokalisierung des Rezeptors in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums könnten zwar einerseits viele physiologische Effekte von Estrogenen, nicht aber die schnellen, zellmembranvermittelten Effekte erklärt werden (Hewitt et al., 2005). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass nicht vollständig geklärt ist, wie GPCRs ihren Syntheseort, das Endoplasmatische Retikulum, verlassen und zur Zellmembran gelangen (Terrillon und Bouvier, 2004).

Nachgewiesen wurde der GPR30 in zahlreichen humanen Geweben wie Nerven, Plazenta, Herz, Ovarien, Prostata, Leber, Gefäßepithel, Lymphknoten, Saphenavenen, Brustarterien und Brustkrebs (Thomas et al., 2005; Haas et al., 2007). Sowohl in humanen als auch in porcinen Koronararterien wurde GPR30 bisher nicht nachgewiesen. Auch eine Beteiligung an der vasorelaxierenden Wirkung von Estrogenen konnte bisher nicht erbracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression des GPR30 in der Schweinekoronararterie mittels Western Blot-Experimenten erstmals gezeigt werden. Allerdings war es nicht möglich, eine Beteiligung dieses Rezeptors an der Estrogen- und SERM-induzierten Vasorelaxation zu bestätigen. PTX beeinflusste selbst in unterschiedlichen Konzentrationen die Dilatation durch E2 und Verbindung **8** nicht. An humanen, koronaren Arteriolen konnte gezeigt werden, dass PTX in einer Konzentration von 100 ng/ml nach einer Inkubationszeit von 60 bis 90 min zu einer Hemmung von G<sub>i</sub>-Proteinen führt (Bosnjak et al., 2003). Auch an der Aorta vom Kaninchen führte eine zweistündige Inkubation mit PTX (250 ng/ml) zu einer Hemmung dieser Proteine (Mukhopadhyay et al., 2002).

Im Vergleich der unterschiedlichen Modelle zeigt sich, dass die Bedeutung des ER $\alpha$ /ER $\beta$  und des GPR30 in der Vermittlung akuter Effekte durch E2 und SERMs weiterhin unklar bleibt und widersprüchlich diskutiert wird. Zu der Komplexität der

diskutierten Mechanismen und beteiligten Strukturen trägt bei, dass die vielfältigen nicht-genomischen Estrogenwirkungen an äußerst unterschiedlichen biologischen Modellen und mit gänzlich verschiedenen Methoden untersucht wurden. Zur Klärung dieser Diskussion würde die Bestimmung der physiologischen Rolle dieses potentiellen Mediators estrogener Effekte beitragen. Entscheidend ist auch die Frage, ob dessen akute Effekte an genomische Effekte nukleärer ERs gekoppelt sind.

#### **4.7 Vergleich der Effekte von 17 $\beta$ -Estradiol und SERMs**

Obwohl sich die vasorelaxierenden Effekte von E2 und den therapeutisch verwendeten SERMs Raloxifen und Tamoxifen wie auch die Effekte von Verbindung **8** in weiten Teilen ähneln, wurden im Rahmen dieser Arbeit doch auch erhebliche Unterschiede in deren Wirkungen erkennbar. So führen alle getesteten Verbindungen zu einer Vasorelaxation, die im Wesentlichen auf eine Hemmung von L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen zurückzuführen ist. Darüber hinaus kann auch für alle Verbindungen eine Beteiligung von ICI 182,780-sensitiven ERs an der Koronararterie des Schweins ausgeschlossen werden. Obwohl für die vasorelaxierenden Effekte von E2, Raloxifen und Verbindung **8** eine Beteiligung des Endothels ausgeschlossen werden konnte, zeigt Tamoxifen eine Dilatation, die zumindest teilweise auf der Aktivierung der eNOS beruht. Einen weiteren Unterschied liefert die Mitwirkung der MAPK p38 an der Relaxation. Die Hemmung der MAPK p38 beeinflusst lediglich die Raloxifen-induzierte Relaxation an Segmenten der porcinen Koronararterie ohne Endothel. In diesem Zusammenhang zeigt sich noch ein weiterer bedeutender Unterschied: Während sowohl E2 als auch Raloxifen und Tamoxifen zu einer Phosphorylierung der MAPK p38 führen, bleibt Verbindung **8** diesbezüglich ohne Wirkung.

Es lässt sich festhalten, dass die Mechanismen, die der E2- oder SERM-induzierten Vasorelaxation zugrunde liegen, nicht vereinheitlicht werden können.

#### **4.8 Ausblick: Therapeutische Verwendung von 17 $\beta$ -Estradiol und SERMs**

Zu den therapeutischen Zielen eines optimalen SERMs gehören die Linderung klimakterischer Beschwerden und die Vermeidung von Osteoporose-bedingten Knochenbrüchen, ohne dabei negative Auswirkungen auf das Brust- und Endometriumgewebe zu zeigen. Im Hinblick auf das kardiovaskuläre System müssen darüber hin-

---

aus negative Einflüsse vermieden, im günstigsten Fall sollte ein protektiver Effekt ausgeübt werden. Da klinische Studien bislang keinen kardiovaskulären Benefit für SERMs belegen konnten, aber auch die Bedeutung des arteriosklerotischen Zustands und damit die Bedeutung des Therapiebeginns nicht eindeutig geklärt werden konnten, ist es von erheblicher Bedeutung, die Mechanismen zu identifizieren, die der Vasorelaxation und damit der potentiellen kardiovaskulären Protektion zugrunde liegen. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es darüber hinaus entscheidend, die vaskulären Effekte von Estrogenen und SERMs nicht zu vereinheitlichen und als Klasseneffekte zu beurteilen. Vielmehr müssen die unterschiedlichen Wirkqualitäten bestimmt und deren Bedeutung für die Kardioprotektion definiert werden. Weiterhin ist es von großem Interesse, die Estrogen- und SERM-bindenden Strukturen zu identifizieren, die die nicht-genomischen Effekte vermitteln. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, eine mögliche Beteiligung des GPR30 näher zu untersuchen. Auch die Verwendung des ersten, spezifischen GPR30-Agonisten G-1 (Bologa et al., 2006) könnte durch Vergleich der Signalwege hierüber Aufschluss geben. Außerdem wäre die Untersuchung der Vasorelaxation der äußerst potenten, vasorelaxierenden Verbindung V 75 – d,l aufschlussreich, da in dieser Verbindung beide phenolischen Hydroxylfunktionen nicht für Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung stehen, die zumindest für eine Aktivierung klassischer Estrogenrezeptoren verantwortlich sind.

Wenn die Bedeutungen der beteiligten Strukturen von Signalkaskaden der Vasorelaxation eindeutig bestimmt sind, können diese Erkenntnisse auch für die Beurteilung der neuen, in klinischen Studien befindlichen SERMs (Idoxifen, Droloxifen, Ospemifen, Arzoxifen, Acolbifen, Levormeloxifen, Lasofoxifen, Bazedoxifen und HMR 3339) herangezogen werden (Vogelvang et al., 2006). Möglicherweise können dann Aussagen über ein zu erwartendes Risiko venöser Thromboembolien oder aber eine potentielle Kardioprotektion dieser Verbindungen getroffen werden.

## 5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten und kostspieligsten Krankheiten in den westlichen Industrienationen und gelten in diesen Ländern als Haupttodesursache. Die Tatsache, dass sich koronare Herzerkrankungen (KHK) bei Frauen erst durchschnittlich zehn Jahre später manifestieren als bei Männern, und die Beobachtung, dass das Risiko koronarer Herzerkrankungen bei postmenopausalen Frauen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen deutlich ansteigt, weist darauf hin, dass Estrogene möglicherweise kardioprotektiv sein könnten. Über einen Zeitraum von etwa 20 Jahren galt die Hormonersatztherapie (HRT) als protektiv gegen koronare Herzerkrankungen. Zunächst konnte in Tierversuchs- und in Beobachtungsstudien ein kardiovaskulärer Nutzen der HRT nach der Menopause nachgewiesen werden. In jüngster Zeit ist allerdings die HRT durch die Ergebnisse randomisierter, placebokontrollierter klinischer Studien in Frage gestellt worden. Ein kardioprotektiver Effekt ließ sich nicht bestätigen. Als Folge dieser Studien ist das Interesse an den kardiovaskulären Effekten selektiver Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) als Alternative zur HRT erheblich gestiegen. SERMs, wie z.B. Raloxifen, sind Substanzen, die gewebespezifisch estrogene oder antiestrogene Wirkung zeigen. Die *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethyldiamine, die neben Raloxifen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten, sind aus struktureller Sicht dem SERM Tamoxifen, aber auch verschiedenen Estrogenen sehr ähnlich und könnten selbst SERM-Charakteristika aufweisen. Da zu den therapeutischen Zielen eines optimalen SERMs neben der Linderung klimakterischer Beschwerden und der Vermeidung von Osteoporose-bedingten Knochenbrüchen auch ein möglichst protektiver Einfluss auf das kardiovaskuläre System gehört, sollten die vasorelaxierenden Eigenschaften als nicht-genomischer Effekt dieser Substanzklasse am Modell der Schweinekoronararterie untersucht und mit den Effekten von E2 verglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vasorelaxierenden Eigenschaften insbesondere von Raloxifen und *d,l-N,N'*-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethyldiamin (Verbindung **8**) charakterisiert. Beide Verbindungen führen an KCl- oder PGF<sub>2α</sub>-vorkontrahierten Gefäßen zu einer nicht-reversiblen, Endothel-unabhängigen, konzentrationsabhängigen Vasodilatation, die nicht durch den Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 gehemmt werden kann. Sie sind wie auch E2 in der Lage, eine CaCl<sub>2</sub>-induzierte Kontraktion nicht-kompetitiv zu inhibieren. Darüber hinaus hemmen E2, Raloxifen und Verbindung **8** die Wirkung des L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal-

---

Aktivators (S)-(-)-Bay K 8644. Damit kann die Vasorelaxation durch diese Verbindungen im Wesentlichen auf eine Hemmung von L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen zurückgeführt werden.

Trotz zahlreicher Gemeinsamkeiten weisen Raloxifen und Verbindung **8** einen erheblichen Unterschied in Bezug auf die Beteiligung der Mitogen-aktivierten Protein-kinase (MAPK) p38 auf. Die Hemmung der MAPK p38 beeinflusst lediglich die Raloxifen-induzierte Relaxation, nicht aber die Relaxation durch Verbindung **8**. Analog dazu zeigt nur Raloxifen, nicht aber Verbindung **8** eine Phosphorylierung der MAPK p38.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es nicht möglich, die Wirkmechanismen der SERMs zu vereinheitlichen. Vielmehr müssen die unterschiedlichen Wirkqualitäten bestimmt und deren Bedeutung für die Kardioprotektion definiert werden, um Aussagen über ein zu erwartendes Risiko venöser Thromboembolien oder aber eine potentielle Kardioprotektion dieser Verbindungen treffen zu können.

## 6 Summary

Coronary heart diseases are the most common and expensive disorders and are considered as the leading cause of death in women in western industrialized countries. The fact that coronary heart disease on average manifests a decade later in women compared to men and the observation that the incidence of coronary heart disease events in postmenopausal women increases dramatically compared to premenopausal women suggests that hormones might be cardioprotective. For two decades, hormone replacement therapy (HRT) was thought to possess a protective effect against coronary heart disease. Initially, animal and observational studies have shown beneficial cardiovascular effects of HRT after the menopause. The potential cardiovascular benefits of hormone replacement therapy, however, have recently been questioned on the basis of findings from randomized, placebo-controlled clinical studies, since a benefit could not be shown. Consequently, the outcomes of these studies have aroused increasing interest in cardiovascular effects of selective estrogen receptor modulators (SERMs) as an alternative to HRT. SERMs such as raloxifene represent a class of non-hormonal agents that show tissue-specific estrogen agonist or antagonist effects. *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-ethylenediamines which should be characterised within this thesis represent a class of compounds that are structurally similar to the SERM tamoxifen and several estrogens and may exhibit SERM-characteristics themselves.

Successful treatment with an ideal SERM includes the alleviation of climacteric ailments in addition to prevention of osteoporosis-induced fractures and a preferable protective effect on the cardiovascular system as well. Therefore, the non-genomic vasorelaxant responses to these compounds should be characterised and compared with the effects of E<sub>2</sub> using the isolated porcine coronary artery as in vitro assay. The present study characterises the vasorelaxant responses particularly with regard to raloxifene and *d,l-N,N'*-dipropyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine (compound **8**). Tissues precontracted either with KCl or PGF<sub>2α</sub> are concentration-dependently relaxed by both compounds. Raloxifene and compound **8** induce endothelium-independent relaxation, which is not inhibited by the estrogen receptor antagonist ICI 182,780 and cannot be reversed by repeated washings. Calcium concentration dependent contractions are insurmountably inhibited by both compounds as well as by E<sub>2</sub>. In addition, E<sub>2</sub>, raloxifene, and compound **8** block the effect of the

---

L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activator (S)-(-)-Bay K 8644. Hence, it is concluded that the vasorelaxant effects to both compounds can primarily be attributed to an inhibitory effect on voltage-gated and receptor operated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

In spite of numerous similarities, raloxifene and compound **8** exhibit a considerable difference regarding the involvement of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38. The inhibition of the MAPK p38 affects solely the vasorelaxant response to raloxifene but not the relaxant response to compound **8**. In line with this observation, raloxifene induces the phosphorylation of MAPK p38 in contrast to compound **8**. The present findings show that it is not possible to unify the mode of action of SERMs. Accordingly, the different modes of action have to be established. It is of utmost importance to define the relevance of the mechanisms of action of SERMs to cardioprotection in order to predict the risk of venous thromboembolism or even a potential protective effect.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abou-Mohamed G, Elmarakby A, Carrier GO, Catravas JD, Caldwell RW, White RE (2003) Estradiol relaxes rat aorta via endothelium-dependent and -independent mechanisms *Pharmacology* 69(1):20-26
- Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M (2004) S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions *Biochem Biophys Res Commun* 316(3):878-883
- Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, Clarkson TB (1990) Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone *Arteriosclerosis* 10(6):1051-1057
- Ajay M, Achike FI, Mustafa MR (2007) Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid *Pharmacol Res* 55(5):385-391
- Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Ando S, Maggiolini M (2007) G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells *Cancer Res* 67(4):1859-1866
- Ameller T, Legrand P, Marsaud V, Renoir JM (2004) Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: the need for selective targeting in estradiol-dependent cancers *J Steroid Biochem Mol Biol* 92(1-2):1-18
- Armen TA, Gay CV (2000) Simultaneous detection and functional response of testosterone and estradiol receptors in osteoblast plasma membranes *J Cell Biochem* 79(4):620-627
- Austin CE (2000) Chronic and acute effects of oestrogens on vascular contractility *J Hypertens* 18(10):1365-1378
- Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R (2004) Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells *FEBS Lett* 567(2-3):243-247
- Bar J, Tepper R, Fuchs J, Pardo Y, Goldberger S, Ovadia J (1993) The effect of estrogen replacement therapy on platelet aggregation and adenosine triphosphate release in postmenopausal women *Obstet Gynecol* 81(2):261-264

- 
- Barrett-Connor E, Grady D, Sashegyi A, Anderson PW, Cox DA, Hozowski K, Rautaharju P, Harper KD; MORE Investigators (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) (2002) Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: four-year results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) randomized trial *JAMA* 287(7):847-857
- Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK; Raloxifene Use for The Heart (RUTH) Trial Investigators (2006) Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women *N Engl J Med* 355(2):125-137
- Becker B, Morel N, Vanbellinthen AM, Lebrun P (2004) Blockade of calcium entry in smooth muscle cells by the antidepressant imipramine *Biochem Pharmacol* 68(5):833-842
- Beldekas JC, Smith B, Gerstenfeld LC, Sonenshein GE, Franzblau C (1981) Effects of 17beta-estradiol on the biosynthesis of collagen in cultured bovine aortic smooth muscle cells *Biochemistry* 20(8):2162-2167
- Benten WP, Stephan C, Lieberherr M, Wunderlich F (2001) Estradiol signaling via sequestrable surface receptors *Endocrinology* 142(4):1669-1677
- Beral V, Million Women Study Collaborators (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study *Lancet* 362(9382):419-427
- Berger F, Borchard U, Hafner D, Pütz I, Weis TM (1997) Effects of 17beta-estradiol on action potentials and ionic currents in male rat ventricular myocytes *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356(6):788-796
- Berry M, Metzger D, Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen *EMBO J* 9(9):2811-2818
- Bian Z, Nilsson S, Gustafsson JA (2001) Selective estrogen receptor modulators and coronary heart disease *Trends Cardiovasc Med* 11(5):196-202

- Bjarnason NH, Haarbo J, Byrjalsen I, Alexandersen P, Kauffman RF, Christiansen C (2001) Raloxifene and estrogen reduces progression of advanced atherosclerosis--a study in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits *Atherosclerosis* 154(1):97-102
- Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR, Frolik CA, Termine JD, Bryant HU (1994) Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats *J Clin Invest* 93(1):63-69
- Blaylock NA, Wilson VG (1995) Pharmacological characterization of noradrenaline-induced contractions of the porcine isolated palmar lateral vein and palmar common digital artery *Br J Pharmacol* 114(3):694-702
- Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER (2006) Virtual and bio-molecular screening converge on a selective agonist for GPR30 *Nat Chem Biol* 2(4):207-212
- Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2004) Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones *Essays Biochem* 40:105-120
- Bosnjak JJ, Terata K, Miura H, Sato A, Nicolosi AC, McDonald M, Manthei SA, Saito T, Hatoum OA, Gutterman DD (2003) Mechanism of thrombin-induced vasodilation in human coronary arterioles *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(4):H1080-1086
- Bracamonte MP, Rud KS, Miller VM (2002) Mechanism of raloxifene-induced relaxation in femoral veins depends on ovarian hormonal status *J Cardiovasc Pharmacol* 39(5):704-713
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* 72:248-254
- Brezinka V, Kittel F (1996) Psychosocial factors of coronary heart disease in women: a review *Soc Sci Med* 42(10):1351-1365
- Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, Pinto A, Cirino G (2002) 17-beta-oestradiol-induced vasorelaxation in vitro is mediated by eNOS through hsp90 and akt/pkb dependent mechanism *Br J Pharmacol* 135(7):1695-1700

- 
- Campbell CH, Bulayeva N, Brown DB, Gametchu B, Watson CS (2002) Regulation of the membrane estrogen receptor-alpha: role of cell density, serum, cell passage number, and estradiol *FASEB J* 16(14):1917-1927
- Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ (1997) Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer *Genomics* 45(3):607-617
- Cattaneo M, Baglietto L, Zighetti ML, Bettega D, Robertson C, Costa A, Mannucci PM, Descenzi A (1998) Tamoxifen reduces plasma homocysteine levels in healthy women *Br J Cancer* 77(12):2264-2266
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels *Pharmacol Rev* 57(4):411-425
- Chambliss KL, Shaul PW (2002) Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase *Endocr Rev* 23(5):665-686
- Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW (2002) ERbeta has nongenomic action in caveolae *Mol Endocrinol* 16(5):938-946
- Chan YC, Leung FP, Yao X, Lau CW, Vanhoutte PM, Huang Y (2005) Raloxifene relaxes rat pulmonary arteries and veins: roles of gender, endothelium, and antagonism of Ca<sup>2+</sup> influx *J Pharmacol Exp Ther* 312(3):1266-1271
- Chan W, Yao X, Ko W, Huang Y (2000) Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta *Cardiovasc Res* 46(1):180-187
- Chen DB, Bird IM, Zheng J, Magness RR (2004a) Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells *Endocrinology* 145(1):113-125
- Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD (2004b) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(6):E1011-1022

- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW (1999) Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen *J Clin Invest* 103(3):401-406
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2 *Science* 296(5567):539-541
- Chester AH, Jiang C, Borland JA, Yacoub MH, Collins P (1995) Oestrogen relaxes human epicardial coronary arteries through non-endothelium-dependent mechanisms *Coron Artery Dis* 6(5):417-422
- Christodoulakos GE, Lambrinoudaki IV, Botsis DC (2006) The cardiovascular effects of selective estrogen receptor modulators *Ann N Y Acad Sci* 1092:374-384
- Colacurci N, Manzella D, Fornaro F, Carbonella M, Paolisso G (2003) Endothelial function and menopause: effects of raloxifene administration *J Clin Endocrinol Metab* 88(5):2135-2140
- Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20(3):358-417
- Crews JK, Khalil RA (1999) Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of coronary vasoconstriction *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(4):1034-1040
- Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A, Jordan VC (1999) The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation *JAMA* 281(23):2189-2197
- Das S, Tosaki A, Bagchi D, Maulik N, Das DK (2006) Potentiation of a survival signal in the ischemic heart by resveratrol through p38 mitogen-activated protein kinase/mitogenand stress-activated protein kinase 1/cAMP response element-binding protein signaling *J Pharmacol Exp Ther* 317(3):980-988

- 
- Dayspring T, Qu Y, Keech C (2006) Effects of raloxifene on lipid and lipoprotein levels in postmenopausal osteoporotic women with and without hypertriglyceridemia *Metabolism* 55(7):972-979
- de Valk-de Roo GW, Stehouwer CD, Meijer P, Mijatovic V, Kluit C, Kenemans P, Cohen F, Watts S, Netelenbos C (1999) Both raloxifene and estrogen reduce major cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women: A 2-year, placebo-controlled study *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(12):2993-3000
- Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C (1997) Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women *N Engl J Med* 337(23):1641-1647
- Deroo BJ, Korach KS (2006) Estrogen receptors and human disease *J Clin Invest* 116(3):561-570
- Diaz M (2002) Triphenylethylene antiestrogen-induced acute relaxation of mouse duodenal muscle. Possible involvement of Ca<sup>2+</sup> channels *Eur J Pharmacol* 445(3):257-266
- Diaz M, Ramirez CM, Marin R, Marrero-Alonso J, Gomez T, Alonso R (2004) Acute relaxation of mouse duodenum by estrogens. Evidence for an estrogen receptor-independent modulation of muscle excitability *Eur J Pharmacol* 501(1-3):161-178
- Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosselli M, Jackson EK, Keller PJ (1999) Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells *Hypertension* 33(1 Pt 2):177-182
- Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Rosselli M, Keller PJ, Jackson EK (2000) Estradiol inhibits smooth muscle cell growth in part by activating the cAMP-adenosine pathway *Hypertension* 35(1 Pt 2):262-266
- Egan KM, Lawson JA, Fries S, Koller B, Rader DJ, Smyth EM, Fitzgerald GA (2004) COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice *Science* 306(5703):1954-1957

- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily *Science* 240(4854):-889-895
- Evinger AJ, Levin ER (2005) Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function *Steroids* 70(5-7):361-363
- Feng W, Webb P, Nguyen P, Liu X, Li J, Karin M, Kushner PJ (2001) Potentiation of estrogen receptor activation function 1 (AF-1) by Src/JNK through a serine 118-independent pathway *Mol Endocrinol* 15(1):32-45
- Fields TA, Casey PJ (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins *Biochem J* 321(Pt 3):561-571
- Figtree GA, Lu Y, Webb CM, Collins P (1999) Raloxifene acutely relaxes rabbit coronary arteries in vitro by an estrogen receptor-dependent and nitric oxide-dependent mechanism *Circulation* 100(10):1095-1101
- Figtree GA, Webb CM, Collins P (2000) Tamoxifen acutely relaxes coronary arteries by an endothelium-, nitric oxide-, and estrogen receptor-dependent mechanism *J Pharmacol Exp Ther* 295(2):519-523
- Filardo EJ (2002) Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer *J Steroid Biochem Mol Biol* 80(2):231-238
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF *Mol Endocrinol* 14(10):1649-1660
- Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI (2002) Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis *Mol Endocrinol* 16(1):70-84
- Filardo EJ, Thomas P (2005) GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release *Trends Endocrinol Metab* 16(8):362-367

- 
- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N (1998) Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study *J Natl Cancer Inst* 90(18):1371-1388
- Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Rubanyi GM (1997) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca<sup>2+</sup> uptake *Circ Res* 81(2):242-248
- Freedman LP (1992) Anatomy of the steroid receptor zinc finger region *Endocr Rev* 13(2):129-145
- Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF (2002) Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(10):1585-1590
- Gerhard M, Ganz P (1995) How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench *Circulation* 92, 5-8
- Godsland IF (2001) Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974-2000 *Fertil Steril* 75(5):898-915
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA *Science* 231(4742):1150-1154
- Greger JG, Fursov N, Cooch N, McLarney S, Freedman LP, Edwards DP, Cheskis BJ (2007) Phosphorylation of MNAR promotes estrogen activation of phosphatidylinositol 3-kinase *Mol Cell Biol* 27(5):1904-1913
- Griffin KL, Woodman CR, Price EM, Laughlin MH, Parker JL (2001) Endothelium-mediated relaxation of porcine collateral-dependent arterioles is improved by exercise training *Circulation* 104(12):1393-1398
- Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1996) Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease *N Engl J Med* 335(7):453-461

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002) Production and actions of estrogens *N Engl J Med* 346(5):340-352

Gudermann T (2005) Sexualhormone, in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Aktorics K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K eds.) pp. 683-713, Urban & Fischer Verlag, München, Deutschland

Gust R, Niebler K, Schonenberger H (1995) Investigation of the configurational and conformational influences on the hormonal activity of 1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamines and of their platinum(II) complexes. 1. Synthesis, estradiol receptor affinity, and estrogenic activity of diastereomeric [*N*-alkyl- and *N,N'*-dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes *J Med Chem* 38(12):2070-2079

Gustafsson JA (1999) Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action *J Endocrinol* 163(3):379-383

Gutendorf B, Westendorf J (2001) Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens *Toxicology* 166(1-2):79-89

Haarbo J, Marslew U, Gotfredsen A, Christiansen C (1991) Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause *Metabolism* 40, 1323-1326

Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, Heigl A, Lachat M, Genoni M, Barton M (2007) Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis *Hypertension* 49(6):1358-1363.

Hall JM, McDonnell DP (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens *Endocrinology* 140(12):5566-5578

- 
- Han G, Ma H, Chintala R, Miyake K, Fulton DJ, Barman SA, White RE (2007) Non-genomic, endothelium-independent effects of estrogen on human coronary smooth muscle mediated by Type I (neuronal) NOS and PI3 kinase/Akt signalling *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1):H314-321
- Han G, Yu X, Lu L, Li S, Ma H, Zhu S, Cui X, White RE (2006) Estrogen receptor alpha mediates acute potassium channel stimulation in human coronary artery smooth muscle cells *J Pharmacol Exp Ther* 316(3):1025-1030
- Han SZ, Karaki H, Ouchi Y, Akishita M, Orimo H (1995) 17 beta-Estradiol inhibits Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> release induced by thromboxane A<sub>2</sub> in porcine coronary artery *Circulation* 91(10):2619-2626
- Hasbi A, O'Dowd BF, George SR (2005) A G protein-coupled receptor for estrogen: the end of the search? *Mol Interv* 5(3):158-161
- Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa WC, Bender JR (2003) Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen *J Biol Chem* 278(4):2118-2123
- He GW, Yang CQ (1999) Comparison of the vasorelaxant effect of nitroprusside and nitroglycerin in the human radial artery in vitro *Br J Clin Pharmacol* 48(1):99-104
- Hewitt SC, Deroo BJ, Korach KS (2005) Signal transduction. A new mediator for an old hormone? *Science* 307(5715):1572-1573
- Himori N (1977) Effects of hexoestrol on the contractility of the isolated, blood-perfused canine papillary muscle and of the guinea-pig ileum *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 297(2):171-175
- Hirst GD, Edwards FR (1989) Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles *Physiol Rev* 69(2):546-604
- Hisamoto K, Bender JR (2005) Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors *Steroids* 70(5-7):382-387

- Huang Y (1998) Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K<sup>+</sup> channel blockers in rat aortic rings *Eur J Pharmacol* 349(1):53-60
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. For the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group *JAMA* 280(7):605-613
- Hussain T, Mustafa SJ (1993) An in vitro pharmacological model of vascular smooth muscle *J Pharmacol Toxicol Methods* 30(2):111-115
- Hutchison SJ, Chou TM, Chatterjee K, Sudhir K (2001) Tamoxifen is an acute, estrogen-like, coronary vasodilator of porcine coronary arteries in vitro *J Cardiovasc Pharmacol* 38(5):657-665
- Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR Jr, Lubahn DB, O'Donnell TF Jr, Korach KS, Mendelsohn ME (1997) Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice *Nat Med* 3(5):545-548
- Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS (1996) Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol *Endocrinology* (1996) 137(5):1735-1744
- Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P (1991) Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro *Br J Pharmacol* 104(4):1033-1037
- Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA (1998) pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167 *Mol Cell Biol* 18(4):1978-1984
- Johnson JD, Fugman DA (1983) Calcium and calmodulin antagonists binding to calmodulin and relaxation of coronary segments *J Pharmacol Exp Ther* 226(2):330-334
- Jordan VC, Gapstur S, Morrow M (2001) Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease *J Natl Cancer Inst* 93(19):1449-1457

- 
- Joy S, Siow RC, Rowlands DJ, Becker M, Wyatt AW, Aaronson PI, Coen CW, Kalló I, Jacob R, Mann GE (2006) The isoflavone Equol mediates rapid vascular relaxation: Ca<sup>2+</sup>-independent activation of endothelial nitric-oxide synthase/Hsp90 involving ERK1/2 and Akt phosphorylation in human endothelial cells *J Biol Chem* 281(37):27335-27345
- Jun SS, Chen Z, Pace MC, Shaul PW (1998) Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium *J Clin Invest* 102(1):176-183
- Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C (2000) Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway *J Biol Chem* 275(24):18447-18453
- Kanda N, Watanabe S (2004) 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression *J Invest Dermatol* 123(2):319-328
- Karas RH, Clarkson TB (2003) Considerations in interpreting the cardiovascular effects of hormone replacement therapy observed in the WHI: timing is everything *Menopausal Medicine* 10(4):8–12
- Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME (1994) Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor *Circulation* 89(5):1943-1950
- Karl J, Gust R, Spruss T, Schneider MR, Schonenberger H, Engel J, Wrobel KH, Lux F, Haeberlin ST (1988) Ring-substituted [1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum (II) complexes: compounds with a selective effect on the hormone-dependent mammary carcinoma *J Med Chem* 31(1):72-83
- Katz AM (1996) Calcium channel diversity in the cardiovascular system *J Am Coll Cardiol* 28(2):522-529
- Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA (2000) Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5):279-285
- Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer *Breast Cancer Res* 2(5):335-344

- Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME, McInerney EM (1997) William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer *Breast Cancer Res Treat* 44(1):23-38
- Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS (1996) Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones *Mol Endocrinol* 10(2):119-131
- Kauffman RF, Bensch WR, Roudebush RE, Cole HW, Bean JS, Phillips DL, Monroe A, Cullinan GJ, Glasebrook AL, Bryant HU (1997) Hypocholesterolemic activity of raloxifene (LY139481): pharmacological characterization as a selective estrogen receptor modulator *J Pharmacol Exp Ther* 280(1):146-153
- Kelly MJ, Qiu J, Ronnekleiv OK (2003) Estrogen modulation of G-protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system *Ann N Y Acad Sci* 1007:6-16
- Keung W, Vanhoutte PM, Man RY (2005) Acute impairment of contractile responses by 17beta-estradiol is cAMP and protein kinase G dependent in vascular smooth muscle cells of the porcine coronary arteries *Br J Pharmacol* 144(1):71-79
- Khalil RA (2005) Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension *Hypertension* 46(2):249-254
- Kim-Schulze S, McGowan KA, Hubchak SC, Cid MC, Martin MB, Kleinman HK, Greene GL, Schnaper HW (1996) Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells *Circulation* 94(6):1402-1407
- Kisanga ER, Gjerde J, Guerrieri-Gonzaga A, Pigatto F, Pesci-Feltri A, Robertson C, Serrano D, Pelosi G, Decensi A, Lien EA (2004) Tamoxifen and metabolite concentrations in serum and breast cancer tissue during three dose regimens in a randomized preoperative trial *Clin Cancer Res* 10(7):2336-2343
- Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi AK (1997) Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle *J Physiol* 499(Pt 2):497-511

- 
- Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H, Forstermann U (1998) Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved *Hypertension* 31(2):582-588
- Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S (2004) Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice *J Clin Invest* 114(6):784-794
- Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12):5925-5930
- Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1997) Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A *Mol Pharmacol* 51(4):605-612
- Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS (1994) Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity *J Biol Chem* 269(6):4458-4466
- Leclercq G, Lacroix M, Laios I, Laurent G (2006) Estrogen receptor alpha: impact of ligands on intracellular shuttling and turnover rate in breast cancer cells *Curr Cancer Drug Targets* 6(1):39-64
- Lee H, Jiang F, Wang Q, Nicosia SV, Yang J, Su B, Bai W (2000) MEKK1 activation of human estrogen receptor alpha and stimulation of the agonistic activity of 4-hydroxytamoxifen in endometrial and ovarian cancer cells *Mol Endocrinol* 14(11):1882-1896
- Leung FP, Yao X, Lau CW, Ko WH, Lu L, Huang Y (2005) Raloxifene relaxes rat intrarenal arteries by inhibiting Ca<sup>2+</sup> influx *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1):F137-144
- Leung HS, Seto SW, Kwan YW, Leung FP, Au AL, Yung LM, Yao X, Huang Y (2007) Endothelium-independent relaxation to raloxifene in porcine coronary artery *Eur J Pharmacol* 555(2-3):178-184

- Leung HS, Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Ko WH, Laher I, Huang Y (2006) Tamoxifen dilates porcine coronary arteries: roles for nitric oxide and ouabain-sensitive mechanisms *Br J Pharmacol* 149(6):703-711
- Li HF, Tian ZF, Qiu XQ, Wu JX, Zhang P, Jia ZJ (2006) A study of mechanisms involved in vasodilatation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery *Physiol Res* 55(4):365-372
- Li L, Haynes MP, Bender JR (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8):4807-4812
- Liew R, Stagg MA, MacLeod KT, Collins P (2004) Raloxifene acutely suppresses ventricular myocyte contractility through inhibition of the L-type calcium current *Br J Pharmacol* 142(1):89-96
- Lincoln TM, Fisher-Simpson V (1984) A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic nucleotides and relaxation in the rat aorta *Eur J Pharmacol* 101(1-2):17-27
- Lonard DM, Smith CL (2002) Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions *Steroids* 67(1):15-24
- Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM (1994) Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women *Circulation* 89(4):1501-1510
- Love RR, Wiebe DA, Feyzi JM, Newcomb PA, Chappell RJ (1994) Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment *J Natl Cancer Inst* 86(20):1534-1539
- Lovren F, Triggle C (2000) Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery *Br J Pharmacol* 131(3):521-529
- Lund CO, Nilas L, Pedersen SH, Dalsgaard T, Ottesen B (2004) Tibolone and its metabolites acutely relax rabbit coronary arteries in vitro *Maturitas* 49(3):179-188

- 
- Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S (2004) The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells *J Biol Chem* 279(26):27008-27016
- Malek D (2006) Interaction of estrogen receptors and the TGF- $\beta$  signal transduction pathway – impact on migration of human breast cancer cells *Dissertation*, Freie Universität, Berlin
- Marquez DC, Pietras RJ (2001) Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells *Oncogene* 20(39):5420-5430
- Martin MB, Franke TF, Stoica GE, Chambon P, Katzenellenbogen BS, Stoica BA, McLemore MS, Olivo SE, Stoica A (2000) A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I *Endocrinology* 141(12):4503-4511
- Martinez C, Sanchez M, Hidalgo A, de Boto MJ (2003) Mechanisms of diethylstilbestrol-induced relaxation in rat aorta smooth muscle *Vascul Pharmacol* 40(4):197-204
- McDonnell DP, Norris JD (2002) Connections and regulation of the human estrogen receptor *Science* 296(5573):1642-1644
- Mendelsohn ME, Karas RH (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system *N Engl J Med* 340(23):1801-1811
- Mendelsohn ME, Karas RH (2005) Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences *Science* 308(5728):1583-1587
- Mercuro G, Zoncu S, Piano D, Pilia I, Lao A, Melis GB, Cherchi A (1998) Estradiol-17 $\beta$  reduces blood pressure and restores the normal amplitude of the circadian blood pressure rhythm in postmenopausal hypertension *Am J Hypertens* 11(8 Pt 1), 909-913
- Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ (1996) Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor *J Neurosci* 16(2):595-604
- Meyer MR, Haas E, Barton M (2006) Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling *Hypertension* 47(6):1019-1026

- Michel T (1999) Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase *Braz J Med Biol Res* 32(11):1361-1366
- Mobasser S, Liebson PR, Klein LW (2004) Hormone therapy and selective estrogen receptor modulators for prevention of coronary heart disease in postmenopausal women estrogen replacement from the cardiologist's perspective *Cardiol Rev* 12(6):287-298
- Moncada S, Higgs EA (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology *Br J Pharmacol* 147(1):S193-201
- Morales A, Diaz M, Ropero AB, Nadal A, Alonso R (2003) Estradiol modulates acetylcholine-induced  $Ca^{2+}$  signals in LHRH-releasing GT1-7 cells through a membrane binding site *Eur J Neurosci* 18(9):2505-2514
- Moritz A, Gust R, Pertz HH (2007) Characterization of the relaxant response to N,N'-dipropyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine in porcine coronary arteries *J Pharmacol Exp Ther* 321(2):699-706
- Moritz A, Radtke OA, Gust R, Glusa E, Pertz HH (2006) Characterisation of the relaxant response to raloxifene in porcine coronary arteries *Eur J Pharmacol* 545(2-3):153-160
- Mosca L, Barrett-Connor E, Wenger NK, Collins P, Grady D, Kornitzer M, Moscarelli E, Paul S, Wright TJ, Helterbrand JD, Anderson PW (2001a) Design and methods of the Raloxifene Use for The Heart (RUTH) study *Am J Cardiol* 88(4):392-395
- Mosca L, Collins P, Herrington DM, Mendelsohn ME, Pasternak RC, Robertson RM, Schenck-Gustafsson K, Smith SC Jr, Taubert KA, Wenger NK; American Heart Association (2001b) Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association *Circulation* 104(4):499-503
- Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL (2006) The role of  $K^+$  channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension *Microcirculation* 13(8):615-632

- 
- Mügge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR (1993) Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro *Cardiovasc Res* 27(11):1939-1942
- Mukhopadhyay S, Chapnick BM, Howlett AC (2002) Anandamide-induced vasorelaxation in rabbit aortic rings has two components: G protein dependent and independent *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(6):H2046-2054.
- Murphy JG, Khalil RA (1999) Decreased  $[Ca^{2+}]_i$  during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17beta-estradiol, progesterone, and testosterone *J Pharmacol Exp Ther* 291(1):44-52
- Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B (2000) Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21):11603-1168
- Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y (1995) 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type  $Ca^{2+}$  currents in aortic smooth muscle cells *Eur J Pharmacol* 294(2-3):625-635
- Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle *Am J Physiol* 268(4 Pt 1):C799-C822
- Nethrapalli IS, Tinnikov AA, Krishnan V, Lei CD, Toran-Allerand CD (2005) Estrogen activates mitogen-activated protein kinase in native, nontransfected CHO-K1, COS-7, and RAT2 fibroblast cell lines *Endocrinology* 146(1):56-63
- Neven P, Quail D, Marin F, Creatsas G, Depypere H, Rechberger T, Liu-Leage S, Pavo I, Schmitt H, Nickelsen T (2005) Comparing raloxifene with continuous combined estrogen-progestin therapy in postmenopausal women: Review of Euralox 1 *Maturitas* 52(2):87-101
- Nikol S, Armeanu S, Engelmann MG, Pelisek J, Fuchs A, Zähringer C, Bartoli JM, Mesana T, Rolland PH (2001) Evaluation of endovascular techniques for creating a porcine femoral artery occlusion model *J Endovasc Ther* 8(4):401-407

- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action *Physiol Rev* 81(4):1535-1565
- Norfleet AM, Thomas ML, Gametchu B, Watson CS (1999) Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry *Endocrinology* 140(8):3805-3814
- Novakovic A, Gojkovic-Bukarica L, Peric M, Nezic D, Djukanovic B, Markovic-Lipkovski J, Heinle H (2006) The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery *J Pharmacol Sci* 101(1):85-90
- Ogita H, Node K, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Takashima S, Minamino T, Hori M, Kitakaze M (2004) Raloxifene improves coronary perfusion, cardiac contractility, and myocardial metabolism in the ischemic heart: role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway *J Cardiovasc Pharmacol* 43(6):821-829
- Oliveira CA, Nie R, Carnes K, Franca LR, Prins GS, Saunders PT, Hess RA (2003) The anti-estrogen ICI 182,780 decreases the expression of estrogen receptor-alpha but has no effect on estrogen receptor-beta and androgen receptor in rat efferent ductules *Reprod Biol Endocrinol* 1:75
- Orshal JM, Khalil RA (2004) Gender, sex hormones, and vascular tone *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(2):R233-249
- O'Sullivan AJ, Ho KK (1995) A comparison of the effects of oral and transdermal estrogen replacement on insulin sensitivity in postmenopausal women *J Clin Endocrinol Metab* 80, 1783-1788
- Ouyang P, Michos ED, Karas RH (2006) Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions *J Am Coll Cardiol* 47(9):1741-1753
- Pappas TC, Gametchu B, Watson CS (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding *FASEB J* 9(5):404-410

- 
- Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME (2002) Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury *Circ Res* 90(10):1087-1092
- Park S, Kim B, Kim J, Won KJ, Lee S, Kwon S, Cho S (2003) Tamoxifen induces vasorelaxation via inhibition of mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle *J Vet Med Sci* 65(11):1155-1160
- Pearce ST, Jordan VC (2004) The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer *Crit Rev Oncol Hematol* 50(1):3-22
- Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006) Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane *Mol Endocrinol* 20(9):1996-2009
- Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER (2006) Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells *Mol Biol Cell* 17(5):2125-2137
- Pietras RJ, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells *Nature* 265(5589):69-72
- Pound WJ, Houpt KA (1978) The pig as a model in biomedical research. In: *The Biology of the Pig* (Pond WG ed.) Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 13-64
- Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JP (1999) Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system *Cardiovasc Res* 43(4):985-991
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA (2007) GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen *Mol Cell Endocrinol* 265-266:138-142
- Purohit A, Newman SP, Reed MJ (2002) The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer *Breast Cancer Res* 4(2):65-69
- Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (2003) Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C *J Neurosci* 23(29):9529-9540

- Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamaci S, Akar F (2005) Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery *Int J Cardiol* 105(2):209-215
- Rao BR (1998) Isolation and characterization of an estrogen binding protein which may integrate the plethora of estrogenic actions in non-reproductive organs *J Steroid Biochem Mol Biol* 65(1-6):3-41
- Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA (2007) The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States *N Engl J Med* 356(16):1670-1674
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells *Mol Endocrinol* 13(2):307-319
- Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER (2004a) Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers *Mol Endocrinol* 18(12):2854-2865
- Razandi M, Pedram A, Rosen EM, Levin ER (2004b) BRCA1 inhibits membrane estrogen and growth factor receptor signaling to cell proliferation in breast cancer *Mol Cell Biol* 24(13):5900-5913
- Register TC, Adams MR (1998) Coronary artery and cultured aortic smooth muscle cells express mRNA for both the classical estrogen receptor and the newly described estrogen receptor beta *J Steroid Biochem Mol Biol* 64(3-4):187-191
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling *Science* 307(5715):1625-1630
- Rifici VA, Khachadurian AK (1992) The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17-beta estradiol *Metabolism* 41(10):1110-1114
- Riggs BL, Hartmann LC (2003) Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice *N Engl J Med* 348(7):618-629
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease *N Engl J Med* 340(2):115-126

- 
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial *JAMA* 288(3):321-333
- Ruff M, Gangloff M, Wurtz JM, Moras D (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors *Breast Cancer Res* 2(5):353-359
- Russo J, Russo IH (2006) The role of estrogen in the initiation of breast cancer *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1-5):89-96
- Saarto T, Blomqvist C, Ehnholm C, Taskinen MR, Elomaa I (1996) Antiatherogenic effects of adjuvant antiestrogens: a randomized trial comparing the effects of tamoxifen and toremifene on plasma lipid levels in postmenopausal women with node-positive breast cancer *J Clin Oncol* 14(2):429-433
- Saitta A, Altavilla D, Cucinotta D, Morabito N, Frisina N, Corrado F, D'Anna R, Lasco A, Squadrito G, Gaudio A, Cancellieri F, Arcoraci V, Squadrito F (2001) Randomized, double-blind, placebo-controlled study on effects of raloxifene and hormone replacement therapy on plasma no concentrations, endothelin-1 levels, and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(9):1512-1519
- Salas E, Lopez MG, Villarroya M, Sanchez-Garcia P, De Pascual R, Dixon WR, Garcia AG (1994) Endothelium-independent relaxation by 17-alpha-estradiol of pig coronary arteries *Eur J Pharmacol* 258(1-2):47-55
- Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Torregrosa G, Alborch E (2001) Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition *J Cereb Blood Flow Metab* 21(4):422-429
- Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E (2002) Acute relaxant effects of 17-beta-estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery *Steroids* 67(5):339-346

- Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Hatanaka K, Asanuma H, Aki T, Shinozaki Y, Ogita H, Node K, Takashima S, Asakura M, Yamada J, Fukushima T, Ogai A, Kuzuya T, Mori H, Terada N, Yoshida K, Hori M (2001) Role of phasic dynamism of p38 mitogen-activated protein kinase activation in ischemic preconditioning of the canine heart *Circ Res* 88(2):175-180
- Seval Y, Cakmak H, Kayisli UA, Arici A (2006) Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium *J Clin Endocrinol Metab* 91(6):2349-2357
- Shang Y, Brown M (2002) Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs *Science* 295(5564):2465-2468
- Shaw L, Taggart MJ, Austin C (2000) Mechanisms of 17 beta-oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries *Br J Pharmacol* 129(3):555-565
- Sherman TS, Chambliss KL, Gibson LL, Pace MC, Mendelsohn ME, Pfister SL, Shaul PW (2002) Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(5):610-616
- Simoncini T, Genazzani AR, Liao JK (2002) Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene *Circulation* 105(11):1368-1373
- Simpson ER (2003) Sources of estrogen and their importance *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5):225-230
- Singh M, Setalo G Jr, Guan X, Frail DE, Toran-Allerand CD (2000) Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice *J Neurosci* 20(5):1694-1700
- Smith CL (1998) Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways *Biol Reprod* 58(3):627-632
- Song J, Standley PR, Zhang F, Joshi D, Gappy S, Sowers JR, Ram JL (1996) Tamoxifen (estrogen antagonist) inhibits voltage-gated calcium current and contractility in vascular smooth muscle from rats *J Pharmacol Exp Ther* 277(3):1444-1453

- 
- Sreeja S, Thampan RV (2004) Estradiol-mediated internalisation of the non-activated estrogen receptor from the goat uterine plasma membrane: identification of the proteins involved *Mol Cell Biochem* 259(1-2):131-140
- Stampfer MJ, Colditz GA (1991) Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence *Prev Med* 20(1):47-63
- Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association *Circulation* 92(5):1355-1374
- Stefanick ML (2006) Risk-benefit profiles of raloxifene for women *N Engl J Med* 355(2):190-192
- Sukocheva O, Wadham C, Holmes A, Albanese N, Verrier E, Feng F, Bernal A, Derian CK, Ullrich A, Vadas MA, Xia P (2006) Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1 *J Cell Biol* 173(2):301-10
- Sumi D, Hayashi T, Jayachandran M, Iguchi A (2001) Estrogen prevents destabilization of endothelial nitric oxide synthase mRNA induced by tumor necrosis factor alpha through estrogen receptor mediated system *Life Sci* 69(14):1651-1660
- Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T, Akishita M, Nahmias C, Ito M, Horiuchi M (2002) Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II *Hypertension* 39(1):41-45
- Teng B, Qin W, Ansari HR, Mustafa SJ (2005) Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in adenosine receptor-mediated relaxation of coronary artery *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(6):H2574-H2580
- Teoh H, Leung SW, Man RY (1999) Short-term exposure to physiological levels of 17 beta-estradiol enhances endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery *Cardiovasc Res* 42(1):224-231

- Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY (2000) Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries *Br J Pharmacol* 129(7):1301-1308
- Terasaka S, Aita Y, Inoue A, Hayashi S, Nishigaki M, Aoyagi K, Sasaki H, Wada-Kiyama Y, Sakuma Y, Akaba S, Tanaka J, Sone H, Yonemoto J, Tanji M, Kiyama R (2004) Using a customized DNA microarray for expression profiling of the estrogen-responsive genes to evaluate estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals *Environ Health Perspect* 112(7):773-781
- Terrillon S, Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization *EMBO Rep* 5(1):30-34
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells *Endocrinology* 146(2):624-632
- Thompson J, Khalil RA (2003) Gender differences in the regulation of vascular tone *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(1-2):1-15
- Thorne C, Lee AV (2003) Cross talk between estrogen receptor and IGF signaling in normal mammary gland development and breast cancer *Breast Dis* 17:105-114
- Toran-Allerand CD (2004) Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology* 145(3):1069-1074
- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES Jr, Nethrapalli IS, Tinnikov AA (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury *J Neurosci* 22(19):8391-8401
- Tosun M, Paul RJ, Rapoport RM (1998) Role of extracellular Ca<sup>++</sup> influx via L-type and non-L-type Ca<sup>++</sup> channels in thromboxane A<sub>2</sub> receptor-mediated contraction in rat aorta *J Pharmacol Exp Ther* 284(3), 921–928
- Traupe T, Stettler CD, Li H, Haas E, Bhattacharya I, Minotti R, Barton M (2007) Distinct Roles of Estrogen Receptors {alpha} and {beta} Mediating Acute Vasodilation of Epicardial Coronary Arteries *Hypertension* 49(6):1364-1370

- 
- Tsai MJ, O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members *Annu Rev Biochem* 63:451-486
- Tsang SY, Yao X, Chan HY, Chen ZY, Ming WC, Huang Y (2002) Effect of 17beta-estradiol exposure on vasorelaxation induced by K(+) channel openers and Ca(2+) channel blockers *Pharmacology* 65(1):26-31
- Tsang SY, Yao X, Essin K, Wong CM, Chan FL, Gollasch M, Huang Y (2004) Raloxifene relaxes rat cerebral arteries in vitro and inhibits L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels *Stroke* 35(7):1709-1714
- van der Mooren MJ, Mijatovic V, van Baal WM, Stehouwer CD (1998) Hormone replacement therapy in postmenopausal women with specific risk factors for coronary artery disease *Maturitas* 30(1):27-36
- Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE (1996) Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function *Circulation* 94(4):727-733
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M (2006) The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells *Mol Endocrinol* 20(3):631-646
- Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER Jr, Wade JL 3rd, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman SM, Runowicz CD, Ganz PA, Reis SE, McCaskill-Stevens W, Ford LG, Jordan VC, Wolmark N; National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) (2006) Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial *JAMA* 295(23):2727-2741
- Vogelvang TE, van der Mooren MJ, Mijatovic V, Kenemans P (2006) Emerging selective estrogen receptor modulators: special focus on effects on coronary heart disease in postmenopausal women *Drugs* 66(2):191-221

- von Angerer E (1982) Effect of *N,N'*-diethyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamines on the 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced mammary carcinoma of the rat *J Med Chem* 25(11):1374-1377
- Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, Paul S, Farmer M, Lawrence JB, Shah AS, Anderson PW (1998) Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women *JAMA* 279(18):1445-1451
- Walsh BW, Paul S, Wild RA, Dean RA, Tracy RP, Cox DA, Anderson PW (2000) The effects of hormone replacement therapy and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial *J Clin Endocrinol Metab* 85(1):214-218
- Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM (1991) Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins *N Engl J Med* 325(17):1196-1204
- Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R (2002) P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor- $\alpha$  and promotes hyperplasia in mammary epithelium *EMBO J* 21(20):5437-5447
- Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE (1996) Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels *Circ Res* 79(5):1024-1030
- White RE (2002) Estrogen and vascular function *Vascul Pharmacol* 38(2):73-80
- White RE, Darkow DJ, Lang JL (1995) Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism *Circ Res* 77(5):936-942
- White RE, Han G, Dimitropoulou C, Zhu S, Miyake K, Fulton D, Dave S, Barman SA (2005) Estrogen-induced contraction of coronary arteries is mediated by superoxide generated in vascular smooth muscle *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(4):H1468-1475

- 
- White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou C, El-Mowafy AM, Barlow RS, Catravas JD, Snead C, Carrier GO, Zhu S, Yu X (2002) Endothelium-independent effect of estrogen on Ca(2+)-activated K(+) channels in human coronary artery smooth muscle cells *Cardiovasc Res* 53(3):650-661
- Woodman OL, Missen MA, Boujaoude M (2004) Daidzein and 17 beta-estradiol enhance nitric oxide synthase activity associated with an increase in calmodulin and a decrease in caveolin-1 *J Cardiovasc Pharmacol* 44(2):155-163
- Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW (2001) Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i) *J Biol Chem* 276(29):27071-27076
- Xiao D, Huang X, Yang S, Zhang L (2007) Direct Effects of Nicotine on Contractility of the Uterine Artery in Pregnancy *J Pharmacol Exp Ther* 322(1):180-185
- Yada-Hashimoto N, Nishio Y, Ohmichi M, Hayakawa J, Mabuchi S, Hisamoto K, Nakatsuji Y, Sasaki H, Seino-Noda H, Sakata M, Tasaka K, Murata Y (2006) Estrogen and raloxifene inhibit the monocytic chemoattractant protein-1-induced migration of human monocytic cells via nongenomic estrogen receptor alpha *Menopause* 13(6):935-941
- Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT (2000) Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(6):H1899-1907
- Ylikomi T, Vienonen A, Ahola TM (2004) G protein-coupled receptor 30 down-regulates co-factor expression and interferes with the transcriptional activity of glucocorticoid *Eur J Biochem* 271(21):4159-4168
- Zakharov SI, Smani T, Dobrydneva Y, Monje F, Fichandler C, Blackmore PF, Bolotina VM (2004) Diethylstilbestrol is a potent inhibitor of store-operated channels and capacitative Ca(2+) influx *Mol Pharmacol* 66(3):702-707
- Zhang F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR (1994) 17 beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line *Am J Physiol* 266(4 Pt 1):C975-980

Zhang Z, Maier B, Santen RJ, Song RX (2002) Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation *Biochem Biophys Res Commun* 294(5):926-933

Zivadinovic D, Gametchu B, Watson CS (2005) Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses *Breast Cancer Res* 7(1):R101-12

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

---

Moritz A, Gust R, Pertz HH (2007) Characterization of the Relaxant Response to *N,N'*-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine in Porcine Coronary Arteries *J Pharmacol Exp Ther* 321(2):699-706

Moritz A, Radtke OA, Gust R, Glusa E, Pertz HH (2006) Characterisation of the Relaxant Response to Raloxifene in Porcine Coronary Arteries *Eur J Pharmacol* 545(2-3):153-160

### Kongressbeiträge

---

Moritz A, Gust R, Pertz HH (2006) Inhibition of L-Type Calcium Channels in Porcine Coronary Arteries by *N,N'*-Dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-ethylenediamines (5. Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, DPhG, "Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor", Berlin; *Abstract-Book* P21)

Moritz A, Gust R, Pertz HH (2006) Characterization of the Relaxant Response to ( $\pm$ )-*N,N'*-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine in Pig Coronary Arteries (47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, DGPT, Mainz; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm*, 372(Suppl 1):92)

Moritz A, Gust R, Pertz HH (2005) ( $\pm$ )-*N,N'*-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine Relaxes Porcine Coronary Arteries via Blockade of L-Type Calcium Channels (Jahrestagung der DPhG, Mainz; *Abstract-Book* P17:148)

Görnemann T, Jähnichen S, Moritz A, Pertz HH (2005) Characterization of the post-synaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptor in porcine pulmonary veins (Jahrestagung der DPhG, Mainz; *Abstract-Book* P06:147)

Moritz A, Gust R, Glusa E, Pertz HH (2005) Raloxifene Relaxes Porcine Coronary Arteries via Blockade of L-Type Calcium Channels. Involvement of the p38 MAPK Pathway (46. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm*, 371(Suppl 1):R86)

Moritz A, Gust R, Glusa E, Pertz HH (2004) Raloxifene Induces Relaxation in Pig Coronary Arteries via Blockade of L-Type Calcium Channels (Jahrestagung der DPhG, Regensburg; *Abstract-Book* P P18:146)

Moritz A, Gust R, Glusa E, Pertz HH (2004) Raloxifene Induces Vasorelaxation in Porcine Coronary Arteries via Blockade of Calcium Channels (4. Tagung der DPhG, "Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor", Berlin; *Abstract-Book* P16)

## Danksagung

Besonders herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Heinz H. Pertz für die Bereitstellung meines Promotionsthemas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Seine Ratschläge und wissenschaftlichen Erfahrungen, seine freundliche, motivierende Unterstützung und die stete Gesprächsbereitschaft haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen und mir wertvolle Hilfe geleistet.

Auch Herrn Prof. Dr. Ronald Gust danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die stets freundliche, wissenschaftliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt außerdem vielen Kolleginnen und Kollegen des pharmazeutischen Instituts für das angenehme Arbeitsklima, ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft, freundschaftlichen Rat und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Judith Seeber, Dr. Daniela Malek, Dr. Anja Lüth, Dr. Pilar Rivera Gil und Dr. Sylvia Schreiber. Für technische und präparative Unterstützung danke ich Dr. Sven Jähnichen, Tilo Görnemann, Dr. Oliver Radtke und Karsten Zimmermann.

Darüber hinaus danke ich Judith Seeber, Dr. Daniela Malek und Paula Brüinig für die vielen Stunden, in denen sie diese Arbeit Korrektur gelesen und kritisch hinterfragt haben.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Barbara Grimm und allen Assistenten des Chemiepraktikums des 8. Semesters für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer mit größtem Interesse Anteil an meiner Arbeit nahmen und mir mit ihrem Rat und ihrer Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht diesen Weg ermöglicht haben.

Nicht zuletzt danke ich Tobias Volkenborn, der mich mit viel Geduld und Verständnis bei der Erstellung dieser Arbeit liebevoll unterstützt hat.

Viele Personen, die mir bei dieser Arbeit ebenfalls geholfen haben, sind ungenannt geblieben. Auch ihnen sei an dieser Stelle Dank gesagt. Ich freue mich, dass mich eine so erstaunlich große Anzahl von Menschen unterstützt.

Danke!