

Synthese und pharmakologische Untersuchung  
neuer Triaryl-1*H*-pyrrole mit estrogenen, zytotoxischen  
und COX-inhibitorischen Eigenschaften

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

**Ricarda Hoffmann**

aus Berlin

März 2007



Dekan:	Prof. Dr. Hartmut Hilger
1. Gutachter:	Prof. Dr. Ronald Gust
2. Gutachter:	Prof. Dr. Helmut Schönenberger
Datum der Disputation:	24.04.2007



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2002 bis Februar 2007 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Gust angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn **Prof. Dr. R. Gust** für die Überlassung des sehr interessanten Themas sowie für die fachlich kompetente und stets freundliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Promotionszeit,

Herrn **Prof. Dr. H. Schönenberger** an der Universität Regensburg für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit,

Herrn **Prof. Dr. G. Leclercq** am Institut Jules Bordet der Freien Universität Brüssel für die freundliche Aufnahme in sein Labor sowie allen Mitarbeitern seines Arbeitskreises, vor allem **Anny Cleeren, Ioanna Laïos** und **Dominique Gallo**, die mich während meines Aufenthalts in Brüssel tatkräftig unterstützt haben,

meinem ehemaligen Kollegen **Dr. Thomas Wiglenda**, dessen großes Interesse sowie die kritischen und konstruktiven Gespräche stets wertvolle Unterstützung und Motivation waren,

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises insbesondere **Thao Koch, Christian Koppe, Magnus Krüger, Dr. Ingo Ott, Ana Scutaru** und **Maxi Wenzel**, die immer ein offenes Ohr für fachliche Gespräche hatten und mit ihrem Humor und freundschaftlichen Rat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern **Dr. Peter Hoffmann** und **Dr. Hriska Hoffmann** und meiner Schwester **Marion**, 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 meinen Freunden, vor allem **Michael König**, der mich mit viel Geduld und Verständnis bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Brustkrebs und seine Therapie</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Der Estrogenrezeptor</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Liganden des Estrogenrezeptors.....	4
1.2.2 Charakterisierung der Estrogenrezeptorsubtypen.....	5
1.2.3 Aufbau des Estrogenrezeptors .....	6
1.2.4 Transkriptionsaktivierung.....	8
1.2.5 Regulierung des Estrogenrezeptorgehalts .....	12
<b>1.3 Liganden-ER-Komplexe</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 17 $\beta$ -Estradiol in der LBD von ER $\alpha$ .....	14
1.3.2 Diethylstilbestrol .....	15
1.3.3 Selektive Estrogenrezeptormodulatoren .....	17
1.3.4 Tetrasubstituierte Fünfringsysteme .....	18
1.3.5 Reine Antagonisten .....	19
1.3.6 Passive Antagonisten .....	20
<b>1.4 Die Cyclooxygenasen</b> .....	<b>22</b>
1.4.1 Die Rolle der COX in der Tumorgenese.....	22
1.4.2 Funktionen und Isoformen der COX.....	23
1.4.3 Unselektive COX-Hemmer .....	25
1.4.4 Selektive COX-2-Hemmer .....	25
<b>2 Problemstellung</b> .....	<b>29</b>
<b>3 Synthese der Untersuchungsverbindungen</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Darstellung der Strukturklassen</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2 Übersicht über die synthetisierten Verbindungen</b> .....	<b>36</b>
3.2.1 An C-3 nicht alkylierte und alkylierte 2,4,5-Triaryl-1 <i>H</i> -pyrrole .....	36
3.2.2 An C-2 alkylierte 1,3,5-Triaryl-1 <i>H</i> -pyrrole .....	37
<b>3.3 Synthese von 2,4,5-Triaryl-1<i>H</i>-pyrrolen</b> .....	<b>39</b>
3.3.1 Synthese von Desoxybenzoinen .....	39
3.3.2 Synthese von $\alpha$ -Bromketonen .....	42
3.3.3 Synthese von substituierten 1,3,4-Triarylbutan-1,4-dionen .....	44
3.3.4 Synthese von 2,4,5-Triaryl-1 <i>H</i> -pyrrolen.....	45
3.3.5 Etherspaltung von methoxylierten 2,4,5-Triaryl-1 <i>H</i> -pyrrolen .....	47
<b>3.4 Synthese von 1,3,5-Triaryl-1<i>H</i>-pyrrolen</b> .....	<b>49</b>
3.4.1 Synthese des 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyds.....	49
3.4.2 Synthese von 1,3-Diarylpropenonen .....	49
3.4.3 Synthese von 1,3-Diaryl-1,4-dionen .....	50
3.4.4 Synthese von 1,3,5-Triaryl-1 <i>H</i> -pyrrolen.....	52
3.4.5 Etherspaltung von methoxylierten 1,3,5-Triaryl-1 <i>H</i> -pyrrolen .....	53

<b>4 Untersuchungen zur Lipophilie und Reinheit.....</b>	<b>57</b>
4.1 HPLC-Methode.....	57
4.2 Ergebnisse .....	58
<b>5 UV-spektroskopische Untersuchungen .....</b>	<b>65</b>
<b>6 Pharmakologische Untersuchungen .....</b>	<b>71</b>
<b>6.1 Verwendete Zelllinien.....</b>	<b>71</b>
6.1.1 Die MCF-7 Zelllinie.....	71
6.1.2 Die MDA-MB 231 Zelllinie .....	71
<b>6.2 Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen Wirkung .....</b>	<b>71</b>
6.2.1 Ermittlung der agonistischen Wirkung.....	72
6.2.2 Ermittlung der antagonistischen Wirkung.....	73
6.2.3 Ergebnisse .....	73
<b>6.3 Bestimmung der relativen Bindungsaffinität am Estrogenrezeptor .....</b>	<b>86</b>
6.3.1 Untersuchung der Rezeptorbindung im Ganzzellassay .....	86
6.3.2 Untersuchung der Rezeptorbindung am isolierten hER $\alpha$ (HAP-Assay).....	87
6.3.3 Ergebnisse .....	88
<b>6.4 Untersuchung des ER<math>\alpha</math>-Gehalts .....</b>	<b>91</b>
6.4.1 Enzymimmunoassay (Western Blot) .....	92
6.4.2 Ergebnisse .....	93
<b>6.5 Testung auf Hemmung der Zellproliferation.....</b>	<b>100</b>
6.5.1 Ergebnisse .....	101
<b>6.6 Untersuchung der COX-1- und COX-2-Hemmung .....</b>	<b>110</b>
6.6.1 Untersuchung der COX-1-Hemmung im thrombozytenbasierten Ganzzellassay .....	110
6.6.2 Untersuchung der COX-1- und COX-2-Hemmung an isolierten Isoenzymen .....	111
6.6.3 Ergebnisse .....	112
<b>7 Diskussion der Untersuchungsergebnisse .....</b>	<b>121</b>
<b>8 Zusammenfassung .....</b>	<b>143</b>
<b>Summary.....</b>	<b>145</b>



<b>9 Experimenteller Teil.....</b>	<b>149</b>
<b>9.1 Synthese .....</b>	<b>149</b>
9.1.1 Verwendete Geräte und Chemikalien.....	149
9.1.2 Synthesevorschriften und analytische Daten .....	150
<b>9.2 Biochemische und pharmakologische Methoden.....</b>	<b>214</b>
9.2.1 Verwendete Geräte .....	214
9.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	215
9.2.3 Reagenzien und Lösungen.....	215
9.2.4 Zelllinien .....	217
9.2.5 Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	219
9.2.6 Luciferaseassay.....	221
9.2.7 Bestimmung der relativen Rezeptorbindungsaffinität (RBA) .....	225
9.2.8 Western Blot.....	228
9.2.9 Testung auf Hemmung der Zellproliferation .....	230
<b>9.3 Untersuchung der COX-1- und COX-2-Inhibierung .....</b>	<b>234</b>
9.3.1 thrombozytenbasierter Ganzzellassay (COX-1) .....	234
9.3.2 Testung an isolierten COX-1- und COX-2-Isoenzymen .....	234
<b>9.4 HPLC-Untersuchungen.....</b>	<b>235</b>
9.4.1 HPLC-System.....	235
9.4.2 Geräte zur Inkubation .....	235
9.4.3 Mobile Phase.....	235
9.4.4 UV-Messungen.....	236
<b>9.5 Röntgenkristallstrukturen .....</b>	<b>236</b>
<b>10 Anhang .....</b>	<b>239</b>
<b>10.1 Abkürzungen .....</b>	<b>239</b>
<b>10.2 Quellen .....</b>	<b>241</b>
<b>10.3 Lebenslauf .....</b>	<b>252</b>
<b>10.4 Posterpräsentationen .....</b>	<b>253</b>
<b>10.5 Vorträge .....</b>	<b>253</b>