

# 6 Pharmakologische Untersuchungen

## 6.1 Verwendete Zelllinien

### 6.1.1 Die MCF-7 Zelllinie

Die humane MCF-7 Zelllinie (Michigan Cancer Foundation) wurde 1970 aus einem Pleuraerguss einer Patientin mit metastasierendem, duktalem Mammakarzinom isoliert, das zuvor drei Jahre mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war [289]. Diese Zelllinie besitzt neben Rezeptoren für Estrogene auch Androgen- und Progesteronrezeptoren und wird deshalb als hormonabhängig bezeichnet [290]. Während hohe Mengen an ER $\alpha$  exprimiert werden, konnte ER $\beta$  nicht nachgewiesen werden [7]. Darüber hinaus wurde eine Überexpression des COX-1-Isoenzym und eine Induzierbarkeit von COX-2 festgestellt [215].

### 6.1.2 Die MDA-MB 231 Zelllinie

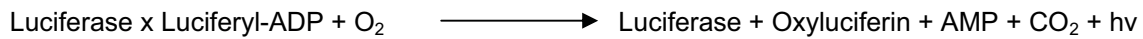
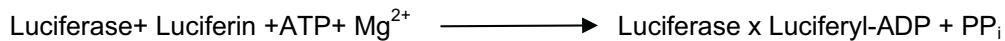
Diese Zelllinie wurde 1974 ebenfalls aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit metastasierendem, duktalem Mammakarzinom gewonnen [291], bei der zuvor eine dreiwöchige Behandlung mit Zytostatika erfolgt war. Aufgrund der Abwesenheit von Estrogen- und anderen Hormonrezeptoren wird sie als hormonunabhängig bezeichnet [292]. Außerdem zeichnen sich diese hochinvasiven MDA-MB-231-Zellen durch eine Überexpression des COX-2-Isoenzym aus [215].

## 6.2 Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen

### Wirkung

Mithilfe eines Luciferaseassays wurde *in-vitro* die estrogenen und antiestrogenen Potenz der neu synthetisierten Verbindungen bestimmt. Um die Gesamtheit der estrogenen Signalwege einzubeziehen, wurde ein Ganzzellassay durchgeführt. Dazu wurden humane, ER-positive MCF-7-Brustkrebszellen verwendet, die mit dem Plasmid ERE<sub>wtc</sub>luc stabil transfiziert waren (MCF-7-2a). Dieses Plasmid enthält neben der Promotorsequenz ERE das aus dem Leuchtkäfer *photinus pyralis* stammende Reporterogen luc [293, 294], welches das Luciferaseenzym codiert. Die Luciferaseexpression erfolgt in Abhängigkeit von der estrogenen Potenz der Testsubstanz [295, 296] und erreicht ab der 42. Stunde ein Maximum [297]. Deshalb wird der Zelltest nach 48 - 50 h durch Zellyse beendet.

Anschließend werden durch Zugabe des Substrates Luciferaseassay-Reagenz (Luciferaseassay-Kit; Promega) folgende Reaktionen katalysiert [298]:



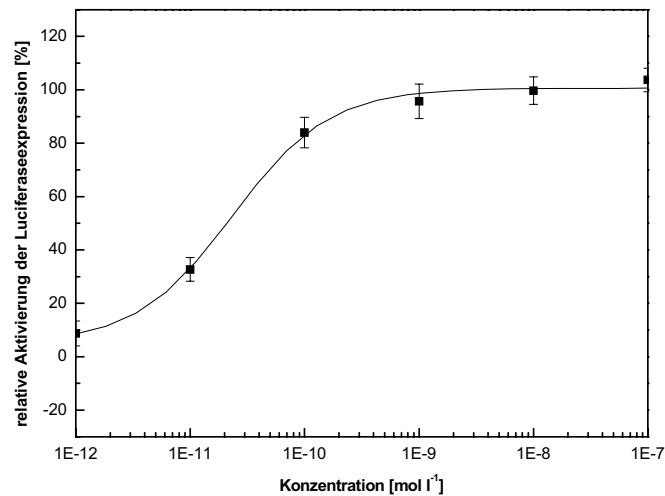
Die entstehende Lichtmenge ist proportional zur Menge an exprimierter Luciferase, wobei die Lichtemission unmittelbar nach Substratzusatz über einen Wellenlängenbereich von 490 - 630 nm einsetzt. Aufgrund der rasch nachlassenden Reaktion, wird die Lichtmenge unmittelbar nach Substratzugabe mit einem Luminometer in einem Wellenlängenbereich von 390 - 520 nm über einen Zeitraum von 10 s quantifiziert [299]. Durch das im Luciferaseassay-Reagenz enthaltene Coenzym A wird die gesamte Lichtausbeute um ein Vieles verstärkt [300]. Die Angabe der Lichtausbeute erfolgt in RLU (relative light units) und wird gegen die eingesetzte Zellmenge korrigiert, die durch Kristallviolett-färbung ermittelt wird. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Tests wird das Ergebnis als relative Aktivierung [%], bezogen auf die maximale Aktivierung durch E2 ( $10^{-8}$  M), ausgedrückt.

Die Ermittlung der relativen Aktivierung der Luciferaseexpression dient zur Einschätzung der biologischen Wirkung (Transkription) einer Testsubstanz. Eine Aussage über deren Ursache kann damit jedoch nicht getroffen werden.

### 6.2.1 Ermittlung der agonistischen Wirkung

Die Bestimmung der estrogenen Potenz erfolgt konzentrationsabhängig durch Quantifizierung der substanzbedingten Luciferaseexpression. Dazu erfolgt die Inkubation von MCF-7-2a-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Testsubstanz ( $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M). Zur Background-Bestimmung werden Zellen mit dem verwendeten Lösungsmittel (0.1%), als Positivkontrolle mit  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-8}$  M) unter identischen Bedingungen inkubiert. Zu Kontrollzwecken wird in jedem Test E2 in den Konzentrationen von  $10^{-12}$  -  $10^{-7}$  M mitgeführt (Abbildung 6-1). Nach 50 h wird der Zelltest beendet, die RLU-Werte ermittelt und die Zellmasse bestimmt. Daraus wird eine Konzentrations-Aktivierungskurve erstellt. Aus der sigmoiden Kurve (Boltzmann-Funktion, Software: Origin 7.0) wird der  $EC_{50}$ -Wert [ $\text{mol l}^{-1}$ ] durch die Berechnung des Wendepunkts ermittelt (Software Origin 7.0) [301]. Der  $EC_{50}$ -Wert ist die molare Konzentration eines Agonisten, die zu 50% seiner maximalen Wirkung führt (Wirkpotenz). Außerdem wird der  $E_{\text{max}}$ -Wert bestimmt (maximal erzielte Aktivierung [%], Wirksamkeit). Der Quotient aus  $E_{\text{max}}$ -Wert und dem theoretisch

erzielbaren Maximaleffekt ( $E_{\max}$ -Wert von E2) wird als intrinsische Aktivität (IA) bezeichnet und gibt die relative Wirkstärke einer Verbindung an.



**Abbildung 6-1:** Konzentrationsabhängige Aktivierung der Luciferaseexpression durch  $17\beta$ -Estradiol (n=3).

## 6.2.2 Ermittlung der antagonistischen Wirkung

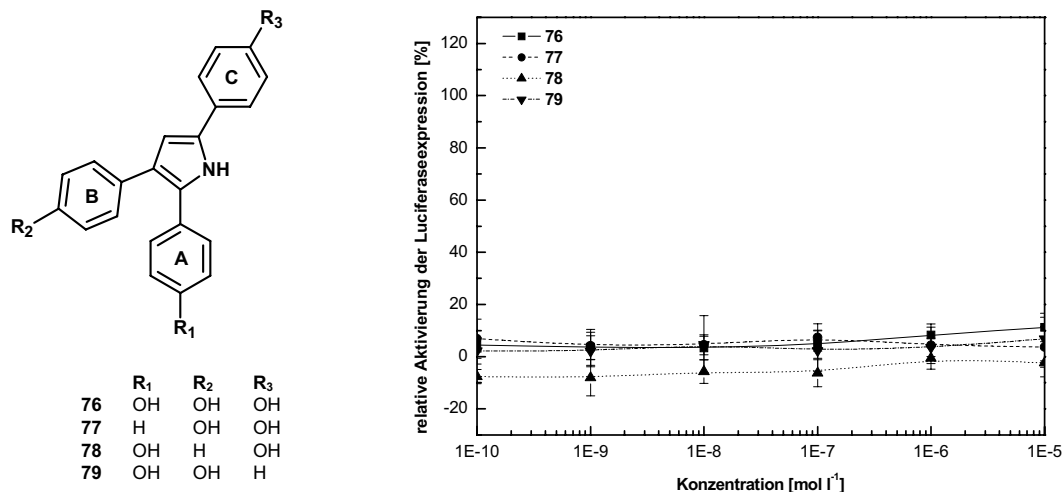
Zur Untersuchung der antagonistischen Eigenschaften wird konzentrationsabhängig die Hemmung der E2-bedingten Transkriptionsaktivierung durch eine Testsubstanz bestimmt. Dazu werden, analog zu Kapitel 6.2.1, MCF-7-2a-Zellen mit einer Testsubstanz inkubiert und zusätzlich eine feste Konzentration an  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-9}$  M) zugegeben. Die weitere Testdurchführung erfolgt wie die Bestimmung der agonistischen Wirkung. Die verbleibende E2-induzierte Transkriptionsaktivierung wird in Abhängigkeit von der Konzentration des Antagonisten dargestellt.

## 6.2.3 Ergebnisse

Mithilfe dieser Methoden wurden die estrogenen und antiestrogenen Eigenschaften der synthetisierten Pyrrole bestimmt. Untersucht wurden der Einfluss der Alkylfunktion an C-3 (Typ-1-Pyrrole) bzw. C-2 (Typ-2-Pyrrole), der *para*-Hydroxylierung der aromatischen Substituenten sowie der Einführung von lipophiler Chlorsubstituenten auf die Transkriptionsaktivierung.

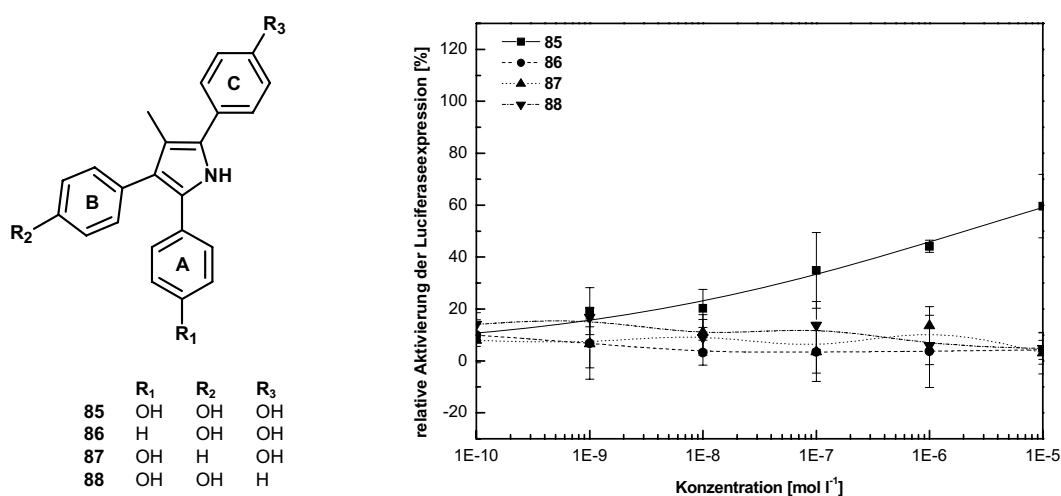
### 6.2.3.1 Eigenschaften von 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen

Das zunächst untersuchte 2,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**76**) wies keine estrogenen Eigenschaften auf. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung der Dihydroxyderivate **77**, **78** und **79** erhalten (Abbildung 6-2).



**Abbildung 6-2:** Genaktivierung durch in C-3 unsubstituierten 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrole (n=3).

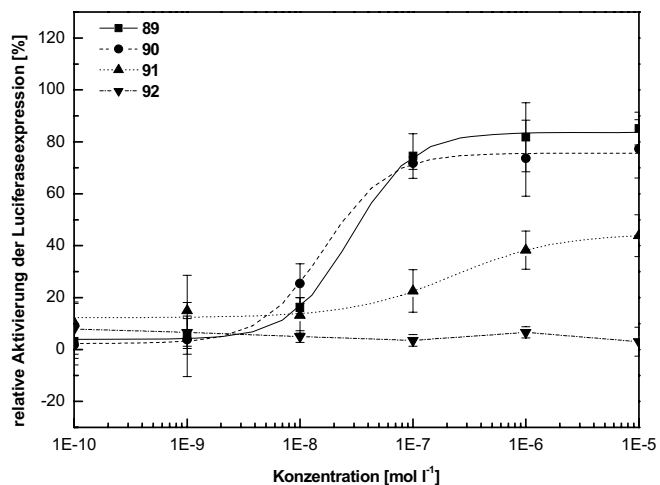
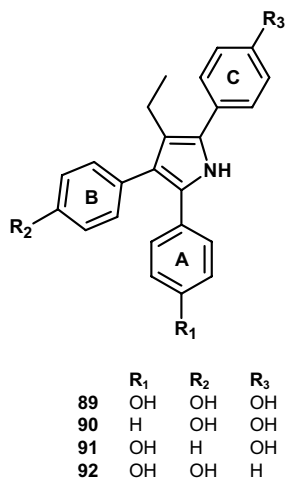
Ausgehend davon wurde versucht, durch die Einführung eines Alkylsubstituenten an C-3 eine estrogenere Wirkpotenz zu erzielen. Die trihydroxylierte, an C-3 methylsubstituierte Verbindung **85** zeigte im Gegensatz zu ihrem nicht alkylierten Analogon **76** estrogenere Wirkung und führte zu einer relativen Transkriptionsaktivierung von 44% (10<sup>-6</sup> M) bzw. 60% (10<sup>-5</sup> M). Aufgrund des stetigen Anstiegs der Funktion (Abbildung 6-3) wird das Wirkmaximum von **85** vermutlich erst außerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs erreicht.



**Abbildung 6-3:** Genaktivierung durch 3-Methyl-2,4,5-triaryl-1*H*-pyrrole (n=3).

Der Verlust einer phenolischen Hydroxygruppe hatte unabhängig von ihrer Position (Aromat A, B oder C) einen Verlust des estrogenen Effekts zur Folge (**86**, **87** und **88**).

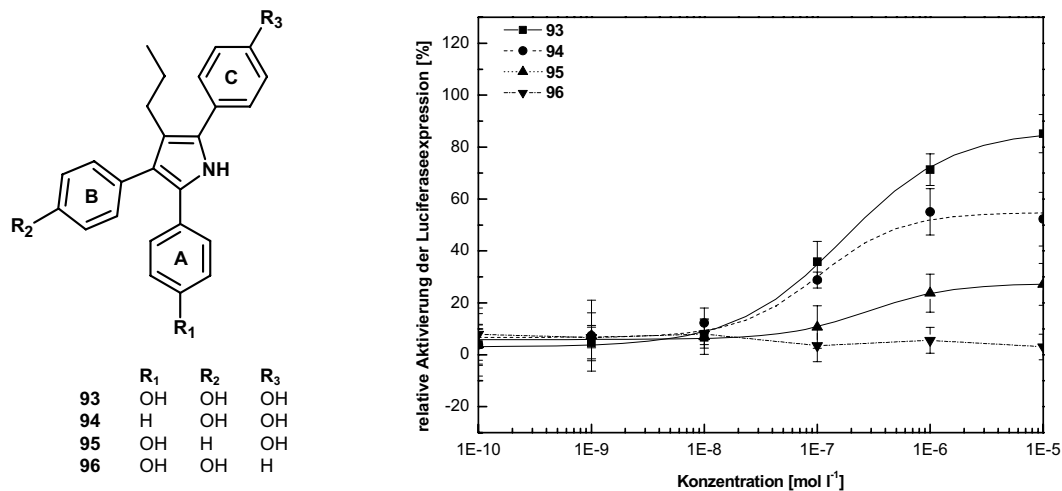
Anschließend wurde versucht, durch Verlängerung der Alkylkette (Me→Et) eine weitere Wirksteigerung zu erhalten. Die größte Aktivität zeigte das Trihydroxyderivat 3-Ethyl-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**89**), das zu einer relativen Transkriptionsaktivierung von 75% ( $10^{-7}$  M), 82% ( $10^{-6}$  M) bzw. 84% ( $10^{-5}$  M) führte. Der  $EC_{50}$ -Wert betrug  $3.8 \cdot 10^{-8}$  M, jedoch konnte keine 100%ige Transkriptionsaktivierung ausgelöst werden (IA: 0.84). Die estrogenen Eigenschaften der dihydroxylierten Analoga (**90**, **91** und **92**) variierten stark in Abhängigkeit von der Position der Hydroxyfunktionen. Das an den Aromaten B und C hydroxylierte Derivat 3-Ethyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**90**) zeigte eine vergleichbare Wirkung wie die trihydroxylierte Verbindung ( $EC_{50}$ :  $3.2 \cdot 10^{-8}$  M). Es konnten relative Transkriptionsaktivierungen von 72% ( $10^{-7}$  M), 74% ( $10^{-6}$  M) und 76% ( $10^{-5}$  M) ermittelt werden. Demgegenüber führte der Verlust der phenolischen Hydroxygruppe an Aromat B (**91**) zu einem drastischen Aktivitätsrückgang ( $10^{-5}$  M: 41%,  $EC_{50}$ :  $2.3 \cdot 10^{-7}$  M). Ein fehlender *para*-Hydroxysubstituent am Aromat C (**92**) hatte einen vollständigen Verlust der agonistischen Wirkung zur Folge (Abbildung 6-4).



**Abbildung 6-4:** Genaktivierung durch 3-Ethyl-2,4,5-triaryl-1*H*-pyrrole (n=3).

Durch die weitere Verlängerung der Alkylkette (Et→Prop) konnte die Wirkung nicht erhöht werden (Abbildung 6-5). Die estrogenere Potenz des propylsubstituierten Trihydroxyderivats **93** ( $EC_{50}$ :  $1.7 \cdot 10^{-7}$  M) war deutlich geringer als die des ethylsubstituierten Analogons, wobei relative Transkriptionsaktivierungen von 36% ( $10^{-7}$  M), 71% ( $10^{-6}$  M) und 85% ( $10^{-5}$  M) erreicht wurden. Außerdem war, anders als bei der ethylierten Verbindung **90**, eine fehlende Hydroxygruppe an Aromat A (**94**) mit einer deutlichen Wirkminderung verbunden. **94** führte lediglich zu Transkriptionsaktivierungen von 29% ( $10^{-7}$  M), 55% ( $10^{-6}$  M) und 53% ( $10^{-5}$  M). War an Aromat B keine Hydroxygruppe vorhanden (**95**), blieb

analog zu den Ergebnissen der ethylierten Verbindungen eine geringe Estrogenität erhalten ( $EC_{50}$ :  $2.8 \cdot 10^{-7}$  M), während sie bei **96**, deren Aromaten A und B hydroxyliert sind, vollständig verloren ging.



**Abbildung 6-5:** Genaktivierung durch 3-Propyl-2,4,5-triaryl-1H-pyrrole (n=3).

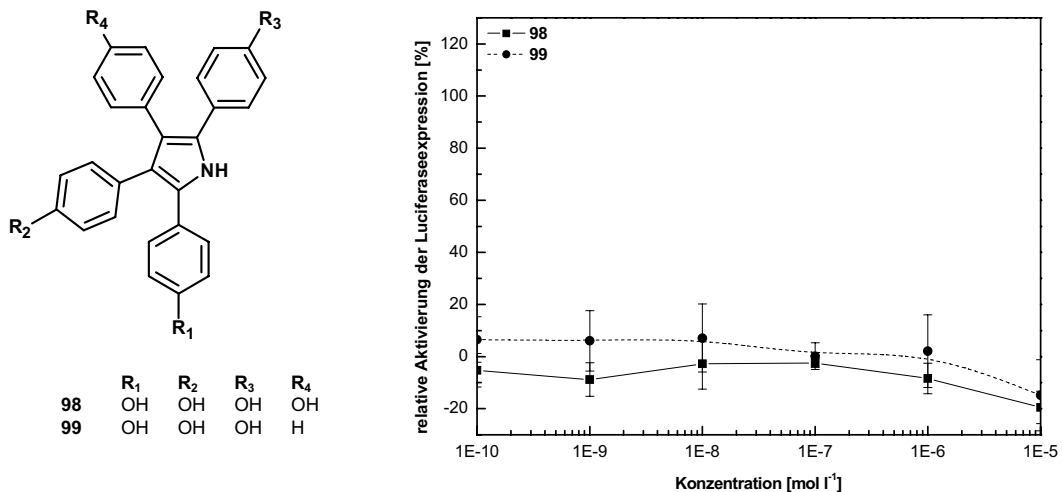
Auf der Grundlage dieser Testergebnisse konnte eine Prioritätsreihe für den Einfluss des Hydroxylierungsmusters der Aromaten auf die estrogenen Potenz analoger Typ-1-Verbindungen aufgestellt werden:

Trihydroxy > Dihydroxy (Aromat B/C) > Dihydroxy (Aromat A/C) > Dihydroxy (Aromat A/B)

Das Vorhandensein der *para*-Hydroxygruppe an Aromat C war bei allen untersuchten 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrolen für die Ausbildung estrogenen Substanzeigenschaften essentiell. Eine fehlende Hydroxylierung an Aromat B führte zum deutlichen Rückgang der Estrogenität, während eine fehlende Hydroxygruppe an Aromat A den geringsten Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung hatte.

Die Einführung von homologen Alkylketten an C-3 führte zur Steigerung der estrogenen Wirkpotenz, wobei die Ethylfunktion die optimale Alkylkettenlänge darstellte. Eine hohe Lipophilie am zentralen Heterozyklus ist deshalb vermutlich eine wichtige Stoffeigenschaft für das Auftreten estrogenen Substanzeigenschaften.

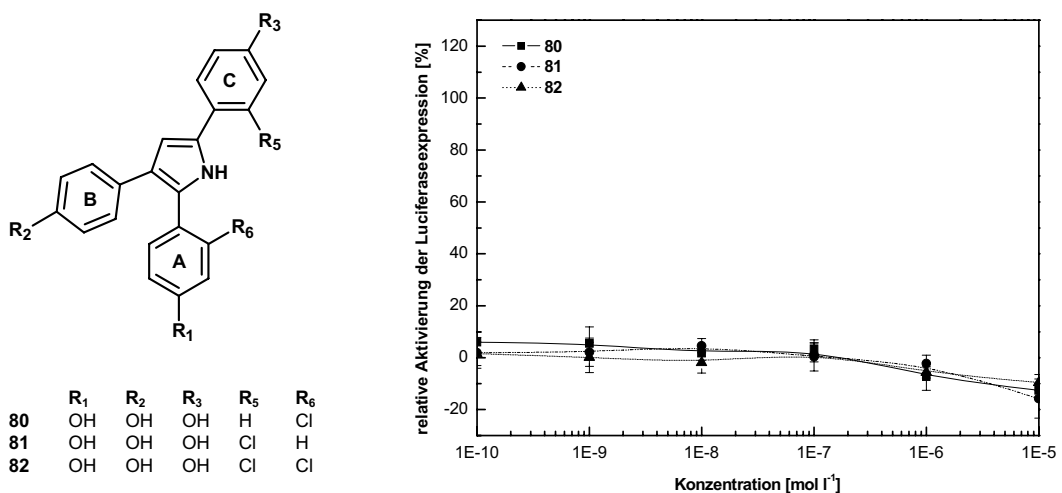
Deshalb wurden in einem nächsten Schritt die lipophilen Eigenschaften durch Einführung eines aromatischen Substituenten in Position C-3 weiter modifiziert, der gegenüber den aliphatischen Alkylsubstituenten eine höhere Lipophile und Rigidität besitzt.



**Abbildung 6-6:** Genaktivierung durch 2,3,4,5-Tetraaryl-1H-pyrrole (n=3).

Weder durch die Einführung eines Phenylsubstituenten noch durch die eines *para*-Hydroxyphenylsubstituenten konnte eine estrogenen Wirkung erzielt werden (Abbildung 6-6). Bei hohen Konzentrationen (10<sup>-5</sup> M) wurden negative Aktivierungen ermittelt, die in zytotoxischen Substanzeigenschaften begründet sein können und in Antiproliferationsstudien näher untersucht werden müssen (Kapitel 6.5.1.3).

Anschließend wurde untersucht, ob durch die Einführung von lipophilen Chlorsubstituenten an die Aromaten A und C eine Wirksteigerung erzielbar ist. Dazu wurden ausgehend von der unwirksamen, an C-3 unsubstituierten, *para*-trihydroxylierten Verbindung **76** zunächst *ortho*-chlorierte Derivate getestet (Abbildung 6-7).



**Abbildung 6-7:** Genaktivierung durch an den Aromaten A und/oder C *ortho*-chlorierte, an C-3 unsubstituierte 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole (n=3).

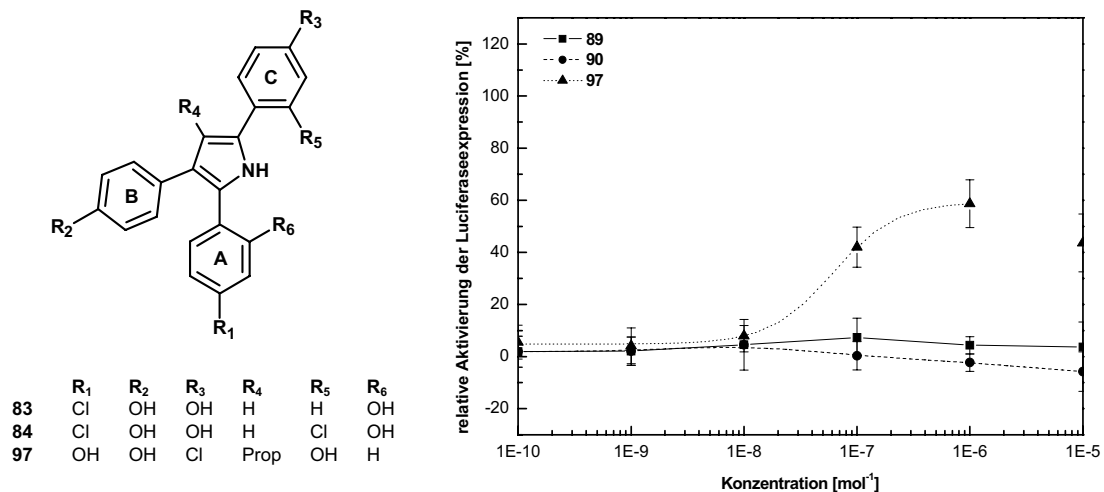
Sowohl die monochlorierten Verbindungen **80** und **81** als auch das dichlorierte Derivat **82** konnten keine Genaktivierung auslösen. Darüber hinaus wurde in hohen Konzentrationen ( $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M) ein negativer Kurvenverlauf erhalten, so dass auch hier noch eine Testung auf Zytotoxizität erfolgen muss (Kapitel 6.5.1.1). Außerdem wurde untersucht, ob die Stellung des Chlorsubstituenten innerhalb eines Aromaten Einfluss auf die genaktivierenden Eigenschaften hat. Dazu wurden die an Aromat A *para*-chlorierten Derivate **83** und **84** analysiert, die jedoch auch keine Genaktivierung bewirkten (Abbildung 6-8).

Der Einfluss der nun *ortho*-ständigen Hydroxygruppen auf die Estrogenität wurde nicht näher charakterisiert, könnte jedoch durch die Untersuchung von nicht chlorierten *ortho*-hydroxylierten Verbindungen beurteilt werden. Aufgrund der fehlenden estrogenen Eigenschaften der untersuchten chlorhaltigen Derivate wurde auf die Einführung von Chlorsubstituenten an weiteren Aromaten und Positionen verzichtet.

Eine interessante Verbindung stellt das in *para*-Position chlorierte 2-(4-Chlor-2-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-3-propyl-1*H*-pyrrol (**97**) dar. Der Propylrest war aufgrund seiner nicht optimalen Kettenlänge besonders geeignet, um sowohl eine Steigerung als auch eine Abnahme der estrogenen Wirkung durch den Chlorsubstituenten erkennbar zu machen.

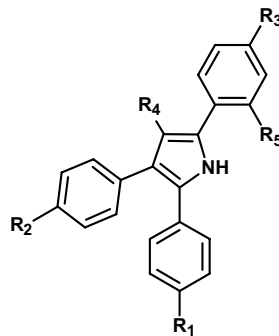
Trotz fehlender *para*-Hydroxyfunktion an Aromat C, deren Vorhandensein für die estrogenen Wirkung als essentiell interpretiert wurde, wies **97** ausgeprägte estrogenen Potenz auf ( $EC_{50}$ :  $8.6 \cdot 10^{-8}$  M). Diese war mit der des analogen nicht chlorierten *para*-Hydroxyderivat **93** ( $EC_{50}$ :  $1.7 \cdot 10^{-7}$  M) vergleichbar. Da bei hoher Konzentration ( $10^{-5}$  M) die estrogenen Potenz wieder abnahm (37%,  $10^{-5}$  M), werden zytotoxische Substanz-eigenschaften vermutet (Abbildung 6-8). Eine unabhängige Beurteilung des Einflusses der Chlorsubstitution auf die estrogenen Wirkung ist deshalb schwierig. Darüber hinaus kann keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die *ortho*-Position der Hydroxygruppe (Aromat C) das biologische Verhalten von Verbindung **97** mitbestimmt.





**Abbildung 6-8:** Genaktivierung durch *para*-chlorierte, an C-3 unsubstituierte 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole **83** und **84** sowie durch 2-(4-Chlor-2-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-3-propyl-1H-pyrrol (**97**). Zur Bestimmung der sigmoiden Konzentrations-Wirkungs-Kurve von **97** wurde die Konzentration von 10<sup>-5</sup> M nicht einbezogen (n=3).

Alle untersuchten 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole führten zu keiner 100%igen Genaktivierung ( $E_{\max} < 1$ ), die intrinsischen Aktivitäten waren stets kleiner als 1 (Tabelle 6-1).



| Verbindung | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | EC <sub>50</sub> [mol l <sup>-1</sup> ] | E <sub>max</sub> [%]     | IA   |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|--------------------------|------|
| <b>E2</b>  |                |                |                |                |                | 1.8·10 <sup>-11</sup>                   | 100 ± 1.1                | 1    |
| <b>85</b>  | OH             | OH             | OH             | Me             | H              | -                                       | -                        | -    |
| <b>89</b>  | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | 3.8·10 <sup>-8</sup>                    | 83.6 ± 6.3               | 0.84 |
| <b>90</b>  | H              | OH             | OH             | Et             | H              | 3.2·10 <sup>-8</sup>                    | 75.7 ± 9.1               | 0.76 |
| <b>91</b>  | OH             | H              | OH             | Et             | H              | 2.3·10 <sup>-7</sup>                    | 44.7 ± 6.2               | 0.45 |
| <b>93</b>  | OH             | OH             | OH             | Prop           | H              | 1.7·10 <sup>-7</sup>                    | 84.5 ± 7.3               | 0.89 |
| <b>94</b>  | H              | OH             | OH             | Prop           | H              | 1.1·10 <sup>-7</sup>                    | 52.9 ± 9.2               | 0.55 |
| <b>95</b>  | OH             | H              | OH             | Prop           | H              | 2.8·10 <sup>-7</sup>                    | 27.5 ± 7.9               | 0.28 |
| <b>97</b>  | OH             | OH             | Cl             | Prop           | OH             | 8.6·10 <sup>-8</sup>                    | 59.3 ± 8.8 <sup>a)</sup> | 0.62 |

**Tabelle 6-1:** EC<sub>50</sub>-Werte der im Luciferaseassay mit MCF-7-2a-Zellen aktiven 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole mit jeweils zugehöriger maximaler Transkriptionsaktivierung ( $E_{\max}$ , 10<sup>-5</sup> M). Bei Verbindung **85** wurde kein sigmoider Kurvenverlauf erhalten. <sup>a)</sup>E<sub>max</sub>-Wert bei 10<sup>-6</sup> M, da es bei höheren Konzentrationen zu einer Verringerung der Wirksamkeit kommt.

Deshalb kann nicht von einem vollen Agonismus dieser Verbindungen ausgegangen werden (Abbildung 6-9).

| intrinsische Aktivität    |              |
|---------------------------|--------------|
| <b>voller Agonist</b>     | 1 (100%)     |
| <b>partieller Agonist</b> | $0 < IA < 1$ |
| <b>Antagonist</b>         | 0            |
| <b>inverser Agonist</b>   | $< 0$        |

**Abbildung 6-9:** Allgemeine Einteilung biologischer Effektoren nach ihren intrinsischen Aktivitäten (IA).

Vielmehr scheint ein partieller Agonismus vorzuliegen. Definitionsgemäß besitzen partielle Agonisten in Anwesenheit eines vollen Agonisten antagonistische Eigenschaften, da sie in Konkurrenz um die Rezeptorbindung treten und dadurch die Wirksamkeit des vollen Agonisten abgeschwächt wird.

Deshalb wurden auch die antiestrogenen Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-2 dargestellt.

| Verbindung | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | Relative Genaktivierung [%] |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| <b>85</b>  | OH             | OH             | OH             | Me             | H              | 80.5 ± 9.4                  |
| <b>89</b>  | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | 71.8 ± 10.3                 |
| <b>90</b>  | H              | OH             | OH             | Et             | H              | 90.4 ± 5.2                  |
| <b>91</b>  | OH             | H              | OH             | Et             | H              | 83.5 ± 11.9                 |
| <b>93</b>  | OH             | OH             | OH             | Prop           | H              | 65.4 ± 9.3                  |
| <b>94</b>  | H              | OH             | OH             | Prop           | H              | 85.8 ± 2.3                  |
| <b>95</b>  | OH             | H              | OH             | Prop           | H              | 91.6 ± 8.5                  |
| <b>97</b>  | OH             | OH             | Cl             | Prop           | OH             | 69.4 ± 7.2                  |

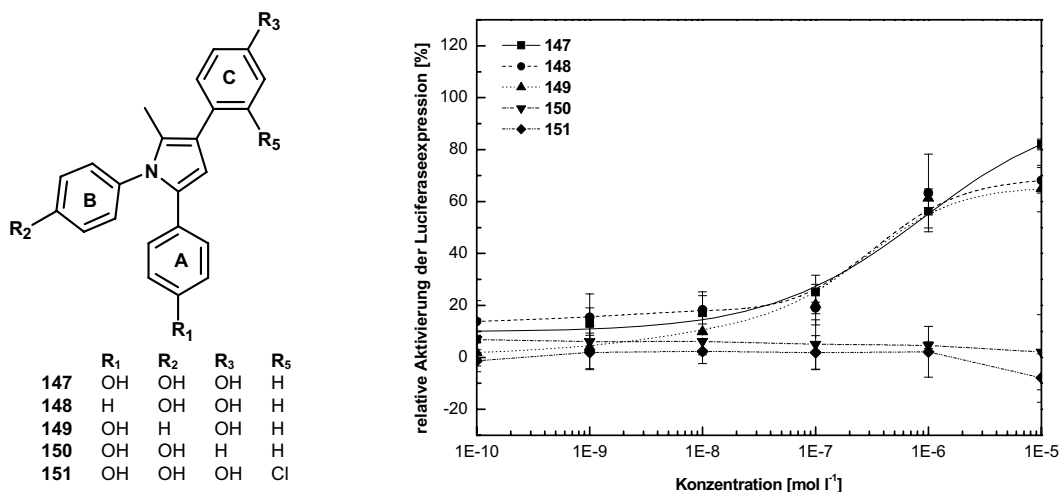
**Tabelle 6-2:** Antiestrogene Eigenschaften der estrogenen 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole in einer Testkonzentration von  $10^{-5}$  M. E2 wurde in einer Konzentration von  $10^{-9}$  M eingesetzt. Es wurde ein Luciferaseassay mit MCF-7-2a-Zellen durchgeführt.

Die getesteten Estrogene übten einen moderaten (**85, 90, 91, 94, 95**) oder deutlichen (**89, 93, 97**) negativen Effekt auf die E2-induzierte Genaktivierung aus. Eine Korrelation mit den estrogenen Eigenschaften konnte jedoch nicht beobachtet werden.

### 6.2.3.2 Eigenschaften von 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen

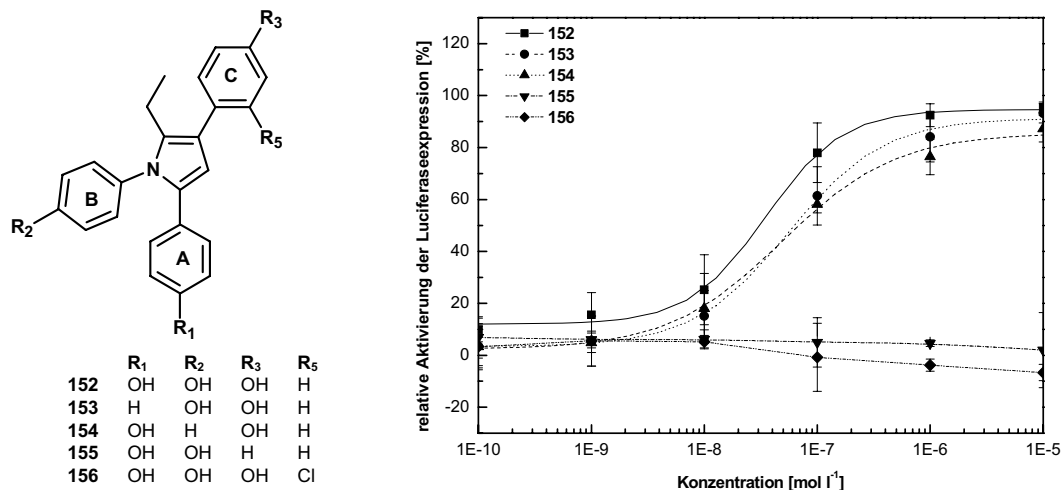
Ähnlich wie bei den 2,4,5-triarylierten Verbindungen wurden bei den 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen an C-2 homologe Alkylsubstituenten eingeführt. Dabei wurde aufgrund der Unwirksamkeit der nicht alkylierten 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrole auf die Synthese der entsprechenden 1,3,5-triarylierten Analoga verzichtet. Außerdem wurde untersucht, ob durch Einführung verzweigter Alkylketten (Iso-Prop, Iso-But) eine Verstärkung der estrogenen Eigenschaften erzielt werden kann. Auch bei den 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen wurde das Hydroxylierungsmuster der Aromaten variiert. Durch die Herstellung und Untersuchung analog hydroxylierter und alkylierter Typ-1- und Typ-2-Verbindungen konnte der Einfluss der unterschiedlichen Stickstoffsubstitution beurteilt werden. Durch Einführung von *ortho*-chlorsubstituierten Aromaten sollte der Einfluss von Chlor auf die genaktivierenden Eigenschaften beurteilt werden.

Das methylsubstituierte Trihydroxyderivat (**147**) führte zu einer Transkriptionsaktivierung von 78% bei  $10^{-5}$  M, wobei der Maximaleffekt bei dieser Konzentration, ähnlich wie beim analogen Typ-1-Derivat, nicht erreicht wurde. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die dihydroxylierten Verbindungen (**148** und **149**) als aktiv. Lediglich beim Derivat mit fehlender Hydroxygruppe an Aromat C (**150**) kam es zum vollständigen Wirkverlust. Auch das an Aromat C *ortho*-chlorsubstituierte Derivat **151** war unwirksam (Abbildung 6-10).



**Abbildung 6-10:** Genaktivierung durch 2-Methyl-1,3,5-triaryl-1*H*-pyrrole (n=3).

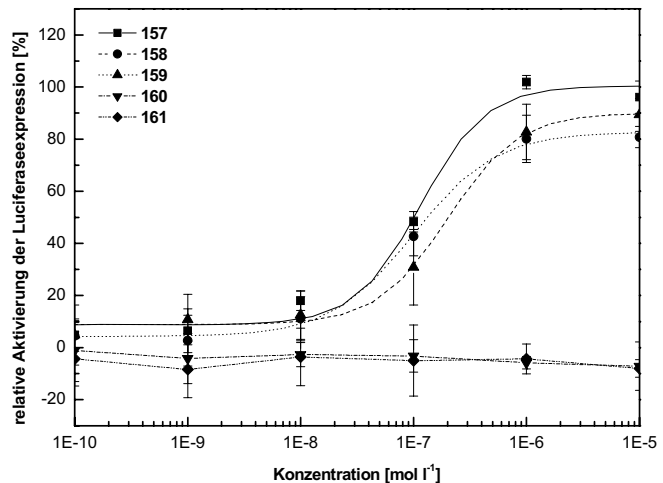
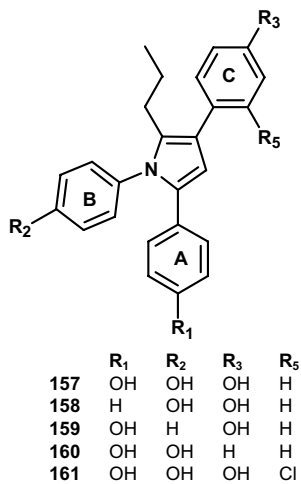
Ähnlich wie bei 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen konnte die estrogenen Potenz durch Verlängerung der Alkylkette an C-2 (Me → Et) gesteigert werden. Die estrogenen Potenzen der ethylsubstituierten analogen Trihydroxyverbindungen waren vergleichbar (**152**, EC<sub>50</sub>:  $2.5 \cdot 10^{-8}$  M, **89**, EC<sub>50</sub>:  $3.8 \cdot 10^{-8}$  M).



**Abbildung 6-11:** Genaktivierung durch 2-Ethyl-1,3,5-triaryl-1H-pyrrole (n=3).

Im Gegensatz zum Typ-1-Derivat **89** konnte **152** jedoch eine nahezu 100%ige Transkriptionsaktivierung auslösen und besitzt somit eine höhere Wirkstärke (Abbildung 6-11). Das Fehlen der *para*-Hydroxygruppe an Aromat A (**153**) bzw. B (**154**) führte bei ähnlichen relativen Transkriptionsaktivierungen von 86% (10<sup>-5</sup> M) bzw. 88% (10<sup>-5</sup> M) und EC<sub>50</sub>-Werten zu einem geringen Wirkverlust (siehe Tabelle 6-3). Andererseits gingen bei fehlender *para*-Hydroxygruppe an Aromat C die estrogenen Eigenschaften verloren (**155**). Das an Aromat C *ortho*-chlorsubstituierte Derivat (**156**) war unwirksam.

Durch die Verlängerung der Alkylkette (Et → Prop) konnte die Estrogenität ähnlich wie bei den analogen Typ-1-Pyrrolen nicht weiter gesteigert werden. 1,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-2-propyl-1H-pyrrol (**157**) weist bei einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M lediglich eine relative Transkriptionsaktivierung von 48% auf, was einem Wirkverlust von ca. 40% gegenüber dem ethylierten Analogon (**152**) entspricht. Die Inkubation mit **157** führte zu einer 100%igen Genaktivierung (IA: 1). Die dihydroxylierten Derivate verhielten sich bei schwächerer Wirkung analog zu den entsprechenden ethylierten Typ-2-Verbindungen (Abbildung 6-12).



**Abbildung 6-12:** Genaktivierung durch 2-Propyl-1,3,5-triaryl-1*H*-pyrrole ( $n=3$ ).

Das Substitutionsmuster des Fünfrings hat Einfluss auf die Wirkstärke. Der Vergleich analoger Verbindungen beider Substitutionstypen zeigte, dass 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole eine höhere Wirkpotenz und Wirksamkeit aufweisen. Neben den geringeren  $EC_{50}$ -Werten für die entsprechenden Typ-2-Derivate konnten vor allem im Gegensatz zu Typ-1-Pyrrolen 100%ige relative Genaktivierungen registriert werden.

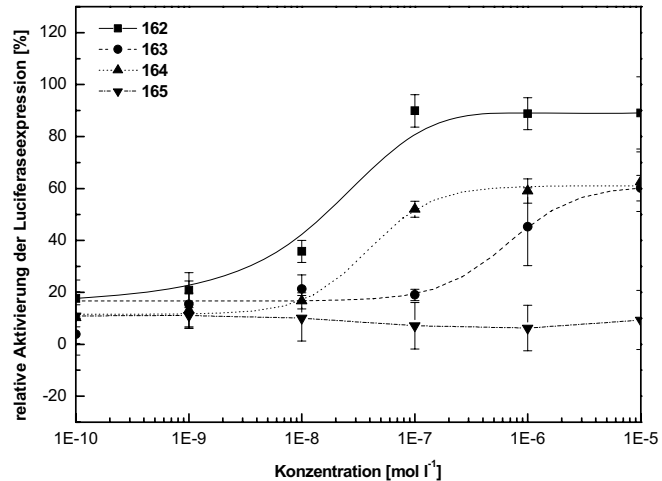
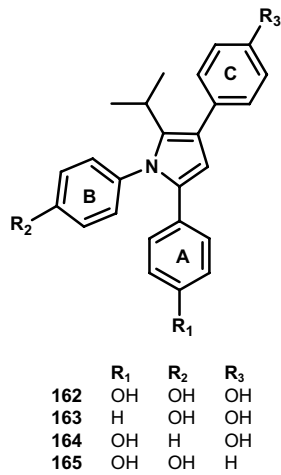
Darüber hinaus wirkte sich der Verlust der Hydroxyfunktion an Aromat B weniger wirkmindernd aus als bei den entsprechenden Typ-1-Verbindungen, so dass folgende Prioritätsreihe für den Einfluss der *para*-Hydroxygruppen auf die estrogenen Substanz-eigenschaften gefunden wurde:

Trihydroxy > Dihydroxy (Aromat B/C) = Dihydroxy (Aromat A/C) > Dihydroxy (Aromat A/B)

Sowohl bei Typ-1 als auch bei Typ-2 stellte die Ethylgruppe die optimale Alkylkettenlänge dar:

Methyl < Ethyl > Propyl

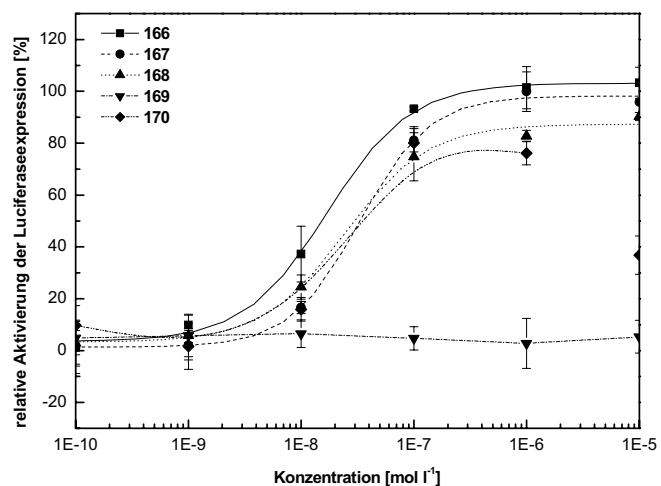
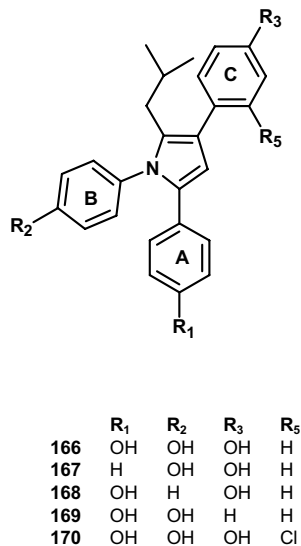
Die Einführung eines Isopropylsubstituenten an C-2 (**162**,  $EC_{50}$ :  $2.8 \cdot 10^{-8}$  M,  $E_{max}$ : 91%) führte zu einer vergleichbaren Wirkung wie bei Ethylsubstitution (**152**,  $EC_{50}$ :  $2.5 \cdot 10^{-8}$  M,  $E_{max}$ : 96%) (Abbildung 6-13). Bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M konnte eine relative Transkriptionsaktivierung von 89% ermittelt werden, die auch durch Einsatz höherer Konzentrationen nicht weiter anstieg. Im Gegensatz zu den ethylsubstituierten Verbindungen erwiesen sich alle Dihydroxyderivate als wenig aktiv (**163**,  $EC_{50}$ :  $6.6 \cdot 10^{-7}$  M, **164**,  $EC_{50}$ :  $3.8 \cdot 10^{-8}$  M) oder unwirksam (**165**). Interessanterweise wirkte sich hier erstmals eine fehlende Hydroxygruppe am Aromat A stärker wirkmindernd aus als am Aromat B.



**Abbildung 6-13:** Genaktivierung durch 2-Isopropyl-1,3,5-triaryl-1*H*-pyrrole (n=3).

Mit der Verlängerung der verzweigten Alkylkette (Iso-Prop → Iso-But) wurde die Lipophilie des Substituenten weiter erhöht. 2-Isobutyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**166**) führte in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M zu einer relativen Transkriptionsaktivierung von 94% und wies damit eine Wirksteigerung gegenüber dem analogen Ethylderivat von 20% auf und zeigte die größte Wirkpotenz ( $EC_{50}$ :  $1.7 \cdot 10^{-8}$  M) der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen (Abbildung 6-14).

Auch die an den Aromaten B/C bzw. A/C dihydroxylierten Derivate (**167**,  $EC_{50}$ :  $3.3 \cdot 10^{-8}$  M, **168**,  $EC_{50}$ :  $2.5 \cdot 10^{-8}$  M) hatten ausgeprägte estrogene Eigenschaften.



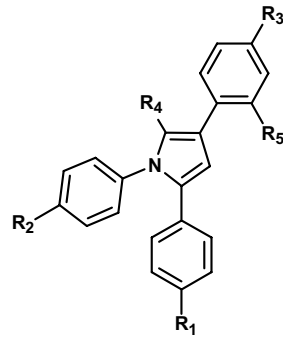
**Abbildung 6-14:** Genaktivierung durch 2-Isobutyl-1,3,5-triaryl-1*H*-pyrrole. Zur Bestimmung der sigmoiden Konzentrations-Wirkungs-Kurve von **170** wurde die Konzentration von  $10^{-5}$  M nicht einbezogen (n=3).

Die am Aromaten C *ortho*-chlorierte Verbindung **170** ( $EC_{50}$ :  $1.3 \cdot 10^{-8}$  M) führte in den Konzentrationen  $10^{-7}$  M und  $10^{-6}$  M zu einer Transkriptionsaktivierung von 80% bzw. 76%.

Da sich jedoch dieser Effekt bei höherer Konzentration verringerte ( $10^{-5}$  M, 16%), werden zytotoxische Substanzeigenschaften vermutet.

Zur Beurteilung dieses Sachverhalts wird die Substanz im Antiproliferationsassay näher untersucht.

In Tabelle 6-3 wurden die  $EC_{50}$ -Werte, die  $E_{max}$ -Werte sowie die intrinsischen Aktivitäten der estrogen wirksamen 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole zusammengefasst.



| Verbindung | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | $EC_{50}$ [mol l <sup>-1</sup> ] | $E_{max}$ [%]    | IA   |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------------------|------------------|------|
| E2         |                |                |                |                |                | $1.8 \cdot 10^{-11}$             | $100 \pm 1.1$    | 1    |
| 147        | OH             | OH             | OH             | Me             | H              | -                                | -                | -    |
| 148        | H              | OH             | OH             | Me             | H              | $3.5 \cdot 10^{-7}$              | $68.8 \pm 4.9$   | 0.69 |
| 149        | OH             | H              | OH             | Me             | H              | $3.7 \cdot 10^{-7}$              | $66.3 \pm 9.0$   | 0.66 |
| 152        | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | $2.5 \cdot 10^{-8}$              | $95.7 \pm 4.2$   | 0.95 |
| 153        | H              | OH             | OH             | Et             | H              | $2.8 \cdot 10^{-8}$              | $85.9 \pm 5.6$   | 0.86 |
| 154        | OH             | H              | OH             | Et             | H              | $1.7 \cdot 10^{-7}$              | $87.5 \pm 3.8$   | 0.88 |
| 157        | OH             | OH             | OH             | Prop           | H              | $1.2 \cdot 10^{-7}$              | $99.6 \pm 1.2$   | 1    |
| 158        | H              | OH             | OH             | Prop           | H              | $1.0 \cdot 10^{-7}$              | $83.5 \pm 6.4$   | 0.84 |
| 159        | OH             | H              | OH             | Prop           | H              | $2.0 \cdot 10^{-7}$              | $90.0 \pm 4.1$   | 0.90 |
| 162        | OH             | OH             | OH             | Iso-Prop       | H              | $2.8 \cdot 10^{-8}$              | $90.6 \pm 9.1$   | 0.91 |
| 163        | H              | OH             | OH             | Iso-Prop       | H              | $6.6 \cdot 10^{-7}$              | $62.6 \pm 4.0$   | 0.63 |
| 164        | OH             | H              | OH             | Iso-Prop       | H              | $3.8 \cdot 10^{-8}$              | $59.4 \pm 9.7$   | 0.59 |
| 166        | OH             | OH             | OH             | Iso-But        | H              | $1.7 \cdot 10^{-8}$              | $99.0 \pm 0.9$   | 1    |
| 167        | H              | OH             | OH             | Iso-But        | H              | $3.3 \cdot 10^{-8}$              | $98.5 \pm 4.8$   | 0.99 |
| 168        | OH             | H              | OH             | Iso-But        | H              | $2.5 \cdot 10^{-8}$              | $92.4 \pm 5.0$   | 0.92 |
| 170        | OH             | OH             | OH             | Iso-But        | Cl             | $1.3 \cdot 10^{-8}$              | $78.2 \pm 3.8^a$ | 0.78 |

**Tabelle 6-3:**  $EC_{50}$ -Werte der im Luciferaseassay mit MCF-7-2a-Zellen aktiven 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole mit jeweils zugehöriger maximaler Transkriptionsaktivierung ( $E_{max}$ ) bei  $10^{-5}$  M, <sup>a)</sup> $E_{max}$ -Wert bei  $10^{-6}$  M.

## 6.3 Bestimmung der relativen Bindungsaffinität am Estrogenrezeptor

Durch die Bestimmung der Rezeptorbindungsaffinitäten (RBA) sollte geprüft werden, ob der Transkriptionsaktivierung durch die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen eine E2-artige Rezeptorbindung zugrunde liegt.

Da die triarylierten Pyrrole keine radioaktive Markierung enthalten, kann ihre Affinität zum Estrogenrezeptor nur im Vergleich zu einem bekannten radioaktiv markierten ER-Liganden bestimmt werden. Dazu wird üblicherweise Tritium markiertes E2 ( $[^3\text{H}]\text{-E2}$ ) verwendet, das in einer festen Konzentration mit den Testsubstanzen unterschiedlicher Konzentrationen um die Bindung am Estrogenrezeptor nach gleichzeitiger Inkubation konkurriert. Anschließend wird nicht gebundenes  $[^3\text{H}]\text{-E2}$  durch Waschen entfernt und die verbleibende Menge des  $\beta$ -Strahlers im Szintillationszähler quantifiziert. Diese ist umso kleiner, je stärker  $[^3\text{H}]\text{-E2}$  von der Testsubstanz aus der Rezeptorbindung verdrängt wurde bzw. je größer ihre Rezeptoraffinität ist. Dieser Test erlaubt jedoch keine Unterscheidung von Agonisten und Antagonisten.

Um die *in-vitro*-Bindungsaffinität zu beurteilen, wurden die Testverbindungen im Ganzzellassay (ER-positive MCF-7-Zellen) sowie am rekombinanten humanen Estrogenrezeptor (hER $\alpha$ , HAP-Assay) untersucht. Während im HAP-Assay die Bindungsaffinität isoliert beurteilt wird, gehen im Ganzzell-Testsystem naturgemäß verschiedene zelluläre Prozesse mit ein (Zellaufnahme, Metabolisierung), die die Testergebnisse beeinflussen können, jedoch den Bedingungen im Organismus besser entsprechen.

Die Arbeiten dazu wurden während eines Forschungsaufenthalts am Institut Jules Bordet im Laboratoire J.-C. Heuson de Cancérologie Mammaire de Médecine der Université Libre de Bruxelles (Brüssel, Belgien) in der Arbeitsgruppe von Professor Guy Leclercq durchgeführt.

### 6.3.1 Untersuchung der Rezeptorbindung im Ganzzellassay

Für die Bestimmung der Rezeptorbindungsaffinität im *in-vitro*-Ganzzellassay werden konfluente MCF-7-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen einer Testsubstanz über einen Zeitraum von 45 min (37 °C / 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Dazu werden Verdünnungen der Testsubstanz in  $[^3\text{H}]\text{-E2}$ -haltigem MEM ( $10^{-9}$  M) hergestellt ( $10^{-5}$  -  $10^{-10}$  M) und auf die Zellen gebracht. Je nach Bindungsaffinität kommt es zur Verdrängung von markiertem E2 aus der ER-Bindungstasche (spezifische Bindung), die definitionsgemäß sättigbar ist. Zusätzlich muss die nicht sättigbare unspezifische Bindung (NSB, **n**on **s**pecific **b**inding)



z. B. an Proteine bestimmt werden. Dazu wird jeder Testsubstanzkonzentration ein Überschuss an unmarkiertem E2 (500-fach) zugesetzt und separat mitbestimmt. Zu Kontrollzwecken wird zusätzlich in jedem Test E2 ( $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M) getestet. Als Negativkontrolle werden Zellen mit Lösungsmittel (0.1%) in [ $^3$ H]-E2-haltigem Medium inkubiert. Nach beendeter Inkubation wird der Überschuss an frei vorliegendem [ $^3$ H]-E2 durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wird das gebundene [ $^3$ H]-E2 mit Ethanol aus den Zellen extrahiert und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit die verbleibende totale Radioaktivität jeder Probe im Flüssigkeitsszintillationszähler quantifiziert. Davon wird durch Subtraktion der zugehörigen NSB der spezifisch gebundene Anteil von [ $^3$ H]-E2 ermittelt. Die erhaltene Radioaktivität [dpm] einer Probe wird auf die Negativkontrolle (100% Radioaktivität) bezogen [302, 303, 304, 163] und als relative Radioaktivität ( $R_{\text{rel}}$  [%]) an [ $^3$ H]-E2 (Kapitel 9.2.7.1.4) gegen den Logarithmus der einzelnen Substanzkonzentrationen aufgetragen. Aus der sigmoiden Kurve wird der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt (Software: Origin 7.0). Der  $IC_{50}$ -Wert ist die Konzentration eines ER-Liganden, die zu einer 50%igen Reduktion der spezifischen Bindung des eingesetzten Radioliganden führt. Der Quotient aus dem  $IC_{50}$ -Wert (Software: Origin 7.0) von E2 und der Testsubstanz wird als RBA-Wert bezeichnet (Gleichung 6-1), der bei E2 definitionsgemäß 100% beträgt.

$$RBA [\%] = \frac{IC_{50E2} [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]}{IC_{50 \text{ Testsubstanz}} [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]} \cdot 100\%$$

Gleichung 6-1

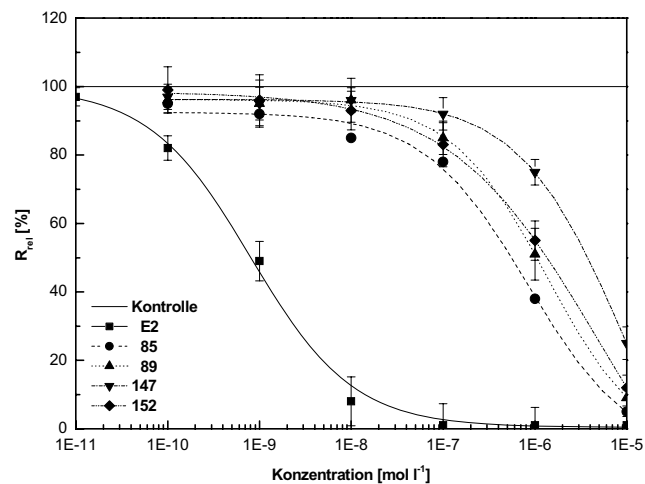
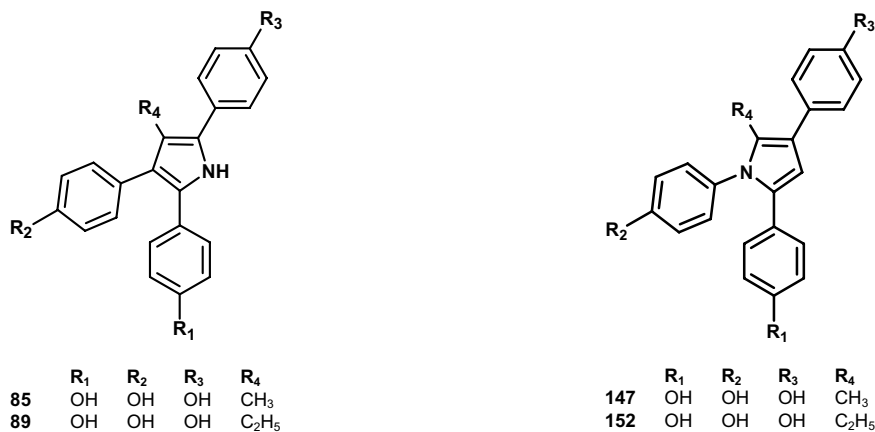
### 6.3.2 Untersuchung der Rezeptorbindung am isolierten hER $\alpha$ (HAP-Assay)

Darüber hinaus werden die Bindungsaffinitäten am isolierten humanen Estrogenrezeptor (hER $\alpha$ ) bestimmt. Im Gegensatz zum zellbasierten Assay werden hier verschiedene Einflussfaktoren wie die Aufnahme der Testsubstanz in die Zelle, die Passage durch die Kernmembran oder Metabolisierungsvorgänge ausgeschlossen. Im HAP-Assay wird der rekombinante ER $\alpha$  (Fa. Calbiochem) an eine [305] Hydroxyapatitmatrix (HAP-Matrix) gebunden und aliquotiert, wobei aufgrund der Empfindlichkeit des ER $\alpha$ -Proteins alle Versuchsschritte bei 4°C durchgeführt werden müssen. Anschließend werden verschiedene Konzentrationen einer Testsubstanz mit einer festen Konzentration [ $^3$ H]-E2 versetzt und damit die rezeptorhaltigen HAP-Pellets in einer Zweifachbestimmung für 12 h inkubiert. Nach Absaugen, Waschen und Zentrifugieren wird das gebundene [ $^3$ H]-E2 mit Ethanol extrahiert, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und vermessen. Die Bestimmung der NSB erfolgt analog zu Kapitel 6.3.1. Auch bei diesem Test wird E2 separat mitbestimmt und zur Negativkontrolle die rezeptorhaltige Matrix mit Lösungsmittel (0.1%) und

[<sup>3</sup>H]-E2 inkubiert. Als weiterer Kontrollwert wird die totale Menge an Radioaktivität eines mit [<sup>3</sup>H]-E2 behandelten Rezeptoraliquots ohne HAP-Matrix bestimmt, um die Funktionsfähigkeit und Brauchbarkeit des Rezeptors zu prüfen. Die graphische Auswertung erfolgt wie in Kapitel 6.3.1.

### 6.3.3 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Rezeptorbindungsaffinitäten der hergestellten Verbindungen wurden in einer initialen Studie analoge Typ-1- bzw. Typ-2-Pyrrole ausgewählt, die im Luciferaseassay eine geringe (**85**, **147**) bzw. ausgeprägte (**89**, **152**) estrogenere Wirkung aufwiesen. Ihre Affinität zum Estrogenrezeptor wurde über einen Konzentrationsbereich von  $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M im Ganzzellassay an MCF-7-Zellen bestimmt (Abbildung 6-15).



**Abbildung 6-15:** Darstellung der relativen Radioaktivität ( $R_{rel}$  [%]) des spezifisch gebundenen [<sup>3</sup>H]-E2 als Funktion des Logarithmus der Konzentration nach Inkubation von MCF-7-Zellen mit den Verbindungen **85**, **89**, **147** und **152**. Als 100%-Kontrolle wurden die Zellen mit [<sup>3</sup>H]-E2-haltigem Medium unter Zusatz von Lösungsmittel (0.1%) inkubiert, E2 wurde als Vergleichssubstanz mitgeführt (n=3).

Aus den Kurven wurden die  $IC_{50}$ -Werte bestimmt und daraus die RBA-Werte berechnet. (Tabelle 6-4). Anhand der Ergebnisse war eine starke Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Testsubstanzen gegenüber E2 erkennbar. Während E2 bereits bei  $10^{-8}$  M ca. 90% an  $[^3H]$ -E2 vom Rezeptor verdrängt hatte, wurde dieser Effekt bei den Testsubstanzen erst bei  $10^{-5}$  M beobachtet. Lediglich bei Verbindung 85 konnte ein RBA-Wert von über 0.1 % ermittelt werden. Daraus wird deutlich, dass die Testverbindungen eine sehr geringe Affinität zum ER aufweisen und > 1000-mal schwächer binden als E2.

| Verbindung | $IC_{50}$ [mol l <sup>-1</sup> ] | RBA [%] |
|------------|----------------------------------|---------|
| <b>E2</b>  | $9.3 \cdot 10^{-10}$             | 100     |
| <b>85</b>  | $8.4 \cdot 10^{-7}$              | 0.11    |
| <b>89</b>  | $1.3 \cdot 10^{-6}$              | 0.07    |
| <b>147</b> | $9.3 \cdot 10^{-6}$              | 0.01    |
| <b>152</b> | $5.1 \cdot 10^{-6}$              | 0.02    |

**Tabelle 6-4:**  $IC_{50}$ - und RBA-Werte der in Abbildung 6-15 dargestellten Verbindungen.

Die ermittelten RBA-Werte zeigen keine Korrelation zur Aktivität der Verbindungen im mit MCF-7-2a-Zellen durchgeführten Luciferaseassay. Darüber hinaus wiesen die im Luciferaseassay wirksameren Typ-2-Verbindungen keine höhere Rezeptorbindungsaffinität als die entsprechenden Typ-1-Derivate (**89**, RBA: 0.07%, **152**, RBA: 0.02%).

Anschließend wurden die Bindungsaffinitäten weiterer triarylierter Pyrrole bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuchs wurden die Substanzen in den nachfolgenden Experimenten in Konzentrationen von  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M eingesetzt. Außerdem wurde wegen der sehr geringen Bindungsaffinitäten auf die RBA-Wert-Berechnung verzichtet. Zur Beurteilung von Unterschieden im Bindungsverhalten wurde die relative Radioaktivität des spezifisch gebundenen  $[^3H]$ -E2 ( $R_{rel}$  [%]) nach Inkubation mit den Testsubstanzen in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M herangezogen. Diese ist umso kleiner, je größer die Affinität einer Testsubstanz zum ER ist.

In Tabelle 6-5 ist  $R_{\text{rel}}$  [%] für die untersuchten Verbindungen ( $10^{-6}$  M) nach Inkubation von MCF-7-Zellen (Ganzzellassay) bzw. des isolierten hER $\alpha$  (HAP-Assay) zusammengefasst.

| Verbindung | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | R <sub>6</sub> | MCF-7-Zellen:<br>R <sub>rel</sub> [%] bei 10 <sup>-6</sup> M | HAP-Assay:<br>R <sub>rel</sub> [%] bei 10 <sup>-6</sup> M |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|---|
| 76         | OH             | OH             | OH             | H              | H              | H              | 75.2 ± 9.8   | 81.5 ± 12.4   |
| 81         | OH             | OH             | OH             | H              | H              | Cl             | 35.3 ± 11.9  | 26.4 ± 8.3  |
| 82         | OH             | OH             | OH             | H              | Cl             | Cl             | 13.1 ± 3.2   | 19.1 ± 4.5  |
| 85         | OH             | OH             | OH             | Me             | H              | H              | 55.5 ± 5.9   | 59.4 ± 4.3  |
| 89         | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 49.1 ± 7.3   | 53.7 ± 8.1  |
| 90         | H              | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 51.7 ± 7.2   | 48.1 ± 7.5  |
| 91         | OH             | H              | OH             | Et             | H              | H              | 44.3 ± 8.8   | 43.7 ± 9.9  |
| 92         | OH             | OH             | H              | Et             | H              | H              | 55.7 ± 9.3   | 50.4 ± 7.3  |
| 93         | OH             | OH             | OH             | Prop           | H              | H              | 51.2 ± 7.4   | 53.5 ± 5.2  |
| 98         | OH             | OH             | OH             | p-OH-Phenyl    | H              | H              | 43.5 ± 7.3   | 49.3 ± 12.7   |
| 147        | OH             | OH             | OH             | Me             | H              | H              | 48.2 ± 8.1   | 42.9 ± 8.5  |
| 152        | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 74.5 ± 8.8   | 80.4 ± 8.2  |
| 153        | H              | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 28.3 ± 7.2   | 22.2 ± 7.9  |
| 154        | OH             | H              | OH             | Et             | H              | H              | 24.6 ± 7.4   | 35.7 ± 10.4   |
| 155        | OH             | OH             | H              | Et             | H              | H              | 17.9 ± 6.3   | 22.6 ± 9.2  |
| 156        | OH             | OH             | OH             | Et             | Cl             | H              | 41.2 ± 8.3   | 30.1 ± 7.1  |
| 157        | OH             | OH             | OH             | Prop           | H              | H              | 38.9 ± 9.7   | 37 ± 8.8  |
| 162        | OH             | OH             | OH             | Iso-Prop       | H              | H              | 14.2 ± 6.3   | 20.1 ± 10.6   |
| 166        | OH             | OH             | OH             | Iso-But        | H              | H              | 37.1 ± 5.8   | 40.2 ± 8.6  |

**Tabelle 6-5:**  $R_{\text{rel}}$  [%] nach Inkubation von MCF-7-Zellen (Ganzzellassay) bzw. dem isolierten hER $\alpha$  (HAP-Assay) mit den Testsubstanzen ( $10^{-6}$  M). Oben: 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole, unten: 1,3,5-Triaryl-1H-pyrrole, n=2.

Alle untersuchten Verbindungen waren in beiden Testsystemen nur in sehr geringem Maße in der Lage, [<sup>3</sup>H]-E2 aus der Rezeptorbindung zu verdrängen. Außerdem wurden in beiden Assays vergleichbare Bindungsaffinitäten gefunden. Es kann deshalb nicht davon ausgegangen werden, dass durch zelluläre Prozesse das Bindungsverhalten beeinflusst wird oder Metabolisierung stattfindet.

Aufgrund der sehr niedrigen Affinität zum Estrogenrezeptor ist eine Interpretation der Daten und die Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen nicht sinnvoll. Jedoch bestätigen die Testergebnisse aller untersuchten Verbindungen, dass eine Korrelation zwischen der Aktivität im Luciferaseassay (MCF-7-2a-Zellen) und der Rezeptorbindungsaffinität besteht.

Beispielsweise führten die analogen methyl- (**85**,  $R_{\text{rel}}$ : 59%), ethyl- (**89**,  $R_{\text{rel}}$ : 54%) und propylsubstituierten (**93**,  $R_{\text{rel}}$ : 59%) 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrole trotz unterschiedlicher estrogener Wirksamkeit im HAP-Assay bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M zu vergleichbaren Ergebnissen. Außerdem führte die Untersuchung der dihydroxylierten Ethylanaloga **90** ( $R_{\text{rel}}$ : 48%), **91** ( $R_{\text{rel}}$ : 44%) und **92** ( $R_{\text{rel}}$ : 50%) zu keinem unterschiedlichen Bindungsverhalten, obwohl die Position der Hydroxygruppen im Luciferaseassay einen starken Einfluss auf die estrogene Potenz der Verbindungen ausübte. Die chlorhaltigen Derivate (**81**,  $R_{\text{rel}}$ : 26% und **82**,  $R_{\text{rel}}$ : 19%) führten trotz fehlender estrogener Eigenschaften zu einer vergleichsweise starken Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]-E2.

Auch die Untersuchungsergebnisse der alkylhomologen 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole konnten nicht in Zusammenhang mit den Ergebnissen des Luciferaseassays gebracht werden. Das dort wenig aktive methylierte Derivat (**147**,  $R_{\text{rel}}$ : 43%) war im kompetitiven Bindungsassay wirksamer als sein Ethylanalogon (**152**,  $R_{\text{rel}}$ : 80%), welches jedoch das deutlich stärkere Estrogen darstellt. Für die ethylsubstituierten Dihydroxyderivate **153** ( $R_{\text{rel}}$ : 22%), **154** ( $R_{\text{rel}}$ : 36%) und **155** ( $R_{\text{rel}}$ : 23%) wurden vergleichsweise höhere Bindungsaffinitäten beobachtet. Die chlorierte ethylsubstituierte Verbindung **156** führte trotz fehlender Estrogenität zu einer Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]-E2 vom Rezeptor ( $R_{\text{rel}}$ : 30%). Bei der im Luciferaseassay aktivsten Verbindung **166** ( $10^{-6}$  M) betrug  $R_{\text{rel}}$  40%.

## 6.4 Untersuchung des ER $\alpha$ -Gehalts

Die Liganden des Estrogenrezeptors beeinflussen den ER-Gehalt in charakteristischer Weise. Da Estrogene wie E2 oder DES zu einer ausgeprägten down-Regulierung des Estrogenrezeptors führen, sollte durch die Untersuchung des ER-Gehalts festgestellt werden, ob die neu synthetisierten Verbindungen einen ähnlichen Effekt ausüben. Zum Nachweis der estrogenen Wirkung werden deshalb ER-positive MCF-7-Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend ihr ER $\alpha$ -Gehalt untersucht. Dazu werden die Zellproteine elektrophoretisch aufgetrennt und das ER $\alpha$ -Protein in einem Enzymimmunoassay (Western Blot) durch Auslösen einer Chemolumineszenzreaktion quantifiziert.

Da der E2-induzierte ER-Abbau über den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg vermittelt wird (siehe Kapitel 1.2.5), sollte außerdem geklärt werden, ob auch der durch die Verbindungen ausgelöste ER-Abbau über das UPS verläuft. Zu diesem Zweck sollten Versuche durchgeführt werden, in denen die Zellen gleichzeitig mit dem Proteasomeninhibitor MB 231 inkubiert werden.

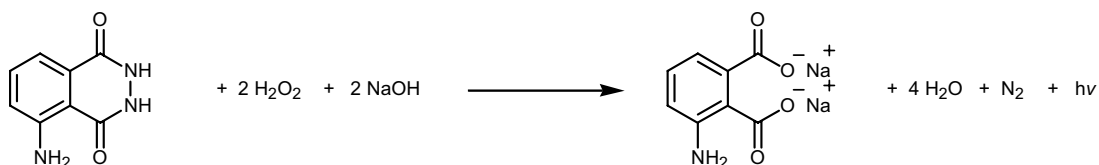
Die Untersuchungen wurden ebenfalls im Arbeitskreis von Prof. Leclercq in Brüssel durchgeführt.

### 6.4.1 Enzymimmunoassay (Western Blot)

Nahezu konfluente MCF-7-Zellen werden mit verschiedenen Konzentrationen einer Verbindung für 24 h inkubiert. Bei Versuchen mit MG 231 beträgt die Inkubationszeit aufgrund seiner toxischen Eigenschaften 4 h. Als Negativkontrolle werden zusätzlich Zellen mit reinem Lösungsmittel (0.1%), als Positivkontrolle mit E2 ( $10^{-8}$  M) versetzt.

Durch Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen wird der Test beendet. Anschließend werden die Zellen lysiert, das Lysat homogenisiert und die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wird aliquotiert, wobei ein Aliquot zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Probe dient. Dazu wird ein BCA- (**b**icin**o**nic **a**cid)-Assay durchgeführt, der auf einer Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch Proteine in alkalischem Milieu beruht. Cu(I) bildet mit BCA einen intensiv gefärbten Komplex, der UV-spektroskopisch bei 550 nm quantifiziert werden kann. Durch Mitbestimmung einer BSA- (**b**ovine **s**erum **a**lbumin)-Standardreihe kann der Gesamtproteingehalt der Probe bestimmt werden.

Zur Quantifizierung des ER $\alpha$  erfolgt zunächst die elektrophoretische Auftrennung der Proteine unter Verwendung des zweiten Aliquots. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit verschiedener Proben wird das Beladungsvolumen der Elektrophoresegelplatten so berechnet, das der Gesamtproteingehalt (ca. 5-10  $\mu$ g) der einzelnen Proben gleich ist. Nach der Elektrophorese wird der Gelinhalt in einem „semidry“-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wird gewaschen und zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen mit einer 5%igen Magermilchpulveremulsion in TBS- (**t**ris **b**uffer **s**aline)-Tween versetzt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit murinem ER $\alpha$ - sowie Aktin-Antikörper, wobei Aktin den internen Standard darstellt. Danach werden die primären Antikörper durch Zugabe von HRP- (**h**orse **r**adish **p**eroxidase)-gekoppeltem Anti-Maus-IgG markiert, die Membran anschließend gewaschen und mit einem Luminolhaltigen Substrat (Fa. Pierce) 5 min inkubiert. Die aus dem Meerrettich stammende Peroxidase katalysiert dabei die Umsetzung von Luminol in dessen oxidierte Form unter Emission von Licht bei 430 nm (Abbildung 6-16).



**Abbildung 6-16:** Luminol-Reaktion.

Mithilfe eines optischen Kamerasystems zur Detektion von Schwachlicht-Chemolumineszenzen (CCD-Kamera) kann es erfasst und quantifiziert werden.

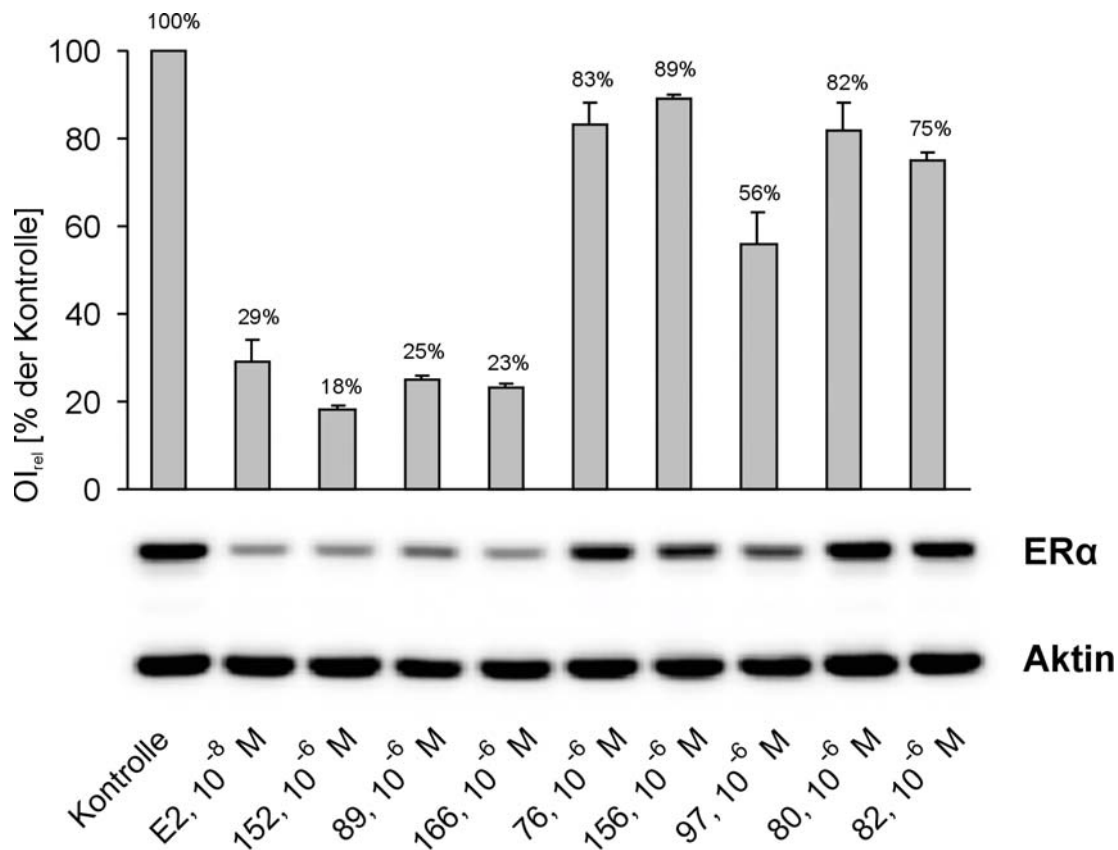
Die Proteinbanden von ER $\alpha$  und Aktin werden visualisiert und die optischen Intensitäten (OI) bestimmt, welche mit dem jeweiligen Proteingehalt korrelieren. Anschließend wird die optische Intensität jeder ER $\alpha$ -Bande durch die optische Intensität der zugehörigen Aktinbande (interner Standard) korrigiert (OI<sub>rel</sub>). Diese stellt bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, deren OI<sub>rel</sub> 100% beträgt, ein Maß für den ER $\alpha$ -Gehalt dar.

### 6.4.2 Ergebnisse

In einem ersten Versuch wurden die ethylsubstituierten Typ-1- bzw. Typ-2-analogen Verbindungen **89** und **152**, die im Luciferaseassay eine hohe estrogenische Wirksamkeit zeigten, in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M untersucht. Das als Positivkontrolle mitgeführte E2 wurde in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M verwendet, in der es seine maximale down-regulatorische Wirkung auf den Rezeptorgehalt zeigt (ER $\alpha$ : 29%). Auch die ethylsubstituierten Pyrrole **89** und **152**, die zunächst in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M eingesetzt wurden, bewirkten eine ausgeprägte Abnahme des ER $\alpha$ -Gehalts. Dabei zeigte die Typ-2-Verbindung **152**, ähnlich wie im Luciferaseassay, eine stärkere Wirkung als das analoge Typ-1-Pyrrol. Nach Inkubation mit Verbindung **89** verringerte sich der Rezeptorgehalt auf 43%, mit Verbindung **152** auf 18%. Interessanterweise konnte mit **152** ( $10^{-6}$  M) eine stärkere ER-down-Regulierung induziert werden als durch E2 (Abbildung 6-17).

Um eine mögliche Korrelation der Ergebnisse des Luciferaseassays mit den ER-down-regulatorischen Eigenschaften näher zu untersuchen, wurden als nächstes Verbindungen, die keine oder nur geringe estrogenische Potenz aufwiesen, eingesetzt. Dazu wurden Zellen zunächst mit 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen (Typ 1) inkubiert. Die nicht alkylierte, trihydroxylierte Verbindung **76** beeinflusste den Rezeptorgehalt kaum (ER $\alpha$ : 83%). Auch die mono- (**80**) bzw. dichlorierten (**82**) Derivate führten nur zu einer geringen Gehaltsabnahme von ER $\alpha$  auf 82% bzw. 75%. Im Gegensatz dazu zeigte 2-(4-Chlor-2-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-3-propyl-1*H*-pyrrol (**97**), das im Luciferaseassay die Transkription aktivierte, ( $59\%$ ,  $10^{-6}$  M) eine stärkere Wirkung (ER $\alpha$ : 56%).

Das chlorierte, im Luciferaseassay unwirksame 3-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-2-ethyl-1,5-bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**156**) zeigte auch im Western Blot kaum Wirkung (ER $\alpha$ : 89%). Im Vergleich dazu bewirkte die isopropylsubstituierte Verbindung **166**, die im Luciferaseassay eine ausgeprägte estrogenische Wirkung zeigte, auch eine ausgeprägte ER-down-Regulierung auf 23% (Abbildung 6-17).



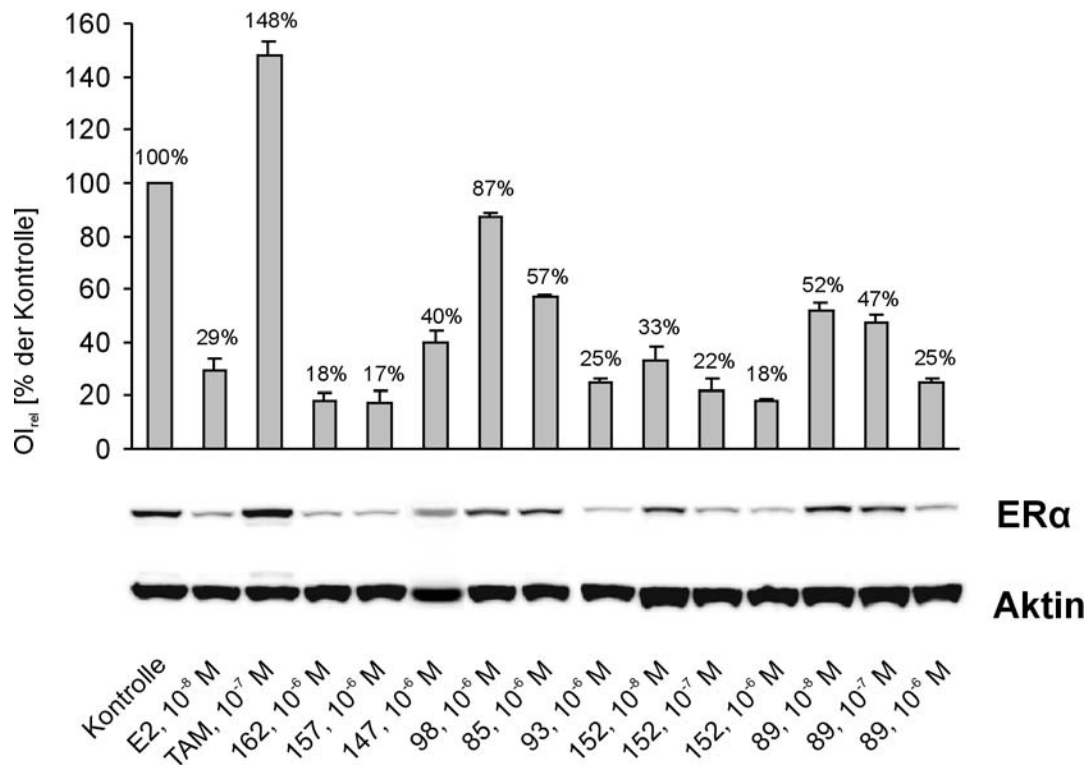
**Abbildung 6-17:** Darstellung von OI<sub>rel</sub> [% der Kontrolle] als Maß für den ER $\alpha$ -Gehalt. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit den Verbindungen **152**, **89**, **166**, **76**, **156**, **97**, **80** und **82** in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M inkubiert und ER $\alpha$  nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im Western Blot quantifiziert.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkpotenz der ethylanalogen Verbindungen **89** (Typ 1) und **152** (Typ 2) auf die ER-down-Regulierung näher untersucht. Dazu wurden die MCF-7-Zellen jeweils mit Konzentrationen von 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> und 10<sup>-6</sup> M inkubiert. 3-Ethyl-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**89**) führte dabei zu einer Abnahme des ER $\alpha$ -Gehalts auf 52%, 47% und 25%, die analoge Typ-2-Verbindung **152** zu einer Abnahme auf 33%, 22% und 18%. Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung der Verbindungen auf den Rezeptorgehalt nicht direkt proportional zur eingesetzten Konzentration zu sein scheint. Zur Aufklärung dieses Sachverhalts müsste die Untersuchung einer engmaschigen Konzentrationsreihe erfolgen. Der down-regulatorische Effekt von **152** (33%, 10<sup>-8</sup> M) war mit dem von E2 (29%, 10<sup>-8</sup> M) vergleichbar.

Weiterhin wurden die Zellen mit den alkylhomologen trihydroxylierten 1,3,5-triarylierten Pyrrolen in einer Testkonzentration von 10<sup>-6</sup> M inkubiert. Das trihydroxylierte Methylderivat (**147**), das Propylderivat (**157**) und das Isopropylderivat (**162**) führten zu einer Reduktion des ER $\alpha$ -Gehalts auf 40%, 17% und 18%, was im Einklang mit ihren estrogenen Eigenschaften steht.



Beide Verbindungen führten in dieser Konzentration zu einer stärkeren ER $\alpha$ -Gehaltsabnahme als von E2 maximal induzierbar (ER $\alpha$ : 29%, 10<sup>-8</sup> M).

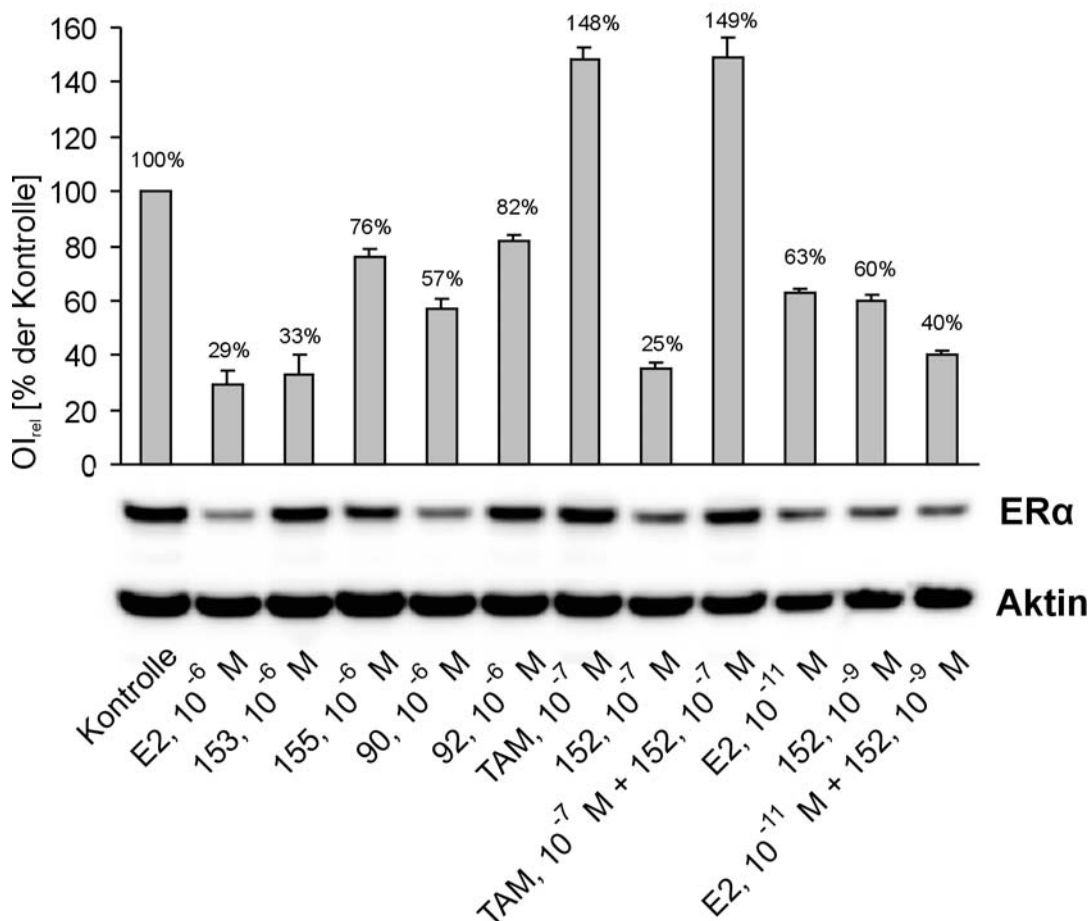


**Abbildung 6-18:** Darstellung von OI<sub>rel</sub> [% der Kontrolle] als Maß für der ER $\alpha$ -Gehalt. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit TAM (10<sup>-7</sup> M) sowie mit den Verbindungen **162**, **157**, **147**, **98**, **85** und **93** in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M sowie Verbindungen **152** und **89** in Konzentrationen von 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M und 10<sup>-6</sup> M inkubiert und ER $\alpha$  nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im Western Blot quantifiziert.

Auch die Untersuchung der alkylsubstituierten Trihydroxyderivate des 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrroltyps ergab ein ähnliches Bild. Während das ethylsubstituierte Derivat **89** zu einer optischen Intensität von 18% (10<sup>-6</sup> M) führte, wurde analog der agonistischen Potenz nach Inkubation mit dem Methylderivat **85** eine ER-down-Regulierung auf 57% und nach Inkubation mit dem Propylderivat **93** auf 25% erhalten (Abbildung 6-18). Dagegen reduzierte die tetraarylierte Verbindung **98** den ER $\alpha$ -Gehalt lediglich auf 87%. Als Vergleichssubstanzen wurde neben E2 (10<sup>-8</sup> M) auch TAM (10<sup>-7</sup> M) eingesetzt, das wie in der Literatur beschrieben [160, 164], eine ER-up-Regulierung bewirkte (optische Intensität: 148%) (Abbildung 6-18).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden dihydroxylierte Derivate untersucht. Dazu wurde mit den Typ-2-Pyrrolen 2-Ethyl-1,3-bis(4-hydroxyphenyl)-5-phenyl-1*H*-pyrrol (**153**) und 2-Ethyl-1,5-bis(4-hydroxyphenyl)-3-phenyl-1*H*-pyrrol (**155**) inkubiert. Während die im Luciferaseassay unwirksame Verbindung **155** eine ER $\alpha$ -Gehaltsabnahme auf lediglich 76% bewirkte, führte das estrogen wirksame Dihydroxyderivat **153** zu einer starken

ER-down-Regulierung (ER $\alpha$ : 33%). Das im Luciferaseassay aktive Typ-1-Derivat 3-Ethyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)-5-phenyl-1*H*-pyrrol (**90**) reduzierte den ER $\alpha$ -Gehalt auf 53%, wohingegen das inaktive 3-Ethyl-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenyl-1*H*-pyrrol (**92**) den ER $\alpha$ -Gehalt lediglich auf 82% bezogen auf die Negativkontrolle verminderte (Abbildung 6-19).



**Abbildung 6-19:** Darstellung von OI<sub>rel</sub> [% der Kontrolle] als Maß für den ER $\alpha$ -Gehalt. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit den Verbindungen **153**, **155**, **90** und **92** in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M sowie Verbindung **152** (10<sup>-7</sup> M) und in Kombination mit TAM (10<sup>-7</sup> M), **152** (10<sup>-9</sup> M) und in Kombination mit E2 (10<sup>-11</sup> M) inkubiert. ER $\alpha$  wird nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im Western Blot quantifiziert.

Die Untersuchungsergebnisse konnten einen engen Zusammenhang zwischen der estrogenen Wirksamkeit der Verbindungen und der von ihr ausgelösten ER-down-Regulierung aufzeigen, wobei eine hohe estrogenen Aktivität eine starke ER-down-Regulierung zur Folge hatte. Interessanterweise bewirkten die Verbindungen **152**, **157**, **162** und **166** in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M eine stärkere Abnahme ER $\alpha$ -Gehalts als durch E2 maximal erreichbar war (29%, 10<sup>-8</sup> M).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-6 zusammengefasst.

| Verbindung             | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | R <sub>6</sub> | OI <sub>rel</sub> [% der Kontrolle] bei 10 <sup>-6</sup> M |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|
| <b>E2<sup>a)</sup></b> |                |                |                |                |                |                | 29 ± 5   |
| <b>76</b>              | OH             | OH             | OH             | H              | H              | H              | 83 ± 5   |
| <b>80</b>              | OH             | OH             | OH             | H              | Cl             | H              | 82 ± 6   |
| <b>82</b>              | OH             | OH             | OH             | H              | Cl             | Cl             | 75 ± 2   |
| <b>85</b>              | OH             | OH             | OH             | Me             | H              | H              | 57 ± 1   |
| <b>89</b>              | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 25 ± 1, 47 ± 3 <sup>b)</sup> , 52 ± 3 <sup>a)</sup>        |
| <b>90</b>              | H              | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 57 ± 4   |
| <b>92</b>              | OH             | OH             | H              | Et             | H              | H              | 82 ± 2   |
| <b>93</b>              | OH             | OH             | OH             | Prop           | H              | H              | 25 ± 4   |
| <b>97</b>              | OH             | OH             | Cl             | Prop           | OH             | H              | 56 ± 7   |
| <b>98</b>              | OH             | OH             | OH             | p-OH-Phenyl    | H              | H              | 87 ± 2   |
| <b>147</b>             | OH             | OH             | OH             | Me             | H              | H              | 40 ± 1   |
| <b>152</b>             | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 18 ± 1, 22 ± 4 <sup>b)</sup> , 33 ± 5 <sup>a)</sup>        |
| <b>153</b>             | H              | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 33 ± 7   |
| <b>155</b>             | OH             | OH             | H              | Et             | H              | H              | 76 ± 3   |
| <b>156</b>             | OH             | OH             | OH             | Et             | Cl             | H              | 89 ± 1   |
| <b>157</b>             | OH             | OH             | OH             | Prop           | H              | H              | 17 ± 5   |
| <b>162</b>             | OH             | OH             | OH             | Iso-Prop       | H              | H              | 18 ± 3   |
| <b>166</b>             | OH             | OH             | OH             | Iso-But        | H              | H              | 23 ± 1   |

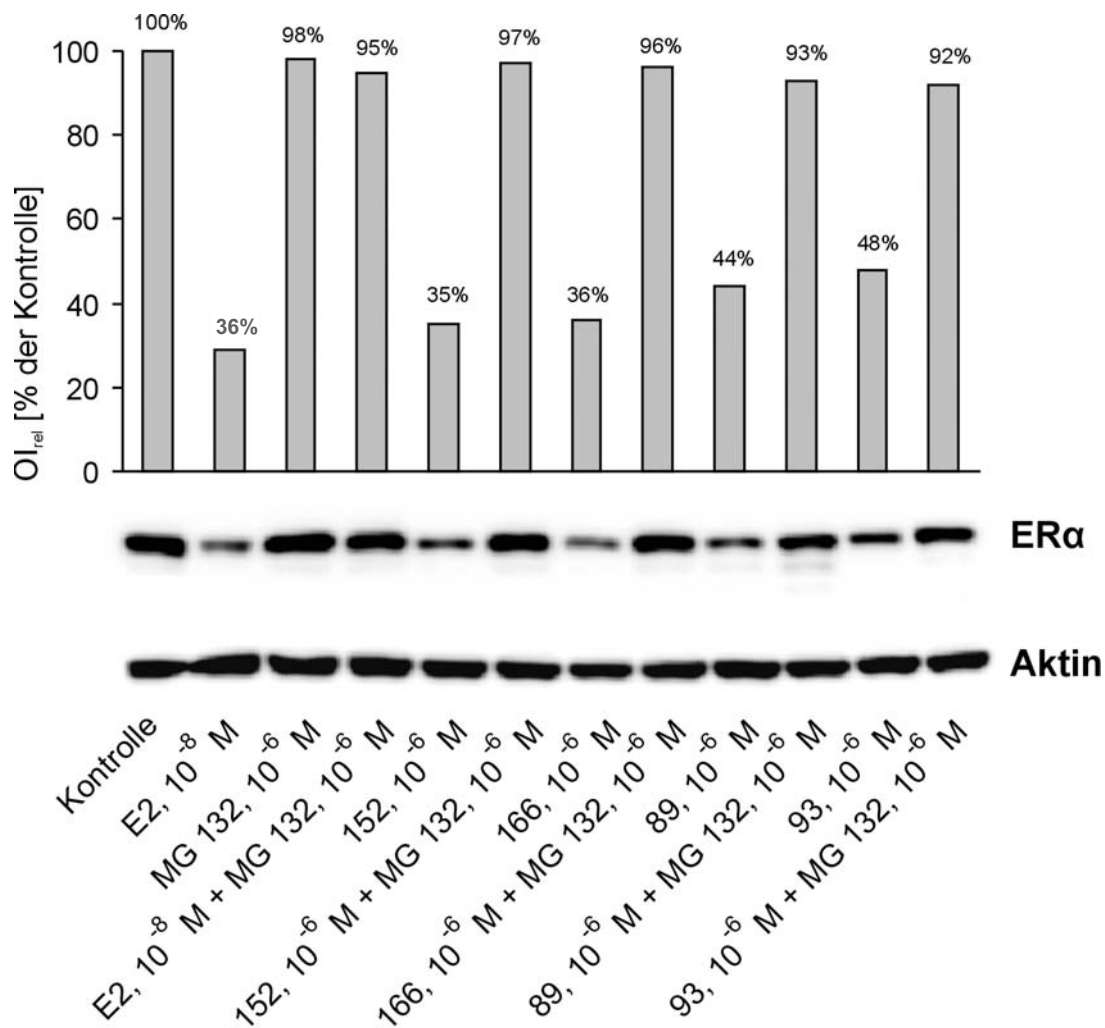
**Tabelle 6-6:** OI<sub>rel</sub> [% der Kontrolle] als Maß für den ER $\alpha$ -Gehalt. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit den Testverbindungen (10<sup>-6</sup> M) für 24 h inkubiert. Oben: Typ-1-Pyrrole, unten: Typ-2-Pyrrole, <sup>a)</sup> 10<sup>-8</sup> M, <sup>b)</sup> 10<sup>-7</sup> M.

In einem weiteren Versuch sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Effekten der neuen Pyrrole und TAM bzw. E2 auf die ER-Regulierung besteht. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit 2-Ethyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**152**) und TAM gleicher Konzentration (10<sup>-7</sup> M) für 24 h koinkubiert (Abbildung 6-19). Die von TAM induzierte ER-up-Regulierung (ER $\alpha$ : 148%) blieb unverändert, was vermuten lässt, dass die Effekte beider Verbindungen auf die ER-Regulierung durch unterschiedliche Wirkmechanismen vermittelt werden.

Außerdem wurde untersucht, ob die Einzeleffekte von E2 und **152** auf die Rezeptor-down-Regulierung durch Koinkubation beider Substanzen verstärkt werden können. Dazu wurden nicht optimale Konzentrationen von **152** (10<sup>-9</sup> M) bzw. E2 (10<sup>-11</sup> M) jeweils einzeln verwendet sowie gemeinsam zu den Zellen gegeben. Während E2 den ER $\alpha$ -Gehalt auf

63% und **152** auf 60% reduzierte, verstärkte sich bei Koinkubation beider Substanzen der down-regulatorische Effekt (ER $\alpha$ : 42%) (Abbildung 6-19), was einen gleichen Wirkmechanismus zur Auslösung des ER-Abbaus vermuten lässt.

Um eine E2-artige Induktion des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS) nachzuweisen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz Koinkubationsexperimente mit dem Proteasomeninhibitor MG 132 durchgeführt. Dazu wurden MCF-7-Zellen für 4 h separat mit E2 ( $10^{-8}$  M), mit den Testverbindungen ( $10^{-6}$  M) und mit MG 132 ( $10^{-6}$  M) inkubiert sowie jeweils mit MG 132 koinkubiert (Abbildung 6-20).



**Abbildung 6-20:** Darstellung von  $OI_{rel}$  [% der Kontrolle] als Maß für den ER $\alpha$ -Gehalt. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit MG 132 ( $10^{-6}$  M), E2 ( $10^{-8}$  M) sowie den Verbindungen **152**, **166**, **89** und **93** in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M sowie in Kombination mit MG 132 für 4 h inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wird ER $\alpha$  im Western Blot quantifiziert.

Wie in der Literatur beschrieben, konnte der down-regulatorische Effekt von E2 (ER $\alpha$ -Gehalt: 36%) durch Zugabe von MG 132 aufgehoben werden [145]. Auch die durch die eingesetzten Pyrrole (Typ 1: **89**, **93** und Typ 2: **152**, **166**) ausgelöste ER-down-Regulierung wurde durch MG 132 inhibiert. Während durch die Testsubstanzen der

ER $\alpha$ -Gehalt auf 35% (**152**), 36% (**166**), 44% (**89**) und 48% (**93**) sank, waren nach Zusatz von MG 132 ER $\alpha$ -Gehalte von 97% (**152**), 96% (**166**), 93% (**89**) und 92% (**93**) messbar.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-7 zusammengefasst.

| Verbindung  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | R <sub>6</sub> | OI <sub>rel</sub> [% der Kontrolle] bei 10 <sup>-6</sup> M         |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|
| <b>E2</b>   |                |                |                |                |                |                | 29 ± 5 <sup>a)</sup> , 63 ± 1 <sup>c)</sup> , 36 ± 1 <sup>e)</sup> |
| <b>152</b> <sup>b)</sup>                              | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 60 ± 2   |
| <b>E2</b> <sup>c)</sup> + <b>152</b> <sup>b)</sup>    |                |                |                |                |                |                | 40 ± 2   |
| <b>TAM</b> <sup>d)</sup>                              |                |                |                |                |                |                | 148 ± 5  |
| <b>152</b> <sup>d)</sup>                              | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 25 ± 2   |
| <b>TAM</b> <sup>d)</sup> + <b>152</b> <sup>d)</sup>   |                |                |                |                |                |                | 149 ± 7  |
| <b>MG 132</b> <sup>f)</sup>                           |                |                |                |                |                |                | 98   |
| <b>E2</b> <sup>e)</sup> + <b>MG 132</b> <sup>f)</sup> |                |                |                |                |                |                | 95   |
| <b>152</b> <sup>f)</sup>                              | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 35   |
| <b>MG 132</b> + <b>152</b> <sup>f)</sup>              |                |                |                |                |                |                | 97   |
| <b>166</b> <sup>f)</sup>                              | OH             | OH             | OH             | Iso-But        | H              | H              | 36   |
| <b>MG 132</b> + <b>166</b> <sup>f)</sup>              |                |                |                |                |                |                | 96   |
| <b>89</b> <sup>f)</sup>                               | OH             | OH             | OH             | Et             | H              | H              | 44   |
| <b>MG 132</b> + <b>89</b> <sup>f)</sup>               |                |                |                |                |                |                | 93   |
| <b>93</b> <sup>f)</sup>                               | OH             | OH             | OH             | Prop           | H              | H              | 48   |
| <b>MG 132</b> + <b>93</b> <sup>f)</sup>               |                |                |                |                |                |                | 92   |

**Tabelle 6-7:** OI<sub>rel</sub> [% der Kontrolle] als Maß für den ER $\alpha$ -Gehalt. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit den Testverbindungen (10<sup>-6</sup> M) für 24 h inkubiert. <sup>a)</sup> 10<sup>-8</sup> M, <sup>b)</sup> 10<sup>-9</sup>, <sup>c)</sup> 10<sup>-11</sup>, <sup>d)</sup> 10<sup>-7</sup> M, <sup>e)</sup> 10<sup>-8</sup> M, Inkubationszeit: 4 h, <sup>f)</sup> 10<sup>-6</sup> M, Inkubationszeit: 4 h.

Aufgrund dieser Untersuchungen kann von einer E2-artigen Beeinflussung der neu synthetisierten Verbindungen der ER-Regulierung ausgegangen werden.

Interessanterweise scheinen die untersuchten Verbindungen und E2 in ähnlicher Stärke den Estrogenrezeptorgehalt zu verringern, obwohl E2 das deutlich potentere Estrogen darstellt. So konnten gleiche Konzentrationen (10<sup>-8</sup> M) von 2-Ethyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol (**152**) und E2 einen ähnlichen Effekt auf den ER $\alpha$ -Gehalt ausüben (ER $\alpha$  **152**: 33%, ER $\alpha$  E2: 29%). Demgegenüber wies Verbindung **152** im Luciferaseassay eine um den Faktor 1000 geringere Wirkpotenz als E2 auf (E2: EC<sub>50</sub>: 1.8·10<sup>-11</sup> M, **152**: EC<sub>50</sub>: 2.5·10<sup>-8</sup> M).

## 6.5 Testung auf Hemmung der Zellproliferation

Zur Beurteilung der antiproliferativen Eigenschaften einer Verbindung kann die Bestimmung der Zellmasse erfolgen. Diese ist proportional zur Zellzahl und wird mithilfe eines kolorimetrischen Verfahrens (Kristallviolett-Assay) ermittelt. Dazu werden die Zellen in einer definierten Aussaatdichte in 96-Lochplatten pipettiert und nach einer Anwachszeit von 48 h (MDA-MB-231-Zellen) bzw. 72 h (MCF-7-Zellen) mit Testsubstanzen verschiedener Konzentrationen versetzt und anschließend im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle dient Cisplatin, als Negativkontrolle reines Lösungsmittel. Die Substanzinkubation wird beendet, indem das Medium abgesaugt und die Zellen mit Glutardialdehyd am Plattenboden fixiert werden. Tote Zellen, die nicht mehr am Plattenboden haften, werden vorher entfernt. Bis zur Kristallviolett-färbung werden die fixierten Zellen mit PBS überschichtet und bei 4° C aufbewahrt. Alle Platten eines Tests werden nun mit Kristallviolett, das hauptsächlich DNA-assoziierte Nukleoproteine anfärbt, versetzt. Der Überschuss an Farbstoff wird mit Wasser ausgewaschen und die verbleibende Menge mit 70% Ethanol vollständig aus den Zellen extrahiert. Die Extinktion der ethanolischen Lösungen wird bei 590 nm UV-spektroskopisch vermessen und daraus die relative prozentuale Wachstumshemmung ( $T/C_{\text{korr}}$ ) berechnet (siehe Kapitel 9.2.6.8). Zur Bestimmung der Ausgangszellmenge wird eine separate Platte bereits zum Zeitpunkt der Substanzzugabe ( $t_0$ -Platte) abgestoppt, die als Korrekturwert in die Berechnung eingeht.

Zur Bewertung der antiproliferativen Eigenschaften einer Substanz mithilfe der  $T/C_{\text{korr}}$ -Werte kann folgende Einteilung herangezogen werden:

$T/C_{\text{korr}} > 80\%$             keine antiproliferative Wirkung

$T/C_{\text{korr}} < 80\%$             antiproliferative Wirkung

$T/C_{\text{korr}} 20\text{-}0\%$             zytostatische Wirkung

$T/C_{\text{korr}} < 0\%$             zytozide Wirkung

Als zytotoxische Wirkung wird jede negative Beeinflussung des Zellwachstums verstanden.

### 6.5.1 Ergebnisse

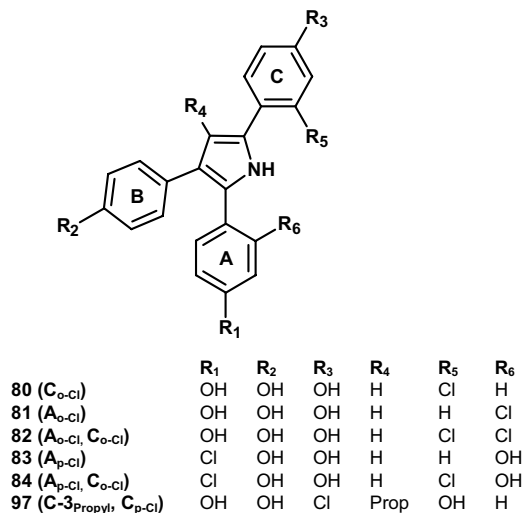
Von besonderem Interesse war die Untersuchung der antiproliferativen Eigenschaften von Verbindungen, bei denen hohe Konzentrationen im Transkriptionsaktivierungsassay zu einem Aktivitätsrückgang bzw. einer Abnahme der Zellzahl in der dort durchgeführten Zellmassebestimmung führten. Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen der wachstumshemmenden Wirkung einer Substanz und dem estrogenen Signalweg besteht, wurde die Testung sowohl an hormonabhängigen MCF-7-Zellen als auch an hormonunabhängigen MDA-MB-231-Zellen vorgenommen.

Für den zeitabhängigen Test wurden die Zellen mit den Testsubstanzen in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  versetzt und im Brutschrank inkubiert. Das Zellwachstum wurde an fünf aufeinander folgenden Zeitpunkten abgestoppt, wobei der letzte Abstopzeitpunkt nach sieben (MDA-MB-231-Zellen) bzw. neun Tagen (MCF-7-Zellen) erreicht wurde. Anschließend erfolgten die Zellmassenbestimmung, die Berechnung der  $T/C_{\text{kor}}$ -Werte und deren graphische Darstellung als Funktion der Zeit. Während bei dieser Testmethode die Beobachtung des kinetischen Verlaufs der Wirkung im Vordergrund steht, wird im konzentrationsabhängigen Test die Wirksamkeit einer Verbindung näher beurteilt.

Deshalb wurden die im zeitabhängigen Test antiproliferativ wirkenden Testsubstanzen anschließend auch im konzentrationsabhängigen Test untersucht. Dazu wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen einer Testsubstanz inkubiert (0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ) und das Zellwachstum an einem Zeitpunkt, nach 72 h (MDA-MB-231-Zellen) bzw. 96 h (MCF-7-Zellen), abgestoppt [306]. Die graphische Auswertung erfolgte durch Auftragen der  $T/C_{\text{kor}}$ -Werte gegen den Logarithmus der Konzentration. Mithilfe der Boltzmann-Funktion (Software: Origin 7.0) wurde eine sigmoide Kurve ermittelt und daraus die Substanzkonzentration, die die Zellmasse um 50% gegenüber der Negativkontrolle (reines Lösungsmittel) herabsetzt ( $\text{IC}_{50}$ -Wert), ermittelt.

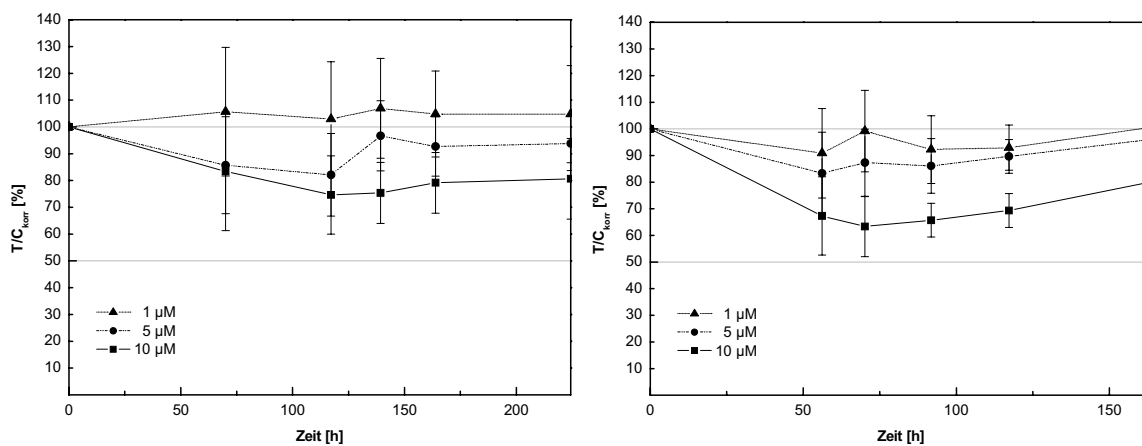
### 6.5.1.1 Chlorierte 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole

Während nicht chlorierte, hydroxylierte 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole über einen Untersuchungszeitraum von sieben bzw. neun Tagen zu keiner negativen Beeinflussung des Zellwachstums führten (Ergebnisse nicht gezeigt), wiesen die chlorierten Verbindungen (Abbildung 6-21) zytotoxische Substanzeigenschaften auf.



**Abbildung 6-21:** Chlorierte 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrole mit zytotoxischen Eigenschaften.

Um dabei die Rolle der Chlorsubstitution näher zu charakterisieren, wurden zunächst die nicht alkylierten Verbindungen, die an verschiedenen Aromaten in *ortho*-Position monochloriert sind, untersucht.

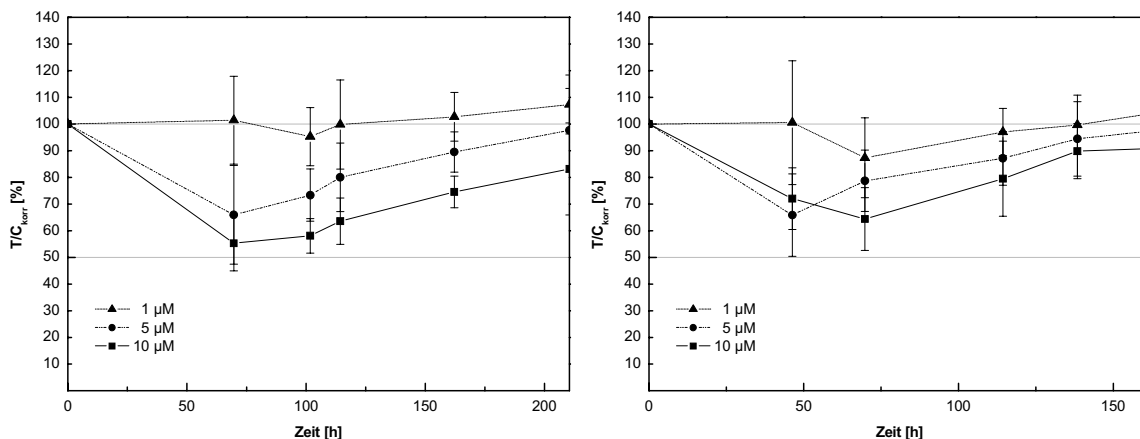


**Abbildung 6-22:** Antiproliferative Wirkung von Verbindung **80** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, n = 16.

Im zeitabhängigen Test führte 5-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol (**80**, C<sub>o</sub>-Cl) in einer Testkonzentration von 10 µM an MCF-7-Zellen (T/C<sub>korr</sub>: 76%, 10 µM) und MDA-MB-231-Zellen (T/C<sub>korr</sub>: 64%, 10 µM) zu einer moderaten Wachstums- hemmung (Abbildung 6-22), während der antiproliferative Effekt des an Aromat A



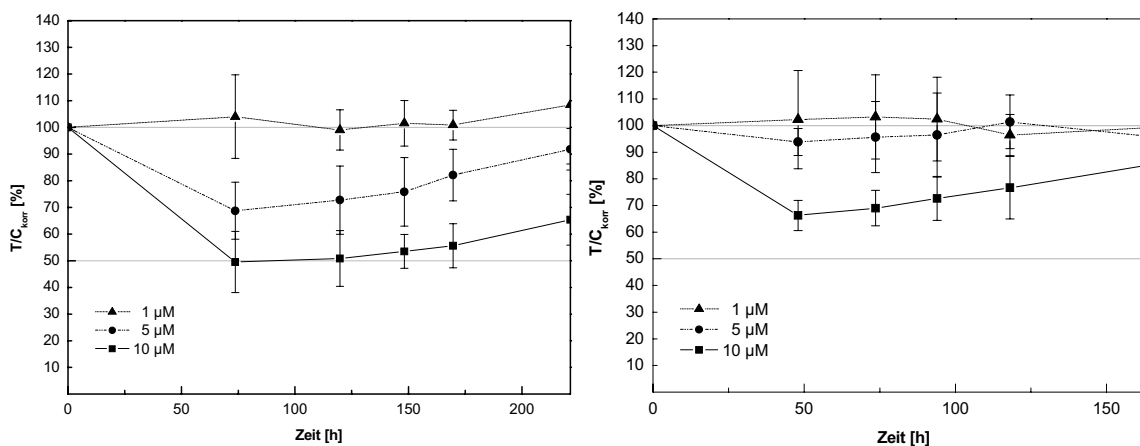
*ortho*-chlorierten Analogons **81** ( $A_{o-Cl}$ ) an MCF-7-Zellen stärker war ( $T/C_{\text{korrr}}$ : 56%, 10  $\mu\text{M}$ ) (Abbildung 6-23).



**Abbildung 6-23:** Antiproliferative Wirkung von Verbindung **81** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen,  $n = 16$ .

Diese Wirkverstärkung an MCF-7-Zellen wurde auch bei der Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte beobachtet (Tabelle 6-8; S. 104).

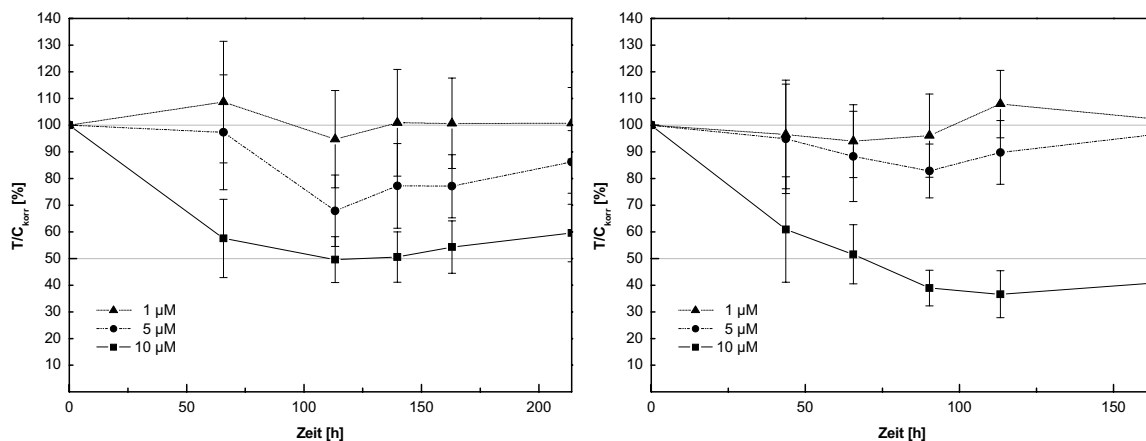
Im nächsten Schritt wurde Verbindung 2,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**82**,  $A_{o-Cl}, C_{o-Cl}$ ) untersucht. Gegenüber seinen monochlorierten Analoga wies **82** an MCF-7-Zellen ( $T/C_{\text{korrr}}$ : 48%, 10  $\mu\text{M}$ ) eine stärkere Zytotoxizität auf, während die Hemmwirkung an MDA-MB-231-Zellen ( $T/C_{\text{korrr}}$ : 64%, 10  $\mu\text{M}$ ) nicht verstärkt wurde (Abbildung 6-24). Auch die anschließend bestimmten  $IC_{50}$ -Werte spiegelten diesen Sachverhalt wider.



**Abbildung 6-24:** Antiproliferative Wirkung von Verbindung **82** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen,  $n = 16$ .

Die in *para*-Position des Aromaten A monochlorierte Verbindung **83** ( $A_{p-Cl}$ ) zeigte gegenüber ihrem *ortho*-chlorierten Analogon **81** sowohl an MCF-7-Zellen ( $T/C_{\text{korrr}}$ : 46%, 10  $\mu\text{M}$ ) als auch an MDA-MB-231-Zellen ( $T/C_{\text{korrr}}$ : 66%, 10  $\mu\text{M}$ ) stärkere wachstumshemmenden Eigenschaften (Abbildung 6-25).

Ob und welchen Einfluss die veränderte Stellung der Hydroxyfunktion (*ortho*) an den jeweils *para*-chlorierten Aromaten auf die zytotoxischen Eigenschaften ausübt, kann nicht festgestellt werden. Dazu müsste die Untersuchung nicht chlorierter *ortho*-hydroxylierter Verbindungen erfolgen.



**Abbildung 6-25:** Antiproliferative Wirkung von Verbindung **83** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, n = 16.

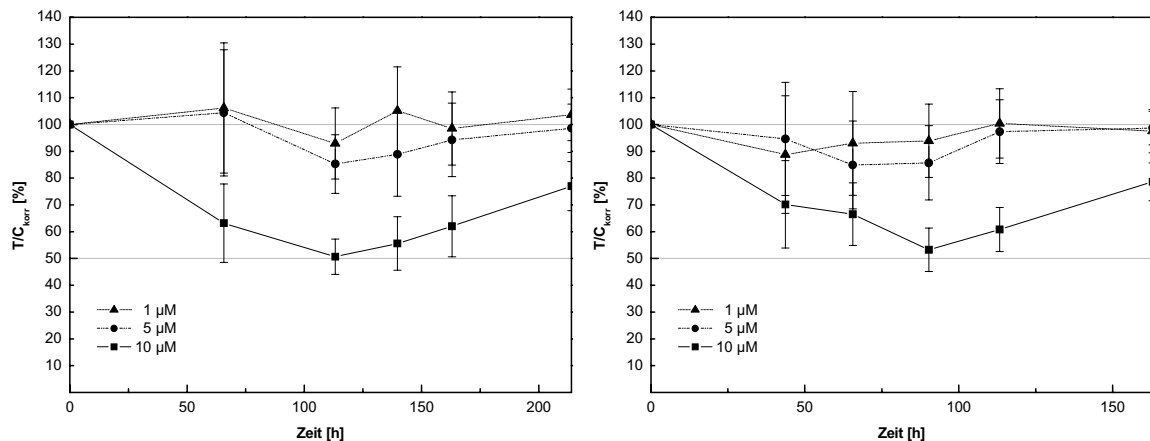
Dies konnte auch im konzentrationsabhängigen Assay gezeigt werden, wo  $IC_{50}$ -Werte von 8.8  $\mu\text{M}$  (MCF-7-Zellen) bzw. 9.2  $\mu\text{M}$  (MDA-MB-231-Zellen) ermittelt wurden (Tabelle 6-8).

| Verbindung                           | $IC_{50}$ (MCF-7) [ $\mu\text{M}$ ] | $IC_{50}$ (MDA-MB 231) [ $\mu\text{M}$ ] |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| <b>80</b> ( $C_{o-cl}$ )             | 16.6 $\pm$ 1.7                      | 13.5 $\pm$ 0.5                           |
| <b>81</b> ( $A_{o-cl}$ )             | 11.3 $\pm$ 0.6                      | 13.0 $\pm$ 1.1                           |
| <b>82</b> ( $A_{o-cl}, C_{o-cl}$ )   | 7.6 $\pm$ 0.9                       | 13.4 $\pm$ 2.3                           |
| <b>83</b> ( $A_{p-cl}$ )             | 8.8 $\pm$ 1.7                       | 9.2 $\pm$ 1.5                            |
| <b>84</b> ( $A_{p-cl}, C_{o-cl}$ )   | 10.5 $\pm$ 0.9                      | 14.0 $\pm$ 0.5                           |
| <b>97</b> ( $C-3_{Prop}, C_{p-cl}$ ) | 8.1 $\pm$ 1.4                       | 6.5 $\pm$ 0.26                           |

**Tabelle 6-8:**  $IC_{50}$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] der Verbindungen **80-84** und **97**, MW  $\pm$  Stabw., n = 6.

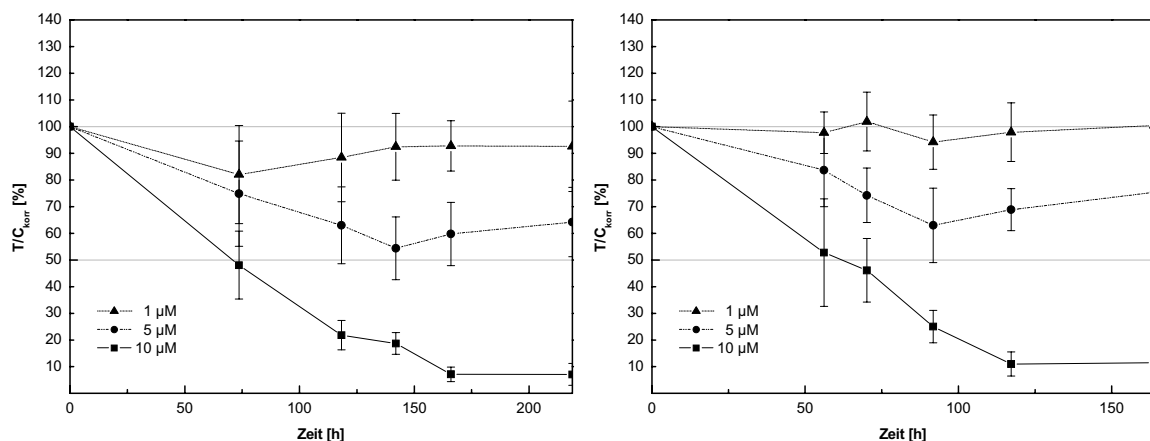
Für das zusätzlich an Aromat C *ortho*-chlorierte Derivat 5-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-2-(4-chlor-2-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol (**84**,  $A_{p-cl}$ ,  $C_{o-cl}$ ) konnte gegenüber Verbindung **83** keine gesteigerte Hemmwirkung an MCF-7-Zellen ( $T/C_{korr}$ : 51%, 10  $\mu\text{M}$ ) bzw. MDA-MB-231-Zellen ( $T/C_{korr}$ : 47%, 10  $\mu\text{M}$ ) festgestellt werden (Abbildung 6-26).

Für Verbindung **84** wurden  $IC_{50}$ -Werte von 10.5  $\mu\text{M}$  (MCF-7-Zellen) und 14.0  $\mu\text{M}$  (MDA-MB-321-Zellen) ermittelt.



**Abbildung 6-26:** Antiproliferative Wirkung von Verbindung **84** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, n = 16.

Das am Pyrrolring propylsubstituierte, am Aromaten C *para*-chlorierte 2-(4-Chlor-2-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-3-propyl-1H-pyrrol (**97**, C-3<sub>Prop</sub>, C<sub>p-Cl</sub>) führte im zeitabhängigen Antiproliferationsassay im Gegensatz zu den nicht chlorierten Propylderivaten nach ca. 120 h (MCF-7-Zellen) bzw. 90 h (MDA-MB-231-Zellen) zu einer ausgeprägten zytostatischen Wirkung (Abbildung 6-27).



**Abbildung 6-27:** Antiproliferative Wirkung von Verbindung **97** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, n = 16.

Während die bisher untersuchten chlorhaltigen Verbindungen zu diesen Zeitpunkten ihre maximale Hemmwirkung bereits erreicht hatten, nahm sie bei Verbindung **97** weiter zu. Sie wurde an MCF-7-Zellen erst nach 162 h ( $T/C_{\text{korr}}$ -Wert: 7.1%, 10  $\mu\text{M}$ ) bzw. an MDA-MB-231-Zellen nach 120h ( $T/C_{\text{korr}}$ -Wert: 10.3%, 10  $\mu\text{M}$ ) erreicht. Auch im konzentrationsabhängigen Test wurden niedrigere  $IC_{50}$ -Werte (MCF-7-Zellen: 8.1  $\mu\text{M}$ , MDA-MB-231-Zellen: 6.5  $\mu\text{M}$ ) ermittelt als bei den nicht alkylierten Derivaten.

Es ist anzumerken, dass die Inkubationszeit (siehe Kapitel 6.5.1) und die an den jeweiligen Abstopzeitpunkten erreichte Zelldichte bei der zeitabhängigen und konzentrationsabhängigen Bestimmung unterschiedlich sind. Deshalb ist ein direkter Vergleich der Testergebnisse nicht sinnvoll, jedoch lassen sich Substituenteneinflüsse mit beiden Methoden beobachten und einschätzen.

### 6.5.1.2 Chlorierte 1,3,5-Triaryl-1H-pyrrole

Auch die antiproliferativen Eigenschaften der an Aromat C *ortho*-chlorsubstituierten, an C-2 unterschiedlich alkylierten 1,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrole wurden untersucht (Abbildung 6-28).

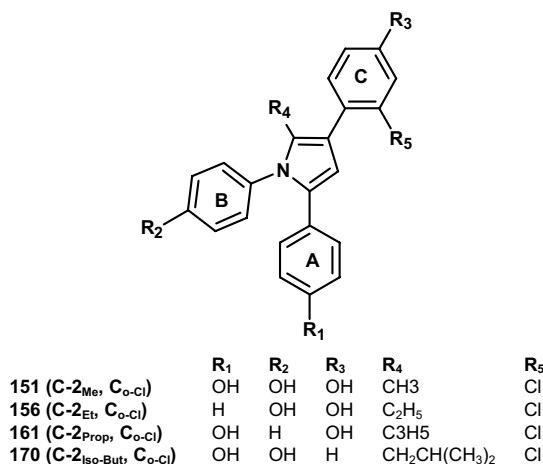


Abbildung 6-28: Chlorierte, alkylierte 1,3,5-Triaryl-1H-pyrrole.

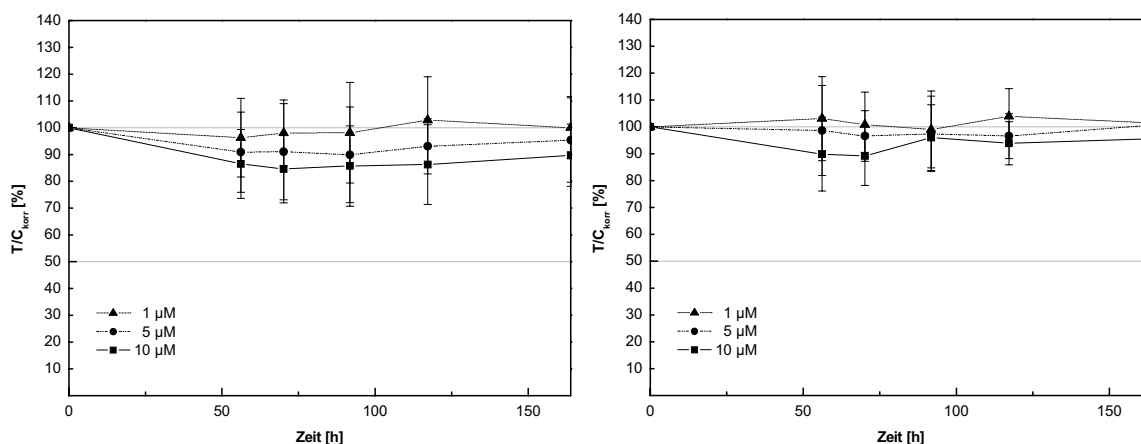


Abbildung 6-29: Antiproliferative Wirkung von Verbindung 156 im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, n = 16.

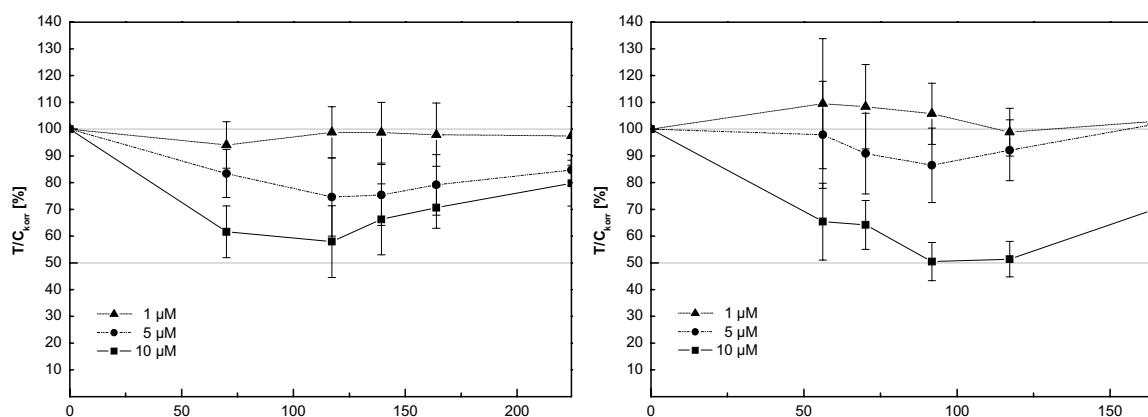
Im zeitabhängigen Assay zeigte 3-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-1,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-methyl-1H-pyrrol (**151**, C-2<sub>Me</sub>, C<sub>o-Cl</sub>) und dessen ethylsubstituierte (**156**, C-2<sub>Et</sub>, C<sub>o-Cl</sub>), propylierte (**161**, C-2<sub>Prop</sub>, C<sub>o-Cl</sub>) Analoga sowohl an MCF-7-Zellen als auch an MDA-MB-231-Zellen keine Hemmwirkung. Exemplarisch sind die Testergebnisse für Verbindung **156** dargestellt (Abbildung 6-29).

Ihre gegenüber den 2,4,5-Triarylderivaten geringere Zytotoxizität wurde auch durch die Ermittlung deutlich höherer  $IC_{50}$ -Werte ( $> 20 \mu\text{M}$ ) bestätigt. Die in zeitabhängigen Assay verwendeten Konzentrationen (bis  $10 \mu\text{M}$ ) waren demnach zu gering, um eine negative Beeinflussung des Zellwachstums zur Folge zu haben (Tabelle 6-9).

| Verbindung   | $IC_{50}$ (MCF-7) [ $\mu\text{M}$ ] | $IC_{50}$ MDA-MB 231 [ $\mu\text{M}$ ] |
|--|-------------------------------------|--|
| <b>151</b> (C-2 <sub>Me</sub> , C <sub>O-Cl</sub> )      | $23.4 \pm 2.1$                      | $27.4 \pm 2.5$                         |
| <b>156</b> (C-2 <sub>Et</sub> , C <sub>O-Cl</sub> )      | $27.8 \pm 0.6$                      | $28.3 \pm 1.1$                         |
| <b>161</b> (C-2 <sub>Prop</sub> , C <sub>O-Cl</sub> )    | $22.5 \pm 3.1$                      | $26.2 \pm 2.3$                         |
| <b>170</b> (C-2 <sub>Iso-But</sub> , C <sub>O-Cl</sub> ) | $15.2 \pm 1.7$                      | $14.1 \pm 0.7$                         |

**Tabelle 6-9:**  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen **151**, **156**, **161** und **170**, MW  $\pm$  Stabw., n = 6.

Lediglich 3-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-1,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-isobutyl-1H-pyrrol (**170**, C-2<sub>Iso-But</sub>, C<sub>O-Cl</sub>) wies im zeitabhängigen Assay zytotoxische Eigenschaften auf (Abbildung 6-30) und führte auch zu geringeren  $IC_{50}$ -Werten. Aufgrund vergleichbarer  $IC_{50}$ -Werte an beiden Zelllinien wird auch hier von keiner ER-abhängigen Hemmwirkung ausgegangen.



**Abbildung 6-30:** Antiproliferative Wirkung von Verbindung **170** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, n = 16.

### 6.5.1.3 Einfluss 2,3,4,5-tetraarylierter Pyrrole auf das Zellwachstum

Die Einführung von Arylsubstituenten an C-3 führte gegenüber den unwirksamen triarylierten Analoga zu ausgeprägten zytotoxischen Substanzeigenschaften (Abbildung 6-32).

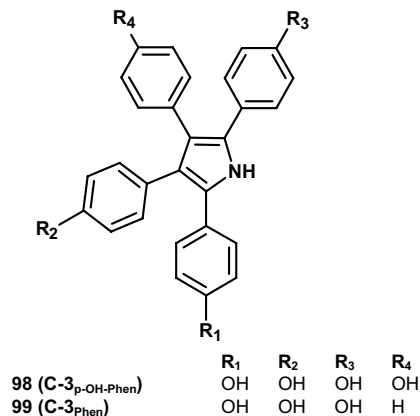


Abbildung 6-31: 2,3,4,5-Tetraaryl-1H-pyrrole mit zytotoxischer Wirkung.

Wie in Abbildung 6-32 und Abbildung 6-33 dargestellt, führten 2,3,4,5-tetraarylierte Pyrrole sowohl an MCF-7-Zellen als auch an MDA-MB-231-Zellen zu einer starken Hemmung des Zellwachstums.

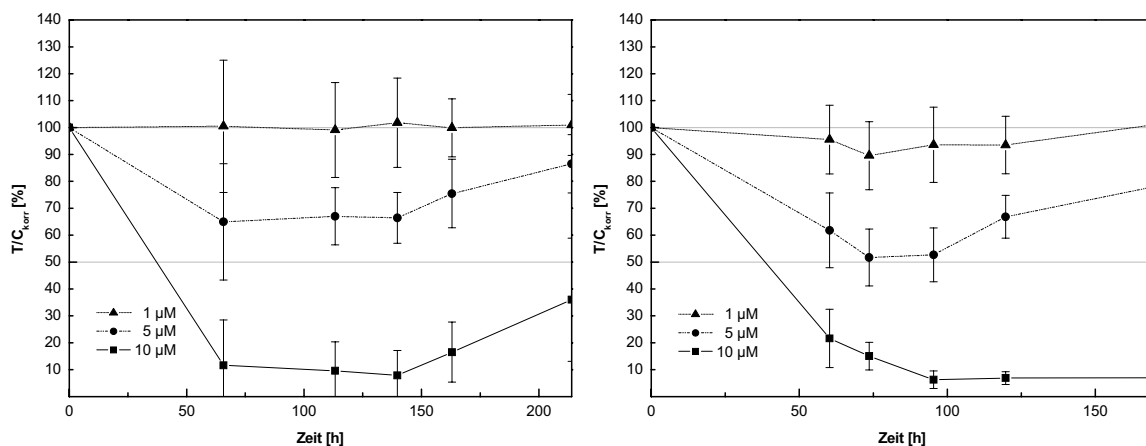
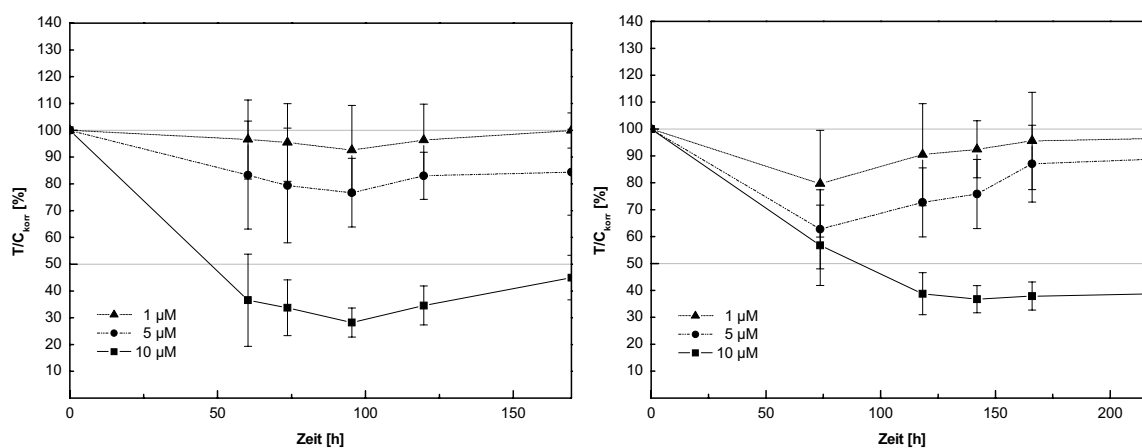


Abbildung 6-32: Antiproliferative Wirkung von Verbindung 98 im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, n = 16.

2,3,4,5-Tetrakis(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol (**98**, C-3<sub>p-OH-Phen</sub>) wies zytostatische Effekte auf. Das analoge trihydroxylierte Derivat 2,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4-phenyl-1H-pyrrol (**99**, C-3<sub>Phen</sub>) war etwas schwächer wirksam.



**Abbildung 6-33:** Antiproliferative Wirkung von Verbindung **99** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, n = 16.

Im konzentrationsabhängigen Test konnten folgende IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt werden, die im Einklang mit den Ergebnissen des zeitabhängigen Assays stehen (Tabelle 6-10).

| Verbindung                          | IC <sub>50</sub> MCF-7 | IC <sub>50</sub> MDA-MB 231 |
|-------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <b>98 (C-3<sub>p</sub>-OH-Phen)</b> | 7.6 ± 0.3              | 8.1 ± 0.8                   |
| <b>99 (C-3<sub>Phen</sub>)</b>      | 11.5 ± 1.0             | 12.2 ± 0.9                  |

**Tabelle 6-10:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **98** und **99**, MW ± Stabw., n = 6.

## 6.6 Untersuchung der COX-1- und COX-2-Hemmung

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen den neu synthetisierten Pyrrolen und bekannten COX-2-Hemmern (Kapitel 1.4.4) wurden Untersuchungen zur Beeinflussung der Cyclooxygenase-Aktivität durchgeführt. Dabei sollte auch geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von zytotoxischen und COX-inhibitorischen Substanzeigenschaften besteht.

In der Literatur beschriebene Untersuchungsergebnisse von COX-2-selektiven 1,2-Diaryl-1*H*-pyrrolen lassen vermuten, dass eine Erhöhung der Lipophilie an den Aromaten zu einer Steigerung der COX-Inhibition führt [255]. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit neben den chlorierten, trihydroxylierten Pyrrolen auch ihre methoxylierten Vorstufen untersucht.

### 6.6.1 Untersuchung der COX-1-Hemmung im thrombozytenbasierten Ganzzellassay

Die Untersuchung der Hemmwirkung der neuen triarylierten Pyrrole auf die Cyclooxygenase 1 erfolgte mit einem thrombozytenbasierten Ganzzellassay [307], der in unserem Arbeitskreis etabliert wurde.

Der Test beruht auf der Quantifizierung des COX-1-Produkts 12-Hydroxyheptadecatriensäure (12-HHT), welches in den Thrombozyten gebildet wird. Diese werden aus venösem Vollblut gewonnen, durch Zentrifugieren isoliert, in Phosphatpufferlösung resuspendiert und mit den Testsubstanzen verschiedener Konzentrationen versetzt (15 min, 37°C, 700 min<sup>-1</sup>). Analog dazu wird zur Bestimmung der Negativkontrolle mit Lösungsmittel inkubiert. Danach wird die COX-1 durch Zusatz von Arachidonsäure, Calciumionophor und CaCl<sub>2</sub> stimuliert und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mit Methanol/HCl beendet und Prostaglandin B<sub>1</sub> (PGB<sub>1</sub>) als interner Standard zugesetzt. Dieser wird zusammen mit 12-HHT nach Abtrennung der Thrombozyten durch Festphasenextraktion (RP<sub>18</sub>) unter Verwendung von Methanol isoliert. Die Quantifizierung von 12-HHT und PGB<sub>1</sub> aus der methanolischen Lösung erfolgt mittels HPLC (Stationäre Phase: Nukleosil C18, mobile Phase: Methanol/Wasser/Trifluoressigsäure 72/38/0.007, Detektion: 235 nm (12-HHT), 280 nm (PGB<sub>1</sub>)). Die Menge an 12-HHT wird durch Berechnung des Flächeninhalts und Korrektur mit dem internen Standard erhalten und durch Bezug auf die Negativkontrolle (0% Hemmwirkung) die prozentuale COX-1-Hemmung bestimmt.



Die Testsubstanzen wurden in Konzentrationen von 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte berechnet.

### **6.6.2 Untersuchung der COX-1- und COX-2-Hemmung an isolierten Isoenzymen**

Um eine mögliche selektive Hemmwirkung an den COX-Isoenzymen zu untersuchen, wurden die im Ganzzellassay wirksamen Pyrrole im Inhibitor Screening Assay (Fa. Cayman Chemicals) eingesetzt. Dort wird ovines COX-1 bzw. rekombinantes humanes COX-2 mit verschiedenen Konzentrationen einer Testverbindung inkubiert und das gebildete COX-Produkt Prostaglandin  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) durch Reduktion mit  $\text{SnCl}_2$  in  $\text{PGF}_{2\alpha}$  umgewandelt. Jede Konzentration wird nach erfolgter Enzymreaktion 1:2000 und 1:4000 verdünnt und zur Durchführung eines Enzymimmunoassays in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Dabei konkurriert  $\text{PGF}_{2\alpha}$  mit einer definierten Menge von  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Acetylcholinesterase (AChE)-Konjugat um die Bindung an eine begrenzte Menge monoklonalem  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -IgG. Der Antikörper- $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Komplex bindet an ein am Plattenboden fixiertes Immunglobulin. Nach dem Waschen der Platte wird Ellmans Reagenz zugesetzt, welches das AChE-Substrat Acetylthiocholin enthält. Das durch enzymatische Reaktion gebildete Thiocholin reagiert mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure aus dem zugesetzten Reagenz zu 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, die UV-spektroskopisch bei 415 nm detektiert wird.

Für jede Substanzkonzentration werden so zwei Werte erhalten, aus denen mithilfe eines Prostaglandin-Standards die gebildete  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Menge ermittelt wird. Nach Einbeziehung der nichtspezifischen und der maximalen Bindung wird die COX-1- und COX-2-Inhibierung durch die einzelnen Substanzkonzentrationen berechnet ( $n = 2$ ).

Die Testsubstanzen wurden in Konzentrationen von 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  (methoxylierte Derivate) sowie 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  (hydroxylierte Derivate) verwendet.

### 6.6.3 Ergebnisse

#### 6.6.3.1 COX-inhibitorische Eigenschaften von 2,4,5-Triaryl-1H-pyrrolen

In einer initialen Untersuchung wurden 2,3,5-Tris(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (**52**) und dessen chlosubstituierte Analoga **56**, **57**, **58**, **59** und **60** sowie die chlorierte, hydroxylierte Verbindung **82** im thrombozytenbasierten Ganzzellassay auf ihre COX-1-inhibitorische Wirkung untersucht (Tabelle 6-11). Während das nicht chlorierte Derivat **52** wenig aktiv war ( $IC_{50}$ : 23.4  $\mu$ M), führten die chlorierten Verbindungen zu einer ausgeprägten COX-1-Inhibierung. Die Wirkung der an Aromaten C bzw. A *ortho*-chlorierten Derivate **56** ( $IC_{50}$ : 0.42  $\mu$ M) und **57** ( $IC_{50}$ : 0.38  $\mu$ M) war vergleichbar. Dagegen wies die an Aromat A *para*-chlorierte Verbindung **59** eine um den Faktor 10 geringere Wirkungspotenz auf. 2,5-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (**58**) bewirkte eine stärkere Hemmung ( $IC_{50}$ : 0.02  $\mu$ M) als die analogen monochlorierten Verbindungen **56** und **57**. Das dichlorierte Derivat mit *para*-ständigem Halogen 5-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-(4-chlor-2-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (**60**,  $IC_{50}$ : 4.95  $\mu$ M) wies dagegen einen geringeren Hemmeffekt auf.

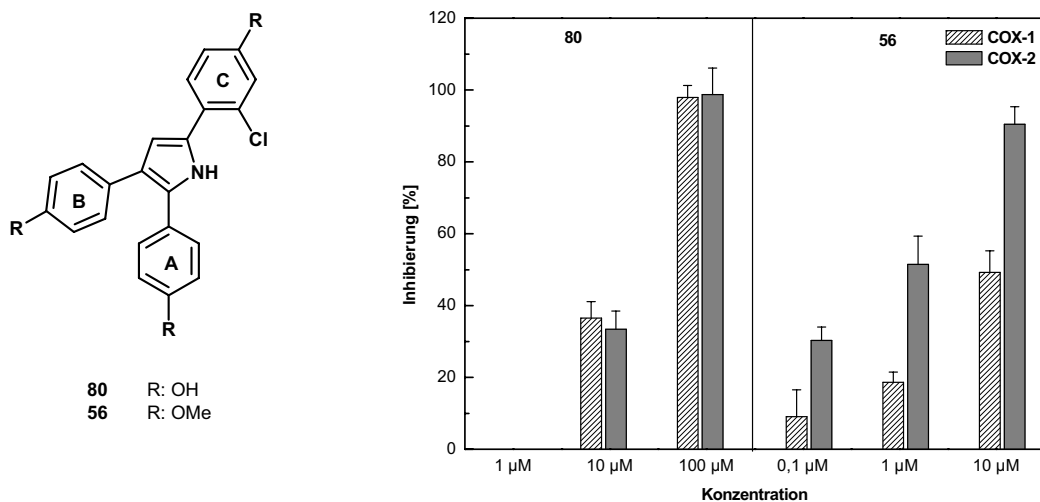
| Verbindung   | $IC_{50}$ (Ganzzellassay) |
|--|---------------------------|
| <b>52</b>  | 23.4 $\mu$ M              |
| <b>56</b> (C <sub>o</sub> -Cl)                     | 0.42 $\mu$ M              |
| <b>57</b> (A <sub>o</sub> -Cl)                     | 0.38 $\mu$ M              |
| <b>58</b> (A <sub>o</sub> -Cl, C <sub>o</sub> -Cl) | 0.02 $\mu$ M              |
| <b>59</b> (A <sub>p</sub> -Cl)                     | 3.85 $\mu$ M              |
| <b>60</b> (A <sub>p</sub> -Cl, C <sub>o</sub> -Cl) | 4.95 $\mu$ M              |
| <b>82</b> (A <sub>o</sub> -Cl, C <sub>o</sub> -Cl) | 11.35 $\mu$ M             |

**Tabelle 6-11:** Ermittelte  $IC_{50}$ -Werte für die COX-1-Hemmung (Ganzzellassay) von 2,3,5-Tris(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (**52**) und seinen chlosubstituierten Analoga **56**, **57**, **58**, **59** und **60** sowie das dichlorierte hydroxylierte Derivat **82**.

Während die methoxylierte dichlorierte Verbindung **58** zu einer starken COX-Inhibierung führte, wies das analoge hydroxylierte Derivat **82** einen geringeren Effekt auf ( $IC_{50}$ : 11.35  $\mu$ M).

Um diese Wirkunterschiede sowie die Selektivität an den COX-Isoformen näher zu untersuchen, wurden anschließend die methoxylierten Verbindungen sowie das hydroxy-substituierte Monochlor- (**80**) bzw. Dichlorderivat (**82**) im Inhibitor Screening Assay getestet.

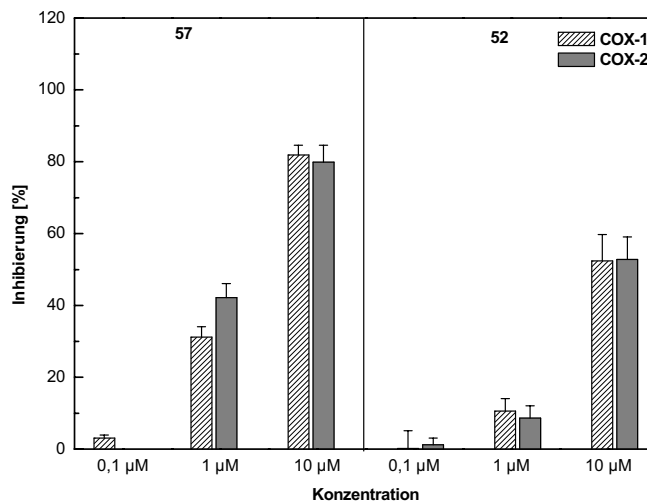
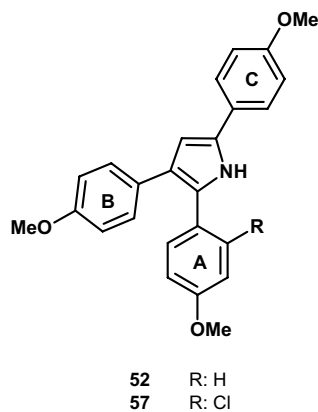
Verbindung **56** ( $C_{o-Cl}$ ) führte in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einer COX-Inhibierung von 19% (COX-1) bzw. 52% (COX-2). Demgegenüber wies das analoge hydroxylierte Derivat **80** einen ca. 10-mal geringeren Hemmeffekt auf. Während **80** die COX-1 bzw. COX-2 ähnlich inhibierte, übte **56** eine stärkere Wirkung auf COX-2 aus (Abbildung 6-34).



**Abbildung 6-34:** COX-Inhibierung durch Verbindungen **80** und **56** an der isolierten COX-1 und COX-2, n=2.

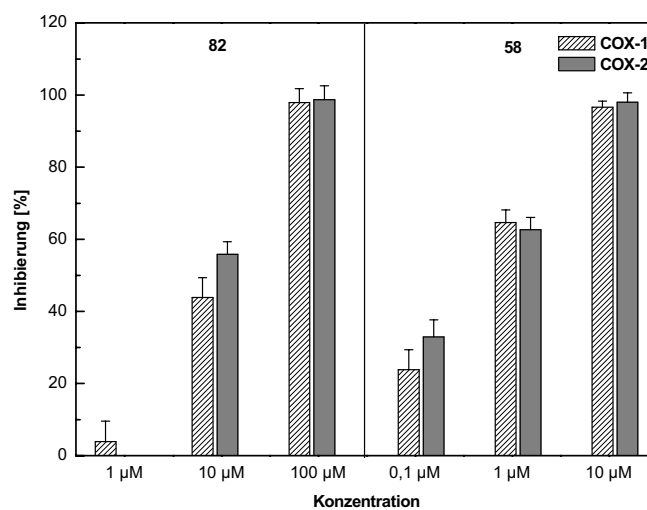
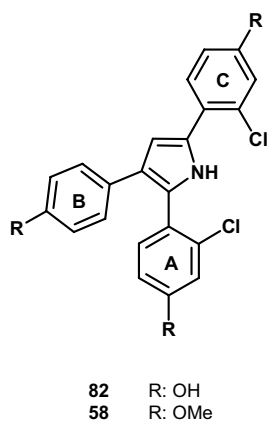
Die an Aromat A *ortho*-chlorsubstituierte methoxylierte Verbindung **57** wies einen ähnlichen Hemmeffekt wie ihr Stellungsisomer **56** auf, wenngleich bei **57** kaum Wirkunterschiede an COX-1 bzw. COX-2 erkennbar waren. In einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  wurden Inhibierungen von 31% (COX-1) bzw. 42% (COX-2) erhalten (Abbildung 6-35).

Auch das nicht chlorierte Methoxyderivat **52** führte zu einer COX-Inhibierung, die jedoch analog zu den Ergebnissen des Ganzzellassays geringer war als beim entsprechenden chlorhaltigen Derivat (**57**).



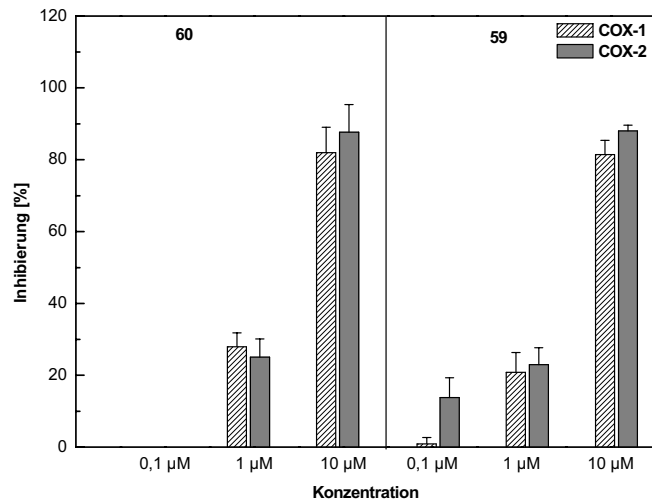
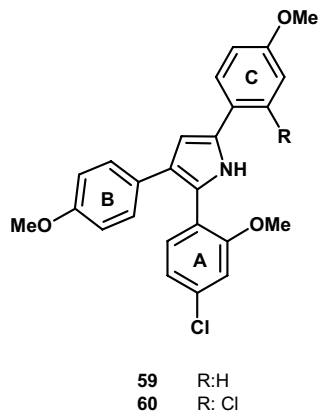
**Abbildung 6-35:** COX-Inhibition durch Verbindungen **57** und **52** an der isolierten COX-1 und COX-2, n=2.

Die Einführung eines zusätzlichen *ortho*-Chlorsubstituenten (**58**) führte zu einer Steigerung der COX-Hemmwirkung. **58** inhibierte in einer Konzentration von 1 μM zu 66% (COX-1) bzw. 63% (COX-2) (Abbildung 6-36). Auch das hydroxylierte Analogon **82** (COX-1: 44%, COX-2: 55%) hemmte die COX-Isoenzyme stärker als die entsprechende monochlorierte Hydroxyverbindung **80**.



**Abbildung 6-36:** COX-Inhibition durch Verbindungen **82** und **58** an der isolierten COX-1 und COX-2, n=2.

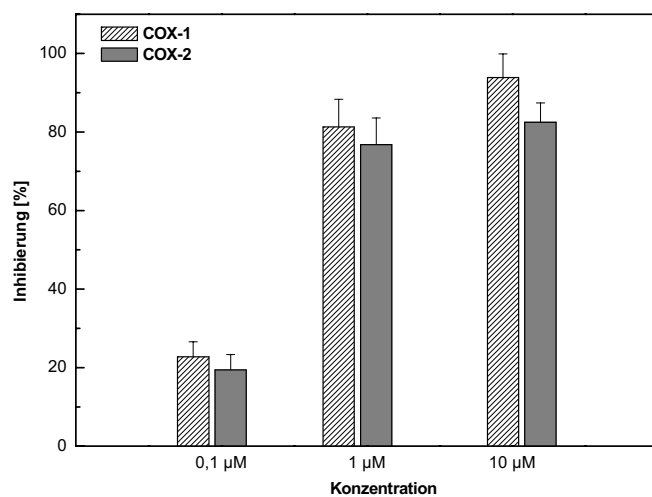
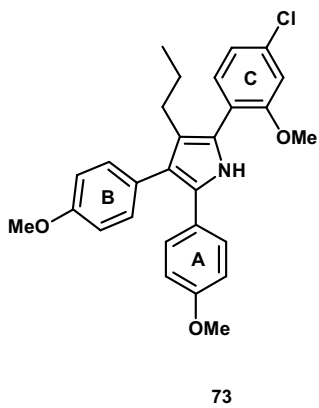
Das an Aromat A *para*-chlorierte 2-(4-Chlor-2-methoxyphenyl)-3,5-bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**59**) führte bei 1 μM zu einer COX-1-Hemmung von 21% und einer COX-2-Hemmung von 23%. Damit war seine COX-Hemmung ähnlich wie im Ganzzellassay geringer als die des analogen *ortho*-chlorierten Derivats **57**. Derivat **60** (A<sub>p-Cl</sub>, C<sub>o-Cl</sub>) inhibierte die COX in vergleichbarer Stärke. So wurden in einer Konzentration von 1 μM COX-Hemmungen von 28% (COX-1) bzw. 25% (COX-2) ermittelt (Abbildung 6-37).



**Abbildung 6-37:** COX-Inhibition durch Verbindungen **60** und **59** an der isolierten COX-1 und COX-2, n=2.

Ähnlich wie im Thrombozyten-Ganzzellassay wurde auch im Test an den isolierten Isoenzymen gezeigt, dass die *para*-chlorierten Verbindungen eine geringere COX-Inhibition auslösen als deren *ortho*-chlorierte Analoga.

Die Untersuchung des propylsubstituierten an Aromat C *para*-chlorierten Derivats **73** zeigte eine ausgeprägte COX-Inhibition an beiden Isoenzymen. In einer Konzentration von 0,1 μM wurde eine COX-1-bzw. COX-2-Hemmung von 22% bzw. 19% beobachtet (Abbildung 6-38). Eine Testkonzentration von 1 μM führte zu einer ca. 80% Inhibition beider Isoenzyme.



**Abbildung 6-38:** COX-Inhibition durch Verbindung **73** an der isolierten COX-1 und COX-2, n=2.

### 6.6.3.2 COX-inhibitorische Eigenschaften von 1,3,5-Triaryl-1H-pyrrolen

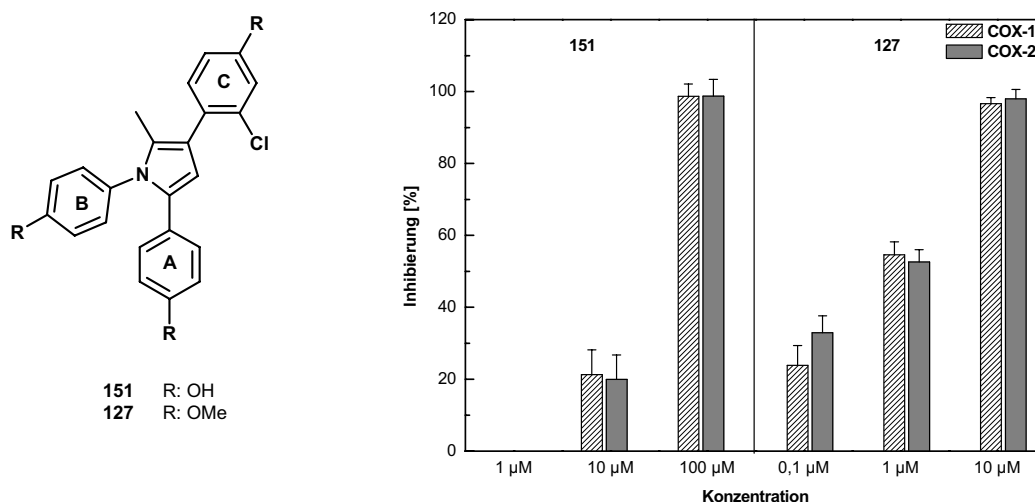
Auch die chlorierten 1,3,5-Triaryl-1H-pyrrole zeigten COX-inhibitorische Wirkung. Die im Thrombozyten-Ganzzellassay untersuchten methoxylierten Verbindungen wiesen in Abhängigkeit von ihrem Alkylsubstituenten an C-2 einen unterschiedlich starken COX-1-Hemmeffekt auf (Tabelle 6-12).

| Verbindung                                   | IC <sub>50</sub> (COX-1-Ganzzellassay) |
|--|--|
| <b>127</b> (C-2Methyl, C <sub>o</sub> -Cl)   | 0.14 μM                                |
| <b>132</b> (C-2Ethyl, C <sub>o</sub> -Cl)    | 1.12 μM                                |
| <b>137</b> (C-2Propyl, C <sub>o</sub> -Cl)   | 48.83 μM                               |
| <b>146</b> (C-2Isobutyl, C <sub>o</sub> -Cl) | 29.9 μM                                |

**Tabelle 6-12:** Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte der COX-1-Hemmung (Ganzzellassay) der chloresubstituierten alkylierten Verbindungen **127**, **132**, **137** und **146**.

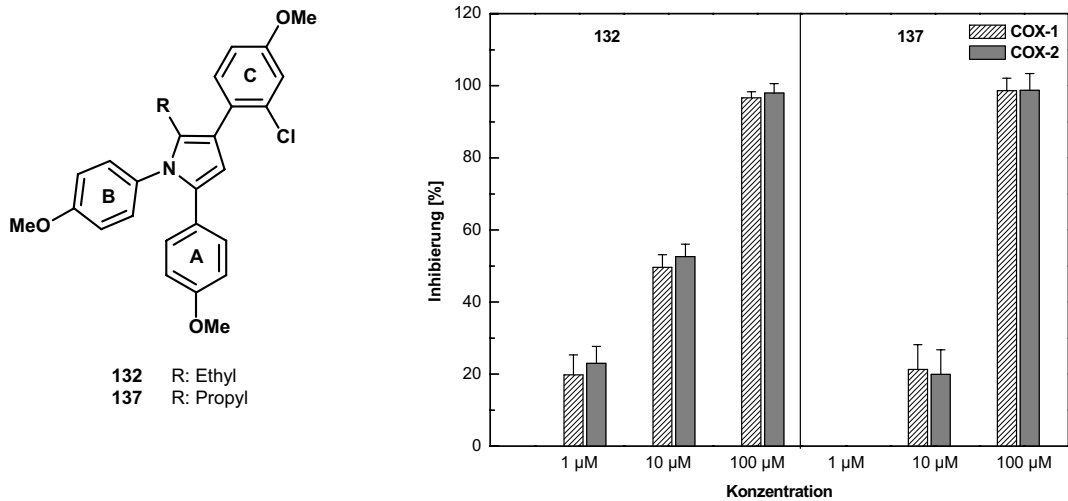
Während das methylsubstituierte Derivat **127** eine ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf die COX-1 ausübte (IC<sub>50</sub>: 0.14 μM), führte die analoge ethylsubstituierte Verbindung **132** zu einer abgeschwächten Hemmwirkung (IC<sub>50</sub>: 1.12 μM). Durch die weitere Verlängerung der Alkylkette sank der COX-1-Hemmeffekt weiter (**137**, IC<sub>50</sub>: 48.83 μM), nahm jedoch beim Isobutylderivat **146** wieder etwas zu (IC<sub>50</sub>: 29.9 μM).

Im Test an den isolierten Isoenzymen führte 3-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-methyl-1H-pyrrol (**127**) in einer Konzentration von 1 μM zu einem Hemmeffekt von 55% (COX-1) bzw. 53% (COX-2). Das analoge hydroxylierte Derivat **151** war deutlich weniger aktiv und hemmte in einer Konzentration von 10 μM die Cyclooxygenase um 21% (COX-1) bzw. 18% (COX-2) (Abbildung 6-39).



**Abbildung 6-39:** COX-Inhibition durch Verbindungen **151** und **127** an der isolierten COX-1 und COX-2, n=2.

Die Verlängerung der Alkylkette führte ähnlich wie im Ganzzellassay zu einem ausgeprägten Rückgang der COX-Hemmeigenschaften. Während das ethylsubstituierte Derivat **132** in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer Hemmung von 49% (COX-1) bzw. 52% (COX-2) führte, war der Hemmeffekt von 3-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-propyl-1*H*-pyrrol (**137**) gleicher Konzentration deutlich geringer (COX-1: 21%, COX-2: 19%) (Abbildung 6-40).



**Abbildung 6-40:** COX-Inhibition durch Verbindungen **132** und **137** an der isolierten COX-1 und COX-2, n=2.

Die untersuchten Verbindungen übten einen unselektiven Hemmeffekt auf die COX-1 bzw. COX-2 aus.