

7 Diskussion der Untersuchungsergebnisse

Zur Auslösung estrogener Effekte muss ein Wirkstoff so mit dem Estrogenrezeptor interagieren, dass dieser eine aktive Konformation einnehmen kann. Bisher kennt man zwei strukturell unterschiedliche Gruppen von Estrogenen.

Für eine E2-artige (Typ-I-Estrogene) Wechselwirkung mit den Aminosäureresten der LBD gilt neben einem ähnlichen Hydroxygruppenabstand das Vorhandensein eines planaren Grundkörpers als wichtige strukturelle Voraussetzung. Die unpolare Strukturelemente können in Analogie zum E2-Gonankörper ausgeprägte hydrophobe Wechselwirkungen mit unpolaren Aminosäureresten der LBD ober- und unterhalb der Ringebene von E2 (Ringe A - D) eingehen und sorgen für eine optimale Orientierung der Hydroxygruppen. Diese bilden in der LBD des ER α Wasserstoffbrückenbindungen einerseits mit Arg394, Glu353 sowie einem inkorporierten Wassermolekül und andererseits mit His524 aus.

Eine Vielzahl von Verbindungen folgt diesem Strukturprinzip und interagiert mit dem Estrogenrezeptor, wobei unterschiedliche Wirkungen beobachtet werden (Abbildung 7-1).

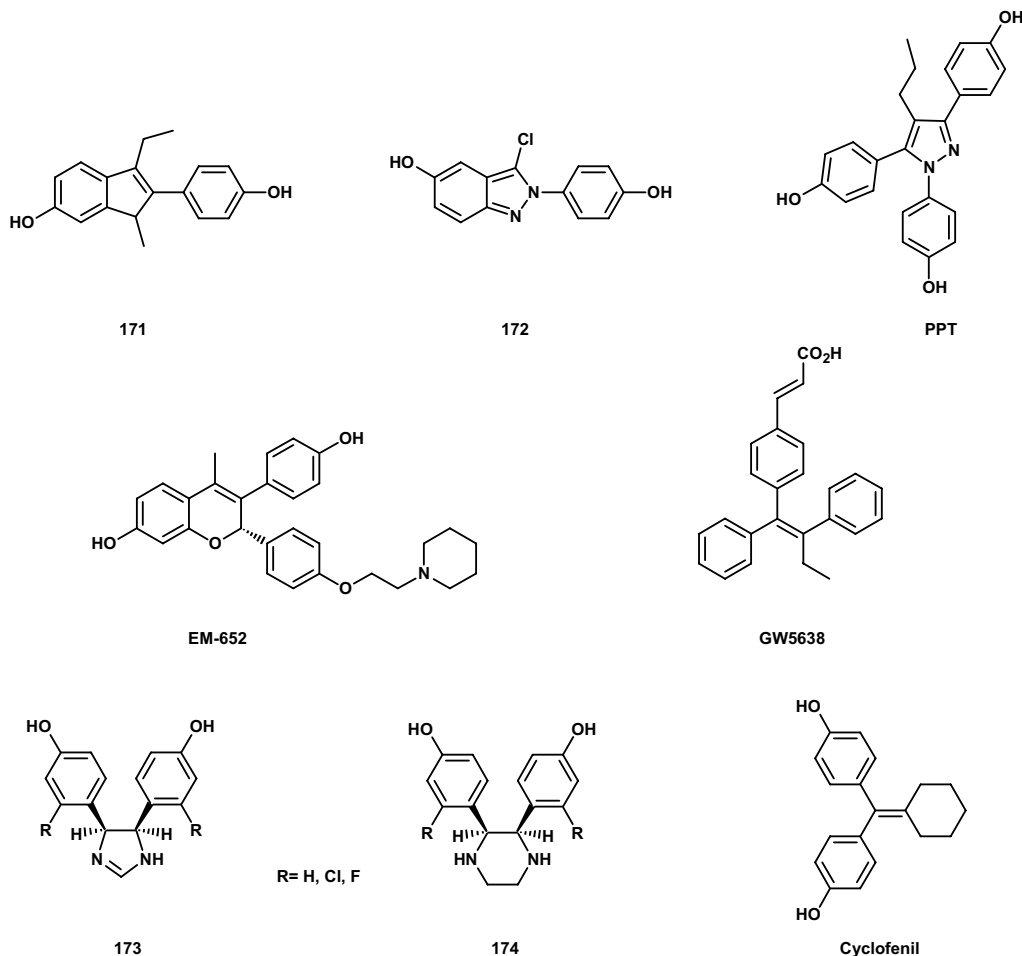


Abbildung 7-1: Liganden des Estrogenrezeptors mit planarem (Typ-I-Estrogene) oder gewinkeltem (Typ-II-Estrogene) Aufbau.

Während 2,3-Arylindene (**171**) [308], Indazole (**172**) [309] oder Bicyclononane [310] ER β -selektiv wirken, bindet PPT (**Propyprazoltriol**) mit hoher Affinität an ER α [199, 311]. Demgegenüber besitzt der SERM E-652 starke antiestrogene Eigenschaften [312]. Ein neuartiges Wirkmuster weist das Triphenylethylenderivat GW5638 auf, welches als gemischter SERM/SERD (SERDs, siehe Kapitel 1.3.5) [313, 314] eine Sonderstellung einnimmt. Es wirkt SERM-artig am Knochen- und Kardiovaskularsystem sowie im Brustgewebe, hat jedoch am Uterus keine estrogenen Aktivität und führt außerdem zur ER-down-Regulierung.

Die als Typ-II-Estrogene bezeichneten nicht planaren Verbindungen wie *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazoline (**173**), *meso*-2,3-Diarylpiperazine (**174**) [315] oder Cyclofenil besitzen einen ER α -Bindungsmodus, der sich von dem des E2 unterscheidet. Aufgrund ihrer gewinkelten Raumstruktur weisen ihre Hydroxygruppen einen im Gegensatz zu E2 (10.9 Å) geringeren Abstand (5 - 7 Å) auf (Abbildung 7-1). Während die Hydroxyfunktion eines Phenolrests analog zu E2 eine Wasserstoffbrückenbindung zu Arg394, Glu353 und einem inkorporierten Wassermolekül ausbilden kann, ist deshalb eine Interaktion mit His524 nicht möglich. Anhand von Molecular-Modeling-Berechnungen wird die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung der zweiten OH-Gruppe mit Thr347 angenommen [316], welches im 11 β -Kanal der E2-Bindungstasche von ER α lokalisiert ist. Typ-II-Estrogene besitzen insbesondere bei Halogensubstitution der Aromaten ausgeprägte estrogenen Eigenschaften, sind jedoch nicht in der Lage, E2 aus seiner Bindungstasche zu verdrängen.

Die in dieser Arbeit synthetisierten 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrole (Typ 1) bzw. deren 1,3,5-triarylierten Stellungsisomere (Typ 2) weisen die strukturellen Anforderungen an Typ-I-Estrogene auf. (Abbildung 7-2).

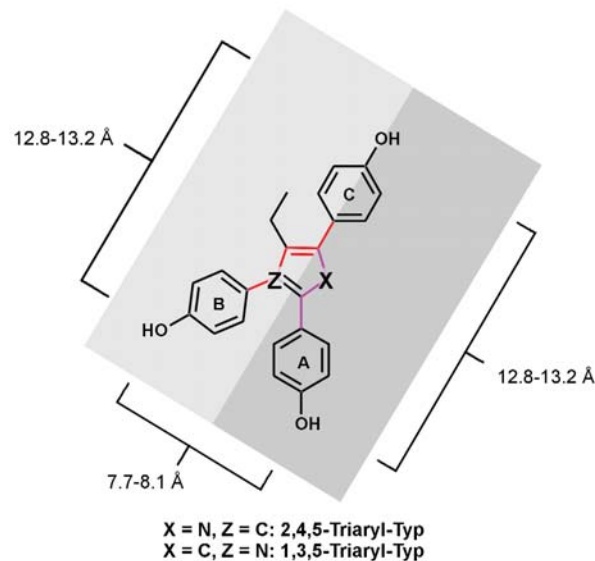


Abbildung 7-2: Leitstruktur der alkylierten Triarylverbindungen mit fünfgliedrigem Kernringssystem unter Kennzeichnung der Symmetrieachse.

Ihr heterozyklisches Kernmolekül besitzt aufgrund seiner sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatome bzw. des Stickstoffs eine trigonal-planare Geometrie, wodurch auch die Arylreste in der Ringebene angeordnet werden. Aufgrund ihres spiegelsymmetrischen Aufbaus liegen zwischen jeweils zwei Aromaten O-O-Abstände von 12.8 - 13.2 Å vor, die aufgrund der im Ringsystem zweifach integrierten „Diphenylpropylenstruktur“ etwas größer als in DES (12.1 Å) sind. Da prinzipiell jeder phenolische Substituent den A-Ring von E2 imitieren kann, sind insgesamt vier DES-analoge Orientierungen der LBD denkbar.

In den vergangenen Jahren wurden die estrogenen Eigenschaften einer Vielzahl von alkylierten triarylierten Fünfringssystemen untersucht, die zum Teil hohe Bindungsaffinitäten zu $ER\alpha$ zeigten [199, 201, 202]. Neben Cyclopenta-1,3-dienen, Furanen und Thiophenen wurde eine Reihe stickstoffhaltiger Heterozyklen eingeführt, deren Bindungsaffinität eine starke Abhängigkeit von der Art und Substitution des fünfgliedrigen Kernmoleküls zeigte. Ausgehend vom alizyklischen 3-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)cyclopenta-1,3-dien (**3**, $RBA_{hER\alpha}$: 4.9%) konnte die Bindungsaffinität zu $ER\alpha$ durch die Einführung eines Pyrazolrings (**1**) um den Faktor acht gesteigert werden. Dagegen sank die Bindungsaffinität bei Austausch gegen ein Imidazolringsystem drastisch. Auch die Anordnung der Substituenten hatte einen Einfluss auf die Bindungsaffinität. Das zu **1** stellungsisomere 1,3,4-arylierte Pyrazol (**175**) war ca. 2.5-fach weniger $ER\alpha$ -affin (siehe Tabelle 7-2, S. 130).

Werden analog substituierte Verbindungen unterschiedlicher Heteroaromaten superpositioniert, nehmen sie eine fast identische Raumgeometrie ein. Das bestimmende Kriterium für das unterschiedliche Bindungsverhalten scheint deshalb eine von den Kernringssystemen abhängende unterschiedliche Polarität der Verbindungen zu sein, welche die Wechselwirkungen mit der Bindungsstelle beeinflusst [259].

Zur näheren Untersuchung dieses Sachverhalts wurden deshalb ausgehend vom hochaffinen 4-Ethyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazol (**1**) zwei triarylierte Pyrroltypen hergestellt, die durch die unterschiedliche Substitution des Stickstoffs eine geringe (Typ 1) bzw. hohe Lipophilie (Typ 2) aufweisen.

Da im Brustgewebe vorwiegend ER α vorkommt, dessen Expression im malignen Mammakarzinomgewebe gegenüber ER β weiter ansteigt, ist die Untersuchung der Wirkung neuer Verbindungen an diesem Subtyp von zentralem Interesse für die Brustkrebsforschung. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchungen an MCF-7-Zellen (bzw. MCF-7-2a-Zellen), die hauptsächlich ER α exprimieren sowie am isolierten hER α (RBA-Wert-Bestimmung) durchgeführt.

In Tabelle 7-1 sind die relativen Genaktivierungen [%] analoger alkylsubstituierter Verbindungen bei einer Konzentration von 10^{-6} M gegenübergestellt. Dabei wird deutlich, dass die Typ-2-Verbindungen stets zu einer stärkeren Genaktivierung führen als die entsprechenden Typ-1-Verbindungen.

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Typ 1	relative Genaktivierung bei 10^{-6} M [%], EC ₅₀ [μ M]	Typ 2	relative Genaktivierung bei 10^{-6} M [%], EC ₅₀ [μ M]
OH	OH	OH	Me	H	85	44	147	56
H	OH	OH	Me	H	86	4	148	63 (EC ₅₀ : $3.5 \cdot 10^{-7}$ μ M)
OH	H	OH	Me	H	87	4	149	61 (EC ₅₀ : $3.7 \cdot 10^{-7}$ μ M)
OH	OH	H	Me	H	88	13	150	4
OH	OH	OH	Et	H	89	82 (EC ₅₀ : $3.8 \cdot 10^{-8}$ μ M)	152	92 (EC ₅₀ : $2.5 \cdot 10^{-8}$ μ M)
H	OH	OH	Et	H	90	74 (EC ₅₀ : $3.2 \cdot 10^{-8}$ μ M)	153	84 (EC ₅₀ : $2.8 \cdot 10^{-8}$ μ M)
OH	H	OH	Et	H	91	38 (EC ₅₀ : $2.3 \cdot 10^{-7}$ μ M)	154	76 (EC ₅₀ : $1.7 \cdot 10^{-7}$ μ M)
OH	OH	H	Et	H	92	7	155	3
OH	OH	OH	Prop	H	93	71 (EC ₅₀ : $1.7 \cdot 10^{-7}$ μ M)	157	100 (EC ₅₀ : $1.2 \cdot 10^{-7}$ μ M)
H	OH	OH	Prop	H	94	55 (EC ₅₀ : $1.1 \cdot 10^{-7}$ μ M)	158	80 (EC ₅₀ : $1.0 \cdot 10^{-7}$ μ M)
OH	H	OH	Prop	H	95	24 (EC ₅₀ : $2.8 \cdot 10^{-7}$ μ M)	159	83 (EC ₅₀ : $2.0 \cdot 10^{-7}$ μ M)
OH	OH	H	Prop	H	96	7	160	11

Tabelle 7-1: Gegenüberstellung der relativen Genaktivierungen [%] sowie die aus den sigmoiden Kurven ermittelten EC₅₀-Werte analog substituierter 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrole (Typ 1) und 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole (Typ 2) bei einer Konzentration von 10^{-6} M.

Beim Vergleich der EC_{50} -Werte, die eine Einschätzung der Wirkung unabhängig von der intrinsischen Aktivität zulassen, erweisen sich die Typ-2-Pyrrole auch als potenter. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass eine hohe Lipophilie am Heteroaromat sich positiv auf die Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten der LBD auswirkt.

Die systematische Untersuchung der genaktivierenden Wirkung der dihydroxylierten Analoga beweist die essentielle Bedeutung der Hydroxyfunktion an Aromat C (R_3), deren Verlust jegliche estrogene Wirkung aufhebt (Tabelle 7-1). In der Literatur wird eine Ausrichtung der für die Estrogenität essentiellen Hydroxygruppe stets analog zum phenolischen A-Ring von E2 in Richtung der Aminosäuren Arg394, Glu353 und des strukturell konservierten Wassermoleküls beschrieben [317, 318, 319]. Deshalb wird für Aromat C ebenfalls diese Orientierung angenommen.

Demgegenüber verringert der Verlust der Hydroxygruppen an Aromat A oder B in geringerem Maße die estrogene Wirkung. Während eine fehlende Hydroxyfunktion an diesen Aromaten bei 1,3,5-triarylierten Pyrrolen kaum zu Wirkunterschieden führte (**158**: 80%, **159**: 83%), führte ein Verlust an Aromat B (R_2) bei den 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen zu deutlichen Aktivitätseinbußen (**94**: 55%, **95**: 24%). Als Ursache dafür kann ein ungünstiger Einfluss des polaren unsubstituierten Stickstoffs angenommen werden, der bei einer Orientierung des Moleküls in der LBD über die Aromaten C und A in Richtung hydrophober Aminosäuren wie Leu346 oder Phe404 ausgerichtet wäre. Dagegen kann für *N*-arylierte Verbindungen ein äquivalentes Bindungsverhalten über Aromat C und A bzw. C und B angenommen werden.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die *para*-Hydroxygruppe am C-3-Aryl (Aromat C) der energieminierten Verbindung **152** mit der Hydroxygruppe des A-Rings des in der LBD des ER α kokristallisierten 17 β -Estradiols [65] sowie C-2 und C-3 mit Position 8 und 9 von E2 in Superposition gebracht (Abbildung 7-3, links). Dabei orientiert sich der Pyrrolring in die Ebene des Gonankörpers, wobei Aromat B in Richtung des D-Rings von E2 ausgerichtet ist (Software: Sybyl 6.91, Tripos). Ring B ragt im Bereich der Position 12 über E2 hinaus, wobei in dieser Region eine Tolerierung einer Vielzahl von Substituenten bekannt ist [199]. Bei Verlust der Hydroxygruppe an Aromat B scheint aufgrund der Testergebnisse auch eine um 180° gedrehte Ausrichtung in der LBD dieses Typ-2-Pyrrols denkbar zu sein, sodass Aromat A zu His524 orientiert ist (Abbildung 7-3, rechts).

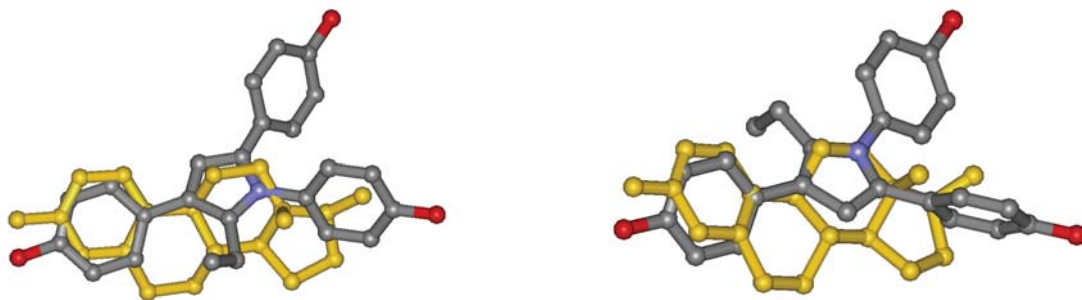


Abbildung 7-3: Superposition von 2-Ethyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**152**) mit 17 β -Estradiol. Links: C-3-Arylrest (Aromat C) wurde in Richtung des A-Rings des Gonankörpers ausgerichtet sowie C-2 und C-3 mit Position 8 und 9 von E2 überlagert. Dabei ist der N-1-Arylrest (Aromat B) in Richtung His524 orientiert. Rechts: **152** wurde um 180° gedreht, so dass der C-5-Arylrest (Aromat A) in Richtung His254 ausgerichtet ist.

Außerdem können die Aromaten C und B der energieminierten Struktur von **152** in Superposition mit dem in der LBD des ER α kokristallisierten DES [172] gebracht werden (Abbildung 7-4, links).

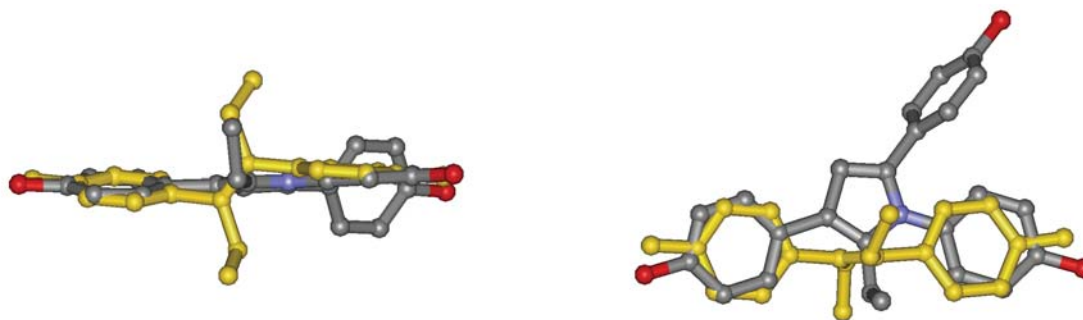


Abbildung 7-4: Superposition von 2-Ethyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**152**) mit Diethylstilbestrol. Die Aromaten B und C liegen in einer Ebene mit dem Stilbenkörper. Die Ethylfunktion an C-2 sowie ein Ethylrest von DES ragen in gleicher Richtung aus der Molekülebene heraus.

Dabei wird der Pyrrolring auch in einer Ebene mit dem Stilbengerüst orientiert. Die Ethylreste von DES und **152** verlassen die Molekülebene gleichgerichtet.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Bindungsmodellen für analog aufgebaute Cyclopentadiene, 1*H*-Pyrrazole und Furane [199, 259, 201, 280, 285], so dass für die triarylierten Pyrrole eine ähnliche Orientierung in der E2-Bindungstasche vorgeschlagen wird (Abbildung 7-5). Dabei ist die *para*-Hydroxyphenylgruppe an C-5 des mit E2 superpositionierten 2-Ethyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrols (**152**) in Richtung von Arg394 und Glu353, der *para*-Hydroxyphenylsubstituent an N-1 in Richtung His524 orientiert. Dazu passt auch, dass die Einführung räumlich anspruchsvoller *ortho*-Chlorsubstituenten am C-4-Hydroxyphenylrest in der relativ kleinvolumigen A-Ring-Kavität von E2 nicht toleriert wird. Deshalb kommt es

im Genaktivierungsassay zu einem Rückgang oder Verlust der estrogenen Wirkung (**151**, **156**, **161** und **170**). Der Alkylrest weist zu Phe404 sowie Leu346. Diese hydrophoben Wechselwirkungen scheinen von großer Wichtigkeit zu sein, da ohne Alkylsubstituenten keine estrogenen Eigenschaften auftreten. In der Literatur wird außerdem eine Interaktion mit Met421 angenommen, die vor allem von längeren Alkylsubstituenten eingegangen werden kann. Auch der Aromat an *N*-1 interagiert mit Met421 [199]. Der Austausch des Alkylsubstituenten gegen eine Arylfunktion (**98**, **99**) wirkt sich wahrscheinlich aufgrund sterischer Effekte negativ auf die Rezeptorbindung aus und führt zum Verlust der estrogenen Wirkung. C-4 tritt in engen Kontakt mit Leu384. In dieser Orientierung betragen alle Abstände zu den genannten Aminosäuren weniger als 3.2 Å, so dass die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen möglich ist.

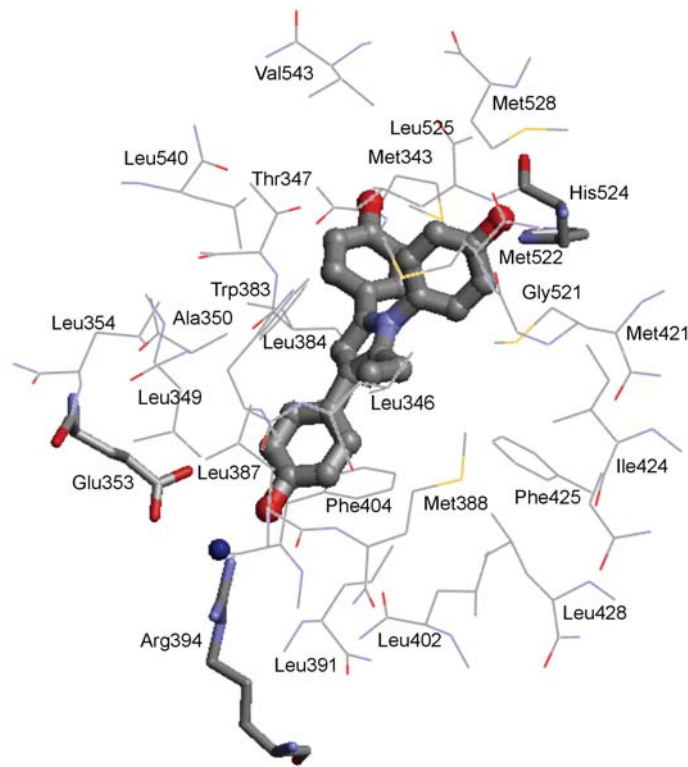


Abbildung 7-5: Postulierte Orientierung von 2-Ethyl-1,3,5-triaryl-1*H*-pyrrol (**152**) in der Ligandenbindungstasche des ER α . In diesem Modell sind die wichtigen Wechselwirkungen der *para*-Hydroxyphenylfunktion an C-3 zu Arg394, Glu353 und dem strukturell konservierten Wassermolekül sowie der *para*-Hydroxyfunktion an *N*-1 mit His524 hervorgehoben.

Interessanterweise handelt es sich dabei um die Aminosäuren der E2-Bindungsstelle, die in ER β konservativ ausgetauscht sind (Leu384 \rightarrow Met336, Met421 \rightarrow Ile373). Diese werden in der Literatur als bedeutsam für das Auftreten von Subtypselektivitäten dieser Verbindungsklasse diskutiert [178]. Molecular-Modeling-Experimente mit PPT in beiden Bindungstaschen lieferten sterische Interaktionen des Pyrazolrings mit dem größeren

Met336-Rest in ER β . Dadurch kam es zu einer veränderten Ausrichtung vor allem des weniger fixierten, zu His524 orientierten Phenylrings [199].

Bei Ausrichtung der energieminierten 2,4,5-triarylierten Pyrrole in der LBD orientiert sich der unsubstituierte polare Stickstoff in Richtung des unpolaren Leu384. Dadurch könnte es in diesem Bereich zur Verminderung der Ligand-Protein-Wechselwirkungen kommen, infolgedessen sich die Lage des gesamten Moleküls in der E2-Bindungstasche ändern würde und die Interaktionsmöglichkeiten mit der LBD sich abschwächen könnten. Es wäre demnach möglich, dass unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Ligand und ER-Protein in diesem Bereich Ursache für die schwächere Wirksamkeit von 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen gegenüber ihren 1,3,5-triarylierten Analoga sind. Eine interessante Weiterführung könnte deshalb die Synthese und Untersuchung von 1,3-dialkylierten 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen darstellen.

Zu dieser Vermutung passt auch, dass die Typ-2-Pyrrole wie **152** und **157** volle intrinsische Aktivität aufweisen, während die Transkriptionsaktivierung analoger 2,4,5-Triaryl-derivate mit einem partiell agonistischen Wirkprofil in Einklang zu bringen ist.

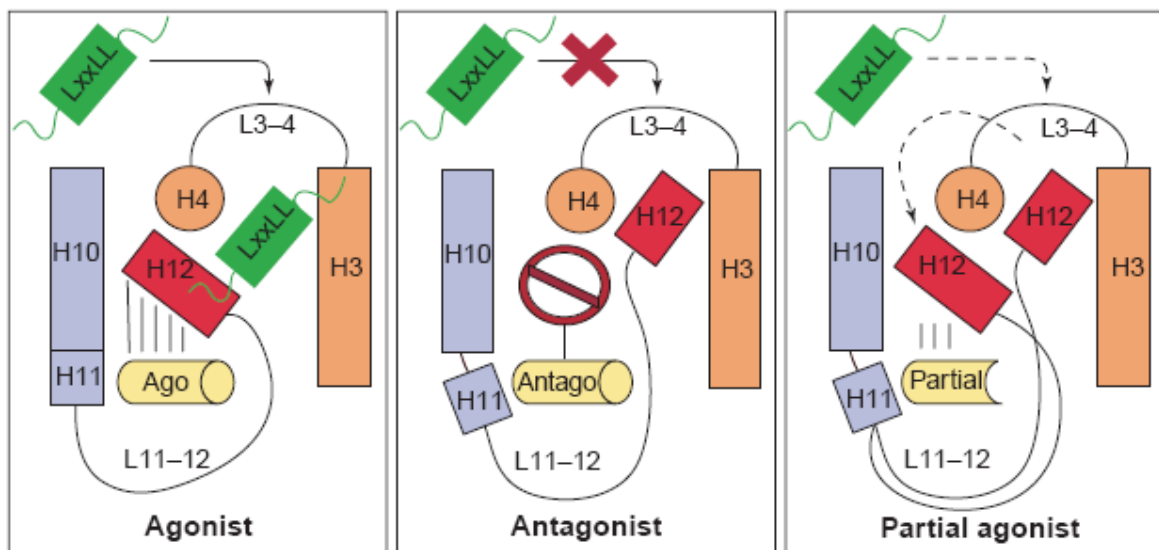


Abbildung 7-6: Schematische Darstellung der ligandeninduzierten ER-Konformation in Anwesenheit eines Agonisten (links), Antagonisten (mitte) oder partiellen Agonisten (rechts). Liganden (gelb), Helix 12 (rot), AF-2-Region (grün), LxxLL-Motiv der Kofaktoren (grün) [166].

Die Unterschiedlichkeit ihres biologischen Charakters (partieller Agonismus/voller Agonismus) spricht für unterschiedliche Wechselwirkungen beider Pyrroltypen im Rezeptor als Ursache für die größere Wirksamkeit der 1,3,5-triarylierten Pyrrole und nicht für Wirkunterschiede, die sich aus ihrer höheren Lipophilie ergeben könnten. Aus den Röntgenstrukturanalysen von in der LBD kokristallisierten ER-Liganden geht hervor, dass

bei Anwesenheit voller Agonisten durch die Orientierung von Helix 12 eine „geschlossene Konformation“ eingenommen werden kann (Abbildung 7-6, links).

Nur so kann sich eine hydrophobe AF-2-Kavität ausbilden und die Kofaktorenanbindung erfolgen. Partielle Agonisten destabilisieren durch sterische Interaktionen die korrekte Ausrichtung von H12. Aufgrund des Fehlens einer voluminösen Seitenkette wie bei SERMs kann H12 jedoch auch nicht in die antagonistengebundene Position überführt werden (Abbildung 7-6, mitte). In dieser wenig stabilisierten „offenen Konformation“ der LBD ist die Ausbildung einer kompetenten AF-2-Region behindert (Abbildung 7-6, rechts). Die estrogenen Eigenschaften solcher partieller Agonisten könnten deshalb in hohem Maße von der Rekrutierung bestimmter Kofaktoren abhängig sein [166]. Vor allem die Aktivierung der ligandenunabhängigen AF-2b-Region (Arg351 sowie Aminosäuren von H12, siehe Kapitel 1.2.3) scheint dabei bedeutsam zu sein [60].

Um die estrogenen Eigenschaften der triarylierten Pyrrole mit bisher untersuchten Fünfringsystemen vergleichen zu können, wurde auch das als hochaffin bekannte Pyrazolderivat PPT im Luciferaseassay untersucht (EC_{50} : $1.6 \cdot 10^{-10}$ M). Gegenüber diesem führen die analog substituierten propylierten Pyrrolverbindungen **93** (EC_{50} : $1.7 \cdot 10^{-7}$ M) und **157** (EC_{50} : $1.2 \cdot 10^{-7}$ M) zu einer starken Rechtsverschiebung der Konzentrations-Aktivierungs-Kurven bzw. zusätzlich zu einer Kurvenabflachung (**93**) (Abbildung 7-7).

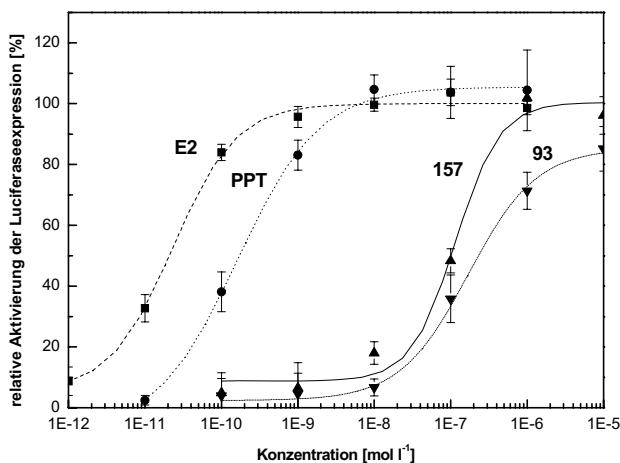
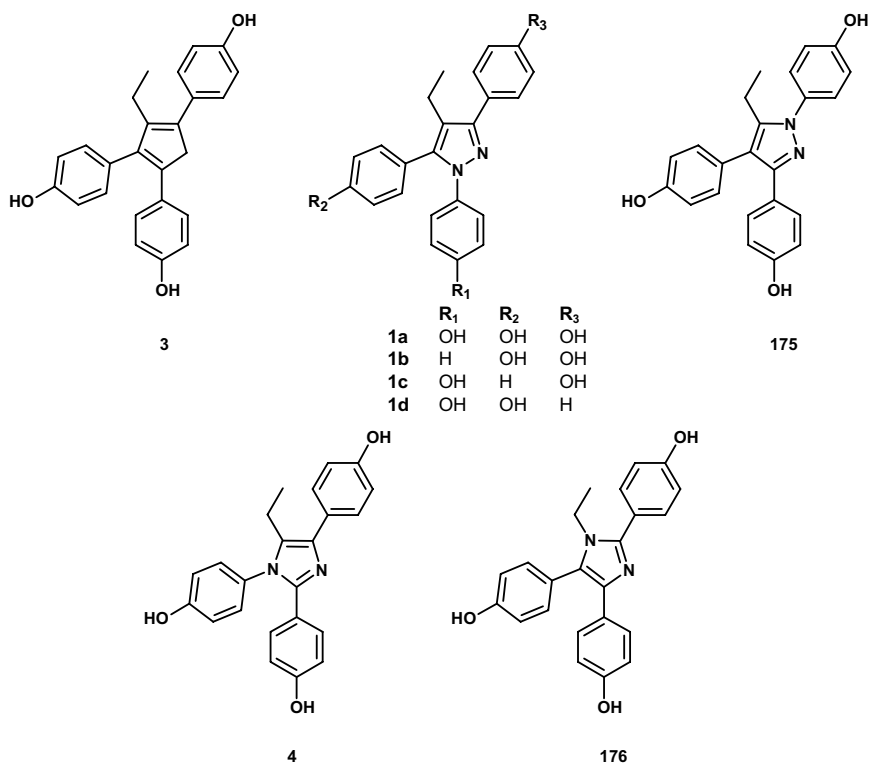


Abbildung 7-7: Relative Aktivierung der Luciferaseexpression durch E2 (EC_{50} : $1.8 \cdot 10^{-11}$ M), PPT (EC_{50} : $1.6 \cdot 10^{-10}$ M), **93** (EC_{50} : $1.7 \cdot 10^{-7}$ M) und **157** (EC_{50} : $1.2 \cdot 10^{-7}$ M) in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Untersuchung erfolgte an MCF-7-2a-Zellen über einen Inkubationszeitraum von 50 h.

Neben dieser vergleichsweise geringeren Aktivität zeigen alle untersuchten Pyrrole im kompetitiven Bindungsassay eine äußerst geringe Affinität zum ER α .

Da sich aufgrund der Ergebnisse ein negativer Zusammenhang zwischen der Polarität der Kernringssysteme und der Affinität zum ER vermuten ließ, wurden die cLogP-Werte sowie die Dipolmomente beider Pyrroltypen und bereits bekannter stickstoffhaltiger triarylierter Fünfringsysteme berechnet und mit den zugehörigen Bindungsaffinitäten verglichen (Tabelle 7-2).



Verbindung	RBA (cytosolisch) [%]	RBA hER α [%]	RBA hER β [%]	cLogP	Gesamtdipol [Debye]
3	1.0 \pm 0.2 ^{a)}	4.9 \pm 0.6 ^{b)}	1.5 \pm 0.2 ^{b)}	5.61	3.20
1a	20.3 \pm 3 ^{d)}	36 \pm 6 ^{c)}	0.15 \pm 0.014 ^{c)}	5.05	1.91
1b	-	31 \pm 15 ^{c)}	1.1 \pm 60.2 ^{c)}	-	-
1c	-	8.9 \pm 0.6 ^{c)}	0.32 \pm 0.01 ^{c)}	-	-
1d	-	7.0 \pm 0.6 ^{c)}	0.80 \pm 0.09 ^{c)}	-	-
PPT	-	49 \pm 12 ^{c)}	0.12 \pm 0.04 ^{c)}	5.58	1.89
175	7.8 \pm 4 ^{d)}	-	-	4.53	3.66
4	0.11 ^{e)}	-	-	5.28	4.01
176	0.38 ^{f)}	-	-	4.79	5.38
89	0.07 ^{g)}	-	-	4.66	4.27
152	0.02 ^{g)}	-	-	6.15	3.31

Tabelle 7-2: RBA-Werte, cLogP-Werte sowie der Gesamtdipol (Software: ChemDraw3D Ultra6.0) triarylierter Verbindungen mit alizyklischem sowie stickstoffhaltigem fünfgliedrigem Kernringssystem, ^{a)} [258], ^{b)} [199], ^{c)} [107], ^{d)} [259], ^{e)} [203], ^{f)} [258], ^{g)} RBA-Wert-Bestimmung erfolgte aus den Daten des Ganzzellassays an MCF-7-Zellen.

Das Pyrazolderivat **1**, das mit hoher Bindungsaffinität an ER α bindet, besitzt eine hohe Lipophilie (cLogP: 5.05) und ein geringes Dipolmoment (p : 1.91). Das analoge Imidazol (**4**) hat bei vergleichbarer Lipophilie (cLogP: 5.28) jedoch einen deutlich höheren Dipolcharakter (p : 4.01). Für **4** wurden äußerst geringe RBA-Werte gemessen. Ein ähnliches Ergebnis wird für das Typ-1-Pyrrol **89** (cLogP: 4.66, p : 4.27) erhalten. Dagegen besitzt das analoge Typ-2-Pyrrol **152** eine höhere Lipophilie (cLogP: 6.15) und ein etwas geringeres Dipolmoment (p : 3.31) als **89**, was im Einklang mit seiner stärkeren Estrogenität steht. Besonders ein geringer Dipolcharakter scheint deshalb mit einer hohen Bindungsaffinität verbunden zu sein.

Besonders interessant ist, dass 2-(4-Chlor-2-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-3-propyl-1*H*-pyrrol (**97**) trotz fehlender *para*-Hydroxyphenylgruppe an C-2 estrogene Eigenschaften aufweist. Da die Orientierung eines phenolischen Rests in der A-Ring-Kavität von E2 eine essentielle Voraussetzung für eine E2-artige Interaktion mit der LBD darstellt, muss ein anderer Bindungsmodus vorliegen, bei dem vorzugsweise der *para*-Hydroxysubstituent an C-4 mit Arg394 und Glu353 in Wechselwirkung tritt. Demnach scheint der Chlorsubstituent die Orientierung dieser Pyrrolverbindung in der LBD zu beeinflussen.

Trotz ihrer geringen Bindungsaffinitäten sind die untersuchten Verbindungen in der Lage, den ER α -Gehalt estrogenartig zu modulieren (Abbildung 7-8).

Verbindungen	OI _{rel} [% der Kontrolle]
17β-Estradiol	29 ^{a)}
DES	37 ^{a)}
RU 58 668	6 ^{c)}
ICI 164 384	10 ^{c)}
4-OHT	143 ^{b)}
RU 39 114	132 ^{b)}
89	52 ^{a)}
152	33 ^{a)}
157	17 ^{c)}

Abbildung 7-8: OI_{rel} [% der Kontrolle] als Maß für den ER α -Gehalt relativ zur unbehandelten Kontrolle (100%) nach 24-stündiger Inkubation von MCF-7-Zellen mit verschiedenen Estrogenen, SERMs, Antiestrogenen sowie **89**, **152** und **157**, ^{a)} 10 nM, ^{b)} 100 nM, ^{c)} 1 μ M [160].

Analog zu E2 führen die Pyrrolverbindungen zu einer ER-down-Regulierung, die mit der im Luciferaseassay bestimmten estrogenen Wirkung korreliert. Aufgrund dessen scheint die Interaktion mit dem Estrogenrezeptor Ursache für die Auslösung des ER-Abbaus zu

sein. Die Koinkubationsexperimente mit dem Proteasomeninhibitor MG 132 bestätigen die estrogenartige Induktion des Proteasomen-Ubiquitin-Systems (UPS) durch die Pyrrole. Auch der durch reine Antiestrogene wie RU 58 668 und ICI 164 384 induzierte ER-Abbau erfolgt über das UPS. Da der Literatur zufolge dieser aber im Gegensatz zur E2-induzierten ER-down-Regulierung nicht durch Cycloheximid (CHX) inhibierbar ist, scheint dem ein anderer Mechanismus zugrunde zu liegen [160]. Um näheren Aufschluss über die Art der UPS-Aktivierung durch die Pyrrole zu erhalten, könnten Koinkubationsexperimente mit CHX durchgeführt werden. Der gezeigte synergistische Effekt von E2 und **152** ist jedoch ein Indiz für eine E2-analoge UPS-Aktivierung.

Trotz der im Vergleich zu E2 geringen estrogenen Potenz erreicht **152** (ER α : 33%, 10⁻⁸ M) eine mit dem Maximaleffekt von E2 (ER α : 29%, 10⁻⁸ M) vergleichbare ER-down-Regulierung (Abbildung 7-8). Dieses zunächst erstaunliche Ergebnis könnte mit Untersuchungen erklärt werden, in denen gezeigt wurde, dass die Besetzung eines geringen Teils (ca. 10%) der Bindungsstellen durch einen Liganden ausreicht, um eine umfassende Modulation der ER-Population auszulösen. Aufgrund dieser Beobachtungen liegt auch die Existenz eines bisher unbekanntesten verstärkenden Prozesses nahe. Die Beobachtung, dass ER-Liganden trotz irreversibler Blockade der LBD (z. B. mit Tamoxifenaziridin) in der Lage sind, eine ER-down-Regulierung auszulösen, stimmt mit dieser Annahme überein [320].

Triarylierte Pyrrole, die bei geringer Estrogenität zu einer starken down-Regulierung des ER führen, könnten deshalb für die Entwicklung neuer Therapeutika für hormonabhängige Tumore von Bedeutung sein.

Neben estrogen wirksamen Verbindungen wurden auch Pyrrole erhalten, die zytotoxische Eigenschaften an hormonabhängigen MCF-7- sowie an hormonunabhängigen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen aufweisen. Während die Chlorierung von Aromaten die estrogen Wirkung senkt oder vollständig bricht, stellt sie ein wichtiges Strukturprinzip für das Auftreten von zytotoxischen Eigenschaften der Pyrrole dar. Die Untersuchungen zeigen, dass sowohl die Position des chlorierten Aromaten (**80**, A > **81**, C) als auch die Stellung des Chlorsubstituenten im Aromaten (**83**, *para* > **81**, *ortho*) Einfluss auf Stärke der zytotoxischen Substanzeigenschaften nehmen. Dass die Hemmwirkung der Verbindungen sowohl an hormonabhängigen MCF-7- als auch an hormonunabhängigen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen beobachtet wird, spricht für einen zelltypunabhängigen Wirkmechanismus. Interessanterweise sind die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der *ortho*-chlorierten Typ-1-Derivate **80**, **81** und **82** jedoch vor allem an MCF-7-Zellen erkennbar, während ihre Hemmwirkung an MDA-MB-231-Zellen weitgehend gleich bleibt (Abbildung 7-9). Dies könnte auf eine Beteiligung zelltypspezifischer Zielstrukturen hindeuten.

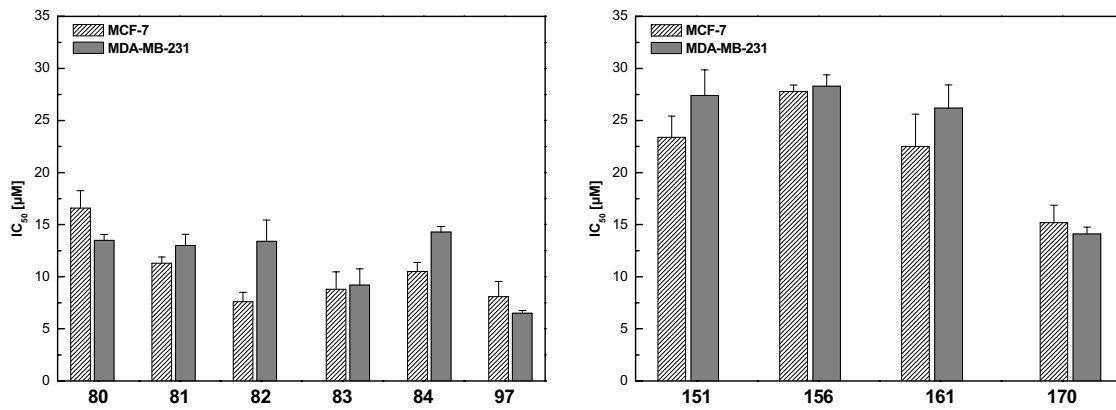


Abbildung 7-9: Antiproliferative Eigenschaften (IC_{50} -Werte) an MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen von chlorierten 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen **80**, **81**, **82**, **83**, **84**, **97** (links) und 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen **151**, **156**, **161**, **170** (rechts).

Zytotoxische Substanzeigenschaften können unter anderem mit der Induktion von Apoptose in Zusammenhang stehen. Diese zeichnet sich morphologisch durch eine DNA-Fragmentierung, eine Vakuolisierung des Zytoplasmas und schließlich durch eine Abschnürung von Vesikeln („apoptotic bodies“) aus. Da eine vermehrte Bildung apoptotischer ssDNA durch ein strukturell sehr ähnliches chloriertes Triaryl-1*H*-imidazol **177** nachgewiesen werden konnte [321, 203], ist ein ähnlicher Effekt der hier untersuchten Pyrrole nicht auszuschließen (Abbildung 7-10).

Das Tumorsupressorprotein p53, das eine zentrale Funktion in der Zellzykluskontrolle besitzt, ist eng mit der Auslösung von Apoptose verbunden. Zum einen verursacht es eine up-Regulierung von p21, welches durch Inaktivierung verschiedener Zyklin/CdK (cyclin-dependent kinase)-Komplexe zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-, S- und G₂-Phase führt [322, 323]. Andererseits hemmt p53 die Transkription von Zyklin A und B, was den Eintritt der Zellen in die mitotische Teilungsphase verhindert. Durch diese Zellteilungsblockade kann Apoptose ausgelöst werden. Die Aktivität von p53 wird durch seinen negativen Regulator hDM2 (human double minute 2) gesteuert, durch dessen Assoziation seine Transaktivierungsstärke reduziert und die Proteolyse ausgelöst wird. Im Gegensatz zu Zelllinien mit mutantern p53 wie MDA-MB-231-Zellen kann bei Wildtyp (wt p53)-exprimierenden Zellen (z. B. MCF-7-Zellen) eine Überexpression von hDM2 beobachtet werden [324], was zu einer verminderten p53-Aktivität und letztlich zum Kontrollverlust des Zellzyklus, des DNA-repairs und der Apoptose führt [325, 326]. Deshalb könnte die spezifisch an MCF-7-Zellen auftretende Zytotoxizität der Verbindungen **80**, **81** und **82** mit einer hDM2-inhibierenden Wirkung in Zusammenhang stehen.

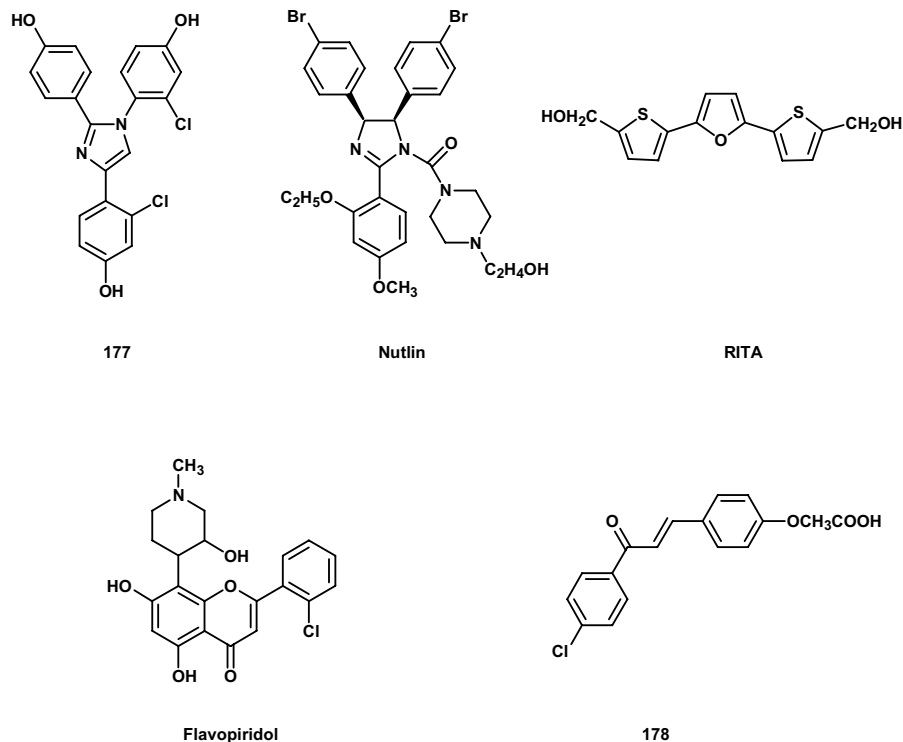


Abbildung 7-10: Verbindungen mit Apoptose-induzierender Wirkung.

Kürzlich wurden hDM2-Antagonisten beschrieben (Abbildung 7-10), die die p53-Bindungsstelle auf der hDM2-Oberfläche (Phe19, Trp23, Leu26) [327, 328] blockieren (Nutlin, **178**) oder wie RITA vermutlich direkt mit p53 interagieren und die für die Anbindung an hDM2 notwendige Konformationsänderung verhindern [329]. Darüber hinaus scheint auch eine Reihe weiterer niedermolekularer Stoffe unterschiedlicher Struktur hDM2 durch Aggregation inaktivieren zu können. Eine solche unspezifische Hemmung von hDM2 durch die Pyrrolverbindungen ist deshalb nicht auszuschließen. Strukturelle Ähnlichkeiten bestehen auch zum CdK-Inhibitor Flavopiridol, welcher durch Interaktion mit der ATP-Bindungstasche verschiedener CdKs den G₁/S- sowie G₂/M-Übertritt der Zellen verhindert und damit das Fortschreiten des Zellzyklus hemmt [330, 331, 332, 333, 334]. Außerdem führte diese Verbindung in Brustkrebszellen zu einer Hemmung der Zyklin-D1-Expression und zu einer down-Regulierung antiapoptotischer Proteine (Bcl-2, survivin) [335, 336].

Eine besonders interessante Verbindung stellt das in einer Konzentration von 10 μM zytostatisch wirkende 2-(4-Chlor-2-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-3-propyl-1H-pyrrol (**97**) dar, das auch ein ausgeprägtes estrogenes Potential besitzt und eine Leitstruktur für die Entwicklung bifunktioneller Verbindungen darstellen könnte.

Um die Ursachen für das Auftreten von zytotoxischen Eigenschaften der triarylierten Pyrrole näher einzugrenzen, sind Untersuchungen zur Apoptose sowie die Quantifizierung

verschiedener am Zellzyklus beteiligter Proteine (CdKs, Zykline) denkbar. Dass die Zytotoxizität der an Aromat C *ortho*-chlorierten 2-Alkyl-1,3,5-triaryl-1*H*-pyrrole (**151**, **156**, **161**, **170**) gering ist, könnte sowohl auf die Alkylsubstitution als auch auf die *N*-Arylierung zurückzuführen sein. Um mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten, müssen Untersuchungen mit nicht alkylierten chlorierten 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen sowie an weiteren Positionen chloresubstituierten Verbindungen erfolgen.

Darüber hinaus konnte für die chlorierten Pyrrole ein ausgeprägter Hemmeffekt auf die Cyclooxygenase-1 (Tabelle 7-3) nachgewiesen werden, der auch in Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung der Verbindungen stehen kann.

Eine COX-2-Aktivierung führt in vielen Tumoren z. B. zu einer p53-Hemmung [337, 338] sowie einer gesteigerten Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 [339]. Selektive COX-2-Hemmer wie NS-398 führen vermutlich durch eine up-Regulierung von p21 und p27 [340] zu einem Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase [341]. Ihre apoptoseinduzierende Wirkung konnte in vielen Tumoren z. B. der Brust [342], des Kolons [343] oder der Prostata [344] bereits nachgewiesen werden. Für klassische NSAIDs wird außerdem ein COX-2-unabhängiger Mechanismus der Apoptoseinduktion über die Inhibierung von cGMP oder ERK2 [224] diskutiert. Kürzlich konnte im PGE₂-Assay an COX-2-überexprimierenden, mit Arachidonsäure vorbehandelten MDA-MB-231-Zellen für Verbindung **58** eine starke Reduktion des PGE₂-Gehalts nachgewiesen werden (Daten unveröffentlicht), der klinischen Studien zufolge mit einem hohen Metastasierungspotential korreliert [345].

Bemerkenswert ist, dass die methoxylierten chlorhaltigen Verbindungen zu einer deutlich höheren COX-Hemmung als die hydroxylierten Analoga führten, was mit dem Aufbau des COX-Enzyms zusammenhängen könnte.

Obwohl das COX-Enzym zu den integralen Membranproteinen zählt, besitzt es keine transmembranäre Sequenz, sondern ist über jeweils vier amphipathische Helices an der Membran verankert, die gleichzeitig den lipophilen Eingangskanal des Enzyms bilden. Zur Aufnahme ins aktive Zentrum müssen die Fettsäurederivate bzw. die COX-Hemmer diese Lipiddoppelschicht passieren [345], was vermutlich den lipophileren Methoxyderivaten besser gelingt.

Tabelle 7-3 zeigt die im Thrombozyten-Ganzzellassay ermittelten IC_{50} -Werte der methoxylierten chlorhaltigen 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrole, die in einer Größenordnung mit denen etablierter Antiphlogistika liegen, die im selben Testsystem untersucht wurden.

Verbindung	IC_{50} [μ M] (COX-1-Ganzzellassay)	Verbindung	IC_{50} [μ M] (COX-1-Ganzzellassay)
ASS	0.57	56	0.42
Indometacin	0.03	57	0.38
Ibuprofen	1.29	58	0.02
Diclofenac	0.54	59	3.85
Celecoxib	3.45	60	4.95

Tabelle 7-3: Im Thrombozyten-Ganzzellassay ermittelte IC_{50} -Werte bekannter COX-Inhibitoren verglichen mit methoxylierten chlosubstituierten Pyrrolen.

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen den Pyrrolen und bekannten COX-2-Hemmern wie SC-558 (Abbildung 7-11) ist ihre analoge Ausrichtung in der COX-2-Bindungstasche nicht auszuschließen.

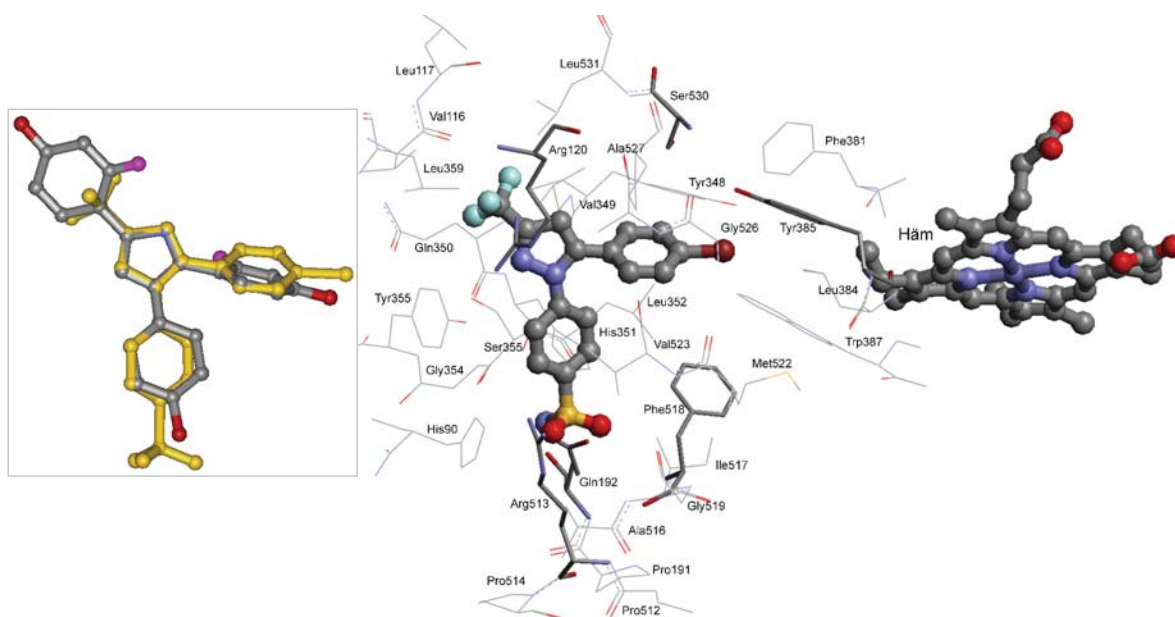


Abbildung 7-11: Links: Superposition von SC-558 (gelb) mit 2,5-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**58**). Rechts: SC-558 in der Bindungstasche der COX-2 [252].

Die Orientierung des chlorhaltigen Aromaten A von Verbindung **58** in Richtung Tyr385 und Ser530 ist denkbar. Aromat B lässt sich mit dem Methansulfonsäure-substituierten Aromaten von SC-558 überlagern, so dass seine Methoxygruppe in Richtung Arg513, Gln192 und Phe518 orientiert sein könnte, die jedoch aufgrund ihrer geringen Polarisierbarkeit nicht für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung steht, was die fehlende Selektivität erklären könnte.

Die enge Interaktion der Methansulfonsäure- bzw. Sulfonamidpartialstruktur der COX-2-selektiven Inhibitoren mit dieser COX-2-Kavität ist vermutlich die Ursache für die zeitabhängige reversible Hemmung des Enzyms. Dabei erfährt der Liganden-Enzymkomplex innerhalb kurzer Zeit eine Konformationsänderung (EI*) (Sekunden bis Minuten), woraus der eigentlich kompetitive reversible Inhibitor nur langsam wieder dissoziiert (Minuten bis Stunden). Andererseits interagieren COX-2-Hemmer im aktiven Zentrum von COX-1 als einfache kompetitive Inhibitoren [346].

Da viele unselektive NSAIDs wie Flurbiprofen, Indometacin oder Diclofenac sowohl die COX-1 als auch die COX-2 in einem zeitabhängigen Mechanismus hemmen, scheint die unterschiedliche Bindungskinetik von COX-2-Hemmern in den aktiven Zentren der COX-Isoenzyme mitverantwortlich für die COX-2-Selektivität zu sein. Die für die zeitabhängige Enzymhemmung notwendigen Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff und dem Protein sind nur unzureichend bekannt. Ein ähnliches Bindungsverhalten für die untersuchten Pyrrole ist nicht auszuschließen.

Dabei würde jedoch die Inkubationszeit einen entscheidenden Einfluss auf die Hemmeigenschaften der Verbindungen nehmen. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde für 75 min (Thrombozyten-Ganzzellassay) bzw. für 10 min (EIA-Assay an den isolierten Isoenzymen COX-1 und COX-2) inkubiert. Da sich dabei die Enzymaktivitäten deutlich unterscheiden können, ist ein direkter Vergleich der Testwerte nicht möglich. Jedoch zeigen die Ergebnisse beider Untersuchungen, dass offensichtlich die Position des Chlorsubstituenten die Hemmeigenschaften beeinflusst, wobei *ortho*-Chlorsubstituenten zu einer Wirkverstärkung führen. Die Untersuchungen der an Aromat C *ortho*-chlorierten C-2-Alkylhomologen 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole zeigen, dass eine Alkylierung des Heterozyklus eine verminderte COX-Hemmung zur Folge hat. Da das 2,4,5-triarylierte propylierte, *para*-chlorsubstituierte Derivat **73** jedoch zu einer ausgeprägten Enzymhemmung führte, kann eine unterschiedliche Ausrichtung der Verbindungen im aktiven Zentrum vermutet werden.

Im thrombozytenbasierten Ganzzellassay konnte für das methoxylierte Derivat **58** eine ca. 500-fach höhere COX-Inhibierung gegenüber der hydroxylierten Verbindung gefunden werden, während im EIA-Assay ein ca. 10-fach höherer Hemmeffekt erhalten wurde. Vermutlich spielt dabei eine bessere Zellaufnahme der lipophileren Methoxyderivate eine Rolle.

Kürzlich konnten Resveratrol-derivate mit COX-inhibitorischen Eigenschaften identifiziert werden. Während Resveratrol selbst zu einer unselektiven COX-Hemmung führt (COX-1: $IC_{50} = 0.54 \mu\text{M}$; COX-2: $IC_{50} = 0.99 \mu\text{M}$) [348], zeigen analoge hydroxylierte Hydroxystil-

bene wie 3,3',4',5-Tetrahydroxy-*trans*-stilben (COX-1: $IC_{50} = 4.713 \mu\text{M}$; COX-2: $IC_{50} = 0.0113 \mu\text{M}$) eine ca. 400-fache Selektivität zu COX-2. Durch Berechnungen mit Sybyl6.9 FlexX auf der Grundlage der Kristallstruktur von SC-558 im aktiven Zentrum der COX-2 konnten jedoch keine Interaktionen mit der für die COX-2-Selektivität in Verbindung gebrachte Seitentasche registriert werden. Deshalb konnte ein anderer Bindungsmodus oder ein anderer Bindungsort nicht ausgeschlossen werden. Bemerkenswert ist, dass bei dieser Verbindungsklasse die methoxylierten Derivate kaum wirksam waren.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und den COX-hemmenden Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pyrrole scheint aufgrund der Untersuchungsergebnisse nicht vorzuliegen. Dafür spricht dass hydroxylierte und methoxylierte Analoga wie z. B. **82** und **58** große Wirkunterschiede bei der COX-Inhibierung aufweisen (**82**, $10 \mu\text{M}$, COX-1: 44%, COX-2: 55%, **58**, $1 \mu\text{M}$ COX-1: 66%, COX-2: 63%), während sie auf das Zellwachstum einen vergleichbaren Hemmeffekt ausüben (**58**: Abbildung 7-12, vgl. **82**: Abbildung 6-24, S. 103).

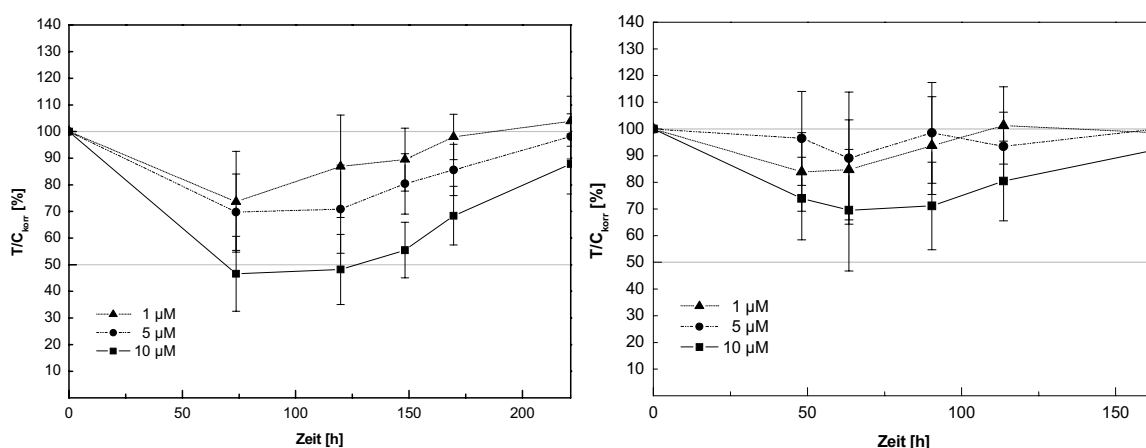


Abbildung 7-12: Antiproliferative Wirkung von Verbindung **58** im zeitabhängigen Assay, links: MCF-7-Zellen, rechts: MDA-MB-231-Zellen, $n = 16$.

Zur Einschätzung des Einflusses der Stickstoffsubstitution auf die COX-inhibitorischen Eigenschaften müssten in weiterführenden Analysen analog zu den Typ-1-Verbindungen unalkylierte, chlorierte Typ-2-Derivate untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Triaryl-1*H*-pyrrole zeichnen sich als neue Gruppe tetrasubstituierter Fünfringsysteme durch ein sehr interessantes Wirkspektrum aus. In Abhängigkeit von der Art und der Stellung der Substituenten am heterozyklischen Ringsystem sowie an den Aromaten können die pharmakologischen Eigenschaften moduliert werden (Abbildung 7-13).

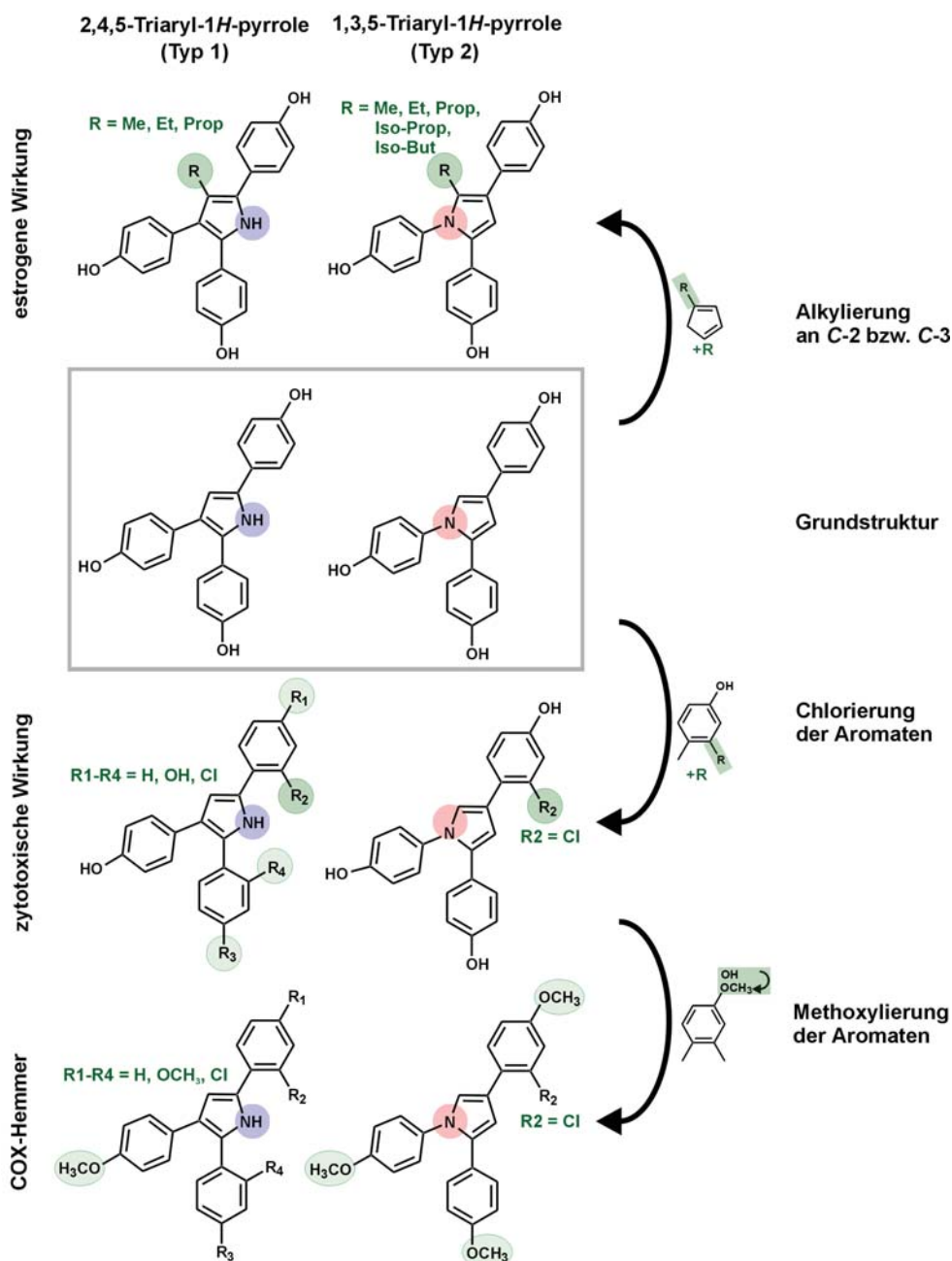


Abbildung 7-13: Beziehung zwischen dem Vorhandensein bestimmter Strukturelemente und den pharmakologischen Eigenschaften verschieden substituierter Triaryl-1*H*-pyrrole.

Verbindungen mit estrogener Potenz werden durch Alkylsubstituenten am Heterozyklus von Tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrolen erhalten. Durch Substitution der Aromaten mit

Chlor können unter Rückgang bzw. Verlust der estrogenen Wirkung zytotoxische Verbindungen erhalten werden. Methoxysubstituierte chlorhaltige Derivate bewirken dagegen bei unveränderter Zytotoxizität eine ausgeprägte COX-Hemmung. Dabei werden die zytotoxischen und COX-inhibitorischen Eigenschaften durch Alkylsubstituenten abgeschwächt oder gehen verloren. Durch geeignete Substituentenauswahl lassen sich kombinierte Wirkprofile erhalten.

Deshalb könnte die Ableitung multifunktionaler Wirkstoffe aus dieser Klasse von Verbindungen möglich sein. Eine Steuerung des Wirkprofils ist durch gezieltes Einbringen der dargestellten Substituenten denkbar. In Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten könnte so die Entwicklung von zytotoxischen COX-Hemmern vor allem zur Behandlung des hormonunabhängigen Mammakarzinoms und von ER-down-Regulatoren ohne estrogenen Eigenschaften zur Behandlung des hormonabhängigen Mammakarzinoms gelingen. Ferner könnte auch das Design von SERM-artigen COX-Hemmern ohne kardiotoxisches Potential ermöglicht werden, die Einsatz bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen [349, 350] oder der Tumorphylaxe finden könnten.