

SYNTHESE UND TESTUNG NEUER WIRKSTOFFE MIT HÖHERER AFFINITÄT
ZUM NUKLEÄREN ESTROGENREZEPTOR UND HOHER
ADSORPTIONSFÄHIGKEIT AUF OBERFLÄCHEN VON HORMONABHÄNGIGEN
TUMORZELLEN

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

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

vorgelegt von

MURAT ÜSTÜNEL

aus Berlin

September 2014

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2008 bis März 2011 über ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB 765 (Teilprojekt B6) unter der Leitung von Prof. Dr. Ronald Gust (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin).

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Disputation: 25.02.2015

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter der Anleitung von **Herrn Prof. Dr. Ronald Gust** angefertigt.

An dieser Stelle bedanke ich mich bei

Herrn Prof. Dr. Ronald Gust für die Überlassung des interessanten und vielfältigen Themas und für die große Freiheit bei der Bearbeitung dieser wissenschaftlichen Arbeit sowie für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen,

Namentlich bei Dr. Magnus Krüger, Dr. Andrey Molchanov, Christian Koppe, Dr. Gerhard Ruber, Dr. Wukun Liu, Dr. Elena Mazzanti und Dr. Maria Proetto, die mir durch ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft zu wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Themen eine wertvolle Unterstützung waren,

Maxi Wenzel für die Einführung in die Zelltestungen, Silke Bergemann für die Durchführung der Luciferase-Assays und Heike Scheffler für die HPLC Messungen,

Den Praktikumsgruppen um Dr. Annette Kietzmann und Dr. Peter Witte für die gute Zusammenarbeit,

Andreas Kannegießer, Nadine Drawert, Nora Reitner und ihrer Tochter Juliane Reitner für die freundliche Bereitschaft hinsichtlich des Korrekturlesens,

Und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie für die Aufnahme der Spektren.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG danke ich für die Erteilung eines Stipendiums. Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Sonderforschungsbereich SFB 765 des Teilprojektes B6.

In aller Hochachtung und aller Liebe meinen Kindern Furkan und Ceyda, meiner Frau Meral und meinen Eltern Hasan und Nermin Üstünel.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	17
1.1 Der menschliche Körper	18
1.1.1 Regulation endogener Prozesse	18
1.2 Der Estrogenrezeptor	19
1.2.1 Allgemeines	19
1.2.1.1 Entdeckungen der Subtypen	19
1.2.1.2 Verteilung im Brustgewebe	19
1.2.1.3 Aufbau des Estrogenrezeptors	19
1.2.1.4 Ligandeninduzierte Genaktivierung	22
1.2.1.5 Liganden des Estrogenrezeptors α , β und deren Bindungsmodi	26
1.3 Der GPR30-Rezeptor	33
1.3.1 Allgemeines	33
1.3.1.1 Klassifizierung	33
1.3.1.2 Aktivierung des GPR30-R	34
1.4 Zielsetzung: Bivalenz	35
1.4.1 Drug-Targeting am ERα/β	35
1.4.2 GPR30-vermittelte Zellaufnahme	39

2 Synthetischer Teil	43
2.1 Übersicht der Verbindungen und deren Synthesewege	44
2.2 Synthese der Ausgangsverbindungen	49
2.2.1 Synthese der 2-Halo-4-methoxybenzaldehyde	49
2.2.2 Synthese der verschieden substituierten <i>meso</i> -1,2-Diarylethyldiamine	53
2.2.3 Methoxyspaltung der Verbindungen 26 und 30	60
2.3 Synthese der Iminoester	61
2.3.1 Synthese des Formimidsäureethylester	62
2.3.2 Synthese des Heptanimidsäureethylester Hydrochlorid	63
2.3.3 Synthese der Diiminoester Dihydrochloride	63
2.4 Synthese von (4<i>R</i>,5<i>S</i>)/(4<i>S</i>,5<i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Monomeren	64
2.4.1 Mögliche Zyklisierungsreaktionen	64
2.4.1.1 Synthese der Monomere nach Martin mit Orthoformiat	64
2.4.1.2 Synthese der Monomere nach Boykin mit Iminoester Hydrochloriden	65
2.5 Synthese der C2-alkylierten 2-Imidazolin-Dimere Dihydrochloride	66
2.6 Synthese der N-Alkyl-bis-<i>meso</i>-4,5-diaryl-2-imidazolin-Dimere	68
3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme	73
3.1 Angewendete pharmakologische Untersuchungen	74
3.2 Die Kristallviolett-Assay-Testung auf Zytotoxizität	74
3.2.1 Testergebnisse der Untersuchungen	75
3.2.1.1 Einfacher Kristallviolett-Assay	75

3.2.1.2 Zeit- und konzentrationsabhängiger Kristallviolett-Assay	80
3.2.1.3 Diskussion der Ergebnisse	82
3.3 Testung auf Estrogenität	83
3.3.1 HAP-Test: Bestimmung der relativen Bindungsaffinität	83
3.3.1.1 Einleitung HAP-Test	83
3.3.1.2 Ergebnisse der Dimere mit 2-Halo-4-hydroxyphenyl-Resten	84
3.3.1.2.1 2- <i>F</i> -4- <i>OH</i> -2-Imidazolin-Dimere: Verbindungen 64-67	85
3.3.1.2.2 2- <i>Cl</i> -4- <i>OH</i> -2-Imidazolin-Dimere: Verbindungen 68-71	86
3.3.1.3 Diskussion der fehlenden Wirkung von Dimeren	86
3.3.2 Der Luciferase-Assay	87
3.3.2.1 Das Testsystem	87
3.3.2.2 Ergebnisse der Testung auf Estrogenität und Antiestrogenität	88
3.3.2.2.1 Estrogenität: Testung auf Agonismus	90
3.3.2.2.1.1 Dimere 64-67 : 2- <i>F</i> -4- <i>OH</i> -substituierte Verbindungen	90
3.3.2.2.1.2 Dimere 68-71 : Verbindungen mit 2- <i>Cl</i> -4- <i>OH</i> -Substitution	90
3.3.2.2.1.3 Das reine Monomer <i>meso</i> -4,5-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (45)	92
3.3.2.2.1.4 Antiestrogenität: Testung auf Antagonismus	94
3.3.2.2.1.5 Diskussion der Ergebnisse	94
3.3.3 Bestimmung der Rezeptordichte	98
3.3.3.1 Das Testsystem	98
3.3.3.2 Testergebnisse	99

3.4 Testung der Zellaufnahme und der Zellaufnahmehemmung	101
3.4.1 Zellaufnahme	101
3.4.1.1 Einleitung	101
3.4.1.2 High Resolution Continuum Source Atomabsorptionsspektroskopie (HR-CS AAS)	101
3.4.1.3 Durchführung und Messung	102
3.4.1.4 Ergebnisse	103
3.4.1.4.1 4,5-Diaryl-2-imidazoline	104
3.4.1.4.2 Platin(II)-Verbindungen	106
3.4.1.5 Diskussion der Testergebnisse	108
3.4.2 Zellaufnahmehemmung	109
3.4.2.1 Einleitung	109
3.4.2.2 Durchführung	110
3.4.2.3 Messungen	111
3.4.2.4 Ergebnisse der Testung der Zellaufnahmehemmung	111
3.4.2.5 Diskussion der Ergebnisse der Zellaufnahmehemmung	113
4 ¹H-NMR-Spektroskopie ausgewählter <i>meso</i>-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere	115
4.1 Einleitung	116
4.2 ¹H-NMR-Untersuchungen	116
4.2.1 1,4-Bis(<i>meso</i> -4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)- butan Dihydrochlorid (68)	116

4.2.2 1,4-Bis(<i>meso</i> -4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)- decan (71)	118
5 Ermittlung der Sättigungslöslichkeit mittels UV/Vis- Spektroskopie	121
5.1 Theoretischer Hintergrund	122
5.2 Ermittlung der Sättigungslöslichkeit	122
5.2.1 Herstellung der Untersuchungslösungen	122
5.2.2 Erstellung der Kalibrierfunktion	123
5.3 Auswertung und Diskussion	123
6 Ermittlung von pK_s-Werten ausgewählter 4,5-Diaryl-2- imidazolin-Dimere	127
6.1 Der 2-Imidazolinring und die Amidin-Partialstruktur	128
6.2 Versuchsmethode: UV/Vis	129
6.3 Versuchsdurchführung	129
6.4 Meßergebnisse, Problematik und Diskussion	129
7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen	135
7.1 Einleitung	136
7.2 Voruntersuchungen	137
7.3 Untersuchungen von Dimeren	139
7.3.1 Die HPLC Methode	139
7.3.2 Versuchsbedingungen und Versuchszeiten	139

7.3.3 Herstellung der Messproben	140
7.4 Stabilitätsuntersuchung analog den Bedingungen der Zellversuche	140
7.5 Untersuchungen im alkalischen Millieu	142
7.6 Chemische Stabilität: Untersuchung in 0.01 M HCl	145
7.7 Diskussion der Ergebnisse aller Versuchsreihen	146
7.8 Interpretation und Produktanalyse von 54 und 66 im Alkalischen	147
7.9 Zusammenfassung	147
8 Zusammenfassung und Ausblick	151
Summary and Outlook	155
9 Experimenteller Teil	159
10 Literaturverzeichnis	235
11 Anhang	253
11.1 Abkürzungen	254
11.2 Posterpräsentationen	259
11.3 Lebenslauf	260

1

Einleitung

1.1 Der menschliche Körper

1.1.1 Regulation endogener Prozesse

Im menschlichen Körper laufen eine Vielzahl an lebenswichtigen regulatorischen Prozessen ab. Hormone nehmen hier eine wichtige Rolle ein. Sie werden im menschlichen Körper synthetisiert und haben ein breites Wirkspektrum [Karlson, 1]. Effekte an Zielorganen [Riggs 2], Differenzierung, Wachstum [Migliaccio et al., 3] und Funktionserhalt der Gewebe [Karas, 4] und Organe [Lavigne, 5] sind ihre Funktionen. Neben nicht-steroidalen Hormonen wie den Neuropeptiden des Hypothalamus, den Glykoproteinen der Adenohypophyse, Parathyrin der Nebenschilddrüsen und Calcitonin, Thyroxin und Triiodthyronin der Schilddrüse, Insulin der pankreatischen Inselzellen, Hormonen des Magen-Darm-Traktes wie Gastrin und den Catecholaminen (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, Melantonin) gibt es außerdem eine weitere Klasse an Hormonen, die ausgehend von Cholesterol entstehen. Alle haben gemeinsam, dass sie ein Steroidgrundgerüst tragen. Diese werden auch als Steroidhormone klassifiziert. Mineral- und Glucocorticoide, aber auch Sexualhormone wie Testosteron oder Estradiol (E2) sind Vertreter dieser Hormonklasse.

Sexualhormone bewirken die Bildung und den Funktionserhalt von sekundären Geschlechtsmerkmalen bei Mann und Frau und haben Effekte an regulatorischen Funktionen bei der Fortpflanzung [Inoue, 6]. Das überwiegend bei Frauen vorkommende Sexualhormon Estradiol (E2) beispielsweise entfaltet eine schützende Wirkung im ZNS, im kardiovaskulären Bereich und in den Knochen [Inoue et al., 7]. Einige Krankheiten werden durch Sexualhormone aufrechterhalten. Tumorerkrankungen an der Brust der Frau sind zum Beispiel auf das E2 sensibilisiert [Leclercq, 8]. Allerdings können Wirkungen nur dann erst auftreten, wenn das endogene Sexualhormon mit den Estrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$, welche die Zielorgane besitzen, interagiert und dadurch eine Genaktivierung einleitet.

Ausgehend vom Hormon E2 und anderen Estrogenen wird im Folgenden der endokrinologische Weg der Estrogenität vorgestellt. Beginnend mit dem Aufbau beider ER-Subtypen wird ein Einblick in die estrogenabhängige Genaktivierung, die Transkription und deren Liganden gegeben. Desweiteren erfolgt eine kurze Darstellung des membranständigen GPR30-Rezeptors.

1.2 Der Estrogenrezeptor

1.2.1 Allgemeines

1.2.1.1 Entdeckungen der Subtypen

Der Estrogenrezeptor (ER) ist in vielen Organen und Geweben verteilt [Brandenberger, 9], [Gustafson, 10]. Hierbei handelt es sich um einen ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktor [King, 11], [Welshorn, 12], der zur Klasse der nukleären Rezeptoren gehört [Htun, 13]. Es existieren zwei Subtypen, der ER α und ER β . Der physiologisch wirksame Ligand, das 17 β -Estradiol (E2), zeigt sehr ähnliche Affinitäten an beiden Subtypen [Matthews, 14]. Vor 51 Jahren (1962) wurde der ER α zum ersten Mal beschrieben [Jensen & Jakobsen, 15]. 1986 konnte die Aminosäuresequenz, also die Primärstruktur des Proteins, aufgeklärt werden [Greene, 16]. Neben der strukturellen Aufklärung gelang auch die Klonierung aus MCF-7 Mammakarzinom-Zellen [Green & Walter et al., 17]. Der Subtyp ER β wurde 1996 entdeckt und isoliert [Kuiper, 18].

1.2.1.2 Verteilung im Brustgewebe

Schätzungsweise 65 % aller Brustkrebserkrankungen sind ER-positiv [Shi, 19]. In gesundem Gewebe dieses Organs treten zwar beide Subtypen auf [Power, 20], der ER α wird aber vermehrt exprimiert [Hayashi, 21]. Dieses Verhältnis ändert sich allerdings bei einer Erkrankung des Brustgewebes [Leygue, 22]. Es kommt zu einer noch stärkeren ER α - und zu einer stark reduzierten ER β -Exprimierung [Speirs, 23].

1.2.1.3 Aufbau des Estrogenrezeptors

Die Subtypen des Rezeptors unterscheiden sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren und der Primärstruktur [Green, 17]. Bestehend aus 596 Aminosäuren hat der α -Subtyp ein Molekulargewicht von 66 kDa. Der β -Subtyp dagegen ist etwas kleiner. Seine Primärstruktur besteht aus 530 Aminosäuren mit 59 kDa Molekulargewicht [Kong, 24].

Nach Entschlüsselung der Primärstrukturen beider Subtypen wurden diese in sechs unterschiedliche Abschnitte, die jeweils verschiedene Aufgaben beziehungsweise unterschiedliche Funktionen bei der Genaktivierung haben, unterteilt [Kumar & Green

1 Einleitung

et al., 25]: die A/B-, C-, D-, E- und die F-Domäne. Vergleicht man den ER α und β miteinander, so liegt beispielsweise deren Homologie der Domäne E bei 53 % und 96 % bei der Domäne C [Dutertre, 26]. Die Abschnitte und deren Homologien sind in **Abb. 1.1** dargestellt.

So wie jedes Protein, beinhaltet der Transkriptionsfaktor ein N- und C-terminales Ende [Löffler, 27]. Die A/B-Domäne befindet sich am N-Terminal und ist Träger der ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion AF-1 [Norris, 28]. Hier wird die Transkription eingeleitet [Giguere, 29]. Diese Stimulation kann entweder durch eine Interaktion mit dem Präinitiationskomplex der Transkription oder mit unterschiedlichen Koaktivatoren erfolgen [Godowski, 30]. Die ligandenunabhängige Aktivierung der AF-1 ist unter anderem vom Phosphorylierungsgrad abhängig [Weigel, 31]. In den Domänen A/B beider Subtypen wird jeweils die Aminosäure Serin (Ser) als eine wichtige Phosphorylierungsstelle genutzt [Bunone, 32]: am ER α ist es Ser 118 [Kato et al., 33], am ER β Ser 106 und 124 [Tremblay, 34], so dass über die Ras-MAP-Kinase-Kaskade eine ligandenunabhängige Aktivierung erfolgt [Tremblay et al., 35]. Die Aktivierung der A/B-Domäne ist vom Phosphorylierungsstatus dieser Aminosäuren abhängig [Aronica, 36]. Neben der AF-1 ist eine weitere Aktivierungsfunktion, die ligandenabhängige AF-2, bekannt, die in der C-terminalen Domäne E entsteht, wenn ein Estrogen den ER stimuliert [Lees, 37]. Außerdem gibt es die ligandenunabhängigen AF-2a [Norris, 28] und AF-2b [Jordan, 38].

Der AF-2 ist Teil der Ligandenbindungsdomäne (LBD). Die LBD ist die Andockstelle für Liganden und dient der Aktivierung der ER-Subtypen [Tedesco, 39]. Sie besteht aus schätzungsweise 250 Aminosäuren und ist vom lipophilen Charakter geprägt [Anstead, 40]. Bei einer Interaktion mit einem Estrogen kommt es zu Wechselwirkungen mit sehr vielen Transkriptionskoaktivatoren, welche in der Region des AF-2 binden [Jordan, 38], [Beato, 41]. Durch eine Stimulation beider ER Subtypen α und β können in den meisten Fällen synergistische Aktivierungen von AF-1 und AF-2 beobachtet werden [Tzukerman, 42], auch wenn sie in einigen Fällen vereinzelt ablaufen [Berry, 43].

Die Domäne E besitzt neben den erwähnten Aktivierungsfunktionen weitere für die Signaltransduktion wichtige Andockstellen: eine Dimerisierungsstelle und Regionen für das „nuclear localisation signal“ (NLS) und das „heat shock protein 90“ (HSP90) [Gronemeyer, 44].

1 Einleitung

Kommt es zu einer ligandeninduzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors, so erfolgt im Anschluss eine Bindung an ER-abhängige Gene der DNA [Evans, 45]. Für die Bindung an die bestimmten DNA-Sequenzen ist die Domäne C des ER verantwortlich [Freedman, 46]. Diese Aminosäuresequenz der DNA bildet den essentiellen Promoter „estrogen response element“ (ERE) [Luisi, 47]. Domäne C beinhaltet zwei Zinkfinger [Tsai, 48]. Beide haben unterschiedliche Aufgaben. Der eine Zinkfinger ist die P-Box. Sie sorgt für die spezifische Interaktion der Domäne C des Rezeptors mit dem Promoter, während der zweite Zinkfinger, auch D-Box genannt, die ER-Dimerisierung ermöglicht [Mader, 49].

Für die ligandeninduzierte Konformationsänderung als auch für die Bindung von Koaktivatoren am Rezeptor ist die Domäne D beider ER Subtypen verantwortlich [Jackson, 50]. Domäne F spielt vermutlich bei der Transaktivierungsstärke der Domäne A/B und E eine Rolle [Hansen, 51].

In der unteren Abbildung (**Abb. 1.1**) sind ER α und β schematisch dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung ist das N-terminale und auf der rechten Seite das C-terminale Ende abgebildet. Die Ziffern deuten auf die Anzahl der Aminosäuren (AS) der jeweiligen Domäne hin [Gronemeyer et al., 52]. So hat die A/B-Domäne vom α -Subtyp 180 AS, die vom β -Subtyp hat 149 AS. Beide sind zu 30 % in ihrer Sequenz homolog zueinander. Die Domäne C besteht aus 83 AS (ER α) beziehungsweise aus 65 AS (ER β) [Green, 53] und Sequenz D ist 39 AS im ER α und 34 AS im ER β groß. Sie sind dennoch nur zu 30 % in ihrer Sequenz identisch. Im Transkriptionsfaktor bildet Abschnitt E die größte Domäne. Der α -Subtyp hat 251 AS. Lediglich eine AS mehr hat der andere Subtyp. Ihre Homologie, siehe unten, beträgt wie bereits erwähnt nur 53 % [Green, 53]. Der Abschnitt F sitzt am C-terminalen Ende und besteht aus 42 AS im ER α und im ER β sind es 30 AS [Tsai, 48].

1 Einleitung

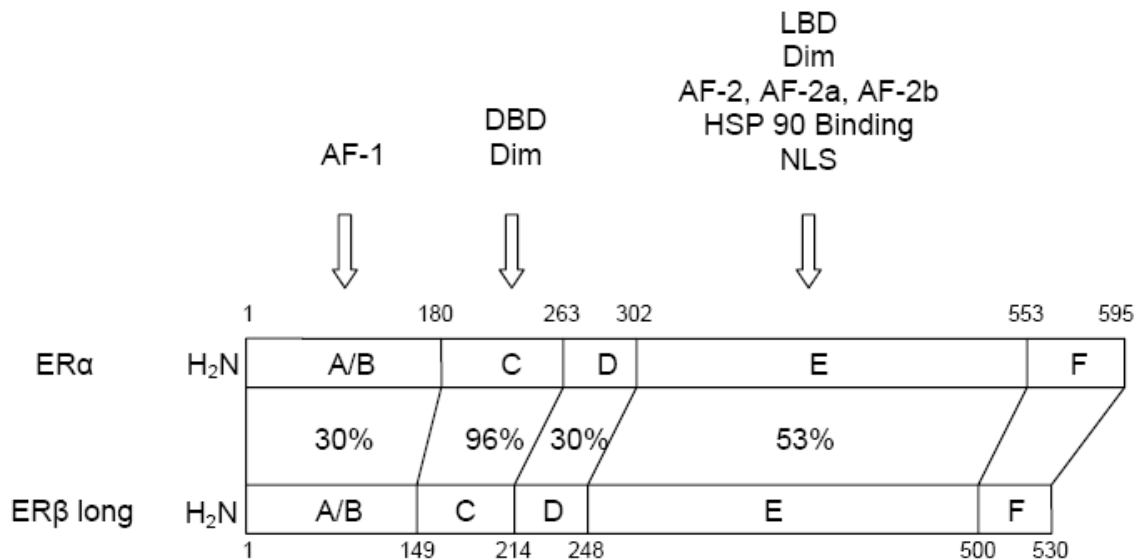


Abb. 1.1: schematische Darstellung beider Subtypen nach Tsai [48] und Gronemeyer et al. [52], gegliedert nach ihren Domänen A-F.

In dieser Abbildung ist der β -Subtyp als „ER β long“ bezeichnet. Das rührt daher, dass weitere Varianten existieren [Schlenk, 54]. Als ursprünglich dieser ER kloniert wurde, bestand er aus 485 AS und wurde „ER β short“ genannt [Mosselman, 55]. Ogawa und Inoue et al. haben diesem nativen Klon zusätzlich eine Aminosäuresequenz am N-terminalem Ende des Proteins angeheftet und dieser wurde „ER β 1 long“ oder auch nur „ER β long“ genannt [Ogawa, Inoue et al., 56]. Im Folgenden wird diese Variante weiterhin nur als ER β bezeichnet. Es gibt allerdings noch eine weitere Variante, die nicht in der Lage ist, Liganden zu binden und eine Genaktivierung einzuleiten. Es handelt sich um den ER β 2 beziehungsweise ER β cx [Ogawa, 57].

1.2.1.4 Ligandeninduzierte Genaktivierung

Vor Beginn einer Genaktivierung liegt der ER zunächst inaktiv vor [Renoir, 58]. Die Domäne E des Transkriptionsfaktors assoziiert mit dem „heat shock protein 90“ (HSP90) [Gronemeyer, 44]. Dieser ist ein Bestandteil eines Proteinkomplexes, welcher den ER im inaktiven Zustand hält [Htun, 13]. Zusätzlich kann diese Domäne mit Korepressoren wie dem SMRT („silencing mediator for retinoic and thyroid

1 Einleitung

hormone receptors“) oder dem NCoR („nuclear receptor corepressor“) assoziiert vorliegen [Evans, 59], [Horlein, 60].

Über zwei unterschiedliche Mechanismen kann der ER in seine aktive Form überführt werden: über einen hormonell gesteuerten Weg oder alternativ über einen ligandenunabhängigen Mechanismus [Leygue, 22].

Zunächst soll der ligandeninduzierte Transkriptionsweg vorgestellt werden. In einem ersten Schritt diffundiert das E2 durch die Plasmamembran und gelangt aktiv über einen durch den NLS („nuclear localisation signal“, siehe **1.2.3**) vermittelten Transport in den Zellkern. Auch ein passiver Weg wäre möglich [Guichon-Mantel, 61]. Das E2 bindet an der Domäne E des Transkriptionsfaktors, wodurch es über einer Phosphorylierung zu einer Rezeptorkonformationsänderung kommt [Bagchi, 62]. Der Phosphorylierungsgrad steigt maximal um ein Vierfaches an [Le Goff, 63]. Der Grad einer Phosphorylierung korreliert auch mit der Stärke eines Estrogens [Denton, 64]. Anschließend erfolgt eine Dissoziation vom HSP90 [Htun, 13]. Erst jetzt kann eine Dimerisierung zweier ER ermöglicht werden. Es können Homomere [Jungblut, 65], bestehend aus zwei identischen ER-Subtypen, oder auch Heteromere aus beiden ER-Subtypen gebildet werden [Little, 66]. Die Stabilität beider Isoformen ist abhängig vom Liganden. Estrogene führen zu einer besseren Stabilität als Antiestrogene [Khan, 67].

Für die später folgende Transkription werden ER-Dimere von einem Komplex aus koregulierenden Proteinen, den Koaktivatoren [Katzenellenbogen, 68], unterstützt. Sie stabilisieren die Wechselwirkung zwischen dem aktivierten ER und dem Transkriptionskomplex [Klinge, 69] und können somit die Transkriptionsaktivität steigern [Glass, 70]. Hierbei interagieren sie mit der AF-2 der Domäne E über die NR-Box, welche aus kurzen leucinreichen Abschnitten besteht [Ding, 71], [Wagner, 72]. Diese Wechselwirkung ist nur deshalb möglich, weil die Helices 3-5 und 12 der LBD eine Kontaktfläche bilden [Renaud, 73], [Bourguet, 74] und somit Signale für die Transkription vom Liganden zum Transkriptionsapparat übertragen [Ding, 71], [Leers, 75]. SRC-1, ERAP und TRAP 220 sind einige Beispiele aus einer Vielzahl von Koaktivatoren [Halachmi, 76], [Leo, 77].

Koaktivatoren besitzen auch eine andere Aufgabe. Vor einer Transkription umringen Histone die DNA und verhindern eine Genaktivierung. Koaktivatoren besitzen eine

1 Einleitung

Histonacetyltransferaseaktivität (HAT-Aktivität) [Struhl, 78]. Die Affinität der Histone zur DNA wird herabgesetzt, indem Histone am N-terminalem Ende acetyliert werden [Struhl, 78]. Somit erleichtern sie die Bildung des Präinitiationskomplexes und die Aktivierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II [Sternklang, 79], [Tsukiyama, 80], [Korzus et al., 81].

Für die Transkription an der DNA dienen einige Koaktivatoren als Transkriptionsfaktoren, beispielsweise TFIIB, TFIID und TFIIF [Greenblatt, 82]. Zunächst bindet der Komplex aus ER-Dimer und Proteinen an die ERE's („estrogen response elements“) und an eine Sequenz, die 25-30 Basenpaare vom Startpunkt der Transkription entfernt liegt. Dieser Startpunkt ist die TATA-Box [Tsai, 48], [Klein-Hitpass, 83].

Zuerst bindet TFIID, bestehend aus dem TATA-bindendem Protein (TBP) und TBP-assoziierten Faktoren (TAFs), an die TATA-Sequenz der DNA [Greenblatt, 82]. Durch weitere Anordnung von TFIIB, TFIIF und der RNA-Polymerase II zusammen mit TFIID [Nikolov, 84] bilden sie einen ternären Komplex im Bereich der TATA-Sequenz [Usheva, 85]. Hierbei handelt es sich um den minimalen Präinitiationskomplex [Buratowski, 86]. TFIIB interagiert hierbei mit TBP, TFIIF, RNA-Polymerase II und mit DNA-Sequenzen, die ober- und unterhalb des TATA-Abschnitts liegen [Nikolov, 84], [Usheva, 85]. Zeitgleich tritt TFIIB auch mit dem AF-2 der Domäne E des ER in Wechselwirkung [Ing, 87]. Die RNA-Polymerase II löst aus diesem Initiationsprozess die Transkription aus, in dem die mRNA gebildet wird [Tsukiyama, 80], [Berger, 88], [Korzus, 89]. Im Anschluss erfolgt die Translation in den Ribosomen, wodurch Proteinbiosynthese erfolgt.

Außer den Koaktivatoren gibt es auch Gegenspieler, die Korepressoren. Sie interagieren nur dann mit dem ER, wenn dieser ungebunden im inaktiven Zustand ist oder wenn Antagonisten des ER mit der Domäne E interagieren [Horwitz, 90]. Dabei kann die Wechselwirkung zwischen den Korepressoren und dem ER durch Antagonisten verstärkt werden [Lavinsky et al., 91]. Diese Proteine wirken einer estrogeninduzierten Transkription entgegen, da unter anderem eine Rekrutierung von Histondeacetylasen erfolgt [Dettmann, 92], welche die Histone deacetylieren und somit die Bildung des Transkriptionsapparates verhindern [Lavinsky et al., 91]. Zu den Korepressoren gehören beispielsweise SMRT („silencing mediator for retinoic

1 Einleitung

and thyroid hormone receptors“) [Evans, 59] und NCoR („nuclear receptor corepressor“) [Horlein, 60].

In der unteren **Abb. 1.2** ist eine Skizze der ligandeninduzierten Transkription schematisch dargestellt. Es gelten folgende Abkürzungen: E = Estrogen; ER = Estrogenrezeptor; HSP90 = „heat shock proteine 90“ bzw. „Hitze Schock Protein 90“; ERE = „estrogene response element“; TAF = TATA-assoziierte Faktoren; TBP = TATA bindendes Protein; GF = „growth factor“, Wachstumsfaktoren.

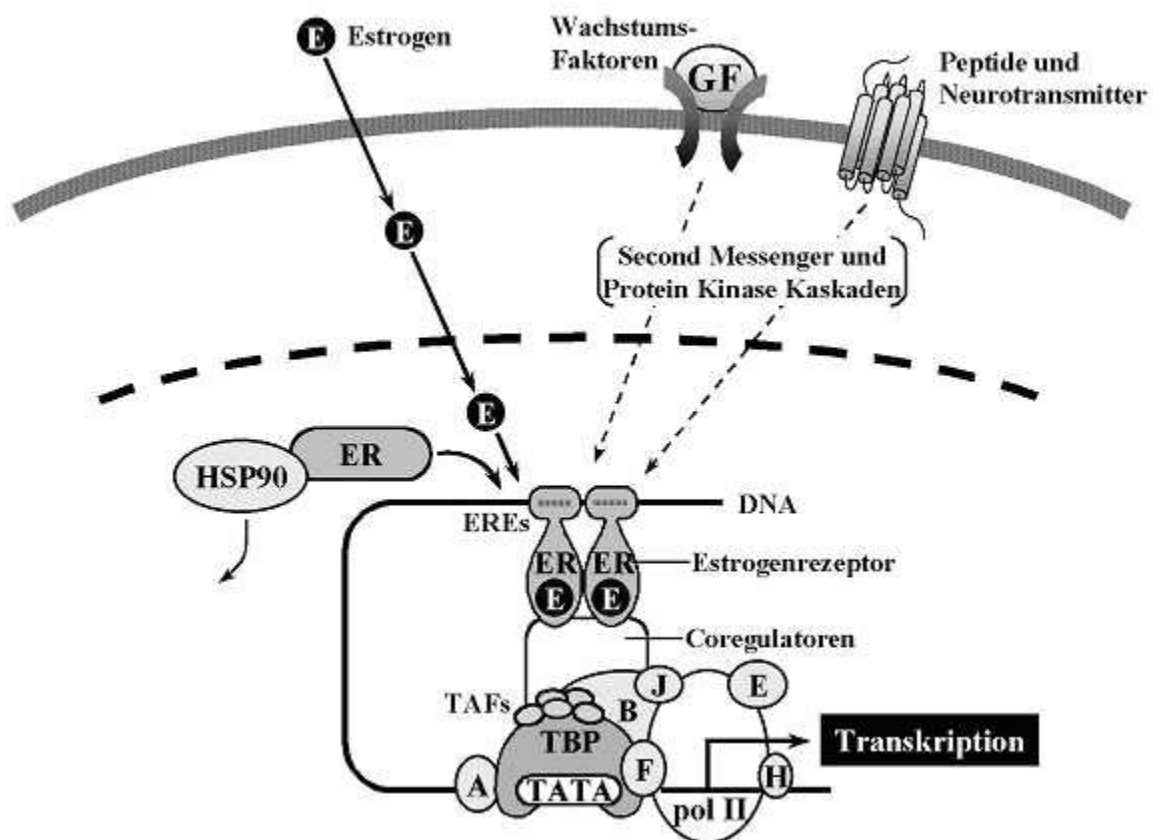


Abb. 1.2: Abbildung nach Tsai [48] und Katzenellenbogen [93].

In dieser Abbildung sind außerdem noch die Wachstumsfaktoren mit GF für „growth factor“ abgebildet. Sie leiten den alternativen Mechanismus der Aktivierung des ER ohne Anwesenheit eines Liganden ein [Leygue, 22]. Vertreter der GF sind beispielsweise der insulinähnliche Wachstumsfaktor IGF-1 („insulin-like growth factor“) und der epidermale Wachstumsfaktor EGF („epidermal growth factor“). Sie

1 Einleitung

bewirken eine über die MAP-Kinase vermittelte Phosphorylierung des Estrogenrezeptors [Bunone, 31], wodurch das Ablösen vom HSP90 mit eingehender Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors eingeleitet wird [Kato, 32]. Der TGF β , ein weiterer Wachstumsfaktor, ist in der Lage, eine hormonabhängige Aktivierung des ER entgegen zu wirken [MacGregor, 94]. G-Protein gekoppelte transmembranäre Rezeptoren können durch Interaktionen mit Neurotransmitter oder Peptiden ebenfalls den alternativen Mechanismus der Aktivierung des ER ohne Anwesenheit eines Estrogen aktivieren, wie es die Wachstumsfaktoren ebenfalls machen [Bunone, 31], [Tsai, 48], [Katzenellenbogen, 93].

1.2.1.5 Liganden des Estrogenrezeptors α , β und deren Bindungsmodi

Im folgendem werden einige Liganden des ER und deren räumliche Ausrichtung in der LBD vorgestellt. Neben dem steroidalen physiologischen Liganden E2 sind *meso*-Hexestrol (HES) und Diethylstilbestrol (DES) auch Liganden des Transkriptionsfaktors. Beide besitzen zwar kein steroidales Grundgerüst, können sich dennoch analog dem E2 in der Bindungstasche ausrichten und wie dieses ebenfalls agonistische Wirkungen entfalten [Shiau, 95]. Solche Verbindungen werden auch als Typ-I-Estrogene klassifiziert [Gust, 96].

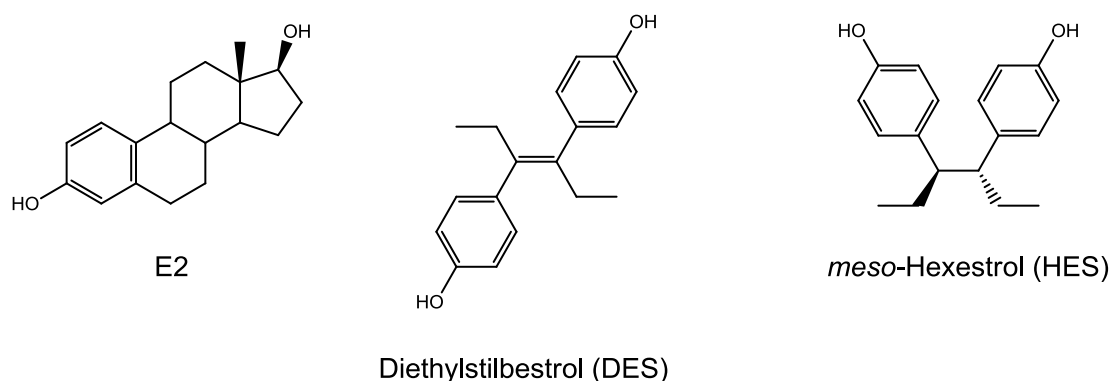


Abb. 1.3: der physiologische Agonist E2 und die synthetischen Estrogene DES und HES.

Zur Veranschaulichung der Interaktionen von Typ-I-Estrogenen in der Bindungstasche der LBD wurden Röntgenkristallstruktur-Analysen, beispielsweise vom E2/ER-

1 Einleitung

Kokristallisiert durchgeführt, um ihre agonistische Wirkungen besser verstehen zu können [Brzowski, 97]. Die sterische Ausrichtung des E2 und ihre genauen Interaktionen konnten nun identifiziert und ihre Aktivierung des ER verstanden werden.

Die LBD der Domäne E des α -Rezeptors, gebildet aus den Helices 3, 6, 8 einschließlich ihrer vorangehenden Schleife und der Helix 11, nimmt den Liganden auf. Mit der damit verbundenen Konformationsänderung verschließt Helix 12 die hydrophobe Bindungstasche, ohne aber selber mit dem E2 zu interagieren [Brzowski, 97]. Dies führt zur Ausbildung der Koaktivatorbindungsstelle aus Teilen der Helices 3, 5, 6, 11 und 12. Diese Formation wird durch Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Glu 542 und Lys 362 stabilisiert. Koaktivatoren können nun über ihre NR-Box am E2/ER-Komplex angreifen.

Dieser Prozess ist unter anderem nur dann möglich, wenn die phenolische *OH*-Gruppe des E2 Wasserstoffbrückenbindungen (*H*-Brücken) zur Carboxylat-Gruppe des Glu 353, zum Guanidiniumrest des Arg 394 und einem Molekül Wasser ausbildet. Die *OH*-Gruppe der 17 β -Position bildet ebenfalls *H*-Brücken zum N3 des Imidazolrings von His 524 aus. Aufgrund seines Steroidgerüsts ist das E2 auch in der Lage, lipophile Wechselwirkungen einzugehen. Auf der α -Seite des Moleküls geht der Agonist mit den Alkylketten der Aminosäuren Phe 404 und Leu 391, auf der β -Seite mit Ala 350 und Leu 387 van-der-Waals-Wechselwirkungen ein. Im Falle von Diethylstilbestrol und *meso*-Hexestrol sind es ihre jeweiligen Ethylreste, welche über hydrophobe Interaktionen mit diesen Aminosäuren stabilisiert werden. Weiterhin sind Ile 424, Gly 521 und Leu 525 daran beteiligt, den D-Ring des E2 zu stabilisieren [Brzowski, 97].

Auch wenn die LBDs der Subtypen α/β nur 53 % identisch sind, so sind deren Bindungstaschen nahezu identisch. Nur in zwei Aminosäuren unterscheiden sie sich: Leu 384 und Met 421 beim ER α , Met 336 und Ile 373 beim ER β [Pike, 98].

Röntgenkristallstruktur-Analysen und Molecular Modelling Studien erbrachten die Kenntnis, dass eine erfolgreiche Ausbildung von *H*-Brücken zu den AS Glu 353, Arg 394 und His 524 nur dann möglich ist, wenn die Abstände beider *OH*-Gruppen in der Größenordnung von 10.9 Å (E2) bis 12.1 Å (DES) liegen und die Verbindungen planare Anordnungen einnehmen können.

1 Einleitung

In der **Abb. 1.4** ist das Bindungsmodell des E2 abgebildet. Schematisch dargestellt sind die hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen des Steroidhormons mit den Aminosäuren der LBD. Weiterhin zeigt die Abbildung die Röntgenkristallstruktur, bei der die Konformationen der Helices abgebildet sind.

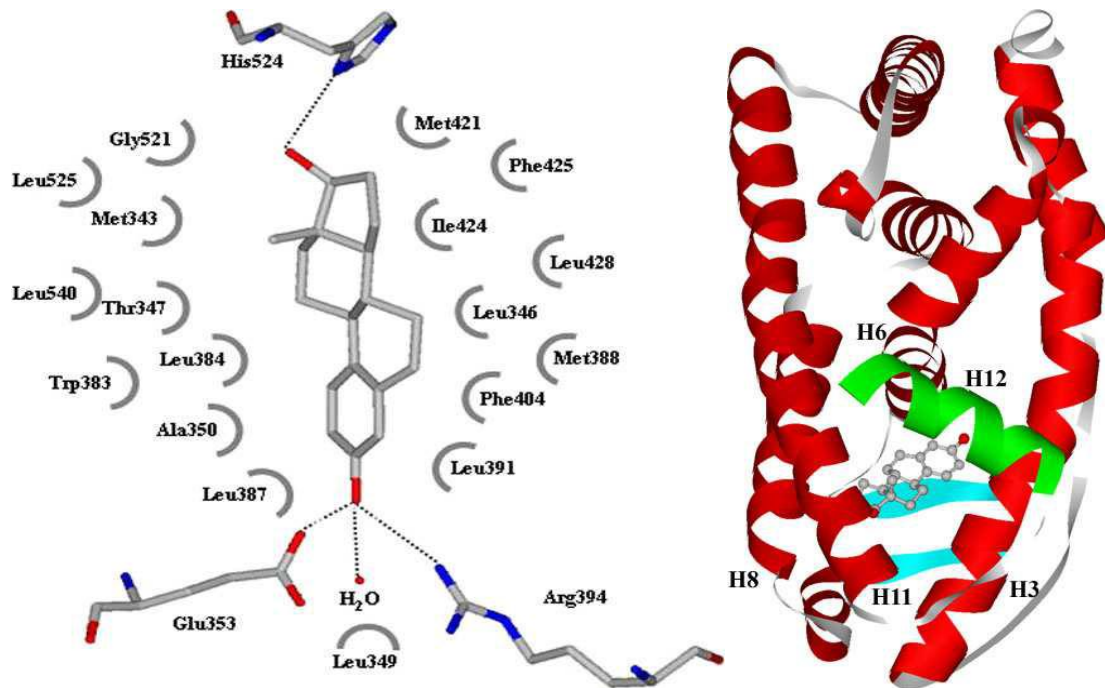


Abb. 1.4: links: schematische Darstellung des E2/Ligand-Komplexes in der Bindungstasche des ER α ; rechts: die Röntgenkristallstruktur der Bindungstasche mit Ligand. H3, 6, 8, 11 = Helices 3, 6, 8, 11; Helix 12 (H12) ist grün abgebildet. Abbildungen aus v. Rauch [99] nach Brzozowski [97].

Auch von DES wurden Kokristallisate mit dem ER α gemacht und ebenfalls die räumliche Ausrichtung in der LBD studiert [Shiau, 95]. Untersuchungen belegen, dass DES eine dem E2 identische Konformation einnehmen kann. Eine phenolische Gruppe des nichtsteroidalen Liganden interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit His 524. Die zweite phenolische Gruppe bildet ebenfalls *H*-Brücken aus, in dem Fall zu Glu 353, Arg 394 und einem Molekül Wasser. Aufgrund beider Ethylreste kann DES auch Taschen in der LBD besetzen, die sich ober- und unterhalb der Molekülebene des E2 befinden [Shiau, 95]. Der etwas größere O-O-Abstand mit 12.1 Å macht sich gegenüber dem Abstand von E2 (10.9 Å) kaum bemerkbar. Typ-I-

1 Einleitung

Estrogene richten sich identisch zum physiologischen Liganden E2 in der Bindungstasche aus. Dadurch bilden sich identische Wechselwirkungen mit den gleichen Aminosäuren aus, wie Röntgenkristallstrukturen belegen [Shiau, 95]. Auch die Helices inklusive Helix 12 nehmen gleiche Konformationen bei einer Interaktion des Liganden in der Bindungstasche an.

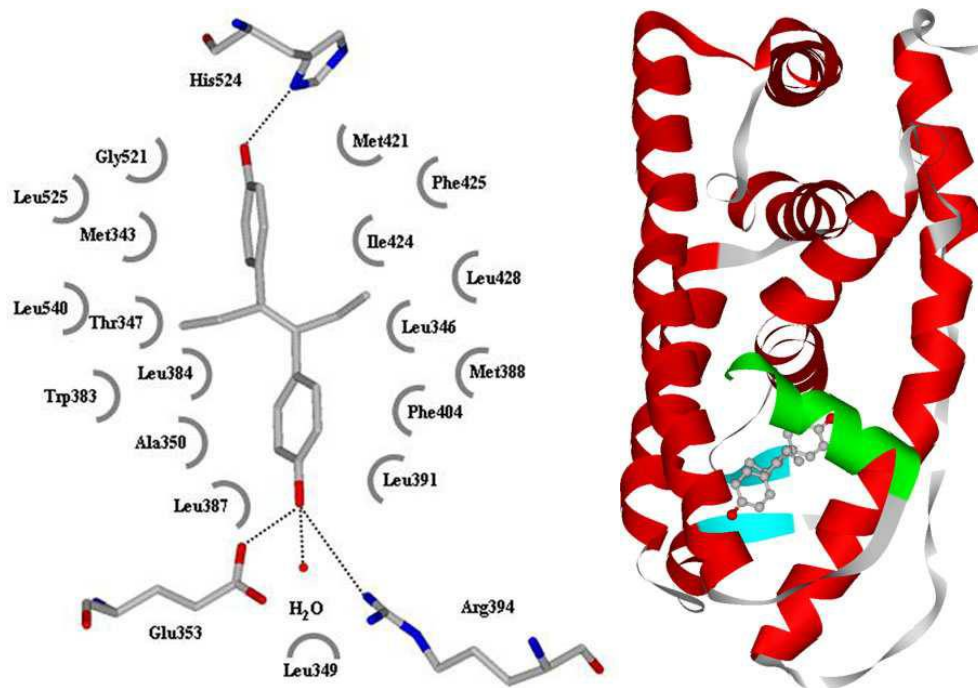
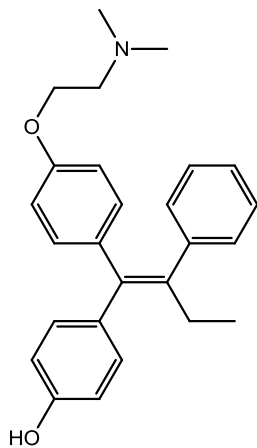


Abb. 1.5: links: identische räumliche Ausrichtung von DES zu E2 im ER α ; rechts: gleiche Konformationen der Helices bei der Interaktion von DES in der LBD (aus Schlenk [54] nach Shiau [95]).

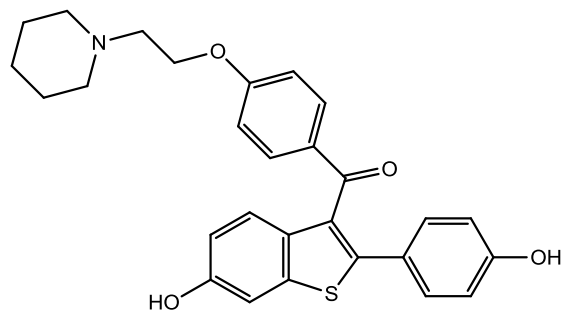
Neben Typ-I-Estrogenen existieren auch noch Typ-II-Estrogene. Sie ordnen sich im Gegensatz zu E2 anders in der LBD an und interagieren mit anderen Aminosäuren, um den ER aktivieren und die Transkription einleiten zu können [Gust, 96]. Sie sind nicht planar, sondern weisen eine gewinkelte Form auf. Ihre O-O-Abstände liegen zwischen 5-7 Å. Zu ihnen gehören beispielsweise [1,2-Diamino-1,2-diarylethan]-platin(II)-Komplexe, 4,5-Diaryl-2-imidazoline, 4,5-Diarylimidazol- oder Piperazin-derivate.

1 Einleitung

Weiterhin gibt es Liganden, die gewebespezifisch wirken. Die Selektiven Estrogenrezeptor Modulatoren (SERMs) können beispielsweise im Knochengewebe estrogenere Wirkungen entfalten, während sie bei Mammakarzinom-Zellen antagonistisch am ER wirken. Vertreter der SERMs sind unter anderem Tamoxifen (TAM), welches zu 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) metabolisiert wird, oder das Raloxifen (RAL).



4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)



Raloxifen (RAL)

Abb. 1.6: an ER α , β antagonistisch wirksame SERMs. Nur Tamoxifen, welches zum aktiven Metaboliten 4-OHT umgewandelt wird, findet in der Brustkrebstherapie Anwendung.

Diese Verbindungen haben basische Seitenketten. Somit hat es Auswirkungen, wenn solche Verbindungen in der LBD des ER anordnen. Aufnahmen von Röntgenkristallstrukturen belegen, dass beispielsweise nach Einschluss von 4-Hydroxytamoxifen oder Raloxifen in der LBD ein zusätzlicher Raum beziehungsweise ein Kanal gebildet wird, worin sich jeweils die basische Seitenkette ausrichtet. Bei diesem Raum handelt es sich um den 11 β -Kanal. Seine Bildung und die Nutzung durch eine basische Seitenkette eines Wirkstoffs sind essentiell für eine antagonistische Wirkung. Dieser Raum wird aber auch von Typ-II-Estrogenen eingenommen. Der Bindungsmodus für ein Typ-II-Estrogen ist ausführlich in **Kap. 3** geschildert. 4-OHT als auch RAL können mit ihren phenolischen OH-Gruppen ebenfalls hydrophile Wechselwirkungen mit Glu 353, Arg 394 und einem H₂O

1 Einleitung

eingehen, genauso wie man es auch von Agonisten kennt. Das RAL kann außerdem mit der zweiten phenolischen *OH*-Gruppe zu His 524 eine E2-identische *H*-Brücke eingehen. Da dem 4-OHT an dieser Stelle diese funktionelle Gruppe fehlt, erfolgt keine Interaktion mit der Aminosäure His 524 [Shiau, 95]. In dem 11 β -Kanal befindet sich die Aminosäure Asp 351. Die basischen Seitenketten können mit ihr interagieren. Nicht nur das Vorhandensein dieser Substituenten ist wie bereits erwähnt wichtig für einen Antagonismus, sondern auch eine Interaktion mit Asp 351 [Gust, 96]. Hierbei übt der protonierte Dimethylaminoethyl-Rest von 4-OHT eine ionische Wechselwirkung mit dem Carboxylat des Asp 351 aus. Zwischen der basischen Seitenkette des RAL's und dieser Aminosäure kommt es dagegen zu einer Interaktion über eine Salzbrücke [Brzozowski, 97]. Der zweite Aromat der Typ-II-Estrogene geht allerdings keine Wechselwirkung mit Asp 351 ein, sondern interagiert vermutlich mit Thr 347. In der Literatur wird aber dennoch Asp 351 mit diskutiert [Gust, 96].

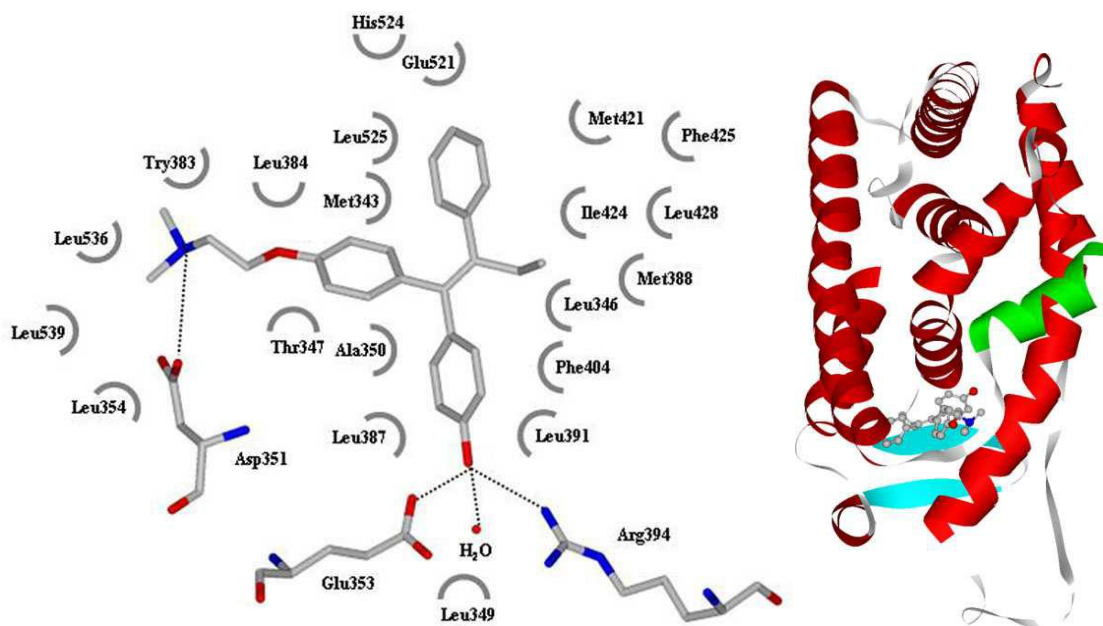


Abb. 1.7: links: zu sehen ist das 4-OHT in seiner Anordnung in der Bindungstasche (ER α), die basische Seitenkette befindet sich im 11 β -Kanal; rechts: Röntgenkristallstrukturanalyse; Helix 12 in grüner Farbe (aus v. Rauch [99] nach Shiau [95]).

1 Einleitung

Die Strukturanalyse zeigt die Helix 12 in einer völlig anderen Position, die bei Agonisten in dieser Weise nicht auftritt. Die Ausbreitung der voluminösen basischen Seitenkette im 11 β -Kanal und ihre Interaktion verhindern eine für die Transkriptionsaktivierung nötige Positionierung der Helix 12. In eine andere Position gedrängt, kann sie innerhalb ihrer eigenen AS-Sequenz Leu 540-544, die eine NR-Box der Koaktivatoren nachahmt, durch hydrophobe Wechselwirkungen binden. Für die Transkriptionsstärke wichtigen Koaktivatoren können diese Stelle nicht mehr binden [Shiau, 95]. Der 4-OHT/ER-Komplex kann ohne Koregulatoren nicht mehr die endokrine Signalkaskade auslösen. Auch im Falle einer Bindung von RAL zum ER wird selbiges beobachtet. Auch hier nimmt die Helix 12 eine Position ein, die analog einer 4-OHT-induzierten Position identisch ist.

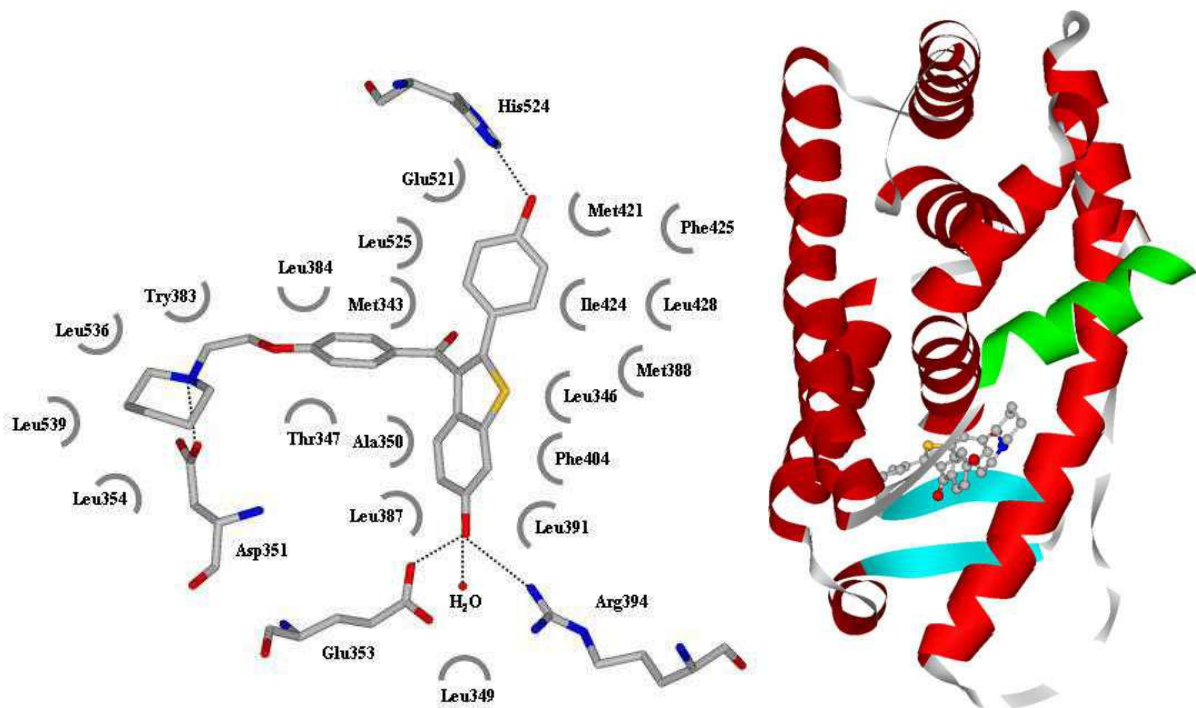


Abb. 1.8: Auch das RAL nimmt eine dem 4-OHT identische Konformation ein; Helix 12 wird in eine identische Position, die auch 4-OHT bewirkt, verschoben, was zur Deaktivierung des ER α führt (aus Schlenk [54] nach Brzozowski [97]).

Echte Antagonisten wie Faslodex (ICI 164 384) besitzen ein steroidales Grundgerüst mit sehr langen Seitenketten an 7 α - oder 11 β -Position. Durch sie nimmt der ER sehr

instabile Konformationen an, so dass selbst die Helix 12 in Röntgenkristallstrukturen nicht zu erkennen ist [Pike et al., 100].

Es gibt auch „passive“ Antagonisten, beispielsweise das 5,11-cis-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydro-chrysen-2,8-diol. Liganden dieser Klasse positionieren sich in der Bindungstasche analog dem E2 [Shiau et al., 101]. Obwohl sich Helix 12 in die „agonistische Position“ ausrichtet, kann der ER nicht aktiviert werden. Die Ethylsubstituenten lassen das gesamte Grundgerüst in der LBD aufgrund sterischer Effekte verschieben, so dass letztendlich keine Koaktivatoren mehr an die Helix 12 binden können.

1.3 Der GPR30-Rezeptor

1.3.1 Allgemeines

1.3.1.1 Klassifizierung

Der GPR30-Rezeptor (GPR30-R) ist Bestandteil jüngster intensiver Forschungen. Er ist ein membranständiger G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Er besteht aus einer heptahelikalen Struktur, deren Helices transmembranär verlaufen. Die Bindungstasche liegt im extrazellulären Raum [Filardo, 102]. Heutzutage gilt als erwiesen, dass dieser Rezeptor ebenfalls zur Klasse der Estrogenrezeptoren gehört [Funakoshi, 103], welcher in sehr vielen Organen unseres Körpers zu finden ist [Rae, 104]. In der Fachliteratur wird auch diskutiert, dass dieser nicht in der Plasmamembran lokalisiert ist, dafür aber am endoplasmatischen Retikulum [Revankar et al., 105].

Bisher ist kein physiologischer Ligand bekannt [Otto et al., 106]. Untersuchungen haben ergeben, dass der GPR30-R durch E2 stimulierbar ist. Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass weitere Estrogene (beispielsweise 17α -Estradiol, Estriol und Estron) oder andere physiologische Steroide wie Testosteron keine Effekte hervorrufen können [Thomas et al., 107]. Nur das Tamoxifen aus der Klasse der SERMs hat eine agonistische Wirkung am GPR30-R, das synthetische Estrogen Diethylstilbestrol (DES) dagegen nicht [Thomas et al., 107]. In vivo Untersuchungen haben belegt, dass Genistein aus der Klasse der Phytoestrogene analog zu Tamoxifen ebenfalls eine agonistische Wirkung entfalten kann [Thomas, 108].

Der GPR30-R ist unter anderem an proliferativen Effekten hormonabhängiger MCF-7 Zellen, die durch Estrogene induziert werden, beteiligt [Thomas et al., 107]. Aber auch andere pathologische Erkrankungen und Körperfunktionen werden mit ihm in Verbindung gebracht [Graeme, 109]. Bis heute sind die vollständigen physiologischen Funktionen und endokrinologische Mechanismen noch nicht eindeutig aufgeklärt und bleiben weiterhin Gegenstand intensiver Forschungen.

1.3.1.2 Aktivierung des GPR30-R

Wie oben bereits erwähnt, führt das E2 nach einer Interaktion mit der extrazellulären Bindungstasche zu einer nichtgenomischen Aktivierung [Otto et al., 106]. Der E2-GPR30-R-Komplex bedingt eine Konformationsänderung und eine Internalisierung des membranständigen Rezeptors. Dies hat zur Folge, dass unter anderem Proteinasen und Kinasen aktiviert werden. Sie führen zur Freisetzung einer Reihe von EGF ähnlichen Wachstumsfaktoren, die dann an deren spezifischen Rezeptoren binden [Ho, 110]. Die Stimulation der EGF-Rezeptoren löst eine Aktivierung von unter anderem der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und der MAP-Kinase (Mitogen aktivierte Protein-Kinase) aus [Thomas, 108]. Außerdem wird ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration beobachtet [Hazell, 111]. Weiterhin können auch intrazelluläre Botenstoffe, die „second messenger“, EGF ähnliche Faktoren aktivieren, die wiederum an ihre dafür vorgesehenen Rezeptoren binden und diese aktivieren [Filardo, 112]. Die Aktivierung und die mit ihr verbundene Signalkaskade führt zu keiner durch aktivierte Gene bedingte Expression von Transkriptionsprodukten [Albanito et al., 113]. Allerdings wird in der Fachliteratur auch über ein Zusammenspiel einer GPR30-induzierten Signalkaskade mit einer ER-induzierten Kaskade diskutiert [Notas, 114].

In der unteren **Abbildung 1.9** ist eine graphische Darstellung einer durch das E2 ausgelösten GPR30-R-Aktivierung zu sehen [aus Ho, 110]. Es gelten folgende Abkürzungen: E2 = 17 β -Estradiol; ER = Estrogenrezeptor; ERE = „estrogen response elements“; mRNA = „messenger“ ribonuclein acid: m-Ribonukleinsäure; GPCR = „G-protein coupled receptors“: hier GPR30; PKA = Proteinkinase A; PKC = Proteinkinase C; RTK = Rezeptor-Thyrosin-Kinasen: Rezeptoren für die Interaktion mit EGF und IGF-1; Ras = Ras-Kinase; Src = „nonreceptor tyrosin kinase“; PI3K = Phosphoinositol-3-Kinase; Akt = „serin-threonine kinase“; NO = Stickstoffmonoxid:

„second messenger“; MAP-Kinasen: ERK-1/2, JNK, p38, EGF ähnliche Wachstumsfaktoren: Sos, Grb2, Shc.

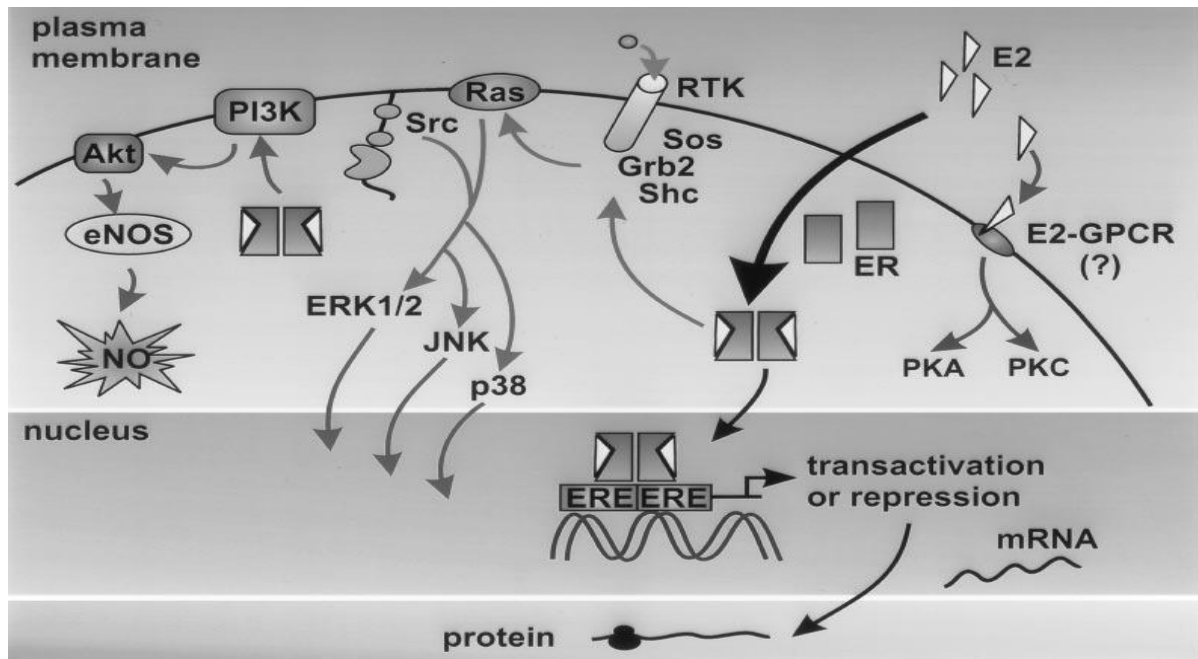


Abb. 1.9: Modell einer E2 induzierten GPR30R-Aktivierung mit folgender Signalkaskade und alternativ die E2 induzierte Estrogenrezeptor-Stimulation [aus Ho, 110].

1.4 Zielsetzung: Bivalenz

1.4.1 Drug-Targeting am ER α/β

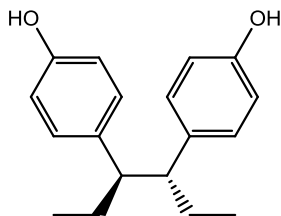
Bereits in sehr vielen Forschungen wurden unter anderem synthetische Estrogene als Liganden des ER entwickelt. Zentraler Punkt war dabei immer, dem physiologischen E2 analoge agonistische Wirkstoffe zu entwickeln und diese zu optimieren. So wurde unter anderem auch das *meso*-Hexestrol (HES) synthetisiert [Wappes, 115]. Aufgrund seiner estrogenen Eigenschaft wurde es in die Mammakarzinom-Forschung mit aufgenommen. Das Ziel war die Entwicklung von tumorselektiven Wirkstoffen. Hierbei wollte man das zytotoxische Potential des Cisplatin mit der estrogenen Eigenschaft des HES an ER-positiven MCF-7-Zellen kombinieren. Struktur-Aktivitätsbeziehungen-Studien (SAR-Studien) führten zur

1 Einleitung

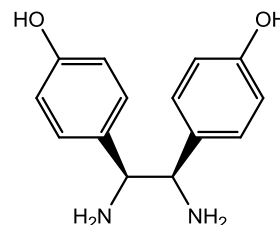
Entwicklung von [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen. Die Entwicklung der ersten Komplex-Prototypen war erfolgreich. Die Ethylreste des HES wurden gegen NH_2 -Reste ausgetauscht und Platin (Pt) konnte am HES-Derivat koordiniert werden. Allerdings ging dies mit einem Verlust der estrogenen Wirkung einher [von Angerer, 116]. Die ersten Verbindungen wurden optimiert. In der *ortho*-Position der Aromaten wurden Halogene substituiert und die NH_2 -Gruppen alkyliert, so dass diese Platin(II)-Komplexe estrogenen Eigenschaften unterschiedlicher Wirkstärken bekamen [Schönenberger, 117], [Karl, 118], [Gust, 119]. Trotz dessen verloren die 1,2-Diarylethylendiamine durch Komplexbildung ihre Bindungsaffinitäten zum ER [Gust, 120].

Im Arbeitskreis Gust wurden anhand dieser Erkenntnisse SAR-Studien durchgeführt. Ausgehend von diesen Verbindungen führten diese Studien unter anderem zur Entwicklung von 4,5-Diaryl-2-imidazolin, bei denen die Platin(II)-Einheit ($N-Pt-N$) gegen eine Amidin-Partialstruktur ($N-C=N$) substituiert wurde. Das Pharmakophor, die 1,2-Diarylethylendiamin-Struktur, die bei den 2-Imidazolin im Heterozyklus enthalten ist, wurde nicht verändert.

Diese neuartigen Verbindungen wurden ebenfalls am ER untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass sie analog ihren Platin(II)-Komplexen ebenfalls geringe Bindungsaffinitäten zum ER hatten, sie dafür aber noch stärkere estrogenen Wirkungen besaßen [Gust, 121]. Modifizierungen am C2 oder N1 des 2-Imidazolinrings wurden unternommen, um die unterschiedlichen Wirkstärken ihrer Estrogenität näher zu untersuchen. Alle Resultate führten zu der Erkenntnis, dass die Platin(II)-Einheit nicht essentiell für eine mögliche Aktivierung des ER war.

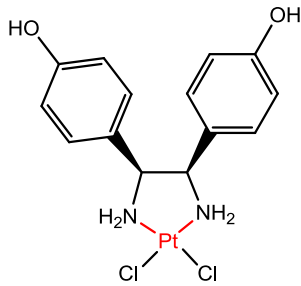


meso-Hexestrol (HES)

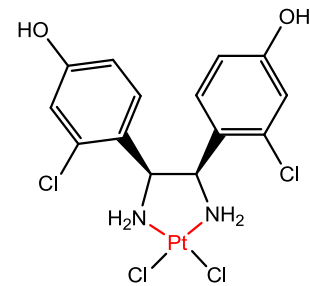


meso-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-ethylenediamin

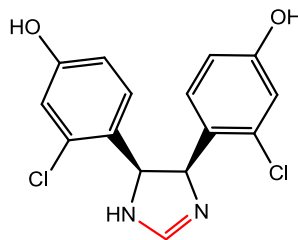
1 Einleitung



[*meso*-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-ethylenediamin]dichloroplatin(II)



[*meso*-1,2-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethylenediamin]dichloroplatin(II)

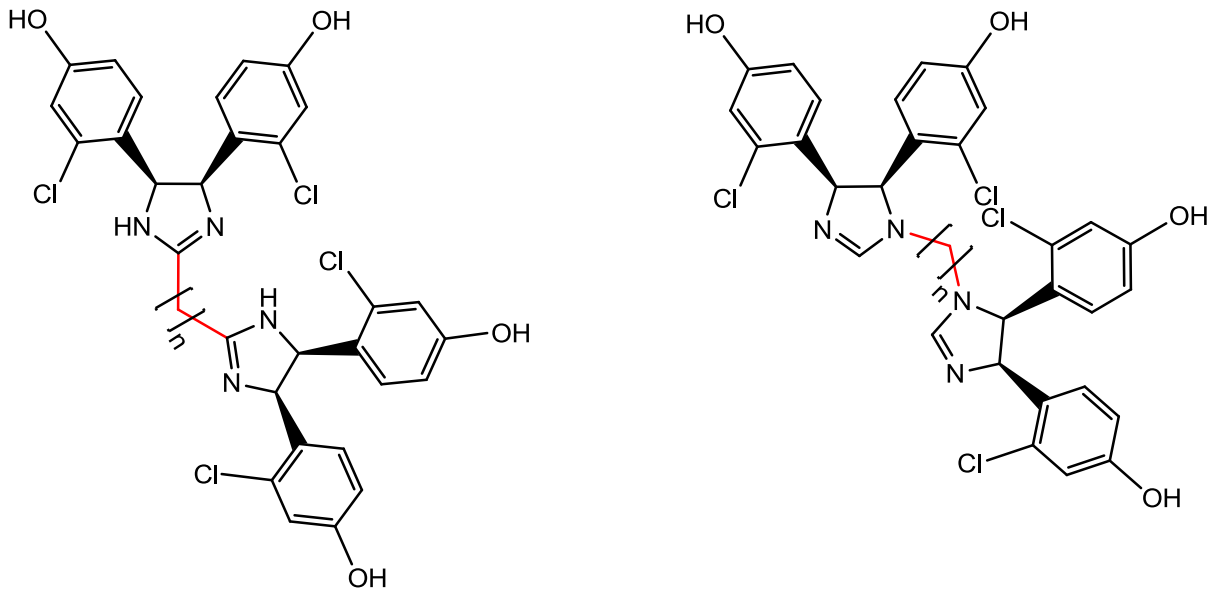


4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin

Zielsetzung dieser Arbeit ist die weitere Modifizierung der bereits untersuchten monovalenten 4,5-Diaryl-2-imidazoline im Rahmen der Forschung zur Bivalenz. Aus ihnen sollen bivalente Liganden entwickelt werden. Von ihnen erhofft man sich gegenüber ihren kognaten Monomeren eine bessere Stabilisierung von ER-Dimeren. Dabei sollen durch den dimeren Wirkstoff gleichzeitig an beiden LBD's Interaktionen stattfinden und diese über einen geeigneten Spacer miteinander verbrückt werden [Berube, 122], [Rabouin, 123].

Die Möglichkeit, an der Amidin-Partialstruktur alkylieren zu können, soll ausgenutzt werden, um C2- und N1-verknüpfte Dimere über Alkylspacer der Kettenlängen $n = 4-10$ zu synthetisieren. Dabei sind *meso*-konfigurierte 2-Chlor-4-hydroxy- oder 2-Fluor-4-hydroxy-substituierte Verbindungen von besonderem Interesse. Mit etablierten pharmakologischen Testverfahren sollen ihre Affinitäten zum Estrogenrezeptor (ER) untersucht werden. Sie sollen zeigen, ob bivalente Wirkstoffe jeweils eine stärkere estrogene Wirkung gegenüber ihren bereits untersuchten kognaten Monomeren zeigen. Erkenntnisse über Interaktionen zwischen bivalenten Liganden und dem ER und darüber hinaus auch die Einflüsse der Verknüpfungsstellen von 2-Imidazolin-Dimeren sollen studiert werden.

1 Einleitung



C2- (links) und N1-verknüpfte (rechts) *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazoline;

n = 4; 6; 8; 10

Bisher wurden bivalente Hexestrol- [Bergmann, 124], Tamoxifen- [Groleau, 125], Estron- beziehungsweise E2-Verbindungen [Berube, 122], [Rabouin, 123] untersucht. Keine dieser Verbindungen zeigte Bindungsaffinitäten oder Transkriptionsaktivitäten am ER. Allerdings zeigten einige Hexestrol-Dimere ungewöhnliche biphasische Kurvenverläufe in Konkurrenzexperimenten, welche vermutlich auf zusätzliche atypische Bindungen am ER zurückzuführen waren [Bergmann, 124]. Außerdem erbrachten jüngste SAR-Studien die Tatsache, dass sich lange Molekülreste bivalenter Wirkstoffe im β -Kanal des ER aufhalten können, beziehungsweise toleriert werden [Shan, 126]. Demnach nimmt man mittlerweile an, dass die Verknüpfungsstellen der Monomere in den dimeren Molekülen essentiell für eine ausgeprägte ER-Dimer-Stabilität sind. Ungeeignete Verknüpfungsstellen können eine Ausrichtung in der LBD und die damit folgende Transkriptionsaktivierung blockieren [Shan, 126]. Aufgrund der biphasischen Kurvenverläufe einiger bivalenten HES-Verbindungen [Bergmann, 124] und Ergebnisse der SAR-Studien von 4-Hydroxytamoxifen-Dimeren mit dem ER [Shan, 126] gewinnen fortführende Forschungen zur Bivalenz am ER immer mehr an Bedeutung.

Neben der Synthese von Dimeren soll auch das Monomer *meso*-4,5-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin synthetisiert und ebenfalls untersucht werden. Im AK

Gust war diese Verbindung bisher nicht synthetisierbar und konnte auch nicht evaluiert werden. Über einen modifizierten Syntheseweg war es in dieser Arbeit nun möglich, sie darzustellen. Die genannte Verbindung schließt die Lücke der estrogen wirksamen 4,5-Diaryl-2-imidazolin-Monomere. Ihre Evaluierungen können durch pharmakologische Untersuchungen am ER komplettiert werden.

1.4.2 GPR30-vermittelte Zellaufnahme

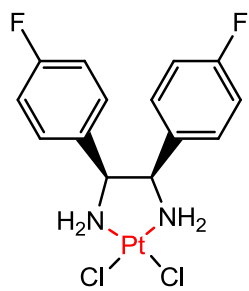
Erkenntnisse über den GPR30-R sollen herangezogen werden, um ihn als Target für die Entwicklung tumorselektiver Verbindungen zu nutzen. Vorarbeiten [Kapp, 127], [Dullin, 128] zufolge scheinen bivalente Strukturen als Liganden des GPR30-R besonders geeignet zu sein.

Bisher wurden 2-Imidazoline entwickelt, die sich von [*meso*-1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen ableiten. In jüngster Vergangenheit wurden unter anderem zwei Pt-Einheiten über kurze Alkylspacer verlinkt und biologischen Testungen, speziell zur Zellaufnahme und der intrazelluläre Anreicherung in hormonabhängigen MCF-7-Zellen, unterzogen [Kapp, 127], [Dullin, 128]. Hierbei wurde die Existenz des zu dieser Zeit noch unbekanntes GPR30-Rezeptors postuliert, der eine vermittelnde Rolle bei der Zellaufnahme und der intrazellulären Anreicherung einzunehmen scheint [Kapp, 129].

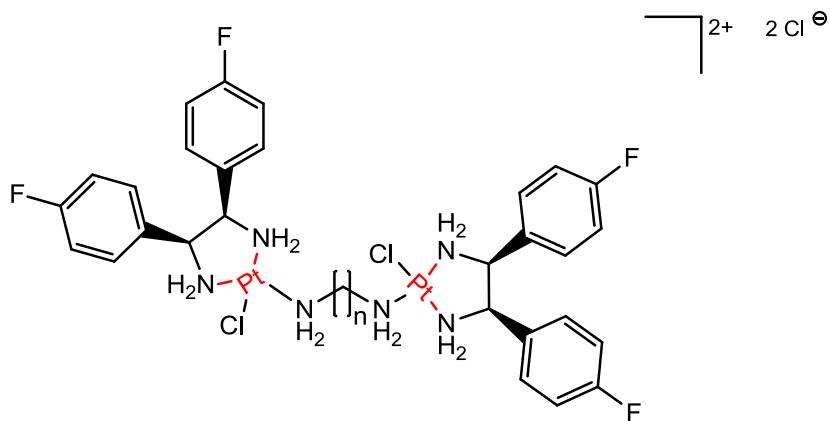
Es wurde beobachtet, dass bivalente Wirkstoffe eine Internalisierung dieses Rezeptors durch selektive Anlagerung an Zelloberflächen von MCF-7-Zellen veranlassten. Von besonderem Interesse scheinen Verbindungen mit 4-Fluor-Substitution am Aromaten zu sein. Dabei wurden monomere Pt-Einheiten weitaus weniger angereichert als analoge Dimere. Diese wichtige Tatsache spricht für eine Beteiligung des GPR30-R an der Zellaufnahme von Dimeren [Kapp, 130].

In dieser Arbeit sollen analog den Pt-Einheit-Dimeren bivalente 2-Imidazoline der Kettenlängen $n = 4-10$ synthetisiert und den etablierten biologischen Testungen unterworfen werden. Zellaufnahmestudien sollen Aussagen liefern, ob bei den bivalenten Wirkstoffen das Pt(II)-Atom durch eine $N=C-N$ -Einheit ersetzbar ist.

1 Einleitung

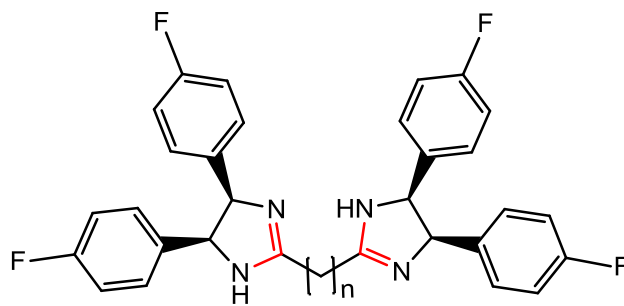


m4F-Pt-Monomer



m4F-Pt-Dimere

$n = 4; 6; 8; 10$



meso-4,5-Bis(4-fluorophenyl)-2-imidazolin-Dimere

$n = 4; 6; 8; 10$

2

Synthetischer Teil

2.1 Übersicht der Verbindungen und deren Synthesewege

In dieser Arbeit synthetisierte Verbindungen leiten sich von verschiedenen substituierten *meso*-1,2-Diarylethylendiaminen (in der (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-Konfiguration) ab. Unter Erhalt ihrer Konfiguration wurden diese weiter zu unsubstituierten oder am Kohlenstoff C2 des Heterozyklus alkylierten *meso*-2-Imidazolin-Monomer Hydrochloride (in der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-Konfiguration) umgesetzt (**Abb. 2.1**).

2-Imidazoline stellen im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit das Grundgerüst dar. Ebenfalls durch Alkylierung am C2 oder auch am N1 wurde sie zu Dimer Dihydrochloride modifiziert (**Abb. 2.2**).

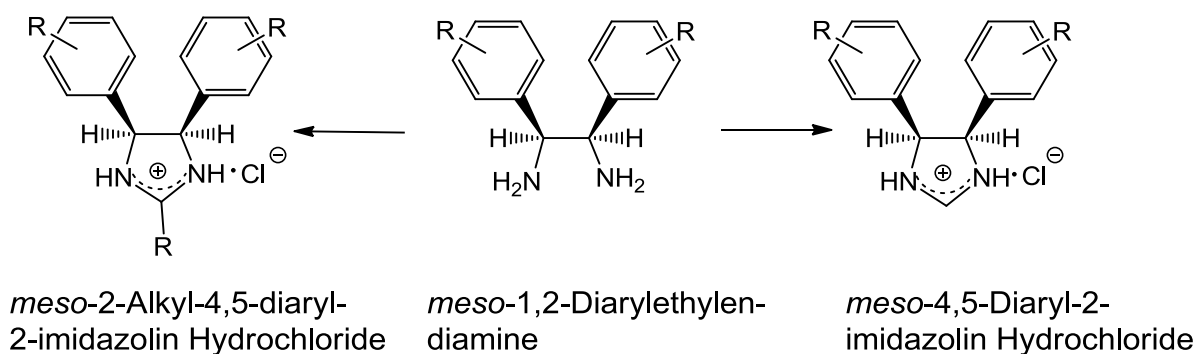


Abb. 2.1: Umsetzung zu 2-Imidazolinen unter Konfigurationserhalt.

2 Synthetischer Teil

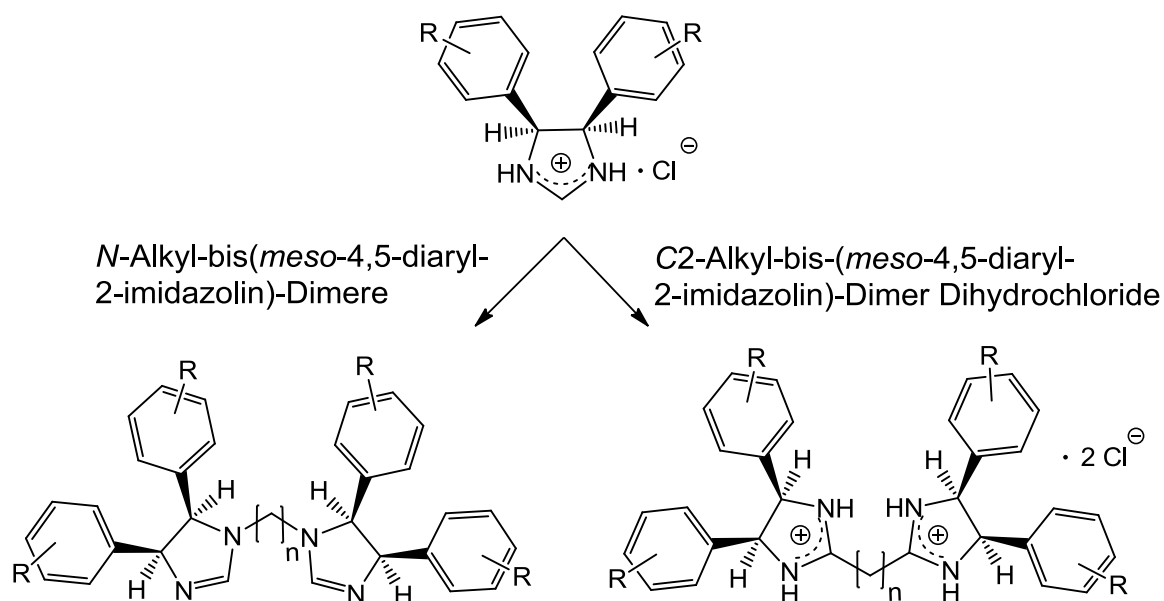
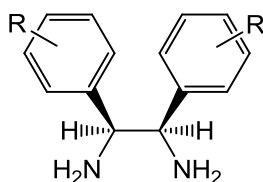


Abb. 2.2: Übersicht aller bivalenten Strukturen der *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Derivate.

In folgenden **Tabellen 2.3** bis **2.7** werden die erhaltenen 1,2-Diarylethylendiamine und davon abgeleitete 4,5-Diaryl-2-imidazoline und ihre Derivate vorgestellt.

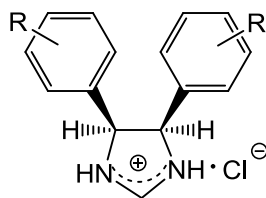


R	Verbindung
3-OH	24
4-OH	25
3-OCH ₃	26
4-OCH ₃	27
4-F	28
2-F-4-OH	29

2 Synthetischer Teil

2-F-4-OCH ₃	30
2-Cl-4-OH	31
2-Cl-4-OCH ₃	32
2,6-Cl ₂ -4-OH	33
2,6-Cl ₂ -4-OCH ₃	34

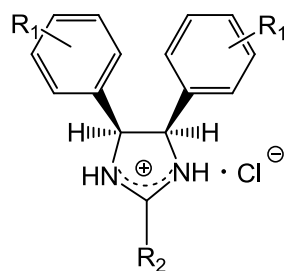
Tab. 2.3: *meso*-1, 2-Diarylethylendiamine verschiedener Substitutionsmuster.



R	Verbindung
4-OCH ₃	41
4-F	42
2-F-4-OCH ₃	43
2-Cl-4-OCH ₃	44
2,6-Cl ₂ -4-OH	45
2,6-Cl ₂ -4-OCH ₃	46

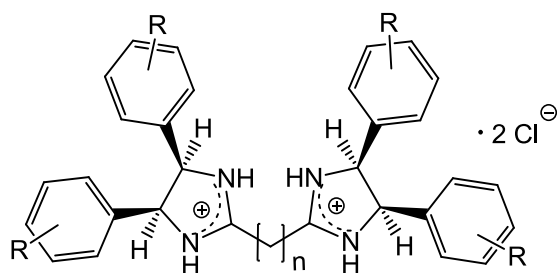
Tab. 2.4: *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin Hydrochloride.

2 Synthetischer Teil



R ₁	R ₂	Verbindung
4-F	Hexyl	47

Tab. 2.5: C2-Alkyl-*meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin Hydrochlorid.



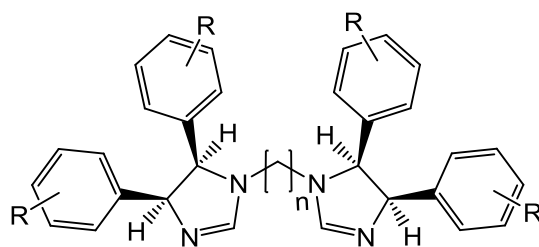
R	n	Verbindung
3-OH	4	48
3-OH	6	49
3-OH	8	50
3-OH	10	51
4-OH	4	52
4-OH	6	53
4-OH	8	54
4-OH	10	55

2 Synthetischer Teil

4-OCH ₃	4	56
4-OCH ₃	6	57
4-OCH ₃	8	58
4-OCH ₃	10	59
4-F	4	60
4-F	6	61
4-F	8	62
4-F	10	63
2-F-4-OH	4	64
2-F-4-OH	6	65
2-F-4-OH	8	66
2-F-4-OH	10	67
2-Cl-4-OH	4	68
2-Cl-4-OH	6	69
2-Cl-4-OH	8	70
2-Cl-4-OH	10	71

Tab. 2.6: über C2-verbrückte symmetrische *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimer Dihydrochloride.

2 Synthetischer Teil



R	n	Verbindung
2-F-4-OCH ₃	4	72
2-F-4-OCH ₃	6	73
2-F-4-OCH ₃	8	74
2-F-4-OCH ₃	10	75
2-Cl-4-OCH ₃	4	76
2-Cl-4-OCH ₃	6	77
2-Cl-4-OCH ₃	8	78
2-Cl-4-OCH ₃	10	79

Tab. 2.7: N-verbrückte symmetrische *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere.

2.2 Synthese der Ausgangsverbindungen

2.2.1 Synthese der 2-Halo-4-methoxybenzaldehyde

Um die *meso*-1,2-Diarylethylendiamine **30**, **32** und **34** synthetisieren zu können, werden der 2-Fluor-4-methoxy-, der 2-Chlor-4-methoxy- und der 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd benötigt. Diese werden aus ihren entsprechend substituierten 3-Haloanisolen dargestellt. Hierbei werden verschiedene Synthesen angewandt. Während es möglich ist, alle 3-Haloanisole Formylierungsreaktionen zu unterziehen, werden zusätzlich bei der Darstellung des 2-Chlor-4-methoxy- und 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehydes auch andere Wege ausprobiert.

2 Synthetischer Teil

Der 2-Fluor-4-methoxybenzaldehyd **2** ist über zwei verschiedene Synthesewege zu erhalten. Aldehyde können durch Formylierung von Organolithiumverbindungen dargestellt werden [Olah, 131], [Karl, 118]. So kann das 2-Fluoranisol mit Hilfe einer 2.6 M n-Butyllithium-Lösung in Hexan und n-Formylpiperidin zu dem gewünschten Benzaldehyd **2** bei -80 °C umgesetzt werden. Das n-Butyllithium fungiert als starke Base und deprotoniert den Aromaten in *ortho*-Position zum Fluorsubstituenten. *N*-Formylpiperidin überträgt die Formylgruppe durch eine elektrophile Substitution an die Organolithium-Verbindung **1**. Der gewünschte Aldehyd wird nach Hydrolyse durch Eiszugabe und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten.

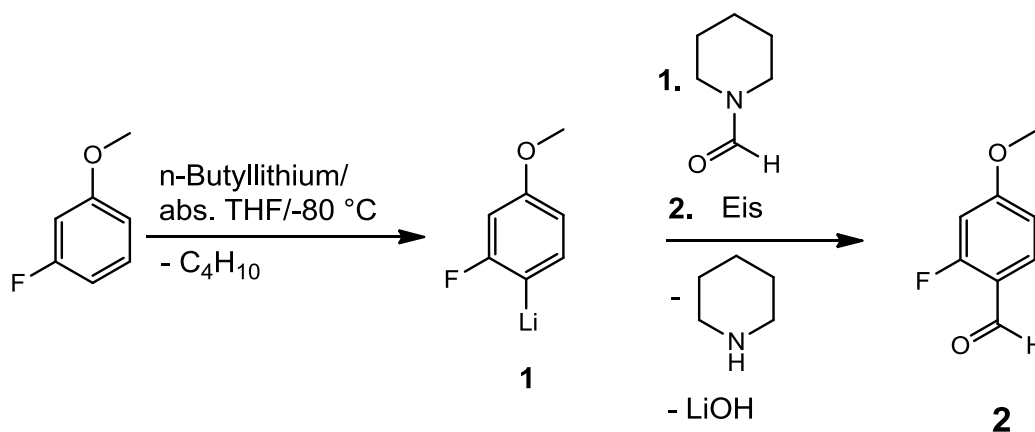
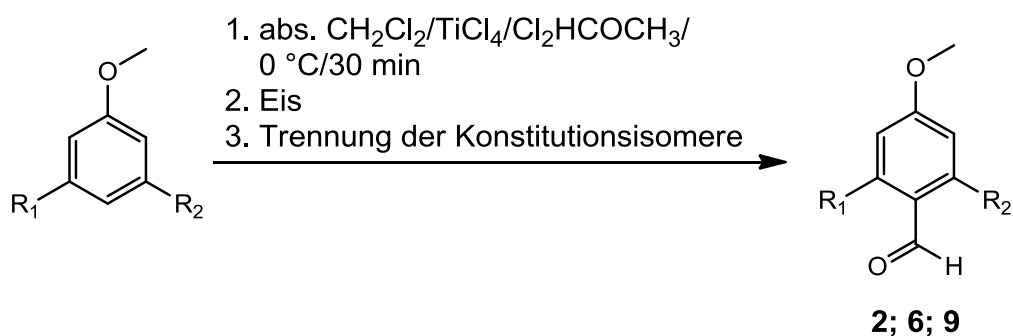


Abb. 2.8: Synthese des 2-Fluor-4-methoxybenzaldehyds nach Olah und Avaghni.

Eine alternative Synthese des Benzaldehydes **2** erfolgt analog einer Synthesevorschrift von Bai [132] nach Fanghänel [133]. Die Synthese des 2-Chlor-4-methoxybenzaldehydes **6** und des 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehydes **9**, die von Karl [118] beschrieben wurde, kann ebenfalls aus ihren Anisolen nach einer Methode von Fanghänel [133] erhalten werden. Hierzu löst man die jeweils entsprechend substituierten Anisole in absolutem Dichlormethan. Unter Eiskühlung werden zunächst Titan[IV]-chlorid, welches als Katalysator dient, zugetropft. Anschließend erfolgt die Zugabe des Formylierungsmittels Dichlormethylmethylether. Nach beendeter Zugabe wird für weitere 30 Minuten heftig gerührt. Durch Eiszugabe erfolgt eine hydrolytische Spaltung. Die gebildeten Konstitutionsisomere können

2 Synthetischer Teil

nach säulenchromatographischer Auftrennung mit anschließender Umkristallisation voneinander getrennt werden (**Abb. 2.9**).



R_1	R_2	Verbindung
F	H	2
Cl	H	6
Cl	Cl	9

Abb. 2.9: ebenfalls nach Fanghänel synthetisierbare Benzaldehyde **2**, **6** und auch **9** (Karl [118]).

Der 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd ist zudem über einen anderen Syntheseweg darstellbar [Gust, 134]: 3-Chloranisol wird hierbei einer Friedel-Crafts-Acylierung unterzogen. In absolutem Dichlormethan versetzt man das Anisol unter Eiskühlung mit Aluminiumchlorid, dann erfolgt durch Zugabe von Acetanhydrid eine Acetylierung [Hünig, 135]. Die entstehenden Chloracetophenon-Konstitutionsisomere **3** werden als Gemisch ohne Aufreinigung über eine Bromoformreaktion in ihre Benzoesäuren überführt [Gust, 134]. Die gewünschte 2-Chlor-4-methoxybenzoesäure **4** kann hierbei durch Umkristallisieren isoliert werden. Durch weitere Umsetzung mit Lithiumaluminiumhydrid [Gust, 134] in absolutem Diethylether entsteht der 2-Chlor-4-methoxybenzylalkohol **5**. Im letzten Schritt findet eine Oxidation durch aktiv gefällten

2 Synthetischer Teil

Braunstein zum 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd **6** statt (**Abb. 2.10**), welches aus einer Methode nach Karl [118] übernommen wird.

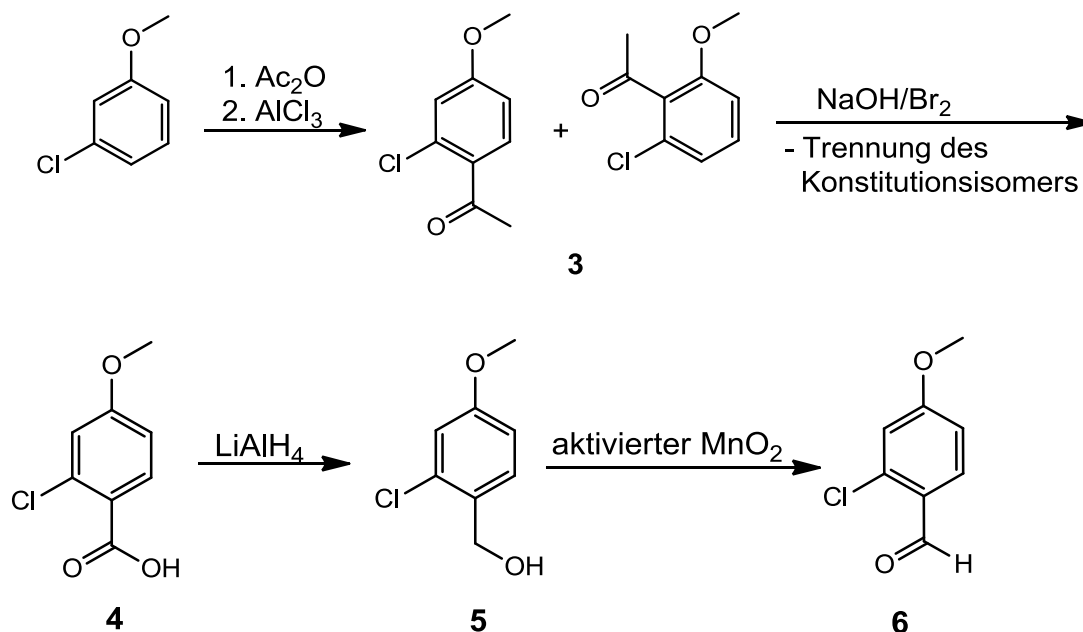


Abb. 2.10: Synthese des 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyden über mehrere Stufen.

Mit der Methode nach Karl [118] kann der 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd **9** erhalten werden. In einem ersten Syntheseschritt setzt man das 3,5-Dichloranisol mit Paraformaldehyd in konzentrierter Salzsäure/Schwefelsäure um, so dass das Chlormethyl-Isomerengemisch **7** entsteht. Dieses wird in einem Wasser/Dioxan-Gemisch mit Natronlauge versetzt und erhitzt. Die Konstitutionsisomere der entstandenen Hydroxymethyl-Derivate werden chromatographisch voneinander abgetrennt. Der abgetrennte 2,6-Dichlor-4-methoxybenzylalkohol **8** wird zum Benzaldehyd **9** durch Verwendung von aktiv gefälltem Braunstein in Toluol oxidiert.

2 Synthetischer Teil

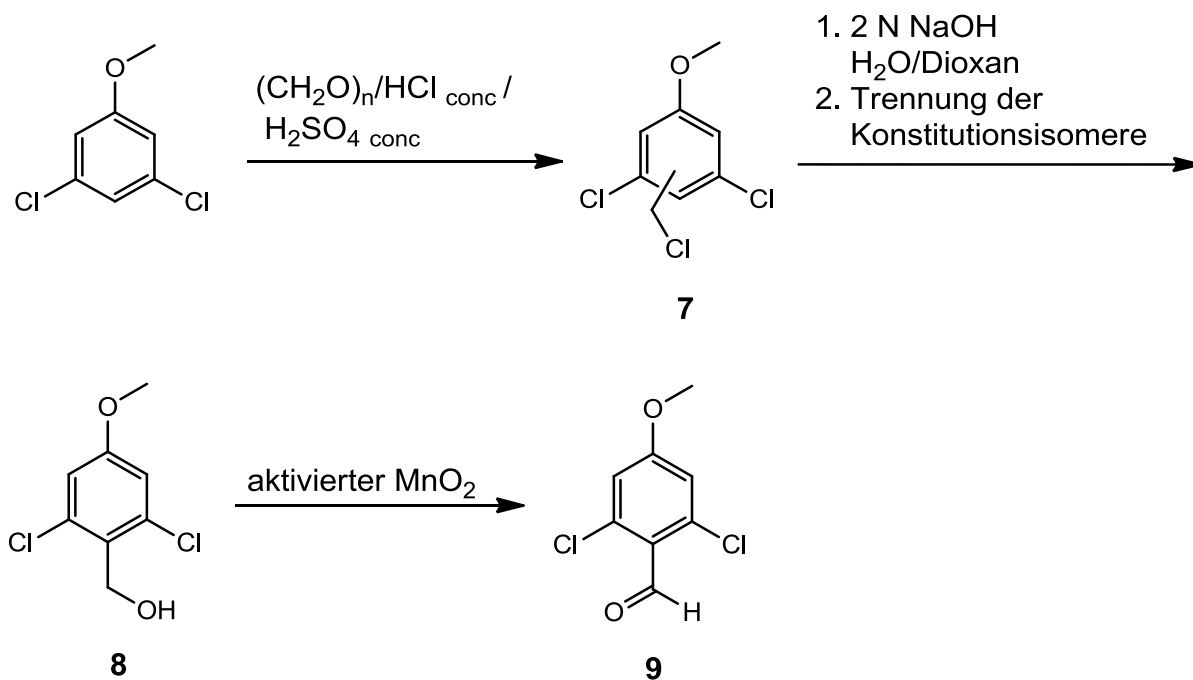


Abb. 2.11: Synthese des 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd nach Karl [118].

2.2.2 Synthese der verschieden substituierten *meso*-1,2-Diarylethylen-diamine

Die *meso*-1,2-Diarylethylen-diamine stellen Edukte der 2-Imidazoline dar. Folglich werden erst diese Grundbausteine mit verschiedenem Substitutionsmuster dargestellt und danach zu ihren Endverbindungen umgesetzt. Alle hergestellten Verbindungen besitzen (**1R,2S**/(**1S,2R**)-Konfiguration. Um auch sie ausschließlich in dieser stereoisomerenreinen Konfiguration zu erhalten [Japp, 136], bedient man sich der Synthese von Vögtle und Goldschmitt [137].

Anders als bei der klassischen Vorschrift nach Vögtle und Goldschmitt [137] werden zur ethanolischen Benzillösung erst der Salicylaldehyd und anschließend die konzentrierte wässrige Ammoniaklösung zugegeben. Anstelle dieser wässrigen Lösung wird bei dem klassischen Verfahren Ammoniak-Gas eingeleitet. Beide Methoden ergeben vergleichbare Ausbeuten (**Abbildung 2.12**).

2 Synthetischer Teil

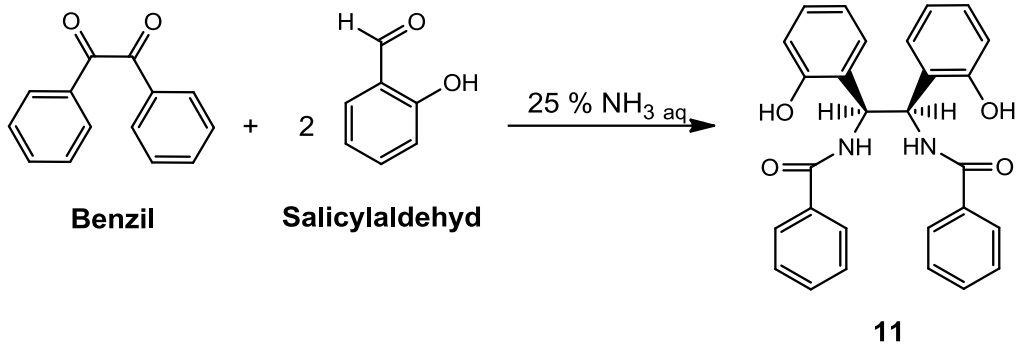


Abb. 2.12: Umsetzung zum *meso*-1,2-Diamino-*N,N'*-dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)-ethan aus Benzil und Salicylaldehyd in ammoniakalischer Lösung.

Zwei Äquivalente des gebildeten Salicylidenimins **10** (**Abb. 2.13**) reagieren mit Benzil zum Diol I, welches durch eine [3,3']-sigmatrope Umlagerung zu einem Diol II überführt wird. Durch Keto-Enol-Tautomerie bildet sich *meso*-1,2-Diamino-*N,N'*-dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **11** (**Abb. 2.14**).

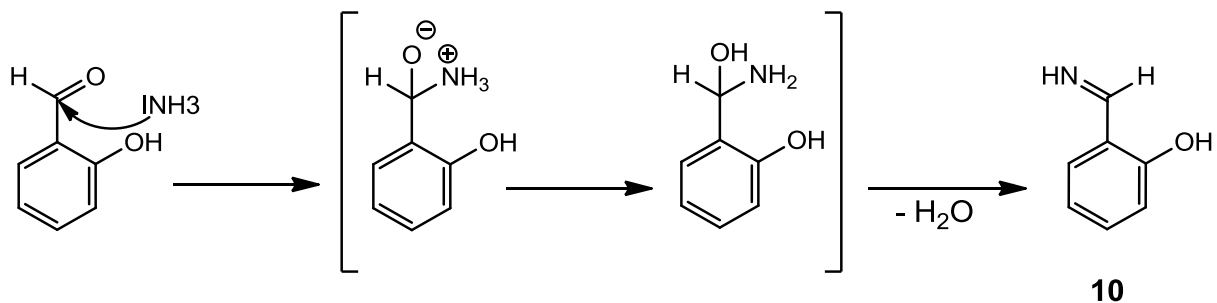
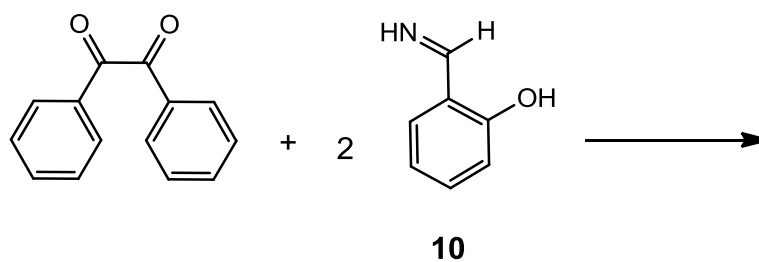


Abb. 2.13: Bildung des Salicylidens



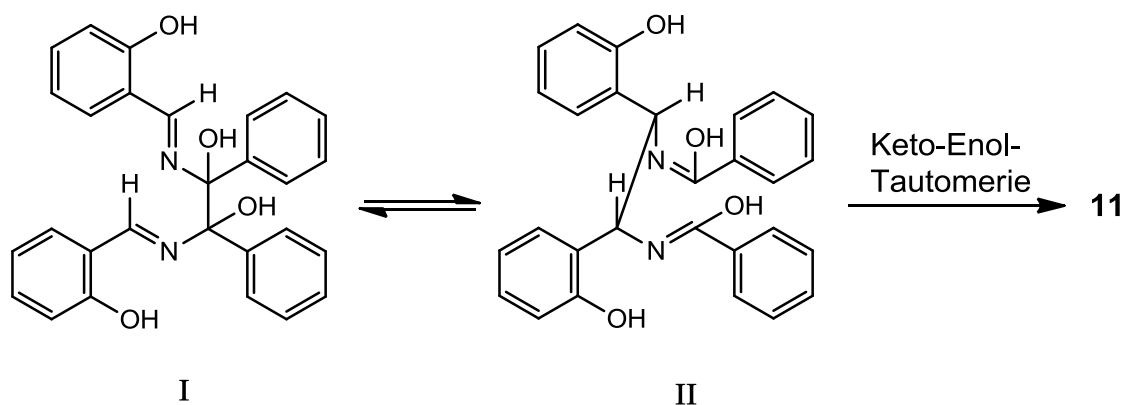


Abb. 2.14: die [3,3]-sigmatrope Umlagerung.

Der Übergang in die *meso*-Konfiguration findet bei Temperaturen unterhalb von 120°C statt, oberhalb dieser Temperatur auch eine Umlagerung in die *d,l*-Konfiguration [Vögtle und Goldschmitt, 137].

Der Ersatz von Ammoniak-Gas ist durch 25 %igem Ammoniakwasser nicht nur wegen vergleichbar guter Ausbeuten, sondern auch aufgrund der Verfügbarkeit an freigesetztem Ammoniak möglich. Bei höheren Temperaturen wird vermehrt Ammoniak freigesetzt, weil das Ammoniumion eine stärkere Brønsted-Säure als das Wasser ist. Bei Verwendung einer gesättigten wässrigen Ammoniumacetatlösung beispielsweise gelingt die Darstellung von **11** nur in sehr niedrigen Ausbeuten. Begründen lässt sich dies anhand der Protolysereaktion des Ammoniumacetats. Die Essigsäure ist eine stärkere Säure ($pK_s = 4.75$) als das Ammoniumion. Bei höheren Temperaturen verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der Acetationen. Es liegt deutlich weniger freies Ammoniak vor.

Bei Verwendung von Ammoniumchlorid anstelle des Acetats findet schon gar keine Umsetzung zu **11** mehr statt. Freier Ammoniak kann nicht aus dem Salz freigesetzt werden. Das Chlorid kann aufgrund seiner sehr geringen Basizität ($pK_b > 14$) in H_2O das Proton nicht aufnehmen. Der Ammoniak dagegen ist eine stärkere Base.

meso-1,2-Diamino-*N,N'*-dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **11** wird in einem nächsten Schritt mit frisch absolutiertem Acetanhydrid zum *meso*-*O,O',N,N'*-Tetraacetyl-1,2-diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **12** umgesetzt (**Abb. 2.15**). Erst

2 Synthetischer Teil

durch den Einsatz konzentrierter 47 %iger Bromwasserstoffsäure entsteht das *meso*-1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethyldiamin **13** (Abb. 2.15).

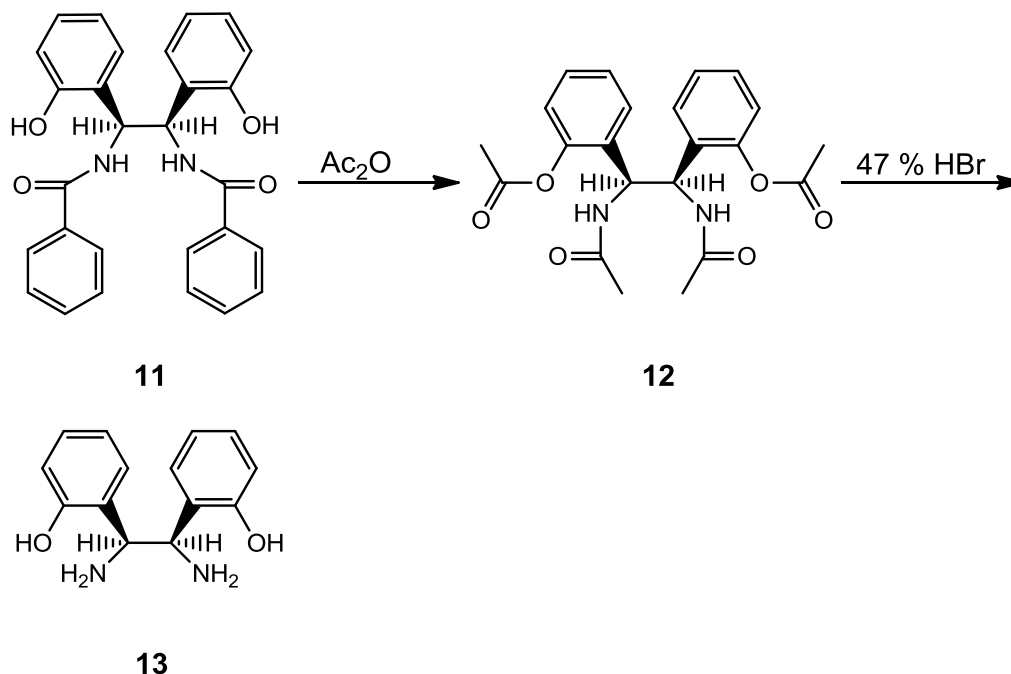
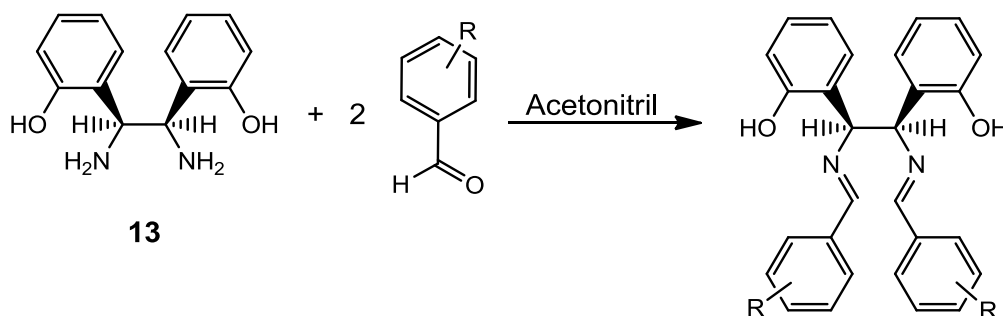


Abb. 2.15: Synthese des *meso*-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **13**.

Mit **13** lässt sich eine Vielzahl an verschiedenen substituierten *meso*-1,2-Diarylethyldiaminen darstellen. **13** wird jeweils mit entsprechenden Benzaldehyden in Acetonitril umgesetzt. Dabei bilden sich *meso*-3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene (Abb. 2.16).



2 Synthetischer Teil

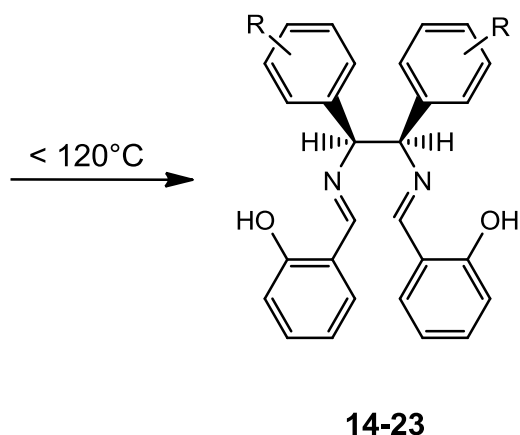
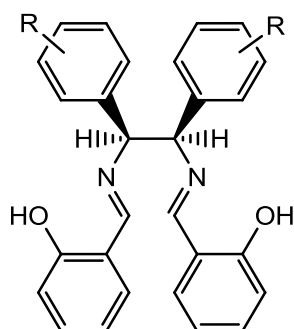


Abb. 2.16: Umsetzung von **13** zu *meso*-3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene **14-23**.

Diese Verbindungen lassen sich je nach Substitutionsmuster an den Aromaten innerhalb von einigen Stunden bis eineinhalb Tagen bilden (**17** und **18**). Reaktionen von **13** mit ausgesuchten Benzaldehyden verlaufen immer mit sehr guten Ausbeuten. Für die Darstellung von **20** und **22** wurden jeweils käuflich erworbener 2-Chlor-4-hydroxybenzaldehyd und 2,6-Dichlor-4-hydroxybenzaldehyd verwendet.



R	Verbindung
3-OH	14
4-OH	15
3-OCH ₃	16

2 Synthetischer Teil

4-OCH ₃	17
4-F	18
2-F-4-OCH ₃	19
2-Cl-4-OH	20
2-Cl-4-OCH ₃	21
2,6-Cl ₂ -4-OH	22
2,6-Cl ₂ -4-OCH ₃	23

Tab. 2.17: Übersicht der dargestellten Verbindungen.

Die erhaltenen Verbindungen **14-23** werden weiter zu *meso*-1,2-Diarylethylendiaminen umgesetzt. Die Spaltung von **16-19**, **21** und **23** erfolgt mit 3 N H₂SO₄ unter Einsatz einer Wasserdampfdestillation (**Variante A**). Der Wasserdampf trägt den abgespaltenen Salicylaldehyd aus dem Reaktionsgleichgewicht heraus. Die entstehenden Dihydrogensulfate der *meso*-1,2-Diarylethylendiamine **26-28**, **30**, **32** und **34** werden aus der sauren Lösung mit Hilfe von 20 %iger Natronlauge in ihre freie Basenform überführt und abfiltriert (**Abb. 2.18**).

Zur Spaltung der *meso*-3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene wurde unter anderem ein anderer Syntheseweg nach Kim et al. [138] erprobt. Kim et al. [138] beschreiben die Spaltung von *d,l*-3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene in Tetrahydrofuran unter Zusatz von Salzsäure. Als Spaltprodukte fallen *d,l*-1,2-Diarylethylendiamine aus. Die Methode wurde in dieser Arbeit übernommen und in Kooperation mit Herrn Molchanov aus dem Arbeitskreis Gust modifiziert. Hierbei werden **15-23** in Acetonitril, in der sich die Verbindungen bilden, mit konzentrierter Salzsäure versetzt. Durch weiteres Kochen unter Rückfluss für einige Stunden oder Rühren bei Raumtemperatur über Nacht lassen sich sämtliche Verbindungen erfolgreich spalten (**Abb. 2.18**). Die ausfallenden Dihydrochloride der *meso*-1,2-Diarylethylendiamine filtriert man ab. Alle sind in heißem Wasser sehr gut löslich. Mit 20 %iger Natronlauge überführt man diese in ihre Basen und isoliert sie durch Absaugen (**Variante B**). **26-28**, **30**, **32** und **34** sind über beide Varianten darstellbar (**Abb. 2.18**).

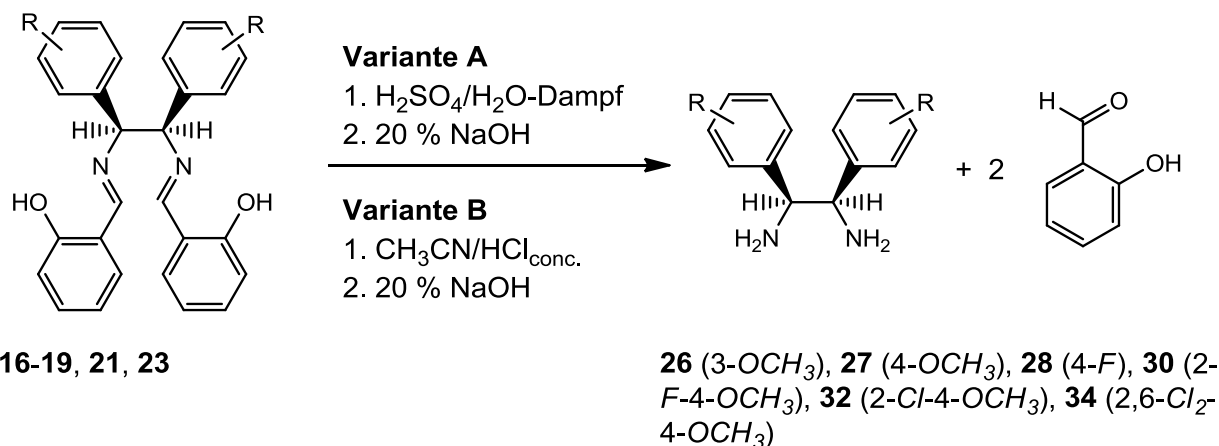


Abb. 2.18: Synthese der *meso*-1,2-Diarylethyldiamine **26-28, 30, 32, 34** über **Variante A** oder **Variante B**.

Über die **Variante A** lassen sich nur eine eingeschränkte Anzahl von *meso*-1,2-Diarylethyldiaminen synthetisieren (**26-28, 30, 32** und **34**). Verbindungen mit Hydroxylgruppen (**24, 25, 29, 31** und **33**) können aber mit dieser konventionellen Methode erst gar nicht erhalten werden. Die Vorstufen von **25, 31** und **33** (**15, 20, 22**) werden hierbei durch die Schwefelsäure oxidativ zerstört.

Auch mit der modifizierten **Variante B** von Kim et al. [138] wurden **25-28** und **30-34** dargestellt. Diese Methode ermöglicht aber insbesondere die Darstellung von Verbindungen mit *OH*-Gruppen (**25, 31, 33**). Anhand dieses großen Vorteils kann die Wasserdampfdestillation ersetzt werden. Vorteilhaft ist auch, dass man die Verbindungen **25-28, 30-34** direkt aus **13** über eine Einstufensynthese ohne Isolierung und Aufarbeitung der Verbindungen **14-23** darstellen kann. Der abgespaltene Salicylaldehyd löst sich in Acetonitril und die Hydrochloride der Endprodukte fallen aus. Der Salicylaldehyd stört nicht mehr das Reaktionsgleichgewicht. **Variante B** kann man entweder bei Raumtemperatur oder durch Aufkochen unter Reflux durchführen. Diese Alternative liefert gegenüber der **Variante A** vergleichbare, wenn nicht sogar deutlich höhere Ausbeuten. Durch die Verwendung der Salzsäure anstelle der Schwefelsäure erweist sie sich als ein sehr schonendes Verfahren.

Allerdings erfolgt die Spaltung nur unter Zusatz konzentrierter Salzsäure. Der Austausch gegen Schwefelsäure in Acetonitril bringt keinen Erfolg. Außerdem lassen

sich nur *meso*-1,2-Diarylethylendiamine mit *para*-ständigen Hydroxylgruppen darstellen. Es erfolgt keine Spaltung von *meso*-3,4-(3-hydroxyphenyl)-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien **14**. Die *OH*-Gruppen in *meta*-Position der Aromaten bilden intramolekulare Wasserstoffbrücken mit den Iminstrukturen aus. Diese Stabilisierung verhindert eine saure Spaltung von **14** zu **24**.

Eine Übersicht der über beide Varianten dargestellten *meso*-1,2-Diarylethylendiamine mit verschiedenen Substitutionsmustern sind in **Tab. 2.3** aufgelistet.

2.2.3 Methoxyspaltung der Verbindungen **26** und **30**

Die Synthese von **24** und **29** erfolgt aus **26** beziehungsweise **30**. Hierbei werden jeweils die methoxylierten Verbindungen mit Hilfe von Bortribromid in ihre hydroxylierten Verbindungen überführt [Benton, 139]. Diese Methode wurde bereits von Benton als ein sehr schonendes Verfahren beschrieben. **26** und **30** löst man jeweils in absolutem Dichlormethan auf. Der Ansatz wird auf -70 °C runtergekühlt. Anschließend wird sehr langsam eine Lösung von Bortribromid in absolutem Dichlormethan zugetropft. Nach beendeter Zugabe rührt man weitere 60 Minuten bei -70 °C. Der Ansatz wird über Nacht auf Raumtemperatur gebracht und vier weitere Tage gerührt. Für die Aufarbeitung wird er unter Eiskühlung jeweils dreimal methanolisiert. Am Rotationsverdampfer zieht man das Lösungsmittel ab. Den Rückstand versetzt man mit 20 %iger NaOH. Mit verdünnter Salzsäure bringt man die klare Lösung auf pH 8-9. Die ausfallenden Basen saugt man ab. Mehrmals wird mit Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxid (P₂O₅) getrocknet.

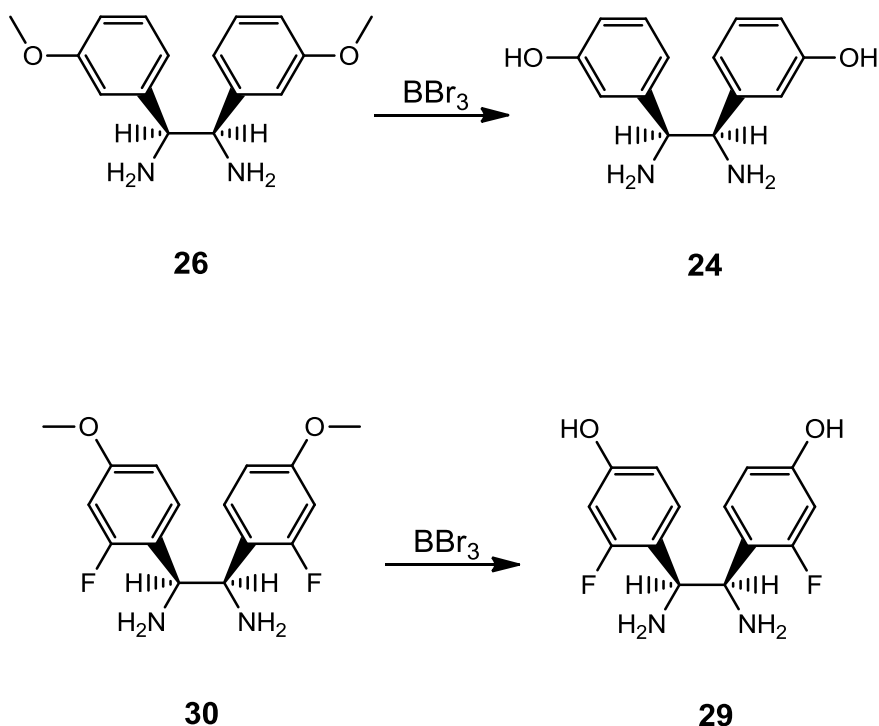


Abb. 2.19: Methoxyspaltung von **26** und **30** nach Benton [10].

2.3 Synthese der Iminoester

Um monomere und dimere 4,5-Diaryl-2-imidazoline erhalten zu können, werden Hydrochloride verschiedener Iminoester eingesetzt. Im Gegensatz zu Iminoester haben Carboxylester eine niedrigere Carbonylaktivität und können daher nicht verwendet werden. Iminoester Hydrochloride sind daher aktivierte Ester. Die Bildung der Heterozyklen gelingt auch mit sterisch anspruchsvollen Verbindungen.

Die Iminoester Hydrochloride müssen erst dargestellt werden. In dieser Arbeit wird eine Methode nach Pinner [140] und Dalko [141] verwendet. Es kommen Alkylnitrile zum Einsatz, die in Diethylether und Ethanol gelöst werden [Pinner, 140]. In diese Lösung wird solange HCl-Gas eingeströmt, bis sich jeweils die Hydrochloride der Iminoester als weiße Niederschläge bilden [Dalko, 141]. Die Bildung der Iminoester setzt die Anwesenheit des HCl-Gases voraus. Ohne dieses kommt es nicht zur Umsetzung [Tuck, 142].

Damit monomere und dimere 2-Imidazoline entstehen können, werden hier sowohl einfache Alkylnitrile als auch Alkyldinitrile umgesetzt. Eine Ausnahme stellt die

Bildung des Formimidsäureethylesters dar (**Kap. 2.3.1**). Auch wenn alle verwendeten Iminoester als Hydro- beziehungsweise Dihydrochloride vorliegen, werden diese im Folgenden meistens nur in Basenform namentlich erwähnt.

2.3.1 Synthese des Formimidsäureethylester

Die Methode von Pinner kann zur Darstellung des Formimidsäureethylesters nicht herangezogen werden. In diesem Fall würde die hochtoxische Blausäure als das einzusetzende Nitril sein. Daher muss man sich einer anderen Vorschrift bedienen. Für die Synthese des Formimidsäureethylesters verwendete Taylor [143] Orthoameisensäuretriethylester (Orthoformiat) und Ammoniumacetat (**Abb. 2.20**). In der Siedehitze fällt nach einigen Stunden das Ethylformimidat als freie Base aus. Das Ethylformimidat als freie Base ist stark hygroskopisch und instabil. Zur Erhöhung der Stabilität wird mit etherischer Salzsäure versetzt und in das Hydrochlorid überführt.

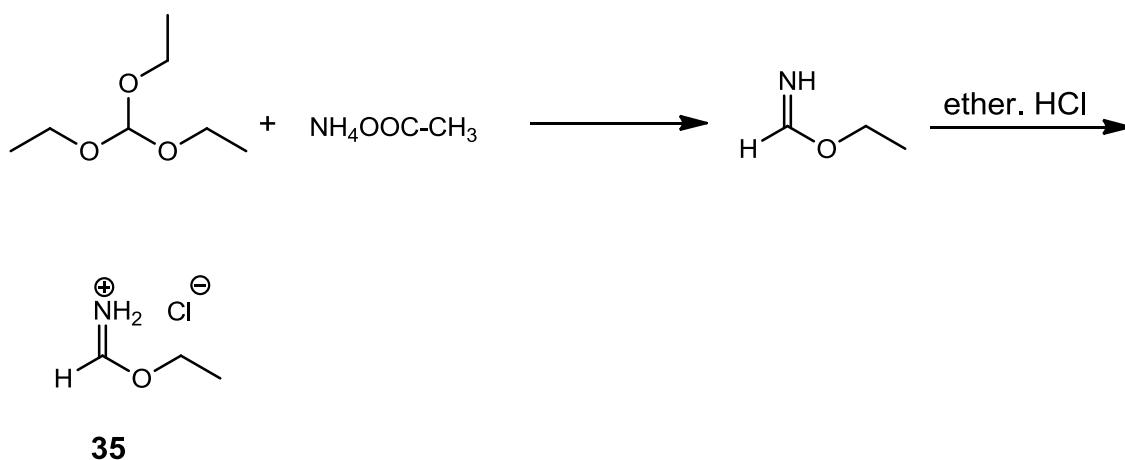


Abb. 2.20: Umsetzung des Orthoformats mit Ammoniumacetats nach Taylor [143] und Überführung zum Formimidsäureethylester Hydrochlorid **35**.

An der Carbimidteilstruktur ist keine Alkylkette vorhanden. Diese funktionelle Gruppe kann daher nicht durch einen positiv induktiven Effekt stabilisiert werden. Dies führt zu einer sehr hohen Instabilität gegenüber Nucleophilen wie Wasser. **35** muss bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.3.2 Synthese des Heptanimidsäureethylester Hydrochlorid

Als einziges einfach substituiertes Alkylnitril wird das Heptannitril eingesetzt und nach der Methode von Pinner [140] und Dalko [141] dargestellt. Allerdings fällt das Hydrochlorid nicht nach Einströmen des HCl-Gases aus. Erst im Gefrierschrank kristallisiert das gewünschte Produkt **36** aus. Die Aufreinigung erfolgt durch Auswaschen mit kaltem Diethylether (**Abb. 2.21**). Die Lagerung erfolgt im Exsikkator über Kaliumhydroxid-Plättchen.

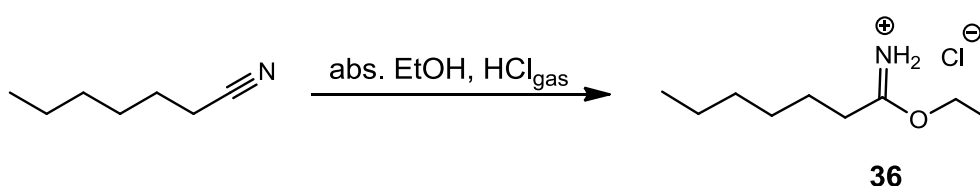


Abb. 2.21: Synthese des Heptanimidsäureethylester Hydrochlorid **36**.

Ein alternativer Syntheseweg zum obigen Verfahren wurde eingeführt, um Hydrochloride einfach substituierter Alkylimidsäureethylester darzustellen. Einfache Nitrile, beispielsweise das Heptannitril, werden zusammen mit trockenem Ethanol in etherischer HCl gelöst und dicht verschlossen unter Eiskühlung heftig gerührt. Nach Auskristallisieren im Gefrierschrank kann die gewünschte Verbindung durch Auswaschen mit kaltem Diethylether isoliert und gereinigt werden. Zum Trocknen und Lagern über KOH-Plättchen wird die Substanz in den Exsikkator gestellt.

2.3.3 Synthese der Diiminoester Dihydrochloride

Die Methode der Darstellung einfach substituierter Iminoester Hydrochloride kann auch auf die Umsetzung von Alkyldinitrilen verschiedener Kettenlängen zu ihren analogen Diiminoester Dihydrochloriden übertragen werden.

In dieser Arbeit wurden 1,4-Dicyanobutan, 1,6-Dicyanohexan, 1,8-Dicyanooctan und 1,10-Dicyanodecan zu **37-40** umgesetzt. Nach einigen Stunden fallen die Endprodukte im Reaktionsansatz aus. Die Reinigung erfolgt durch Waschen mit Diethylether. **37-40** können bei Raumtemperatur im Exsikkator gelagert werden.

Aufgrund der induktiven Effekte der Alkylketten besitzen die Iminoester **37-40** eine hohe Stabilität.

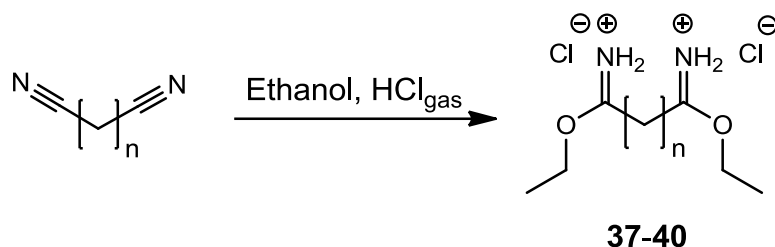


Abb. 2.22: Umsetzung der Alkyldinitrile zu **37** ($n = 4$), **38** ($n = 6$), **39** ($n = 8$) und **40** ($n = 10$).

2.4 Synthese von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Monomeren

2.4.1 Mögliche Zyklisierungsreaktionen

Die *meso*-1,2-Diarylethylendiamine **24-34** können über zwei Synthesewege zu 2-Imidazolinen zyklisiert werden. Während Martin [144] die Synthese mit Orthoameisensäuretriethylester beschrieb, verwendete Boykin [145] Iminoester. Einige 2-Imidazolin-Monomere wurden im Arbeitskreis Gust bereits synthetisiert [Keilitz, 146], [von Rauch, 99]. Im Rahmen dieser Arbeit dienen sie als Ausgangsstoffe für einige Dimerisierungsreaktionen (**Kap. 2.6**), weshalb diese auch hier dargestellt worden sind.

2.4.1.1 Synthese der Monomere nach Martin mit Orthoformiat

Mit Orthoformiat wurden die Verbindungen **27**, **28**, **30** und **32** in ihre entsprechenden 2-Imidazoline umgesetzt (**Abb. 2.23**). Der Orthoester dient sowohl als Reagenz als auch als Lösungsmittel. Mit katalytischen Mengen an konzentrierter Salzsäure werden die Ansätze unter Rückfluss erhitzt.

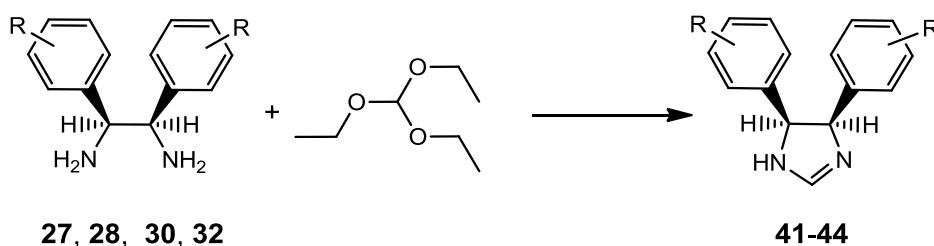


Abb. 2.23: Synthese der Verbindungen **41** (4- OCH_3), **42** (4- F), **43** (2- F -4- OCH_3) und **44** (2- Cl -4- OCH_3) nach Martin [144].

2.4.1.2 Synthese der Monomere nach Boykin mit Iminoester Hydrochloriden

Die nach Martin [144] synthetisierten Verbindungen **41-44** wurden ebenfalls mit Ethylformimidat Hydrochlorid **35** nach Boykin [145] dargestellt. In gleicher Weise erfolgten auch die Synthesen von **45** und **46** (**Abb. 2.24**). Die Verbindungen **33** und **34** haben jeweils vier voluminöse Chloratome in den *ortho*-Positionen. Die Ringschlüsse zu ihren analogen 2-Imidazolinderivaten **45** und **46** konnten nur erfolgen, weil **35** eine höhere Carbonylaktivität als das Orthoformiat hat. Vor allem der Synthese von **45** wird eine große Bedeutung zugeschrieben. In Vorarbeiten versuchte man aus **46** das *meso*-4,5-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid **45** über eine Methoxyspaltung mit BBr_3 zu erhalten. Verbindung **45** konnte nie dargestellt werden. Neben der Methoxyspaltung hydrolysierte zusätzlich der 2-Imidazolinring [Keilitz, 146], [von Rauch, 99]. Die Möglichkeit, über die **Variante B** (**Kap. 2.2.2; Abb. 2.18**) *meso*-1,2-Diarylethylendiamine mit bereits freien *OH*-Gruppen erhalten zu können, bietet den Vorteil, Verbindung **33** zu synthetisieren und anschließend mit **35** im Überschuss zum gewünschten Produkt umsetzen zu können. Somit ergibt sich auch der Vorteil, ohne die Methoxyspaltung 2-Imidazolinderivate mit bereits freien Hydroxylgruppen zu erhalten. Die Synthesen der 2-Imidazolin-Dimer Dihydrochloride erfolgten durch Einsatz der Diiminoester Dihydrochloride **37-40** (**Kap. 2.5**).

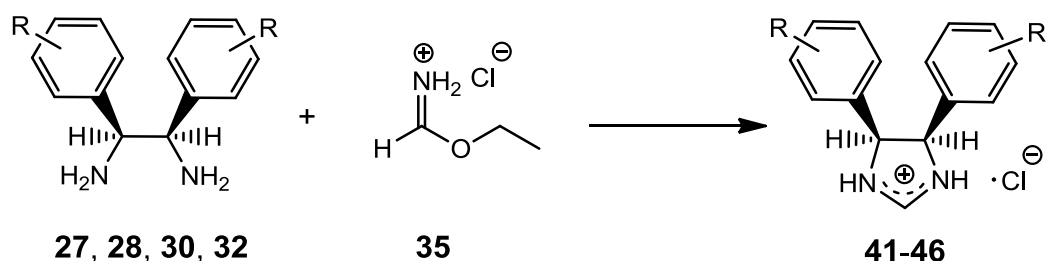


Abb. 2.24: Synthese von **41** (4- OCH_3), **42** (4- F), **43** (2- F -4- OCH_3), **44** (2- Cl -4- OCH_3), **45** (2,6- Cl_2 -4- OH) und **46** (2,6- Cl_2 -4- OCH_3) nach Boykin [145] unter Verwendung des Formimidsäureethylester Hydrochlorid.

Unter Verwendung des einfach substituierten Heptanimidsäureethylester Hydrochlorid **36** und der Verbindung **28** wurde als einziges 2-Alkyl-2-imidazolin-Monomer die Verbindung **47** synthetisiert.

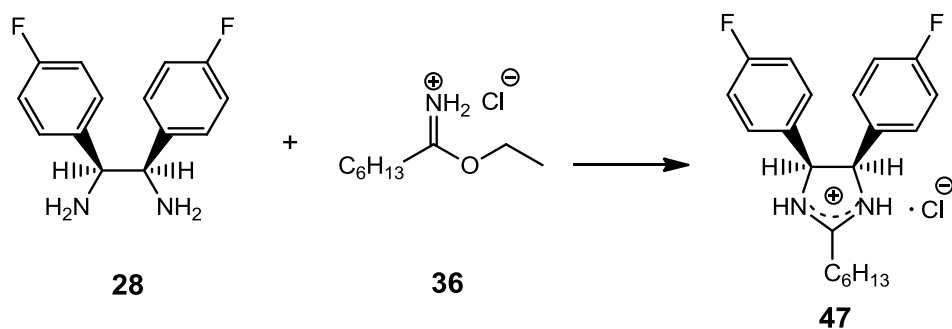


Abb. 2.25: Umsetzung von **28** zum 2-Hexyl-2-imidazolin-Monomer.

2.5 Synthese der C2-alkylierten 2-Imidazolin-Dimere Dihydrochloride

Basierend auf dieser Darstellungsmöglichkeit der 2-Imidazoline sollte hier die Synthese von analogen Dimeren erprobt werden. Hierzu wurden **37-40** (Kap. 2.3.3) jeweils mit den entsprechenden *meso*-1,2-Diarylethylenediaminen **24-25**, **27-29**, **31**

2 Synthetischer Teil

und **32** umgesetzt. Eine Übersicht der erhaltenen Verbindungen ist in **Tab. 2.6** dargestellt.

Die *meso*-1,2-Diarylethylendiamine werden zusammen mit den Diiminoester Dihydrochloriden mit trockenem Ethanol aufgenommen und für 4-7 Tage unter Rückfluss erhitzt. Die entstehenden Dihydrochloride der Dimere können nach dem Eindampfen der Lösung aus dem Rohprodukt durch Waschen mit organischem Lösungsmittel isoliert werden. Zum Waschen eignen sich unter anderem Aceton, Dichlormethan oder Ethanol. In seltenen Fällen erfolgt eine Umkristallisation in Methanol/Diethylether oder Ethanol/Petrolether. Dimere in protonierter Form können bei Raumtemperatur gelagert werden, da sie gegenüber hygroskopischen Zersetzungen stabiler als ihre unprotonierte Formen sind.

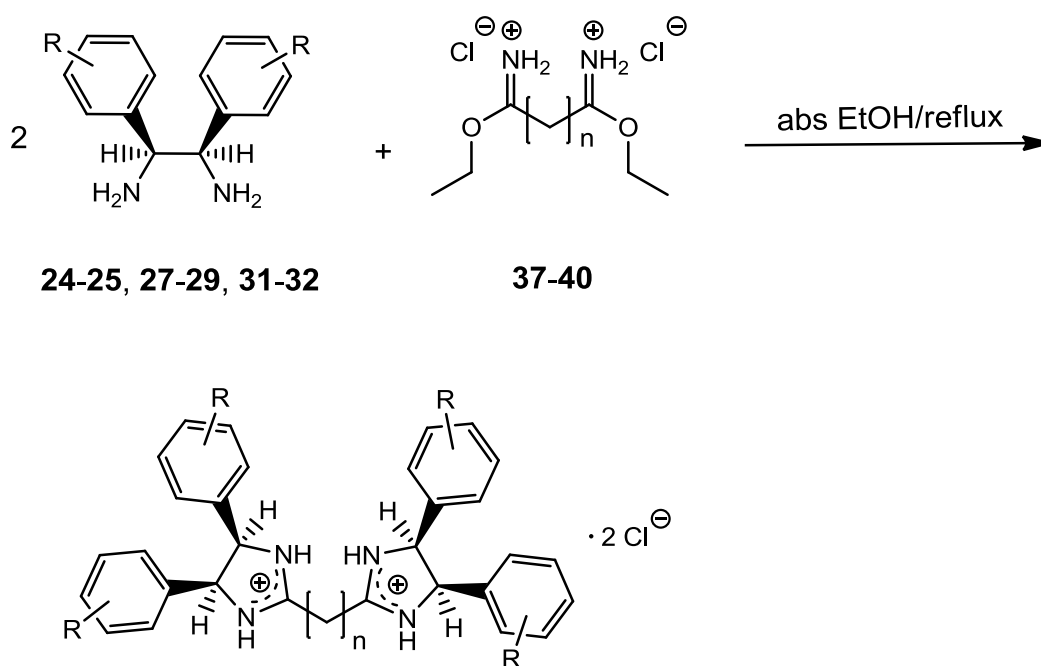


Abb. 2.26: Synthese der 2-Imidazolin-Dimer Dihydrochloride **48-71**; $n = 4, 6, 8, 10$.

Diese Methode hat aber auch ihre Einschränkungen. So ist unter diesen Reaktionsbedingungen nicht möglich, **33** mit einem dieser Diiminoester Dihydrochloride zu dimerisieren. Auch Veränderungen der stöchiometrischen

Verhältnisse, der Reaktionszeit und der Zusatz wasserentziehender Salze wie Natriumsulfat brachten keinen Erfolg.

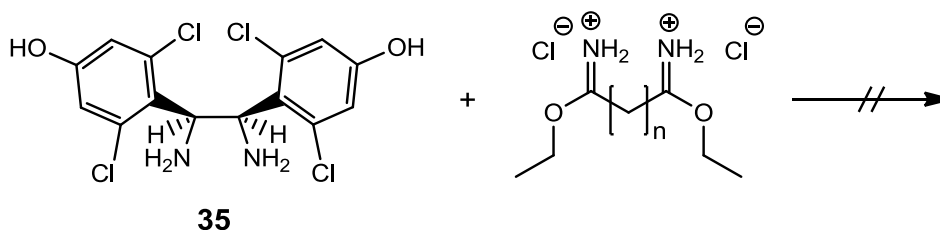


Abb. 2.27: **33** konnte nicht umgesetzt werden.

Anhand massenspektroskopischen Untersuchungen kann nachgewiesen werden, dass der Ringschluss zum Heteroaromaten nur auf der einen Seite eines eingesetzten Diiminoester Dihydrochlorids erfolgt, während auf der anderen Seite die Iminoester-Gruppe frei vorliegt. Kyrides [147] verwendete Ester, um 2-Imidazoline zu erhalten. Dieser Syntheseweg wurde auch in dieser Arbeit unter Verwendung von Alkyldiethylester erprobt. Allerdings konnten keine der gewünschten Dimere erhalten werden.

2.6 Synthese der *N*-Alkyl-bis-*meso*-4,5-diaryl-2-imidazolin-

Dimere

Der 2-Imidazolinring bietet die Möglichkeit, an verschiedenen Positionen zu alkylieren. Neben der C2-Alkylierung nutzte man in vorherigen Forschungsarbeiten im Arbeitskreis Gust die Deprotonierfähigkeit des Heteroringes mit Hilfe einer starken Base (beispielsweise Natriumhydrid oder *n*-Butyllithium), um an Stickstoffatomen einfach oder zweifach substituierte 2-Imidazoline zu erhalten.

Neben Synthese der über die C2-Atome verbundenen Dimere sollten in dieser Arbeit auch über die N1-Atome verknüpften bivalenten Verbindungen synthetisiert werden. Die Monomere **43** und **44** wurden eingesetzt, um sie miteinander über Alkylketten der Länge C = 4-10 zu verbinden.

2 Synthetischer Teil

Nach einer Vorschrift von Gruseck [148] wird das zu alkylierende 2-Imidazolin Hydrochlorid in trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Die Lösung kühlt man auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ runter, zu der vorsichtig eine in Hexanol vorliegende 2,5 molare n-Butyllithiumlösung hinzuge tropft wird. Zum Ansatz tropft man ausgewählte disubstituierte Alkylhalogenide und rührt weitere 60 Minuten in der Kälte. Über Nacht wird dieser Ansatz auf Raumtemperatur gebracht.

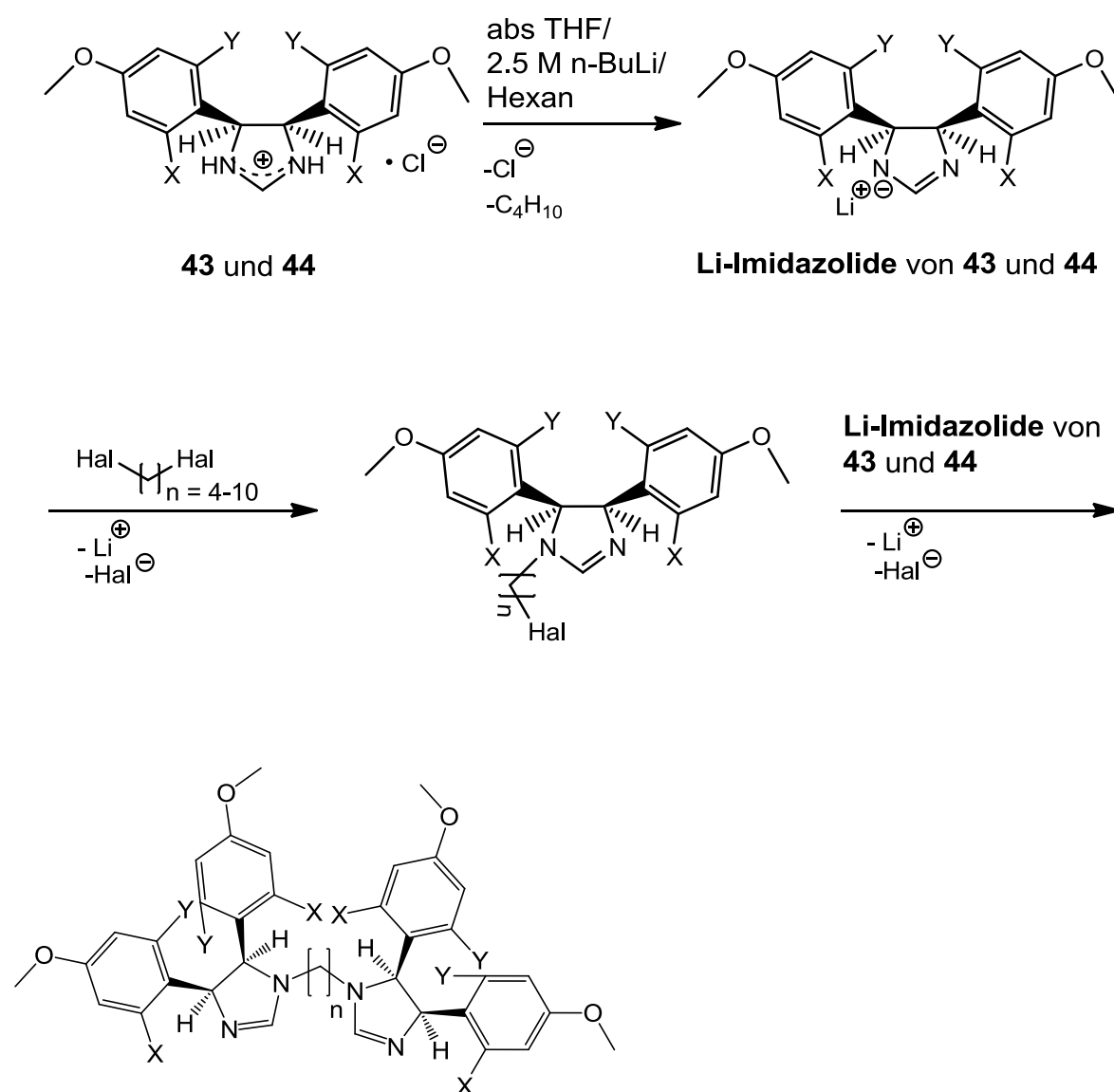


Abb. 2.28: N-alkylierte Dimere aus den Monomeren **43** ($X = 2\text{-F}$, $Y = 6\text{-H}$) und **44** ($X = 2\text{-Cl}$, $Y = 6\text{-H}$) verschiedener Kettenlängen; Hal = Halogen; $n =$ Alkylspacerlänge 4-10.

2 Synthetischer Teil

Für die *N*-Verbrückung standen im Arbeitskreis 1,4-Dibrombutan, 1,6-Dibromhexan, 1,8-Diiodoctan und 1,10-Dibromdecan zur Verfügung. Eine Übersicht der synthetisierten *N*-verlinkten Verbindungen **72-79** kann man aus **Tab. 2.7** entnehmen. Allerdings stellt sich eine Einschränkung dieser Methode der *N*-Alkylierung heraus. Anders als **43** und **44** werden die Verbindungen **42** und **46** erst gar nicht am *N*1-Atom des 2-Imidazolinringes alkyliert. Der Versuch, diese Verbindung mit Hilfe von Alkyldihalogeniden zu dimerisieren, scheitert.

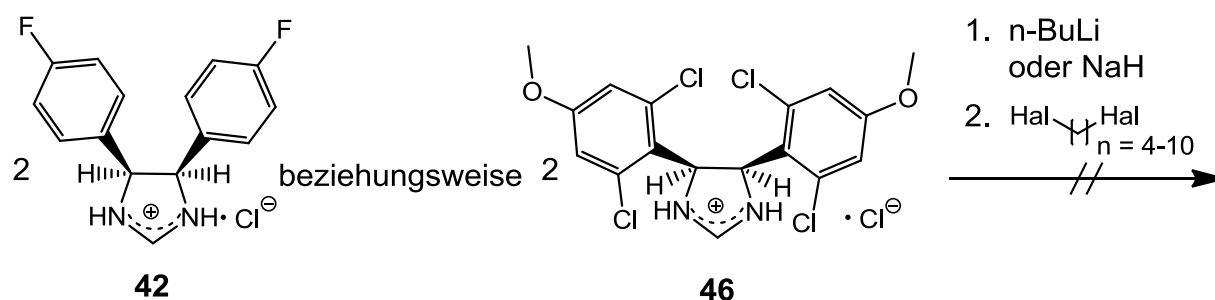


Abb. 2.29: Verbindung **42** und **46** werden nicht dimerisiert.

Vermutlich ist das Substitutionsmuster ein entscheidender Faktor für die Umsetzung zu Dimeren. **43** und **44** besitzen jeweils außer *para*-ständige Methoxygruppen noch *ortho*-ständige Halogenatome. Ohne diese finden keine *N*-Alkylierungen statt. Deshalb setzt sich **42** nicht um. In der Dissertation von Rauch [99] wurde versucht, **41** am *N*1-Atom zu alkylieren. Auch hier konnte kein Erfolg erzielt werden. So wie bei **42** sind die Aromaten nur in den *para*-Positionen substituiert. **46** hat zwar in allen *ortho*-Positionen Chloratome, dennoch kommt es aber erstaunlicherweise zu keiner *N*-Alkylierung. Hier dürfte das große Volumen des Moleküls ein sterisches Hindernis sein.

3

**Pharmakologische Untersuchungen
Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme**

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

3.1 Angewendete pharmakologische Untersuchungen

Alle synthetisierten Testverbindungen wurden erst auf mögliche Zytotoxizität mittels des Kristallviolett-Assays untersucht. Einige ausgewählte Verbindungen wurden auf Effekte am Estrogenrezeptor (ER_{α} , β) und auf ihre Zellaufnahmen getestet.

3.2 Die Kristallviolett-Assay-Testung auf Zytotoxizität

Die synthetisierten Testverbindungen **41-42**, **45** und **47-71** wurden alle an hormonabhängigen MCF-7 Mammakarzinom- und teilweise auch an den nicht hormonabhängigen MDA-MB-231-Zellen (**64-71**) auf ihre Zytotoxizität hin untersucht. Die verwendeten MCF-7-Mammakarzinom-Zellen [Horwitz, 149] exprimieren den Estrogenrezeptor ER_{α} [Stoica, 150]. Bei der MDA-MB-231-Zelllinie handelt es sich auch um Brustkrebs-Zellen [Engel, 151], welche aber keine Gene besitzen, die für den ER-Rezeptor kodieren können [Mathew, 152].

Hierbei soll zunächst über einen einfachen Test (Zweipunktbestimmung) überprüft werden, ob die in diesem Arbeitskreis entwickelten Testverbindungen wachstumshemmende Wirkungen zeigen. Diese werden durch den T/C_{corr} - Wert, der bei $\leq 50\%$ liegen muss, ausgedrückt. Bei vorhandener Zytotoxizität erfolgt ein ausgedehnteres Verfahren, bei der nach der Konzentration ermittelt wird, die die Zellzahl um die Hälfte der Anfangskonzentration nach einer bestimmten Zeit reduziert. In diesem kombinierten Test (Konzentrations-Zeit-Kristallviolett-Assay) wird diese Konzentration durch den IC_{50} -Wert ausgedrückt [Gillies, 153].

Bei der Zweipunktbestimmung werden Konzentrationen von 10 und 20 μM der Testsubstanz gegen Cisplatin-Lösungen ebenfalls in der Konzentration von 10 und 20 μM getestet. Erst erfolgt die Zellaussaat. Nach Anwachsen der Zellen folgt die Substanzzugabe. 96 Stunden nach der Inkubation wird der Versuch abgestoppt, die Zellversuchsplatten mit einer Glutardialdehyd-Lösung fixiert und anschließend mit einer Kristallviolett-Lösung angefärbt, welche nach 30 Minuten herausgewaschen wird. Nach dem Anfärben pipettiert man in die Zellversuchsplatten 70 %igen Ethanol. Diese Platten werden geschüttelt und danach die Absorption der Lösung UV-photometrisch vermessen. Eine bis zur Substanzzugabe mitgeführte Testplatte, die

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

nur mit Zellsuspension versehen ist, wird abgestoppt und bis zur Anfärbung mit folgender Vermessung aufbewahrt. Diese t_0 -Platte dient als Referenz.

Bei dem kombinierten Test wurden von einer Testsubstanz jeweils fünf Lösungen hergestellt, beginnend ab der Konzentration, die $T/C_{\text{corr}} \leq 50\%$ erreicht. Die Cisplatin-Verdünnungsreihe dient auch hier als Referenz. Neben einer t_0 -Platte finden fünf identische Substanzplatten ihre Verwendung. Jeweils eine Platte wird im Abstand von 24 Stunden, beginnend ab 48, 72, 96, 120 und 144 h nach Substanzzugabe abgestoppt. Die Aufarbeitung bis zur Messung der Platten ist identisch zur Zweipunktbestimmung.

3.2.1 Testergebnisse der Untersuchungen

3.2.1.1 Einfacher Kristallviolett-Assay

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen von allen Testverbindungen an MCF-7-Zellen und von **64-71** auch die Ergebnisse der Untersuchungen an MDA-MB-231-Zellen vorgestellt. Die Übersicht ist unterteilt in monomere 4,5-Diaryl-2-imidazoline (**41**, **42**, **45** und **47**) und jeweils in 4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere mit den Substitutionsmuster 3-OH und 4-OH (**48-55**), 4-OCH₃ und 4-F (**56-63**) sowie 2-Halo-4-OH (**64-71**) in den Aromaten.

Die linken Seiten der Abbildungen geben die Resultate der getesteten Substanzen bei Konzentrationen von 10 μM und die rechte Seite von 20 μM wieder. In jedem Graphen ist der T/C_{corr} -Wert von Cisplatin mit aufgeführt.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

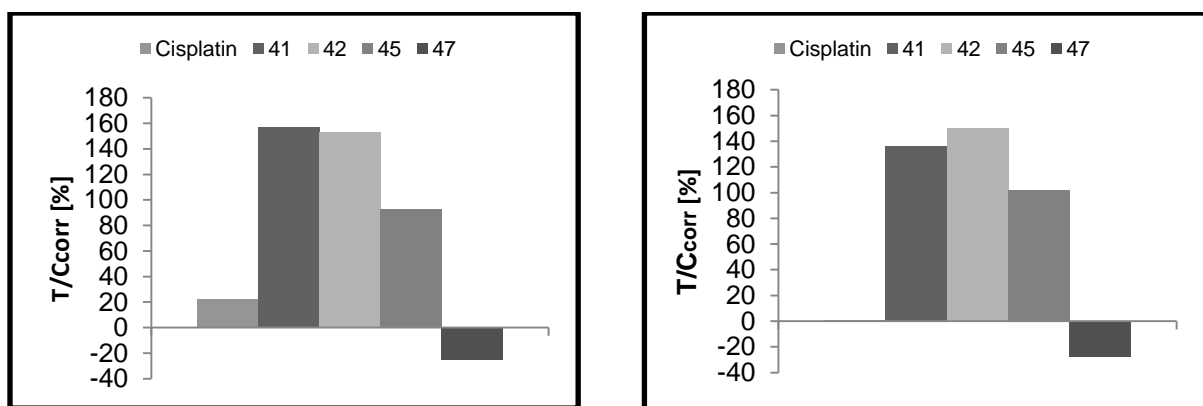


Abb. 3.1a und 3.1b: antiproliferative Wirkung des Cisplatin ($T/C_{\text{corr}} = 22\%$ bei $10\ \mu\text{M}$; $T/C_{\text{corr}} = 1\%$ bei $20\ \mu\text{M}$) und **47** ($T/C_{\text{corr}} = -25\%$ bei $10\ \mu\text{M}$; $T/C_{\text{corr}} = -28\%$ bei $20\ \mu\text{M}$) an MCF-7-Zellen.

Die 2-Imidazolin-Monomere **41**, **42** und **45** wirken in den getesteten Konzentrationsbereichen nicht wachstumshemmend an der eingesetzten MCF-7-Zelllinie. Dabei spielt das Substitutionsmuster an den Aromaten bei **41** (4- OCH_3), **42** (4- F) und **45** (2,6- Cl_2 -4- OH) keine Rolle. Bereits in einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ übt **47** eine antiproliferative Wirkung aus. Auch bei einer Erhöhung der Konzentration auf $20\ \mu\text{M}$ ändert sich der T/C_{corr} -Wert ($T/C_{\text{corr}} = -28\%$) kaum. Im Gegensatz zu den anderen Substanzen handelt es sich hier um ein mit einer Hexylkette am C2-Atom substituiertes 2-Imidazolin. In einer weiteren Testung wurde die MCF-7-Zelllinie jeweils mit **41** und **42** mit einer höheren Konzentration ($>20\ \mu\text{M}$) inkubiert. Auch bei $50\ \mu\text{M}$ können keine zytotoxischen Wirkungen beobachtet werden. Allerdings scheinen beide Testverbindungen bei 10 und $20\ \mu\text{M}$ eine starke Stimulation der Zellen hervor zu rufen (siehe **3.1a+b**).

Anders verhalten sich bivalente 4,5-Diaryl-2-imidazoline. Unterschiede der Substitutionsmuster und Kettenlängen ($C = 4, 6, 8$ und 10) spielen hinsichtlich ihrer Wirkungen eine enorme Rolle. Mit 3- OH - (**48-51**) oder 4- OH -Gruppen vorliegende Verbindungen (**52-55**) üben außer **55** (bei $20\ \mu\text{M}$ $T/C_{\text{corr}} = 24\%$) bei den eingesetzten Konzentrationen keine antiproliferativen Effekte aus. Bei $20\ \mu\text{M}$ wirken die 4- OH -substituierten Verbindungen insgesamt besser als die 3- OH -substituierten.

Die Wirkung von **55** ist allerdings nur schwach. In den **Abbildungen 3.2a** und **3.2b** sind die Konzentrations-Wirkungs-Säulendiagramme dieser Dimere der Kettenlänge $C = 4$ (**48**, **52**), $C = 6$ (**49**, **53**), $C = 8$ (**50**, **54**) und $C = 10$ (**51**, **55**) dargestellt.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

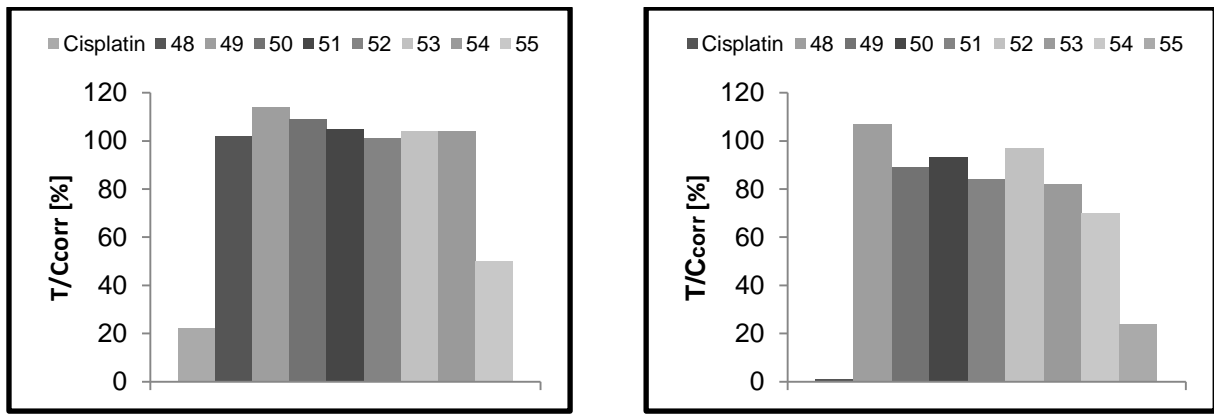


Abb. 3.2a und **3.2b**: Dimere mit 3-*OH*- (**48-51**) und 4-*OH*-Substitution (**52-55**) bei 10 µM (links) und 20 µM (rechts).

Enorme Effekte an Mammakarzinom-Zellen zeigen Dimere mit einer 4-*OCH*₃- oder 4-*F*-Substitution. Bei 10 µM als auch bei einer Konzentration von 20 µM (**Abb. 3.3a+b**) ist **56** (T/C_{corr} = -28 %) unter den methoxylierten *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimeren am zytotoxischsten. **56-59** haben in beiden gemessenen Konzentrationen identische T/C_{corr}-Werte, welche im Bereich von T/C_{corr} = -33 und 3 % liegen. In *para*-Position an den Aromaten fluorierte Dimere sind zytotoxischer als ihre methoxylierten Analoga. Interessanterweise besitzen **60** und **61** in beiden gemessenen Konzentrationen nahezu identische T/C_{corr}-Werte von -67 bis -63 %, gefolgt von **62** (T/C_{corr} = -31 %) und **63** (T/C_{corr} = -27 %).

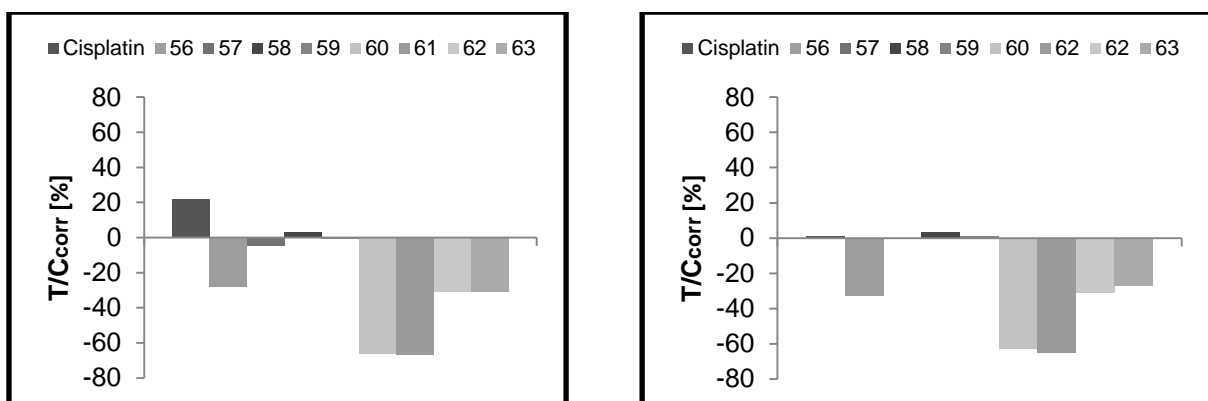


Abb. 3.3a und **3.3b**: 4-*OCH*₃-substituierte (**56-59**) und 4-*F*-substituierte Dimere (**60-63**) bei 10 µM (links) und 20 µM (rechts).

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Bivalente Verbindungen mit 2-*F*-4-*OH*- oder 2-*Cl*-4-*OH*-Gruppen in den Aromaten rufen enorme Veränderungen an MCF-7 Mammakarzinom-Zellen hervor. Anders als bei **60-63** gehen bei diesen Testverbindungen die zytotoxischen Effekte verloren. Mit zunehmender Kettenlänge sind nur schwache Wirkungen bei **64-67** vorhanden. **64** und **65** zeigen bei 10 μM keine Wirkungen ($T/C_{\text{corr}} = 103\%$; 114%). Eine schwache Zytotoxizität kann nur bei **67** erkannt werden ($T/C_{\text{corr}} = 52\%$). **66** und **67** haben bei einer jeweiligen Konzentration von 20 μM den identischen Effekt ($T/C_{\text{corr}} = 37\%$). **71** wirkt bei 10 μM wie **67**. Die C8- und C10-Dimere **69** und **70** wirken identisch. Bei einer jeweiligen Konzentration von 20 μM sind die Effekte von **69** und **70** nahezu identisch zu **71** (**Abb. 3.4b**). Nahezu unabhängig vom Halogenatom in *ortho*-Position nimmt die antiproliferative Wirkung einer Verbindung mit steigender Kettenlänge zu. Bemerkenswert ist die identische Wirkung von **65** (2-*F*-4-*OH*-Substitution) und **54** (*OH*-Substitution) in einer jeweiligen Konzentration von 10 μM .

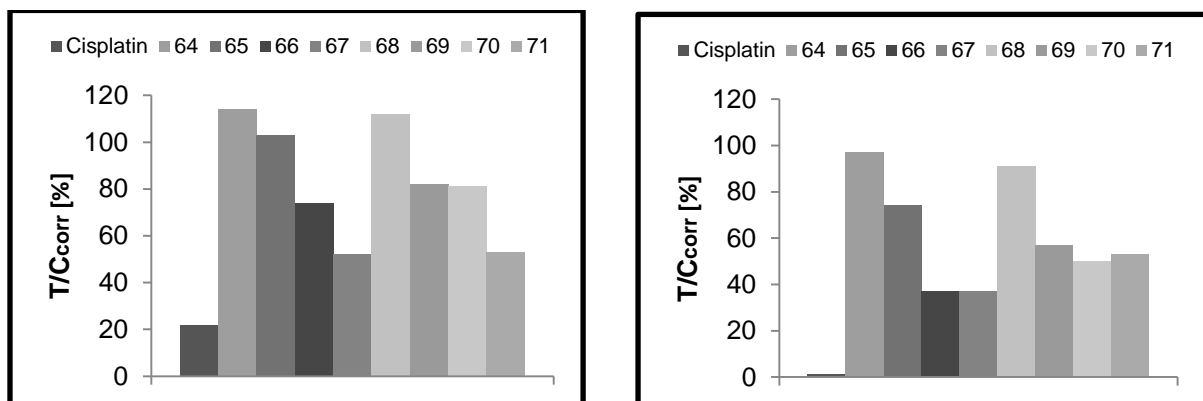


Abb. 3.4a und **3.4b**: Dimere mit 2-*F*-4-*OH*- (**64-67**) und 2-*Cl*-4-*OH*-Substitution (**68-71**) bei 10 μM (links) und 20 μM (rechts).

Beim einfachen Kristallviolett-Assay wurden MDA-MB-231-Zellen nur für die Untersuchung der 2-*Halo*-4-*OH*-substituierten Verbindungen **64-71** eingesetzt. Da diese auch auf Estrogenität getestet werden sollten, war es wichtig zu klären, ob ihre Wirkungen an Mammakarzinom-Zellen im Zusammenhang mit der Anwesenheit von Estrogenrezeptoren stehen. Die Ergebnisse der Zelltestung sind in der unteren **Abb. 3.5a+b** dargestellt.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Bei einer Konzentration von 10 μM sind die T/C_{corr} -Werte bei den Dimeren mit 2-*F*-4-*OH*-Substituenten unterschiedlich. **64** und **66** wirken leicht wachstumshemmend ($T/C_{\text{corr}} = 72$ und 82 %). **65** und **67** sind aktiver. Ihre T/C_{corr} -Werte liegen bei 50 beziehungsweise 63 %. Bei der Zelltestung mit der Konzentration von 20 μM steigt nur die Wirkung des C8-Dimers **66** ($T/C_{\text{corr}} = 43$ %). Bei **64**, **65** und **67** gibt es einige Veränderung ihrer Wirkungen: Bei **64** ist sie gleichbleibend ($T/C_{\text{corr}} = 73$ %), bei **65** nimmt sie leicht ab ($T/C_{\text{corr}} = 74$ %) und bei **67** leicht zu ($T/C_{\text{corr}} = 56$ %).

Interessanterweise haben bis auf **68** (10 μM : $T/C_{\text{corr}} = 101$ %; 20 μM : $T/C_{\text{corr}} = 76$ %) insgesamt alle 2-*C*-4-*OH*-substituierten Verbindungen in beiden gemessenen Konzentrationen jeweils eine stärkere Wirkung als ihre 2-*F*-4-*OH*-Analoge. In einer Konzentration von 10 μM sind sie bei **69** ($T/C_{\text{corr}} = 22$ %) und **70** ($T/C_{\text{corr}} = 27$ %) am stärksten ausgeprägt. **71** ($T/C_{\text{corr}} = 61$ %) hat nach **68** die geringste Wirkung. Bei **69** bleibt die Wirkung an MDA-MB-231-Zellen auch bei einer Erhöhung der Konzentration auf 20 μM unverändert ($T/C_{\text{corr}} = 20$ %). **70** verliert leicht an Wirkung, bleibt dennoch unter der 50 %-Grenze ($T/C_{\text{corr}} = 41$ %). Im Gegensatz zum C8-Dimer steigt der Effekt von **71** an ($T/C_{\text{corr}} = 32$ %).

An ER-negativen MDA-MB-231-Zellen sind **68-71** generell wirksamer als an ER-positiven MCF-7-Mammakarzinom-Zellen.

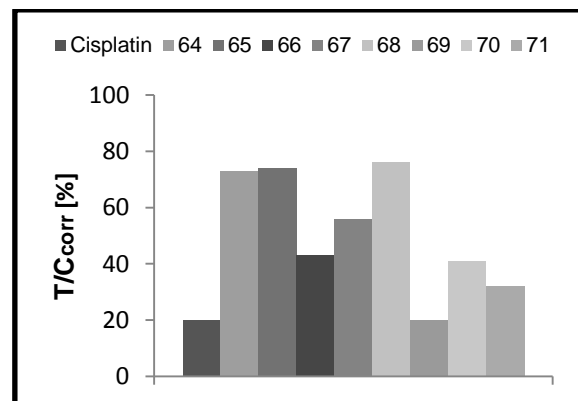
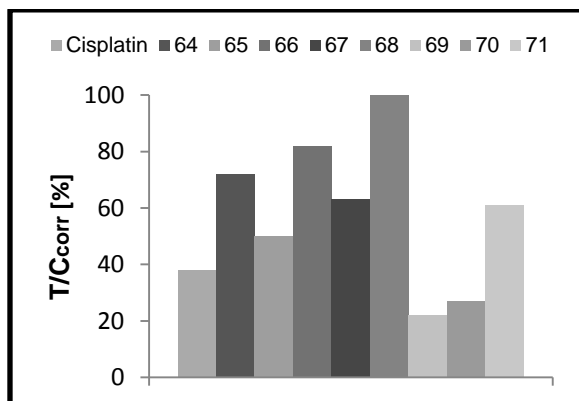


Abb. 3.5a und 3.5b: Testung der 2-*F*-4-*OH*- und 2-*C*-4-*OH*-Diaryl-2-imidazolin-Dimere an MDA-MB-231-Zellen bei 10 μM (links) und 20 μM (rechts).

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

3.2.1.2 Zeit- und konzentrationsabhängiger Kristallviolett-Assay

In diesem Testmodell wurden nur **47** und **60-63** näher auf ihrer Wirkungen an beiden Zelllinien untersucht. Einerseits war die Ermittlung der IC₅₀-Werte dieser potenten Verbindungen für die Untersuchungen auf die Zellaufnahme an MCF-7-Zellen wichtig (**Kap. 3.4**). Andererseits sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich diese Verbindungen nur an ER-positiven MCF-7 Mammakarzinom-Zellen zytotoxisch verhalten. Nach vorherigen Untersuchungen, bei denen T/C_{corr}-Werte deutlich unter 0 erreicht wurden, sollten nun Erkenntnisse über deren Konzentrationen gewonnen werden, die nötig sind, um die Zellzahl um die Hälfte des Anfangswertes nach einem bestimmten Zeitpunkt zu reduzieren. Der IC₅₀-Wert einer potenten Verbindung ist ein Richtwert, der sich für dieses Testsystem auf 96 Stunden bezieht. Mit steigender Zytotoxizität eines Testwirkstoffs werden die IC₅₀-Werte kleiner.

Verbindung	Rest bzw. Alkylspacer	IC ₅₀ an MCF-7 [µM]	IC ₅₀ an MDA-MB-231 [µM]	Zeitpunkt [h]
Cisplatin	-	1.93	1.72	96
47	Hexyl	2.5	5.8	96
60	But-1,4-diyl	0.63	0.91	96
61	Hex-1,6-diyl	0.43	0.68	96
62	Oct-1,8-diyl	0.26	0.47	96
63	Dec-1,10-diyl	0.24	0.34	96

Tab. 3.6: Übersicht der IC₅₀-Werte des Hexyl-Monomers und der Dimere.

Gegenüber den Dimeren (IC₅₀ < 1) ist das Monomer **47** schwächer wirksam. Mit IC₅₀-Werten von 2.5 µM (MCF-7) und 5.8 µM (MDA-MB-231) sind sie höher. Eine sehr starke Zytotoxizität wird nur bei 4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit 4-*F*-Substitution erreicht, wenn zwei dieser pharmakophoren Moleküle über einen Alkylspacer miteinander verbunden sind. Mit steigender Kettenlängenzahl [C4 (**60**) << C10 (**63**)] nimmt die Wirksamkeit zu. **47** besitzt zwar auch eine Wirkung, aber dieser Wirkstoff besteht nur aus einem Pharmakophor und einer Alkylkette. **63** zeigt die höchste

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Toxizität (MCF-7: $IC_{50} = 0.24$; MDA-MB-231: $IC_{50} = 0.34$). Alle bivalenten 4-F-Verbindungen sind potenter als Cisplatin. Die Wirkungen an beiden Zelllinien sind nahezu identisch. Als Beispiel ist von **63** und Cisplatin eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve an MCF-7-Zellen (**Abb. 3.7**) dargestellt. Von Cisplatin wurden Konzentrationen von 0.63, 1.25, 2.5, 5 und 10 μM und von **63** 0.06, 0.25, 0.5 und 1 μM eingesetzt.

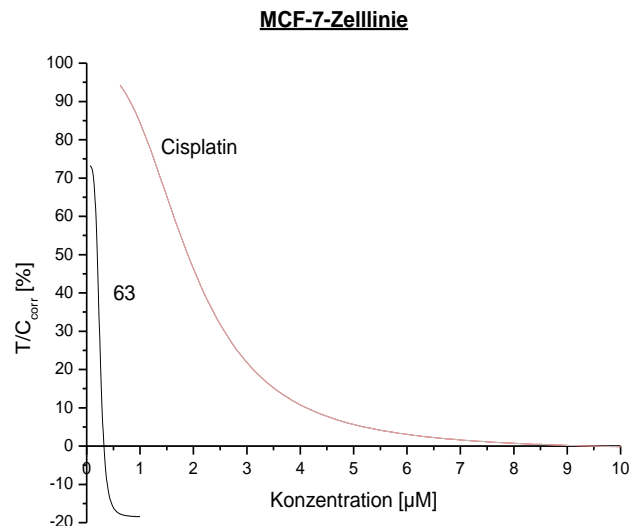


Abb. 3.7: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Cisplatin ($IC_{50} = 1.93 \mu\text{M}$) und **63** ($IC_{50} = 0.24 \mu\text{M}$) an MCF-7-Zellen.

Cisplatin zeigt einen sigmoidalen Kurvenverlauf, **63** dagegen nicht (**Abb. 3.7**). Der Kurvenabfall ist sehr steil. Ab einer Konzentration von 0.13 μM zur nächst höheren Konzentration (0.25 μM) kann eine sehr rasche Abnahme des T/C_{corr} -Wertes beobachtet werden. Die nächstgrößere Konzentration von 0.5 μM bewirkt sogar eine Abnahme der Werte in den negativen Bereich. An MCF-7 Mammakarzinom-Zellen hat **63** eine zytocide Wirkung.

Eine Substanz dieser Eigenschaft müsste ebenfalls einen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigen. Daher ergab sich die Frage, ob **63** tatsächlich zytocid ist oder ob sich die Zellen nur vom Boden der Testplatte ablösen ohne dabei abgetötet zu werden. Hierzu wurde **63** in einem weiteren kombinierten Kristallviolett-Assay untersucht, bei der man die 96-Lochplatte noch vor der Zellaussaat mit Poly-D-Lysin überschichtete.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Durch diese Matrix werden die Zellen am Plattenboden verklebt und können sich nicht mehr ablösen. Parallel zu dieser wurde eine weitere Platte ohne diese Beschichtung mit Zellen ausgesät und **63** zugegeben. In diesem Test zeigte diese Verbindung allerdings eine identische Wirkung sowohl auf der speziell mit Poly-D-Lysin beschichteten, als auch auf der nicht beschichteten Versuchsplatte. Der IC_{50} -Wert = 0.24 μ M konnte bestätigt werden und zeigt einen identischen Kurvenverlauf zu **Abb. 3.7**. Dieses Resultat zeigt, dass die Wirkung der getesteten Verbindung nicht auf ein Ablösen der Zellen vom Plattenboden zurück zu führen ist. Die stark zytotoxische Wirkung konnte bestätigt werden.

Derivate von **47** mit kürzeren oder längeren Alkylresten wurden in dieser Arbeit nicht synthetisiert. Diese Verbindungen wären insofern ebenfalls interessant zu testen, um Kenntnisse zu erlangen, inwiefern die Reste Auswirkungen auf IC_{50} -Werte der Testsubstanzen haben könnten. Dass sie sich zumindest zytotoxisch auswirken müssten, steht außer Frage. Analog der Dimere lässt sich aber eine Zunahme ihrer Wirkungen mit steigenden Kettenlängen vermuten. Dennoch sollten aber ihre IC_{50} -Werte größer sein als die der Dimere **60-63**.

3.2.1.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Testergebnisse stellen einen Zusammenhang zwischen dem Substitutionsmuster, der Kettenlänge und der Zytotoxizität einer Verbindung dar. Solche mit *OH*-Substituenten unabhängig der Alkylspacerlänge (3-*OH*: **48-51**; 4-*OH*: **52-55**; 2-*F*-4-*OH*: **64-67** und 2-*Cl*-4-*OH*: **68-71**) besitzen trotz geringer Ausnahmen keine antiproliferative Eigenschaften. Auch die drei Monomere **41**, **42** und **45** zeigen gleiches Verhalten.

Anders sieht es mit Testverbindungen mit rein lipophilen Substituenten (4- OCH_3 : **56-59**; 4-*F*: **60-63**) aus. Sobald ein Wirkstoff lipophile Substituenten hat und an der *C2*-Position mit einer Alkylkette verknüpft ist, erlangt er enorme Zytotoxizität. Dabei spielt es keine Rolle, ob ein Monomer oder eine Dimer vorliegt. Das 4-*F* substituierte Monomer **47** mit einem Hexylrest beispielsweise wirkt sich wachstumshemmend aus, während sein strukturell ähnliches, am *C2*-Atom nicht substituiertes Derivat **42** keinen Effekt hat. Zudem haben Dimere dieser Art an beiden Zelllinien eine stärkere Wirkung als ihre Monomere. **47** und **61** haben die gleiche Alkylkettenlänge (Hexyl-

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

beziehungsweise Hex-1,6-diyllkette). Ein Vergleich ihrer IC_{50} -Werte miteinander bestätigt die Annahme, dass Dimere potenter sind als ihre analog alkylysubstituierten Monomere. So ist die bivalente Verbindung **61** (MCF-7: $IC_{50} = 0.43 \mu\text{M}$; MDA-MB-231: $IC_{50} = 0.68 \mu\text{M}$) beispielsweise zytotoxischer als ihr analoges Monomer **47** (MCF-7: $IC_{50} = 2.5 \mu\text{M}$; MDA-MB-231: $IC_{50} = 5.8 \mu\text{M}$).

Fluorierte C2-Alkyl-Dimere sind wirksamer als ihre methoxylierten Analoga. Je lipophiler der Substituent, desto wachstumshemmender wird auch die Verbindung. Außerdem wirken Dimere umso zytotoxischer, je länger ihre Alkylspacer werden. So ist unter den 4-*Fluor* substituierten Verbindungen **63** toxischer als sein Derivat **60** (Tab. 3.6). Auch für die 4-Methoxy-Dimere gilt selbiges. Die Zytotoxizität von **56** zu **59** ist aufsteigend.

3.3 Testung auf Estrogenität

3.3.1 HAP-Test: Bestimmung der relativen Bindungsaffinität

3.3.1.1 Einleitung HAP-Test

Noch vor der Testung auf Estrogenität werden die relativen Bindungsaffinitäten (RBA) zum ER im Vergleich zum natürlichen Liganden 17β -Estradiol (E2) unter Einsatz des HAP-Testsystems (HAP = Hydroxylapatit) untersucht. Hierbei handelt es sich um einen Competitionstest, bei dem zeitgleich Testverbindungen und das radioaktiv markierte E2 an isolierten ER_{α} , β getestet werden [Carlson, 154], [Stauffer, 155]. Da der natürliche Ligand und die Testverbindungen um die Besetzung der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des ER konkurrieren, kann man die Affinitäten der Verbindungen zur LBD bestimmen. Es handelt sich hier um eine *in vitro* Untersuchung an isolierten ER_{α} , β . Endokrine Prozesse können nicht stattfinden oder verfolgt werden. Auch liefern die Ergebnisse dieser Testung keine Aussagen über die Estrogenität oder Antiestrogenität.

Die Zellversuchsplatten werden mit Hydroxylapatit (HAP), einem Calciumphosphat-Salz ($\text{Ca}_5[(\text{OH})(\text{PO}_4)_3]$) beschichtet. Lösungen mit ER_{α} , β werden dazu gegeben. Beide Subtypen adsorbieren sodann auf dieser Matrix. Lösungen aus einer Mischung von radioaktiv markiertem [^3H]-E2 und dem zu testenden Wirkstoff werden auf die

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Untersuchungsplatte aufgetragen [Carlson, 154]. Nach Ablauf des Versuches wird mit Ethanol die überschüssige Menge des radioaktiven E2, welches nicht mit dem ER α , β interagieren kann, herausgewaschen [Carlson, 154]. Die Intensität der β -Strahlung des mit den ER-Subtypen interagierenden Anteils wird gemessen. Über die Intensität der radioaktiven Strahlung kann der Anteil des verdrängten E2 und somit die Affinität einer Verbindung zum ER α , β zurückverfolgt werden.

Bei Monomeren der 2-Halo-4-hydroxy-2-imidazoline wurden bereits sehr geringe Affinitäten zum ER beobachtet [Gust, 96]. Ihre RBA-Werte liegen im Bereich von < 0.02 bis 0.08 % [Gust, 156]. Die Auswirkungen einer Dimerisierung einschließlich der Auswirkungen der Kettenlängen dieser bereits untersuchten monomeren Liganden waren das Ziel dieser Versuchsreihe.

3.3.1.2 Ergebnisse der Dimere mit 2-Halo-4-hydroxyphenyl-Resten

Für den HAP-Kompetitionstest wurden die Verbindungen **64-71** untersucht. Nach folgender Berechnung ermittelt man ihre RBA-Werte [Strohmeier, 157]:

$$\text{RBA} = \frac{\text{IC}_{50}([\text{}^3\text{H}]\text{-E2})}{\text{IC}_{50}(\text{Ligand})} \cdot 100 \%$$

In diesem Testsystem werden auf jede Versuchsplatte neben einer Wirkstoff- $[\text{}^3\text{H}]\text{-E2}$ -Mischung auch eine Lösung aus $[\text{}^3\text{H}]\text{-E2}$ ohne den Wirkstoff aufgetragen. Letztere dient als Richtwert zur Beurteilung der Messergebnisse. In der unteren Abbildung ist die Konzentration gegen die Affinität in % angegeben.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

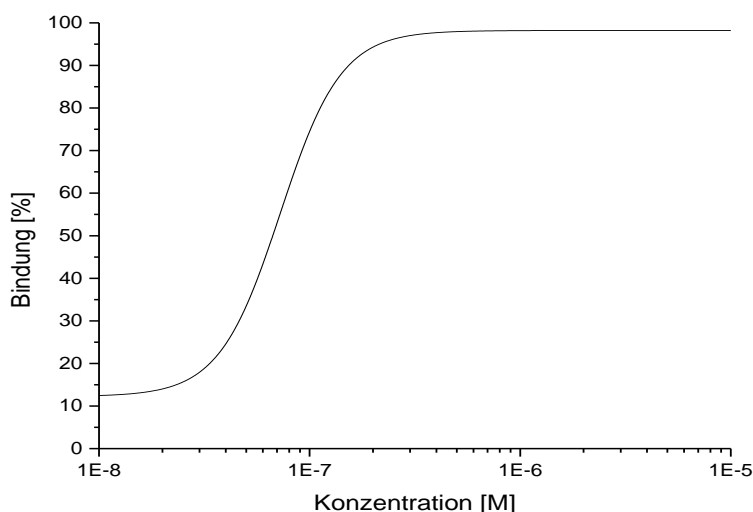


Abb. 3.8: Kurvenverlauf von radioaktiv markiertem [³H]-E2.

3.3.1.2.1 2-F-4-OH-2-Imidazolin-Dimere: Verbindungen 64-67

Für keine dieser Testverbindungen kann ein messbarer RBA-Wert ermittelt werden. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der Ergebnisse wieder:

Verbindung	Alkylspacer	ER α : max.	ER β : max.	RBA [%]
		Bindung in % bei 10 ⁻⁵ M	Bindung in % bei 10 ⁻⁵ M	
64	But-1,4-diyl	14	5	-
65	Hex-1,6-diyl	0	2	-
66	Oct-1,8-diyl	20	30	-
67	Dec-1,10-diyl	0	9	-

Tab. 3.9: Messergebnisse von **64-67** an ER α , β .

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

3.3.1.2.2 2-Cl-4-OH-2-Imidazolin-Dimere: Verbindungen 68-71

Auch der Austausch von Fluor gegen Chlor in *ortho*-Position bringt keine besseren Ergebnisse. Die Größenordnung der Bindungsaffinitäten bleibt auch bei diesen Verbindungen unverändert.

Verbindung	Alkylspacer	ER α : max.	ER β : max.	RBA [%]
		Bindung in % bei 10 ⁻⁵ M	Bindung in % bei 10 ⁻⁵ M	
68	But-1,4-diyl	12	10	-
69	Hex-1,6-diyl	25	10	-
70	Oct-1,8-diyl	20	1	-
71	Dec-1,10-diyl	33	24	-

Tab. 3.10: Messergebnisse von **68-71** an ER α , β .

3.3.1.3 Diskussion der fehlenden Wirkung von Dimeren

Die in dieser Arbeit synthetisierten Testsubstanzen brachten auch durch Dimerisierung keine Verbesserung der Bindungsaffinität gegenüber den Monomeren (RBA < 0.08 %) mit sich [Gust, 96], [Gust, 156]. Damit eine Verbindung überhaupt E2 aus der Bindungstasche des ER verdrängen kann, muss diese analog dem natürlichen Liganden binden [Hartmann, 158]. Dies geschieht nur, wenn eine identische Konformation eingenommen werden kann. In so einem Fall würde eine Testverbindung einen hohen RBA-Wert aufweisen, so wie bei den bereits untersuchten *meso*-1,2-Diarylethylendiaminen [Gust, Niebler et al., 121]. Zusammen mit Diethylstilbestrol (DES) und Hexestrol (HES) weist diese Verbindungsklasse eine dem E2 entsprechende Konformation auf. Diese Verbindungen werden deshalb als Typ-I-Estrogene klassifiziert. Diese identische Konformation zu E2 können 2-Imidazoline nicht einnehmen. Daher haben sie keine identischen hohen relativen Bindungsaffinitäten analog den Typ-I-Estrogenen, zeigen dennoch Aktivität im Luciferase-Assay. Sie gehören den Typ-II-Estrogenen an.

3.3.2 Der Luciferase-Assay

3.3.2.1 Das Testsystem

Nach Ermittlungen der RBA-Werte sollen alle 2-Halo-4-hydroxy-Verbindungen **64-71** und das Monomer *meso*-4,5-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid **45** auf mögliche agonistische oder antagonistische Interaktionen mit dem Estrogenrezeptor untersucht werden. Das Ausmaß einer möglichen Interaktion in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) im ER ist eine zentrale Frage.

Nach einer Aktivierung durch eine Verbindung dimerisieren zwei ER miteinander. Der Komplex aus Ligand/ER-Dimer bindet sich an die „estrogen response elements“ der DNA, den sogenannten EREs [Brzozowski, 159]. Dadurch erfolgt eine Aktivierung der Proteinbiosynthese. Wird diese Signalkaskade ausgelöst, spricht man von Estrogenität einer Verbindung. Der im menschlichen Körper auftretende natürliche Ligand ist das Estradiol.

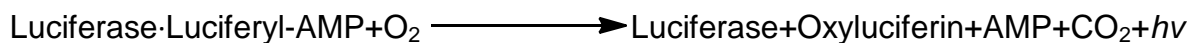
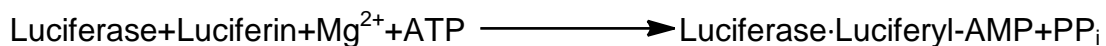
Für die Ermittlung der Estrogenität oder Antiestrogenität wird ein Luciferase-Assay durchgeführt. Diese Methode ist geeigneter als die Bestimmung der RBA-Werte, da nicht am isoliertem ER untersucht wird, sondern an lebenden Zellen. Somit können auch endokrine Prozesse mit untersucht werden. Dieser Transaktivierungsassay bringt reproduzierbare Ergebnisse, weshalb sich dieser im AK Gust fest etablieren konnte. Während noch bis vor einigen Jahren MCF-7-2a-Zellen [Meyer, 160] auch in diesem Arbeitskreis eingesetzt wurden [Dettmann, 92], werden heutzutage U2OS-Zellen eingesetzt. Früher auch als 2T-Zellen bekannt [Ponten, 161], handelt es sich dabei um eine humane Zelllinie, die erst 1964 von Menschen mit einer Osteosarkom-Erkrankungen isoliert werden konnte [Engel, 162]. Seitdem werden sie kultiviert und für die in vitro Untersuchungen verwendet.

U2OS-Zellen haben von Natur aus keine Gene, die für den ER codieren [Engel, 162]. Sie werden erst mit einem Rezeptor- (pSG5-ER α oder pSG5-ER β) und einem Reporterplasmid (p(ERE) $_2$ -luc $^+$) transfiziert, welches das Reportergen luc vom Leuchtkäfer *Photinus pyralis* [Meyer, 163] für die Codierung der Luciferase enthält [Meyer, 160], [DeLuca, 164].

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Eine Untersuchungssubstanz mit einer estrogenen Wirkung führt zu einer Exprimierung von Luciferase, die mit der Wirkstärke einer Verbindung korreliert [Hafner, 165], [von Angerer, 166].

Die Menge und die Aktivität an gebildeter Luciferase kann durch Zugabe des Substrates Luciferin ermittelt werden. Dabei katalysiert das Enzym die Spaltung des Substrates zu Oxyluciferin unter Lichtemission. Je stärker die Lichtemission ist, desto mehr Luciferase wurde exprimiert und durch Luciferin gespalten. Sie ist umso höher, je stärker die estrogenen Eigenschaften eines Wirkstoffes ist. Beim emittierten Licht handelt es sich um Fluoreszenzlicht, welches sich nach unten stehendem Schema bildet [de Wet, Wood et al. 167]:



Die Luciferase bindet das Luciferin in Anwesenheit eines Magnesiumions und Adenosintriphosphat (ATP). Hierbei entsteht ein Komplex aus Luciferase·Luciferyl-AMP. Dieser reagiert mit Sauerstoff, wobei Luciferase abgespalten und das ursprüngliche Luciferin zu Oxyluciferin unter Emission von Fluoreszenzlicht umgesetzt wird. Die Lumineszenz verläuft sehr schnell. Bereits nach einigen Minuten ist keine Emission mehr zu messen. Deshalb erfolgt eine rasche Messung nach der Luciferin-Zugabe. Bereits nach 60 Sekunden sind nur noch 10 % der gesamten ausgestrahlten Lichtmenge mit einem Luminometer zu messen. Sein Messbereich erstreckt sich im Bereich von 390-520 nm, auch wenn der Wellenlängenbereich des ausgestrahlten Lichts 490-630 nm umfasst [Hoffmann, 168]. Die Messung erfolgt in einem zehn Sekundentakt. Die ausgestrahlte Lichtmenge wird in „relative light units“, kurz RLU, angegeben.

3.3.2.2 Ergebnisse der Testung auf Estrogenität und Antiestrogenität

In jeder Testreihe wird der natürliche Ligand des ER α , β , das Estradiol E2, als Positivkontrolle und das Lösungsmittel als Negativkontrolle, welche keine Aktivierung

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

hervorrufen, mit aufgeführt. Für jede Untersuchung wird das E2 in den Konzentrationen von 10^{-14} bis 10^{-8} M aufgetragen. Nach einer Aktivierung des ER werden Konzentrations-Wirkungs-Kurven, aus denen der EC_{50} -Wert des physiologischen Liganden resultieren, abgelesen. Dabei handelt es sich um die notwendige Konzentration, die eine Aktivierung von 50 % verursacht. Graphisch betrachtet ist sie der Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Sie ist nur dann gültig, wenn beim Kurvenverlauf 0 und 100 % erreicht werden (siehe **Abb. 3.11**). Beim $ER\alpha$ liegt er im Bereich $1.5 \cdot 10^{-12}$ M und beim $ER\beta$ $2 \cdot 10^{-11}$ M. Bei einer Aktivierung von 100 % ist die Plateau-Phase zu sehen. Der EC_{50} -Wert des E2 wird als Referenz zur Beurteilung der Wirkstärke von Testsubstanzen verwendet. Alle relevanten Verbindungen wurden in den Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-5} M getestet.

Estrogen wirken diejenigen Verbindungen, deren Konzentrations-Wirkungs-Kurven zumindest die intrinsische Aktivität von 50 % der Luciferase-Expression einer E2-Lösung erreichen können. Wird diese Aktivierungsgrenze nicht überschritten, kann von keiner Estrogenität gesprochen werden. Für estrogene Wirkstoffe kann eine relative Transkriptionspotenz (RTP) angegeben werden. Dieser berechnete Wert stellt ein Maß der agonistischen Wirkung einer Verbindung in Bezug auf E2 dar. Der RTP-Wert wird nach folgender Berechnung ermittelt [von Rauch et al., 169]:

$$RTP = \frac{EC_{50}(E2)}{EC_{50}(\text{Substanz})} \cdot 100 \%$$

Die Testung auf Antiestrogenität erfolgt gleichermaßen, nur dass hier den Untersuchungslösungen noch zusätzlich feste E2-Konzentrationen (α : $3 \cdot 10^{-11}$ M; β : $3 \cdot 10^{-10}$ M) zugesetzt werden. Eine antiestrogene Verbindung kann eine Luciferase-Expression des E2 abschwächen. Jene Konzentration, die die Luciferaseaktivität auf 50 % des Estradiolwerts herabgesetzt, wird in Form eines IC_{50} ausgedrückt.

Abb. 3.11 zeigt ein Beispiel der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des E2 am $ER\alpha$. Aufgetragen ist die intrinsische Aktivität gegen die Konzentration.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

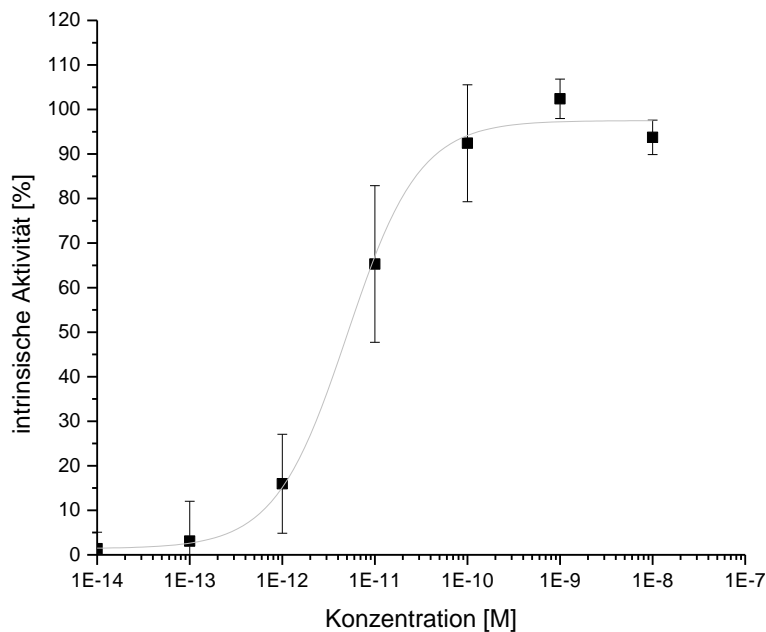


Abb. 3.11: sigmoidaler Kurvenverlauf des E2 am ER α .

3.3.2.2.1 Estrogenität: Testung auf Agonismus

3.3.2.2.1.1 Dimere 64-67: 2-*F*-4-*OH*-substituierte Verbindungen

Alle Dimere mit diesem Substitutionsmuster an den Aromaten sind an beiden ER-Subtypen unwirksam. In keiner der eingesetzten Konzentrationen kann 50 % der intrinsischen Aktivität erreicht werden. Die Luciferase-Expression würde sicherlich auch nicht steigen, wenn höhere Konzentrationen zur Untersuchung eingesetzt werden, da bei keiner Verbindung annähernd die Grenze der halbmaximalen Wirkung zu erreichen ist. Aus diesem Grund wird auf die Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven verzichtet.

3.3.2.2.1.2 Dimere 68-71: Verbindungen mit 2-*Cl*-4-*OH*-Substitution

Unter diesen Testsubstanzen zeigt nur **68** eine estrogenische Wirkung. Die intrinsische Aktivierung übersteigt die 50 %-Grenze. Daher kann für das Dimer mit dem But-1,4-diyl-Alkylspacer jeweils ein EC₅₀-Wert für beide ER-Subtypen angegeben werden. Für den Subtyp α beträgt die halbmaximale Aktivierung $5 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-7}$ M, mit $8.8 \cdot 10^{-7}$

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

$\pm 1.7 \cdot 10^{-7}$ M beim Subtypen β unterscheidet sie sich geringfügig. Mit längeren Kettenlängen verlieren allerdings bivalente 2-Cl-4-OH-substituierte Verbindungen an estrogener Eigenschaft an U2OS-Zellen. Ihre Wirkungen sind vergleichbar zu **64-67**. Trotz einer estrogenen Wirkung kann bei **68** nicht von einer hochpotenten Substanz gesprochen werden, da das E2 ($EC_{50} = \alpha: 1.5 \cdot 10^{-12}$ M, $\beta: 2 \cdot 10^{-11}$ M) nahezu 100.00mal wirksamer ist. Für die Wirkung an beiden Subtypen wurden die RTP-Werte von **68** ermittelt. Für die Berechnungen geht man von den EC_{50} -Werten ohne ihre Standardabweichungen aus.

$$RTP_{\alpha} = \frac{EC_{50}(E2)}{EC_{50}(\mathbf{68})} \cdot 100 \% = 0.0003 \%$$

$$RTP_{\beta} = \frac{EC_{50}(E2)}{EC_{50}(\mathbf{68})} \cdot 100 \% = 0.0023 \%$$

Die relative Transkriptionspotenz am Subtyp β ist nahezu achtmal stärker als beim Subtyp α :

$$\frac{RTP_{\beta}(\mathbf{68})}{RTP_{\alpha}(\mathbf{68})} = 7.7$$

Ein Vergleich des Dimers **68** mit seinem reinen Monomer, dem *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid, welches bereits im AK Gust auf Agonismus am ER untersucht wurde [von Rauch, 99], [Keilitz, 146], zeigte ebenfalls eine sehr ähnliche estrogenen Wirkung. Für das Monomer liegt ein EC_{50} von $3.8 \cdot 10^{-7}$ M vor [Gust, 121].

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

3.3.2.2.1.3 Das reine Monomer *meso*-4,5-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (**45**)

Die Testung auf Estrogenität von **45** steht unter besonderer Beachtung, da in keiner Vorarbeit die Verbindung synthetisiert und pharmakologisch am ER untersucht werden konnte. Sie ist das fehlende Bindeglied der bisher am ER untersuchten Monomere. Die Ergebnisse der Estrogenitätstestung sind beachtlich. Wie in den folgenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven zu erkennen ist, kann **45** viel besser beide ER-Subtypen stimulieren als das einzig wirksame Dimer **68**. **Abb. 3.12** und **3.13** zeigen die Konzentrations-Wirkungs-Kurven an ER α und β .

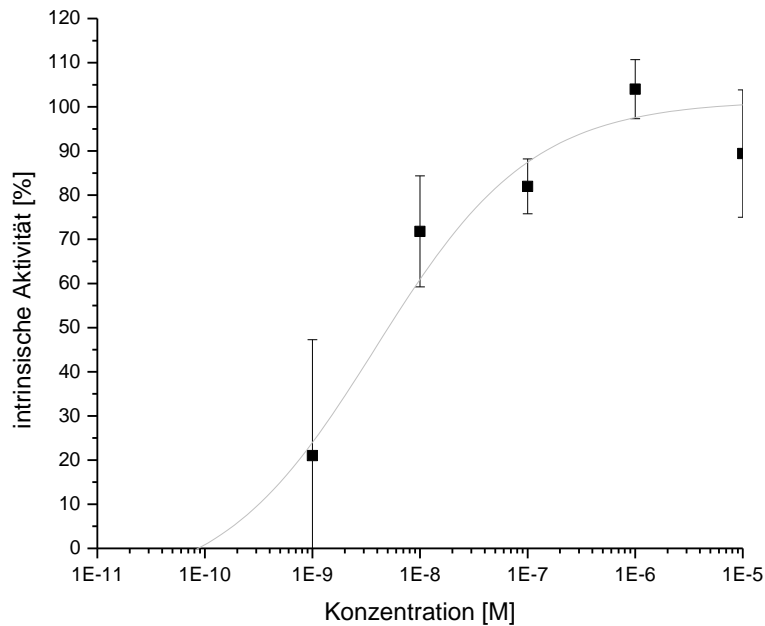


Abb. 3.12: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von **45** am ER α .

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

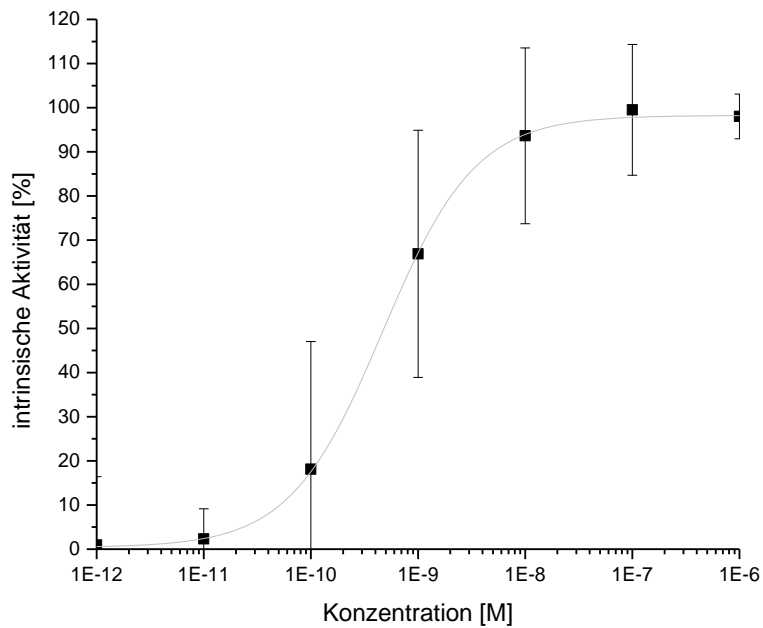


Abb. 3.13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von **45** am ER β .

Verbindung **45** ist mit seinen insgesamt vier Chlor-Atomen gegenüber den anderen Testverbindungen am lipophilsten. Mit einem EC₅₀-Wert von $3.88 \cdot 10^{-9} \pm 2.9 \cdot 10^{-9}$ M am ER α und $4.7 \cdot 10^{-10} \pm 4.4 \cdot 10^{-10}$ M am ER β ist **45** die in dieser Arbeit am stärksten wirkende Substanz. Auch die RTP-Werte bestätigen die Wirksamkeit:

$$\text{RTP}_\alpha = \frac{\text{EC}_{50}(\text{E2})}{\text{EC}_{50}(\mathbf{45})} \cdot 100 \% = 0.039 \%$$

$$\text{RTP}_\beta = \frac{\text{EC}_{50}(\text{E2})}{\text{EC}_{50}(\mathbf{45})} \cdot 100 \% = 4.3 \%$$

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Mit einer relativen Transkriptionspotenz von 4.3 % ist der agonistische Effekt am Subtyp β nahezu 110mal stärker als beim anderen Subtypen.

$$\frac{\text{RTP}_{\beta} (45)}{\text{RTP}_{\alpha} (45)} = 110$$

3.3.2.2.1.4 Antiestrogenität: Testung auf Antagonismus

Selbige Verbindungen wurden auch auf mögliche antagonistische Wirkungen an beiden ER-Subtypen untersucht. Bei keinem können in den festgelegten Konzentrationen antiestrogene Wirkungen beobachtet werden. Das E2 kann trotz Anwesenheit dieser Substanzen den ER aktivieren und die Signalkaskade einleiten.

3.3.2.2.1.5 Diskussion der Ergebnisse

Von den Dimeren zeigt nur **68** und das Monomer **45** eine estrogenische Wirkung. **68** aktiviert den ER α , β mäßig, **45** aber sehr gut. Ihre RTP-Werte zeigen deutlich bessere Affinitäten zum β -Subtyp. In der kleineren Bindungstasche des ER β können hydrophile und lipophile Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und den Aminosäuren der LBD ausgeprägter sein als in der etwas größeren Bindungstasche von ER α .

64-67 besitzen keine EC₅₀-Werte. Dies zeigt, dass einerseits die Lipophilie der Fluoratome in den *ortho*-Positionen der 2-Imidazolin-Teilstrukturen nicht ausreichend genug für die wichtigen Interaktionen mit lipophilen Resten der Aminosäuren sind [Gust, 156]. Mit dem Austausch von Fluor- gegen Chloratome in den *ortho*-Positionen steigen Lipophilie und Volumen einer Verbindung. **68** kann deutlich besser als **64** mit lipophilen Resten interagieren [Keilitz, 146]. Trotz Austausch der Substituenten verlieren Verbindungen ihre Wirkungen mit steigenden Kettenlängen (**69-71**). Es ist daher anzunehmen, dass die bivalenten Verbindungen aufgrund ihrer molekularen Struktur nicht in die LBD gelangen können. Eine Ausnahme stellt **68** dar. **64** mit der identischen Spacerlänge könnte auch in die LBD gelangen, hat aber, wie bereits erwähnt, aufgrund einer nicht ausreichender Lipophilie keine estrogenische Eigenschaft.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Die Dimere könnten aber auch eine Dimerisierung des ER stören [Berube, 170]. Besitzt eine bivalente Struktur eine nicht ausreichende Kettenlänge, kann diese Auswirkungen auf die Konformation des ER haben. Beide Rezeptoren können nach Belegung ihrer Ligandenbindungsdomänen (LBD) völlig andere Raumstrukturen einnehmen, bei der keine Dimerisierung erfolgt [Berube, 170]. Vermutlich sind hierfür **64-71** zu kurz kettig [Shan, 171]. Die Atome der Spacer müssten mehr als 14 Atome aufweisen, da die Ligandenbindungsdomäne (LBD) tief im Rezeptor liegt, so dass ein Dimer ungehindert an zwei LBD binden kann [Bergmann, 172]. Die untere **Abb. 3.15** stellt den Einfluss der Spacerlänge dar.

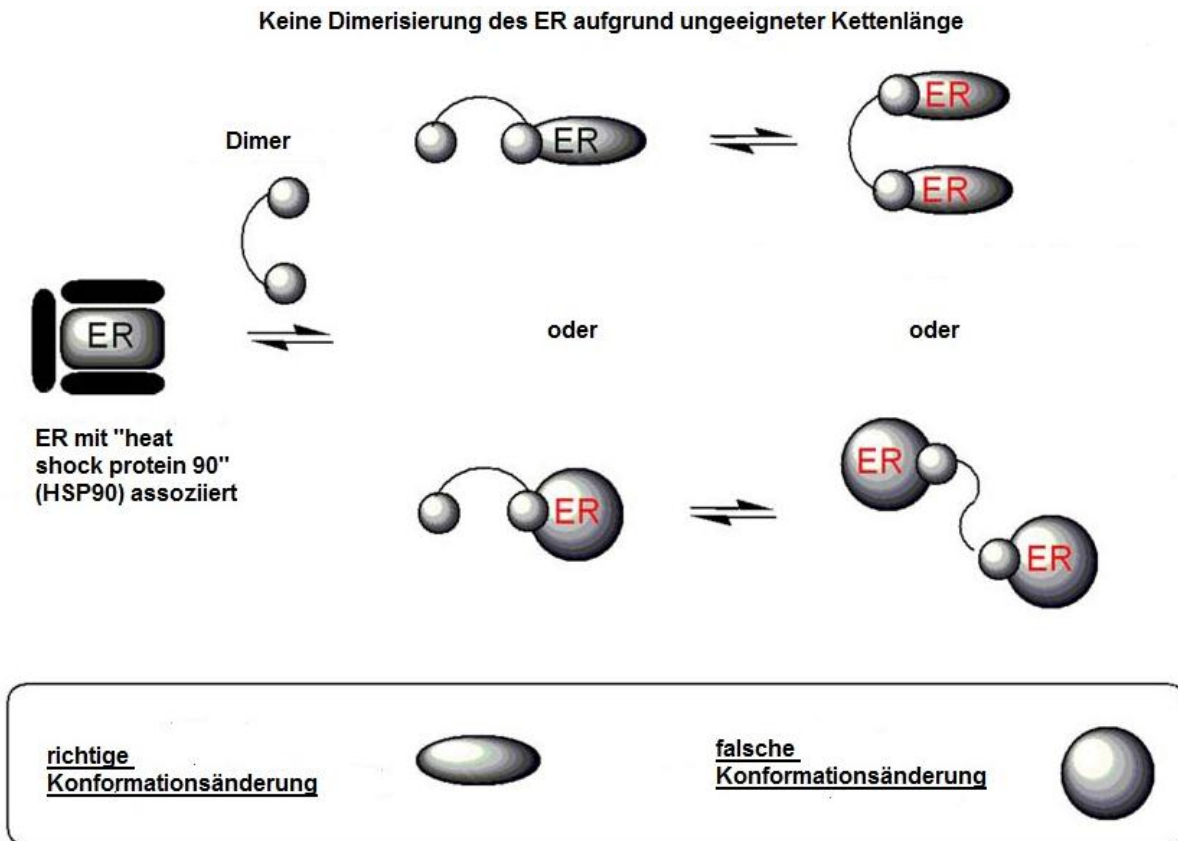


Abb. 3.14: Interaktion einer bivalenten Verbindung mit einer ungeeigneten Spacerlänge am ER (rot = ER kann nicht dimerisiert werden); [nach Berube, 170].

Vorstellbar ist auch eine mögliche ungünstige Verknüpfungsstelle am C2 der 2-Imidazolinringe. Ein ER-Dimer kann nur bivalent stabilisiert werden, wenn seine beiden LBD parallel ausgerichtet vorliegen, so dass eine bivalente Verbindung über seinen Spacer sterisch ungehindert binden kann [Bergmann, 172]. Ungünstige

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Konformationsänderungen durch **64-67** und **69-71** sind vorstellbar. Dass die Verknüpfungsstelle einer bivalenten Verbindung wichtig ist, zeigen Computer gestützte Modeling Studien von einigen dimeren Diethylstilbestrol-Verbindungen [Shan, 171].

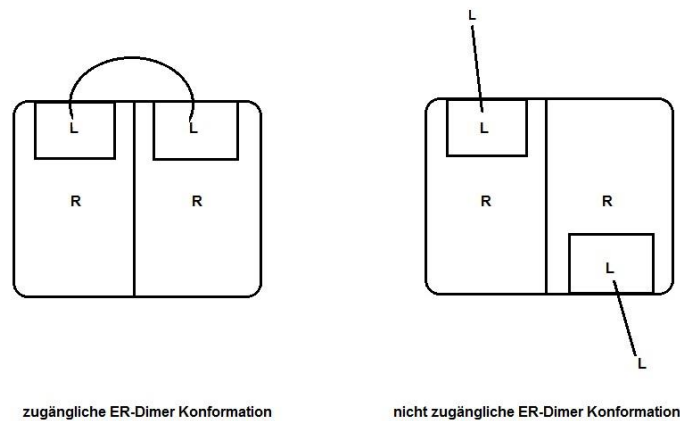


Abb. 3.15: links: Stabilisierung des ER-Dimer, bei der ein Dimer beide LBD belegt; rechts: zwei Dimere besetzen jeweils nur eine LBD, daher keine ER-Dimer-Stabilität (R = Rezeptor, L = Teilstruktur eines dimeren Liganden); [nach Bergmann, 172].

Warum aber ausgerechnet **68** estrogen wirksam ist, bleibt fraglich. Eine bivalente Bindung zwischen zwei LBD ist aufgrund seinem sehr kurzem Alkylspacer ausgeschlossen. Seine Wirkstärke ist vergleichbar zu seinem reinen Monomer [Keilitz, 146], [von Rauch, 99]. Eine Vermutung wäre eine univalente Anordnung von **68** in nur einer LBD des ER-Dimers analog seinem reinen Monomer. Die Verknüpfungsstelle über das C2-Atom scheint nicht zu stören. Die Wirkung von **68** könnte auch mit Hilfe des Bindungsmodells für 2-Imidazoline erklärt werden [Gust, 96].

Trotz estrogenen Wirkung der 2-Imidazoline haben diese Verbindungen eine völlig andere Raumstruktur als E2 [Gust, 96], wie bereits unter **Kap. 1.2.5** erläutert. Interessanterweise nehmen sie in der Bindungstasche eine den Selektiven Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM) und ER-Antagonisten (z.B. 4-Hydroxytamoxifen, kurz

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

4-OHT) ähnliche Raumstruktur ein [Gust, 156]. Der eine Phenolrest des 2-Imidazolins kann zwar analog zu E2 mit Glu 353, Arg 394 und einem H₂O interagieren, der zweite Phenolrest liegt aber anders ausgerichtet vor als die zweite phenolische *OH*-Gruppe der 17 β -Position des E2. Die *H*-Brücke zu His 524 bleibt aus. Stattdessen kommt es zur ionischen Interaktion mit Asp 351 oder vermutlich Thr 347 [Kekenes-Huskey, 173]. Die Aminosäure Asp 351 befindet sich im 11 β -Kanal der LBD und ist essentiell für einen möglichen Agonismus und Antagonismus [Shiau, 95]. Aliphatische Reste der hydrophoben Domäne wechselwirken mit den lipophilen *Cl*-Atomen des Liganden. Durch eine Interaktion eines SERM's oder eines Typ-II-Estrogens entsteht der 11 β -Kanal. Dieser erlaubt eine Einordnung von sperrigen oder langen Molekülresten [Shan, 171]. Nach Einschluss von Typ-I-Estrogenen wird er nicht gebildet [Kekenes-Huskey, 173].

Dass der 11 β -Kanal von Dimeren genutzt werden kann, zeigen Computer gestützte Modelling Studien von bivalenten Liganden des 4-Hydroxytamoxifen (BL-4-OHT) [Shan, 171]. Nicht nur die basische Seitenkette nutzt diesen Kanal [Pike, 100], sondern auch der restliche Molekülteil der bivalenten Verbindung einschließlich des Spacers orientiert sich darin. Außerdem weisen sie bessere RBA-Werte als Hexestrol- oder Diethylstilbestrol-Dimere auf [Shan, 171], [Bergmann, 172]. Dies führt zur Erkenntnis, dass Dimere vom 4-OHT-Typ in dem 11 β -Kanal toleriert werden. Die Toleranz dieses Kanals scheint für die Bivalenz essentiell zu sein [Shan, 171].

Die Unwirksamkeit von **64-67** und **69-71** dürfte nicht durch Hydrolysen begründet sein. In **Kap. 7** werden **54**, **62** und **66** auf ihre Stabilitäten untersucht. Unter Bedingungen der Zellversuche (PBS, 37 °C, pH = 7.4) sind sie sehr stabil. Auch die Alkylspacer sind stabil.

Die Synthese und pharmakologische Testungen von 2-*Cl*-4-*OH*- oder mehrfach chlorierten 4-*OH*-substituierten bivalenten Verbindungen unterschiedlicher Verknüpfungspositionen (z.B. *N1* oder *C2*) und mit deutlich längeren Alkylspacern ($n > 14$) könnten Erklärungen liefern. Da keine Röntgenstruktur-Analyse eines Kokristallisat eines der Dimere **64-71** und dem ER vorgenommen werden konnte, sind alle Erklärungsansätze und Überlegungen rein hypothetisch.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Das Monomer **45** mit einem 2,6-*Cl*₂-4-*OH*-Substitutionsmuster der beiden Aromaten ist mit der maximalen Anzahl an *Cl*-Atomen in den *ortho*-Positionen substituiert. Somit besitzt sie eine sehr hohe Lipophilie. Dies begründet auch die sehr gute estrogenische Eigenschaft ($EC_{50} = 3.88 \cdot 10^{-9}$ bzw. $4.7 \cdot 10^{-10}$ M für beide Subtypen). Hydrophobe Wechselwirkungen in der Bindungstasche des ER α und vor allem im ER β sind deutlich ausgeprägter als Pharmakophore mit nur 2-*Cl*-4-*OH*-Substituenten.

Wie bereits erwähnt, konnte diese Verbindung bisher in keiner Vorarbeit synthetisiert werden. Umso mehr haben die Ergebnisse der Luciferase-Assays dieser Verbindung eine enorme Bedeutung. In bisherigen Forschungsarbeiten konnte unter anderem nur die mit maximal drei *Cl*-Atomen substituierte Substanz *meso*-4-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-5-(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin synthetisiert werden [von Rauch, 99], [Keilitz, 146]. Diese Verbindung ist mit einem EC_{50} -Wert von $70 \cdot 10^{-9}$ M (RTP = 0.114 %) die am stärksten wirksame Substanz der an den 2-Imidazolinringen nicht substituierten Verbindungen [Gust, 156]. Das *N*-Ethyl-Derivat mit dem 2-*Cl*-4-*OH*-Substitutionsmuster ist sogar die am stärksten estrogen wirksame Verbindung ($EC_{50} = 15 \cdot 10^{-9}$ M) unter den 2-Imidazolinen, die bisher in Forschungsarbeiten im AK Gust synthetisiert werden konnten [von Rauch, 99]. Die EC_{50} -Werte von **45** verglichen mit denen der beiden Verbindungen zeigen, dass **45** der stärkste Agonist an 2-Imidazolin-Verbindungen im AK Gust ist.

3.3.3 Bestimmung der Rezeptordichte

3.3.3.1 Das Testsystem

Das im menschlichen Körper vorkommende Steroidhormon E2 ist nicht nur in der Lage, seinen nukleären Rezeptor zu stimulieren, sondern auch die Dichte in hormonabhängigen MCF-7 Mammakarzinom-Zellen zu reduzieren. Bei einer Halbwertszeit von 4-5 Stunden des Rezeptors α und β erfolgt eine Down-Regulierung durch proteolytischen Abbau [Burger, 174]. Die Dichte wird durch Aktivierung des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS) erniedrigt [Burger, 174], damit hormonell gesteuerte zelluläre Prozesse in normalem Rhythmus ablaufen können [Minorics, 175]. Laut Literatur können Estrogene einen ER-Abbau induzieren, während reine Antagonisten (z.B. Tamoxifen) raschere Eliminierung durch

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Destabilisierung des ER bewirken. Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM) wie Raloxifen können gegenteilige Effekte ausüben: Sie leiten eine up-Regulierung ein [Kiang, 176]. Dabei wird nicht eine ER-Transkription vorangetrieben, sondern eine Abnahme der Proteolyse. Diskutiert wird die Wichtigkeit der basischen Seitenkette der SERM's [Kiang, 176].

Für die Bestimmung der Rezeptordichte wurden nur **68-71** getestet. Ziel dieser Untersuchung war die Ermittlung der Einflüsse dieser Verbindungen auf die Rezeptordichte [Esslimani, 177]. Die Untersuchungen fanden an den hormonabhängigen MCF-7-Zellen statt.

Unter allgemeinen Kultivierungsbedingungen wird die Zelllinie herangezüchtet, ausgesät und für 24 Stunden bebrütet. Hier erfolgt die Substanzzugabe in ähnlicher Weise wie beim Luciferase-Assay. Die Stammlösung aus E2 hat eine Konzentration von 10^{-2} M, aus der Verdünnungen von 10^{-6} M und 10^{-5} M hergestellt und zur Substanzplatte pipettiert werden. Testverbindungslösungen liegen auch in selbiger Konzentration vor. Nach beendeter Zugabe wird die Platte für 24 Stunden im Brutschrank bebrütet. Anschließend wird radioaktiv markierte [3 H]-Estradiollösung dazu pipettiert und die Platte nochmals für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Der Überstand der Testplatte wird abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0.3 N NaOH lysiert. Darauffolgend wird Szintillationsflüssigkeit hinzu pipettiert, kurz geschüttelt und am β -Counter vermessen. Je höher die gemessene β -Strahlung der Probe ist, desto weniger wird die Rezeptordichte durch die Untersuchungssubstanzen down-reguliert.

3.3.3.2 Testergebnisse

Diskutiert wird die **Abb. 3.16**. Erwartungsgemäß erniedrigt das natürliche Hormon E2 in beiden Konzentrationen die Rezeptordichte identisch stark. In einer Konzentration von 1 μ M reduziert **69** um 45 % am stärksten die Dichte, gefolgt von **71** (um 35 %). Die weiteren zwei Verbindungen **68** und **70** haben bei dieser Konzentration nur einen schwachen Effekt. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 10 μ M ist jeweils eine geringe Steigerung dieser Wirkungen bei **70-71** zu beobachten. Unter den Untersuchungssubstanzen hat das C10-Dimer **71** den stärksten Effekt. Diese Verbindung hat in dieser Hinsicht zugleich den wirkungsvollsten Einfluss der in dieser

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Testung eingesetzten Verbindungen. **69** ist bei beiden Konzentrationen nahezu identisch in seiner Wirksamkeit.

Wie bereits erwähnt, können nur Estrogene eine down-Regulierung bewirken. Die untersuchten Verbindungen können diesen Effekt einerseits genauso wie die Estrogene auslösen, besitzen andererseits aber keine Estrogenität (**Kap. 3.3.2.2.1.2**). Interessanterweise hat nur **68** einen stimulierenden Effekt. Bei einer Konzentration von 10 μM vermag das C4-Dimer die Rezeptordichte zu erhöhen. Alle anderen Verbindungen besitzen diese Eigenschaft an MCF-7-Zellen nicht.

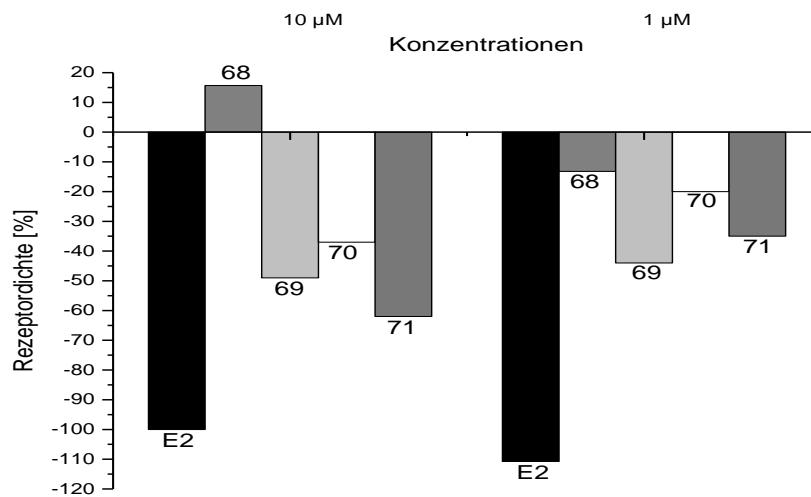


Abb. 3.16: **68** mit stimulierende Wirkung bei 10 μM . Keine up-Regulation bei **69-71**.

Das Monomer **45** und die Dimere mit 2-*F*-4-*OH*-Substitution konnten zu gegebenem Zeitpunkt nicht mehr untersucht werden.

3.4 Testung der Zellaufnahme und der Zellaufnahmehemmung

3.4.1 Zellaufnahme

3.4.1.1 Einleitung

In vorherigen Forschungsarbeiten wurden dimere [meso-1,2-Diarylethylendiamin]-platin(II)-Komplexe auf Zellaufnahme in hormonabhängigen MCF-7 Mammakarzinom-Zellen hin untersucht [Kapp, 127]. Postuliert wurde die Existenz eines zu dieser Zeit noch unbekanntes membranständigen Rezeptors, den GPR30, der eine vermittelnde Rolle bei der Zellaufnahme einzunehmen scheint. Bivalente Wirkstoffe lassen vermutlich den Rezeptor internalisieren. Besonders interessant sind an den Aromaten 4-*Fluor* substituierte Verbindungen. Monomere Pt-Komplexe wurden weniger angereichert als die Dimere [Kapp, 127].

Gegenstand dieser Zellaufnahmestudie ist die Untersuchung der bivalenten 4-*Fluor*-substituierten 4,5-Diaryl-2-imidazoline **61-63** analog den identisch substituierten Pt(II)-Dimeren [Krüger, 178] als mögliche Liganden des membranständigen GPR30-Rezeptors. Außerdem sollen ebenfalls die Monomere **42** und **47** und ihre analogen Pt(II)-Monomere mit untersucht werden [Krüger, 178]. Die Frage, ob das Pt gegen eine Amidin-Einheit in den Verbindungen ersetzbar ist, soll geklärt werden.

Die Aufnahme in die Zellen wird über eine Fluorgehaltsbestimmung verfolgt. Je höher die Anreicherung einer Verbindung ist, desto höher ist in den MCF-7-Zellen der Anteil an Fluor. Dieser dient dabei als Sonde. Dabei gewinnt eine relativ neue Methode an Bedeutung, welche für die Ermittlung des Fluorgehalts sehr geeignet ist - die High Resolution Continuum Source Atomabsorptionsspektroskopie (HR-CS AAS) [Huang et al., 179].

3.4.1.2 High Resolution Continuum Source Atomabsorptionsspektroskopie

(HR-CS AAS)

Mit einem konventionellen Atomabsorptionsspektrometer (AAS) ist eine Erfassung von organisch gebundenem Fluor nicht denkbar [Huang et al., 179]. Ein Grund ist seine Wellenlänge von < 100 nm. Die Resonanzlinie liegt unterhalb des

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

ausgestrahlten Linienspektrums einer Hohlkathodenlampe [Huang et al., 179]. Sie ist nicht erfassbar [Fry, 180]. Weiterhin spielt seine unter den Elementen am höchsten vorliegende Elektronegativität von 4.0 eine Rolle. Fluoridionen sind nicht atomisierbar. Frühere Methoden zur Fluordetektion waren wenig erfolgreich [Chiba, 181], [Okamoto, 182].

Das neuentwickelte HR-CS AAS kann organisch gebundenes Fluor bestimmen. Im Atomisator bilden sich in Anwesenheit von Galiumionen Galiumfluorid [Tsunoda, 183], [Dittrich & Vorberg, 184]. Detektiert wird das Spektrum einer Molekülabsorption mit Hilfe einer Xenon-Kurzbogenlampe [Tsunoda, 185], [Welz, 186]. Sie erzeugt ein breitbandiges Spektrum von 189-900 nm [Heitmann, 187].

Der Atomisator besteht aus einer Luft-Acetylen-Flamme oder einem Graphitrohr. Nachgeschaltet ist ein Double Echelle Monochromator (DEMON) [Welz, 186], mit dem eine hohe Spektralauflösung erreicht wird. Charge Coupled Devices-Detektoren (CCD's) ermöglichen eine Erfassung kleinster Absorptionsveränderungen [Krüger, 178].

3.4.1.3 Durchführung und Messung

Alle Platin-Verbindungen, die man für die Testung der Zellaufnahme als Vergleich zu den 2-Imidazolinen mit herangezogen hat, wurden von Herrn Magnus Krüger im AK Gust synthetisiert. Auch die präparative Durchführung und Vermessung mit der HR-CS AAS erfolgten durch Herrn Krüger [Krüger, 178].

Die Stammlösungen der Verbindungen werden in Aqua bidest. hergestellt und haben eine Konzentration von 20 mM. Aus dieser Stammlösung werden Untersuchungslösungen von 2 µM in FCS-freiem Medium hergestellt.

In Zellkulturflaschen werden MCF-7-Zellen bebrütet. Das FCS-haltige DMEM-Zellkulturmedium wird durch substanzhaltiges, FCS-freies DMEM ersetzt. Für eine gute Benetzung der Zellen schwenkt man die Kulturflaschen. Die Messungen beginnen ab 0 (t_0), 10 (t_{10}), 20 (t_{20}), 40 (t_{40}) und 60 (t_{60}) Minuten nach Inkubation. Für den t_0 -Wert wird die Zellkulturflasche kurz mit substanzhaltigem, FCS-freiem DMEM geschwenkt.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Nach Inkubation saugt man das FCS-freie DMEM ab. Mit PBS werden die MCF-7-Zellen gewaschen und dann trypsiniert. Nach Zugabe von FCS-haltigem DMEM überführt man den gesamten Inhalt in Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellpellets jeweils dreimal mit PBS resuspendiert und zentrifugiert. Nach jedem dieser Schritte trennt man jeweils vorsichtig das überstehende PBS ab. Das zurückbleibende Zellpellet wird mit Aqua bidest. gewaschen.

Die Zellpellets mit den jeweiligen Untersuchungsverbindungen werden mit der HR-CS AAS vermessen. Die Kalibrierung der Eichgerade erfolgt mit Hilfe der Matrixangleichung, das heißt, dass die jeweilige Substanz in Zellsuspension vermessen wird. Für die Messung verwendet man einen Magnesium-Modifizier [Krüger, 178].

3.4.1.4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Resultate der Messungen der monomeren 4,5-Diaryl-2-imidazoline **42** und **47** und der bivalenten Verbindungen **61-63** vorgestellt.

Alle Verbindungen wurden in der Konzentration von 2 µM getestet, da bis auf **42** alle 2-Imidazoline zytotoxisches Verhalten bei 10 µM zeigen. Das Maß der Zellaufnahme einer Verbindung wird durch einen Anreicherungsgrad (AG) ausgedrückt. Der AG ist eine Größe ohne eine Einheit und drückt den Quotienten aus der intrazellulären Konzentration einer Testsubstanz, im weiteren Sinne die Fluorkonzentration, und der extrazellulären Substanzkonzentration im Zellmedium aus:

$$AG = \frac{c(\text{intrazellulär})}{c(\text{extrazellulär})}$$

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

3.4.1.4.1 4,5-Diaryl-2-imidazoline

Alle erhaltenen Daten der Zellaufnahme und Zellaufnahmemehmung stammen von Herrn Krüger aus dem AK Gust [Krüger, 178].

Betrachtet man den Anreicherungsgrad einer Verbindung, so grenzt sich das unsubstituierte Monomer **42** von seinem C2-Hexyl-Derivat **47** und vor allem von den Dimeren **61-63** ab. Die untere **Abbildung 3.17** macht dies deutlich.

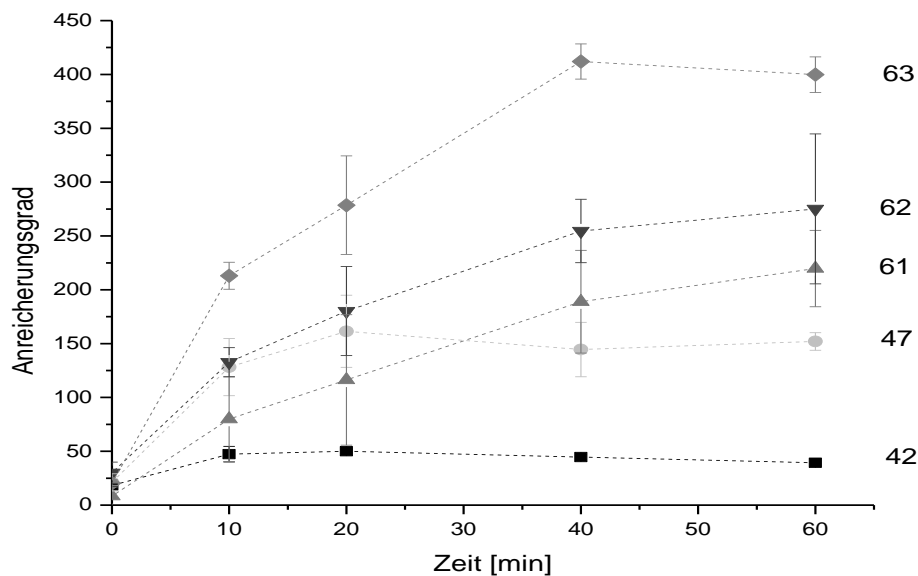


Abb. 3.17: Anreicherungsgrade der Monomere **42** und **47** und Dimere **61-63**.

Die folgende **Tabelle 3.18** gibt zahlenmäßig die Anreicherungsgrade in Abhängigkeit der Zeit in Minuten nach Inkubation wieder.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Verbin- dung	Zeit nach Inkubation [min] mit ihren Anreicherungsgraden				
	0	10	20	40	60
42	18.29± 1.03	47.33± 7.24	50.03± 1.68	44.68± 2.44	39.38± 3.15
47	21.19± 7.98	128.20± 26.52	161.43± 33,53	144.51± 25.28	152.02± 8.18
61	8.41± 12.67	79.84± 39.22	116.30± 60.57	188.90± 47.69	219.75± 35.44
62	30± 10	132.74± 13.50	180.23± 41.37	254.59± 29.47	275.11± 69.64
63	20.32± 3.54	213.04± 12.56	278.55± 45.76	412.04± 16.37	399.79± 16.5

Tab. 3.18: Übersicht der Verbindungen mit ihren Anreicherungsgraden.

Unter den untersuchten Verbindungen hat **42** zeitabhängig den niedrigsten Anreicherungsgrad (**Abb. 3.17**). Die Substitution eines Wasserstoffatoms gegen einen Hexylrest am Amidin-C-Atom bewirkt eine nahezu dreimal höhere Zellaufnahme bei **47**. Beide Monomere haben bei t_{20} jeweils eine maximale Zellanreicherung (**42**: 50.03 ± 1.68 ; **47**: 161.43 ± 33.53), welche bei t_{40} wieder leicht sinkt und bis Ende der Messungen nahezu konstant bleibt (**Tab. 3.18**).

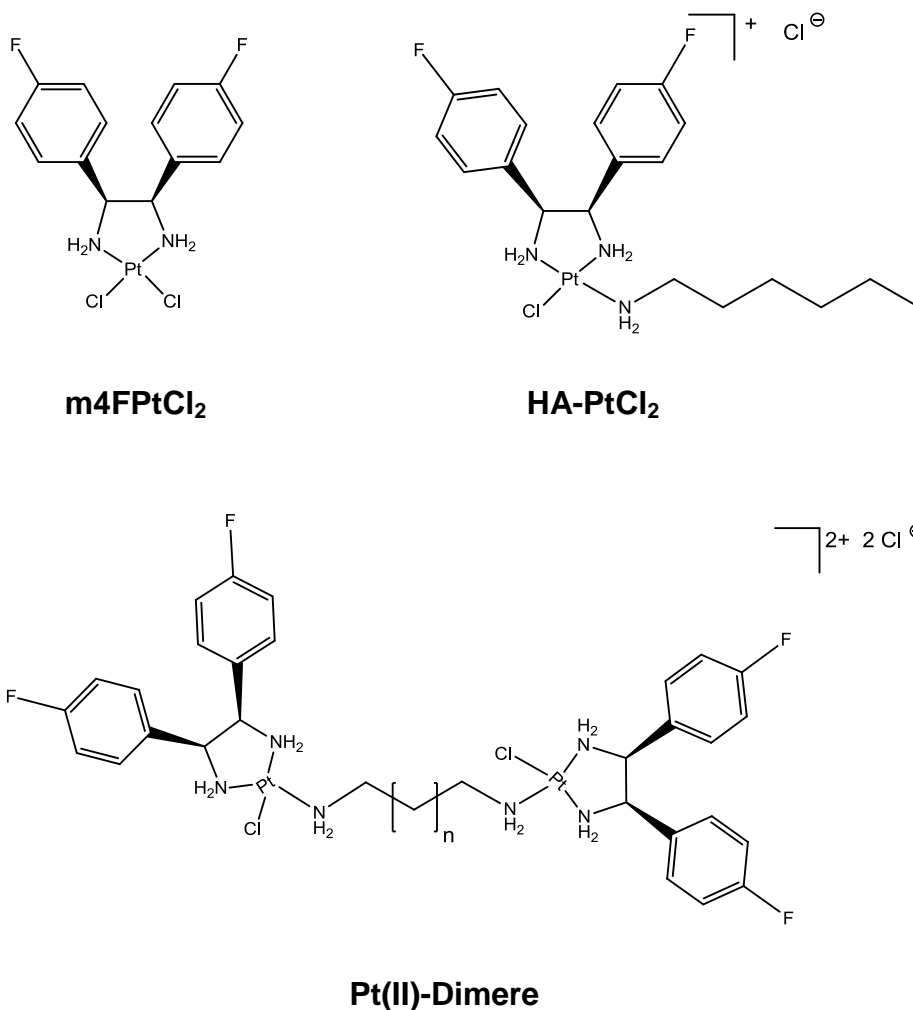
Sobald aber Dimere vorliegen, werden deutlich stärkere Zellaufnahmen beobachtet (**Abb. 3.17**). Mit steigender Alkylspacerlänge werden ihre Anreicherungsgrade deutlich höher: **61** < **62** < **63**. Das C10-Dimer **63** hat unter getesteten Monomeren

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

und Dimeren den größten Anreicherungsgrad von 412.04 ± 16.37 nach 40 Minuten, gefolgt vom C8-Dimer **62** mit 275.11 ± 69.64 nach 60 Minuten (**Tab. 3.18**).

3.4.1.4.2 Platin(II)-Verbindungen

Diese Platin(II)-Verbindungen wurden vergleichend zu den 2-Imidazolin-Verbindungen auf ihre Zellaufnahme getestet. Zur Testung wurden ebenfalls MCF-7-Zellen eingesetzt. Das **m4FPtCl₂** ist analog zum reinen Monomer **42**, das **HA-PtCl₂** zu **47**. Die Pt(II)-Dimere mit den Kettenlängen 6, 8 und 10 sind zu den folgenden 2-Imidazolin-Dimeren analog: **DAH-PtCl₂** zu **61**, **DAO-PtCl₂** zu **62** und **DAD-PtCl₂** zu **63** (**Tab. 3.19**).



3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Verbindung	n	Alkylspacer
DAH-PtCl ₂	4	1,6-Diaminohexan
DAO-PtCl ₂	6	1,8-Diaminooctan
DAD-PtCl ₂	8	1,10-Diaminodecan

Tab. 3.19: Übersicht der Verbindungen von Herrn Krüger, AK Gust [Krüger, 178].

Werden die Amidin-Teilstrukturen der 2-Imidazoline gegen eine Platin-Einheit ausgetauscht, so hat das gravierende Auswirkungen auf die Zellaufnahme. **Abb.3.20** zeigt die Anreicherungen der Pt(II)-Verbindungen. Diese haben gegenüber den in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen deutlich geringere Anreicherungsgrade [Krüger, 178].

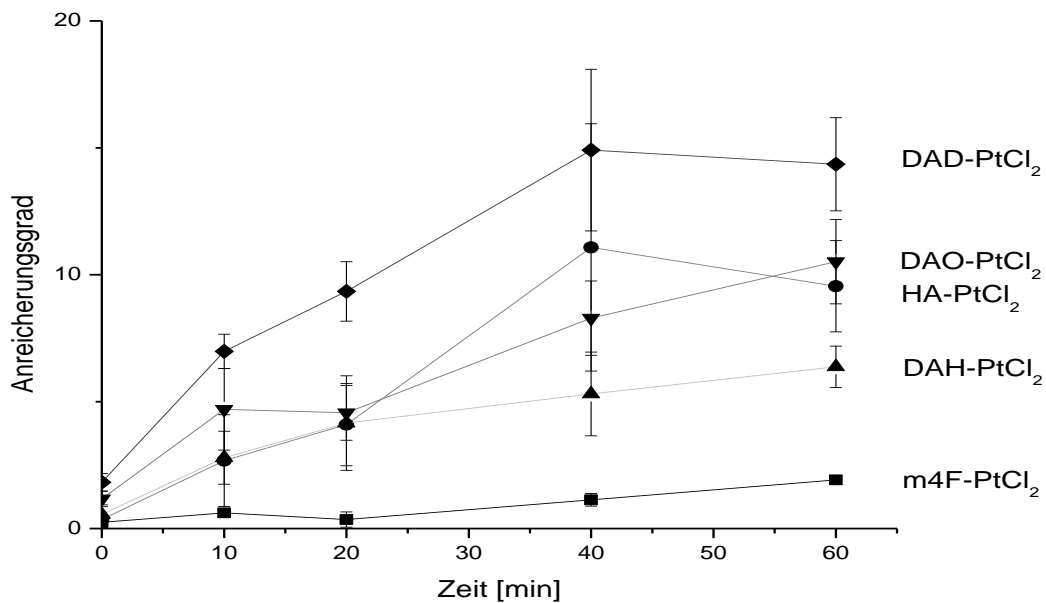


Abb. 3.20: Platin(II)-Verbindungen und deren Anreicherungsgrade an MCF-7-Zellen.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Auch hier liegt die gleiche Situation wie bei den 2-Imidazolinen vor. Das reine Monomer **m4FPtCl₂** verglichen zu den anderen Verbindungen wird bei dieser Fluorbestimmung nahezu gar nicht erst aufgenommen. Sein Hexylamin-Derivat wird etwas besser aufgenommen. Mit längeren Alkylketten werden Dimere besser angereichert als ihre Monomere. Über die gesamten Messzeiten liegen ihre Anreicherungsgrade unter 20. Bei den 2-Imidazolinen wie bei **63** werden Anreicherungsgrade bis zu 412.04 ± 16.37 erreicht (**Tab. 3.18**).

3.4.1.5 Diskussion der Testergebnisse

In diesem Kapitel wird der Vorteil der indirekten Bestimmung von organisch gebundenem Fluor über die HR-CS AAS sehr deutlich. Nicht nur Aussagen über die Zellaufnahme der 2-Imidazoline werden getroffen. Durch Gegenüberstellung mit den mit untersuchten Pt(II)-Verbindungen kann eindeutig bestätigt werden, dass die Platin-Einheit durch die Amidin-Teilstruktur nicht nur ausgetauscht werden kann, sondern dass dieser Austausch auch eine enorme Erhöhung der Zellaufnahme in die MCF-7-Zellen mit sich bringt.

Monomere 2-Imidazoline werden, wie bereits erwähnt, weitaus weniger angereichert als ihre Dimere. Je länger die Alkylspacer der Dimere werden, desto höher werden deren Anreicherungsgrade. Unter den getesteten Verbindungen wird **63** am stärksten angereichert. Interessanterweise korrelieren ihre Zellaufnahmen mit ihren Zytotoxizitäten. Das reine Monomer **42** ist nicht wachstumshemmend und wird kaum in den Zellen angereichert. Sobald aber am C2-Atom des 4,5-Diaryl-2-imidazolins ein Alkylsubstituent wie beispielsweise bei **47** vorhanden ist, wirkt dieses zytotoxisch und wird außerdem besser angereichert als eine unsubstituierte Verbindung wie **42**. Wenn aber an einem Molekül zwei 4,5-Diaryl-2-imidazoline über einen Spacer verbunden sind (**61-63**), steigt die Aufnahme in die Zellen enorm und wird zytotoxischer als **47**. So wird am meisten das C10-Dimer **63**, gefolgt vom C8-Dimer **62** und dem C6-Dimer **61** aufgenommen. Vermutlich spielt hierbei auch die Lipophilie eine Rolle.

Postuliert wird bei der Zellaufnahme die vermittelnde Rolle des membranständigen GPR30-Rezeptors. Mit der HR-CS AAS ist es nicht möglich zu überprüfen, ob die 2-Imidazoline mögliche Interaktionen mit diesem Target eingehen und ihn

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

internalisieren lassen oder ob sie durch andere Mechanismen wie der Diffusion oder der Endozytose aufgenommen werden. Weiterhin muss hinterfragt werden, ob die Anreicherungen tatsächlich auf eine Zellaufnahme der Verbindungen in die Zelle beruhen oder ob sie sich doch nur auf der Zellmembran anlagern. Die Entwicklung und Etablierung eines Testsystems für den GPR30-Rezeptor könnte Aufschluss über die offenen Fragestellungen geben. Daher kann auch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht davon ausgegangen werden, dass bivalente 4,5-Diaryl-2-imidazoline Liganden des GPR30-Rezeptors sind.

3.4.2 Zellaufnahmehemmung

3.4.2.1 Einleitung

Damit überhaupt Verbindungen in Zellen aufgenommen werden können, existieren verschiedene Aufnahmemechanismen, damit sie durch die Membran, bestehend aus einer Phospholipid-Doppelschicht, transportiert werden können [Leistner, 188]. Mögliche Wege sind unter anderem der Transport von organischen Kationen oder Anionen [Plattner, 189], die Makropinozytose [Karp, 190], aber auch Clathrin- [Alberts et al., 191] oder Caveolin-vermittelte Endozytosen [Levin, 192] durch die Zellmembran in die Zellen sind bekannt.

Um mögliche Hinweise über den genauen Mechanismus der Zellaufnahme zu erhalten, wird die Testung der Zellaufnahmehemmung durchgeführt. Den MCF-7-Zellen werden vor Inkubation mit der Untersuchungsverbindung verschiedene Hemmstoffe zugesetzt. Diese verhindern jeweils einen bestimmten Mechanismus der Zellaufnahme. Folgende Zellaufnahme-Hemmstoffe macht man sich für die Untersuchungen zunutze:

- Tetraethylammoniumchlorid (TEA), Cimetidin und Amilorid hemmen den Transport von organischen Kationmolekülen.
- Die Aufnahmehemmung von organischen Anionmolekülen wird durch Ouabain und Natriumglykocholat bewirkt. Auch wenn hier die Testverbindung (**Kap. 3.4.2.3**) kein Anionmolekül ist, werden trotzdem beide Substanzen zugesetzt, damit das gesamte Spektrum der Zellaufnahmemechanismen abgedeckt ist.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

- Hemmer der Makropinozytose sind Amilorid (hemmt auch die Aufnahme von organischen Kationen, siehe oben), 5-(*N*-Ethyl-*N*-isopropyl)amilorid, kurz EIPA, und Cytochalasin D.
- Eine Clathrin vermittelte Endozytose hemmt das Chlorpromazin, das Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD) und Nystatin verhindern Endozytosen, die durch Caveolin vermittelt werden.

3.4.2.2 Durchführung

Die Versuchsdurchführung ist sehr ähnlich der Testung auf Zellaufnahme. In Zellkulturflaschen werden MCF-7-Zellen ausgesät. Das FCS-haltige Medium saugt man ab und gibt FCS-freies DMEM hinzu. Für jeweils eine Zellkulturflasche erfolgt die Zugabe eines dieser Zellaufnahme-Hemmstoffe: Tetraethylammoniumchlorid (500 μ M), Cimetidin (500 μ M), Amilorid (1 mM), Oubain (500 μ M), Natriumglykocholat (500 μ M), 5-(*N*-Ethyl-*N*-isopropyl)amilorid (0.1 mM), Cytochalasin D (10 μ M), Chlorpromazin (10 μ g/L), Methyl- β -Cyclodextrin (10 mM) und Nystatin (25 μ g/ml).

Die Zellen werden für 30 Minuten inkubiert und danach das Medium abgesaugt. Die in DMEM gelöst vorliegende Untersuchungssubstanz (2 μ M) wird in die Zellkulturflaschen pipettiert und diese für eine Stunde im Brutschrank gelagert. Eine weitere Probe ohne einen Hemmstoff stellt man in den Kühlschrank bei 4 °C. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit kaltem PBS gewaschen. Unter Zusatz von Trypsin pelletiert man die Zellen und zentrifugiert diese ab. Das erhaltene Zellpellet wird zweimal mit kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Alle erhaltenen Zellpellets werden bis zu ihrer Messung bei -18 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Parallel zur Herstellung der Untersuchungspellets werden drei Zellkulturflaschen, die nur mit Untersuchungssubstanz inkubiert sind, als Negativkontrolle mitgeführt. Sie enthalten keine Zusätze an Zellaufnahme-Hemmstoffen.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

3.4.2.3 Messungen

Für die Untersuchungen wurde das C10-Dimer **63** getestet. Die Messungen der Versuchsproben erfolgten auch hier durch Herrn Krüger mit der HR-CS AAS [Krüger, 178].

3.4.2.4 Ergebnisse der Testung der Zellaufnahmemhemmung

Die Zellaufnahme-Hemmstoffe bewirken kaum eine Aufnahmemhemmung von **63** in die Zellen. Nur die Anwesenheit von M- β -CD hat Auswirkungen. Die untere Abbildung zeigt dies deutlich. Alle Werte kann man aus den **Tabellen 3.22** und **3.23** entnehmen.

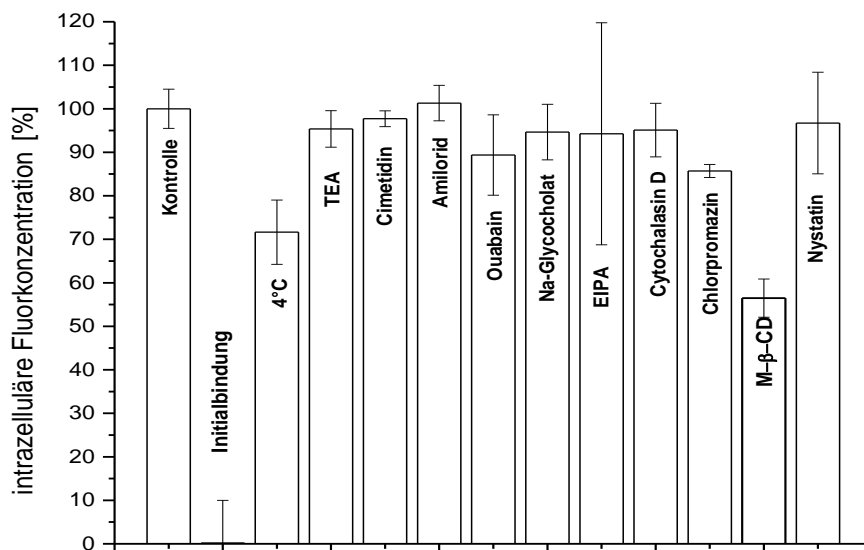


Abb. 3.21: Zellaufnahmemhemmung von **63**, bezogen auf die Kontrolle und der Initialbindung

Nur unter Zusatz von M- β -CD wird eine Anreicherung von **63** vermindert. Bezogen auf den Kontrollwert ist die intrazelluläre Fluorkonzentration fast bis auf die Hälfte reduziert (56.49 ± 4.4 %). Eine leichte Verminderung des intrazellulären Fluorgehalts kann bei der Probe nur mit Untersuchungssubstanz, bei der ohne Zusatz eines

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

Hemmstoffs bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert wurde, beobachtet werden ($71.64 \pm 7.4 \%$). Im Folgenden sind die Messergebnisse tabellarisch dargestellt. In der oberen Spalte liegen die Parameter der Messproben, die keine Zellaufnahme-Hemmstoffe enthalten, vor (**Tab. 3.22**). Diese Substanzen sind in der **Tab. 3.23** aufgelistet. In der unteren sind die intrazellulären Fluorkonzentrationen mit ihren Standardabweichungen in % zur Kontrolle zu sehen.

	Kontrolle	Initialbindung	4°C
Fluorgehalt von 63 in %	$100 \pm 4.5 \%$	$0.2 \pm 9.8 \%$	$71.64 \pm 7.4 \%$

Tab. 3.22: Parameter der Messproben (ohne Zellaufnahme-Hemmstoffe).

Hemmstoff	Fluorgehalt von 63 in %	Hemmstoff	Fluorgehalt von 63 in %
TEA	$95.35 \pm 4.18 \%$	EIPA	$94.24 \pm 25.52 \%$
Cimetidin	$97.71 \pm 1.81 \%$	Cytochalasin D	$95.11 \pm 6.16 \%$
Amilorid	$101.30 \pm 4.1 \%$	Chlorpromazin	$85.70 \pm 1.50 \%$
Ouabain	$89.36 \pm 9.24 \%$	M-β-CD	$56.49 \pm 4.4 \%$
Na-Glykocholat	$94.64 \pm 6.39 \%$	Nystatin	$96.72 \pm 11.67 \%$

Tab. 3.23: Fluorgehalt in Anwesenheit der jeweiligen Hemmstoffe. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Kontrolle.

3 Pharmakologische Untersuchungen Zytotoxizität, Estrogenität und Zellaufnahme

3.4.2.5 Diskussion der Ergebnisse der Zellaufnahmehemmung

Abschließend soll die in den Zellen vorliegende reduzierte Fluorkonzentration, vermittelt durch 10 mM M- β -CD, diskutiert werden. Dieser Wirkstoff löst das in der Zellmembran vorhandene Cholesterol heraus [Tarasenko, 193], [Byfield et. Al., 194]. Ohne diesen wichtigen Zellmembranbestandteil werden die Caveolen der Zellmembranen in ihren physiologischen Funktionen [Samarzija, 195] deutlich eingeschränkt [Toselli, 196], beispielsweise die Caveolin-vermittelnde Endozytose [Lajoie, 197].

Das Ergebnis der Zellaufnahmehemmung von **63** liefert einen sehr wichtigen Hinweis, wie das Monomer **47** und die bivalenten 4,5-Diaryl-2-imidazoline **61-63** angereichert werden können. Vermutlich spielt bei der Anreicherung dieser Wirkstoffe eine Caveolin-vermittelnde Endozytose eine Rolle. Dass aber die Aufnahme ausschließlich über diesen Mechanismus erfolgt, kann nicht eindeutig bestätigt werden. Ein Grund dafür liefert das Messergebnis mit Nystatin. Das Antimykotikum hemmt auch diese Art der Endozytose [Sato, 198], [Sharma, 199]. Untersuchungen von **63** mit diesem Hemmstoff zeigen aber keine reduzierte intrazelluläre Fluorkonzentration. Sie ist mit 96.72 ± 11.67 % sehr identisch zum Kontrollwert (**Abb. 3.22**). Würde die Messprobe Nystatin mit **63** eine verminderte intrazelluläre Konzentration organisch gebundenem Fluor enthalten, so könnte die Vermutung einer Aufnahme der untersuchten Verbindungen über eine Caveolin abhängige Endozytose erhärtet werden. Nichts desto trotz bedarf es weiterer Untersuchungen, die den genauen Mechanismus der Anreicherungen von bivalenten Strukturen aufklären und hierbei auch die Rolle des membranständigen GPR30-Rezeptors mit einschließen.

4

¹H-NMR-Spektroskopie ausgewählter *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere

4.1 Einleitung

In dieser Forschungsarbeit wurde eine Reihe von bivalenten *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolinen synthetisiert. Für die Interpretation von pharmakologischen Testergebnissen sollten auch Strukturaufklärungen mit Hilfe von ¹H-NMR-Spektren herangezogen werden. Im Arbeitskreis Gust wurden bereits verschieden substituierte Monomere von 4,5-Diaryl-2-imidazolinen ausführlich untersucht [von Rauch, 99], [Keilitz, 146]. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der estrogen-wirksamen, bivalenten Verbindung **68** und dem nicht estrogen-wirksamen C-10-Dimer **71** aus der Reihe der *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl-Dimere vorgestellt. Für räumliche Darstellungen der Verbindungen wurden die Programme ChemBioDraw Ultra 12.0 und Chem3D Pro 12.0 verwendet.

4.2 ¹H-NMR-Untersuchungen

4.2.1 1,4-Bis(*meso*-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)-butan Dihydrochlorid (**68**)

Da die Amidin-Partialstruktur im 2-Imidazolin von **68** protoniert vorliegt, wird der Heterozyklus in eine nahezu planare Anordnung gezwungen. Diese resultiert durch partiell sp²-hybridisierte *N*-Atome [von Rauch, 169]. Der 2-Imidazolinrest des Moleküls **68** wird dadurch symmetrisch [Schlenk, 54]. Dadurch erlangen nicht nur die benzyllischen Protonen chemische Äquivalenz, welche im Spektrum als Singulett-Signal bei 5.94 ppm auftreten, ebenfalls durch den symmetrischen Aufbau des 2-Imidazolinrings erzeugen die vier *OH*-Gruppen bei 10 ppm und die vier *NH*-Gruppen bei 10.81 ppm jeweils einen Singulett. Die entsprechenden *H*-Atome der Aromaten sind dem entsprechend auch nahezu chemisch äquivalent (*H*-3: 6.58 ppm; *H*-5: 6.65 ppm; *H*-6: 7.0 ppm). Für den Alkylspacer erscheinen nur zwei Signale. Bei 1.94 ppm ergeben die *H*-Atome der mittleren zwei Methylen-Einheiten einen Multipllett. Die anderen zwei zu den Amidin-C-Atomen benachbarten -CH₂-Gruppen werden durch elektronenziehende Effekte dieser Partialstruktur leicht entschirmt. Deren Signale sind leicht tieffeldverschoben und ergeben bei 2.82 ppm ein Multipllett.

Bei der Interpretation des Spektrums wurde bewusst auf die Vermessung der freien Base von **68** verzichtet. In diesem Fall ist das Proton der Amidin-Struktur aufgrund

4 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ausgewählter *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere

eines tautomeren Gleichgewichts zwischen beiden *NH*-Gruppen delokalisiert. Es kommt außerdem zu Austauschprozessen zwischen diesem Proton mit dem deuterierten Wasser, welches in Spuren im ebenfalls deuterierten Dimethylsulfoxid (DMSO-d_6) vorhanden ist [Gronert, 200]. Das Signal im NMR-Spektrum verschwindet folglich. Das Problem umgeht man durch Überführen von **68** zum Dihydrochlorid.

Mit Chem3D Pro 12.0 wurde eine rein hypothetisch mögliche räumliche Struktur des Dihydrochlorids von 1,4-Bis(*meso*-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolinium-2-yl)butan **68** erstellt (**Abb. 4.1**; Chloridionen nicht abgebildet).

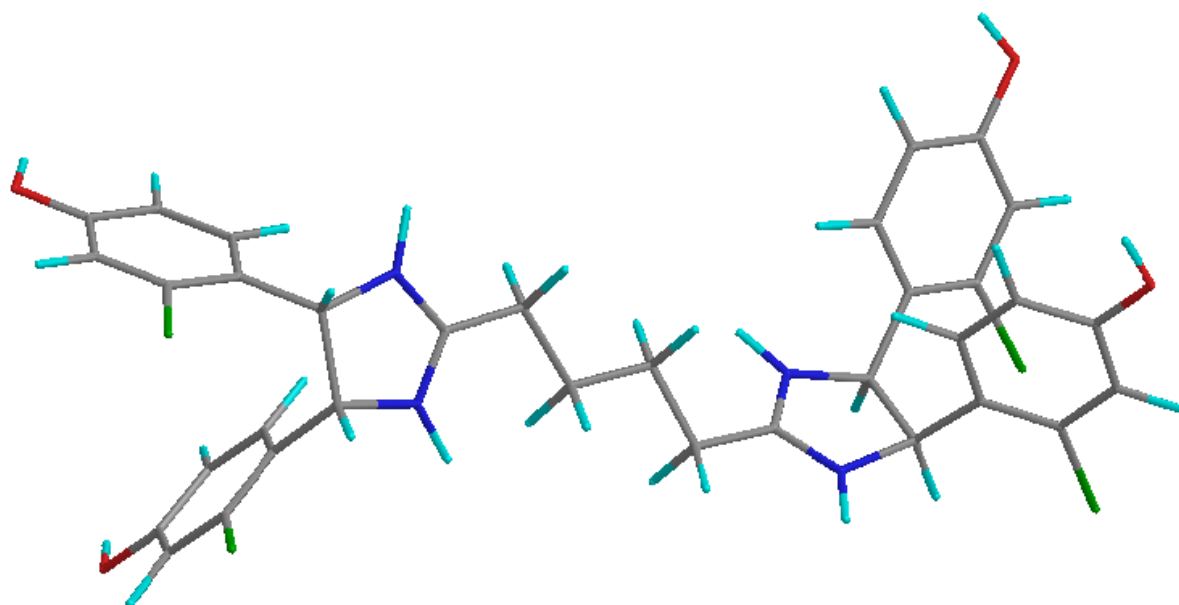


Abb. 4.1: räumliche Ausrichtung des Dimers **68** [C: grau; H: hellblau; N: blau; O: rot; Cl: grün].

Alle Aromaten sind ekliptisch zueinander angeordnet und befinden sich auf der gleichen Seite der beiden 2-Imidazolinringebenen. Die vier benzylichen Protonen befinden sich nicht in den Ringströmen der Aromaten. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum liegen ihre Signale im tiefen Feld. In Bezug auf diese Protonen sind die Signale der aromatischen Protonen (*Ar-H*) hochfeldverschoben. Sie sind den Ringstromeffekten der jeweils gegenüberliegenden Aromaten ausgesetzt. Im Spektrum von **68** wird für die Protonen in Position 3 (*Ar-H-3*) bei 6.58 ppm ein Doppelduplett und jeweils bei 6.65 ppm (*Ar-H-5*) und 7 ppm (*Ar-H-6*) ein Duplett erzeugt. Die Aromaten beider 2-Imidazolin-Teilstrukturen des Dimers richten sich in gleicher Weise pseudoaxial aus

4 ¹H-NMR-Spektroskopie ausgewählter meso-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere

wie die Aromaten des untersuchten Monomer [Gust, 156]. Die Chloratome zeigen in die entgegengesetzte Richtung der von beiden Heterozyklen gebildeten Ebenen. Die Chloratome sind im Raum sehr voluminös, weshalb eine uneingeschränkte Rotation der Aromaten um 360° nicht möglich wird. Auch deshalb sind die benzylichen Protonen chemisch äquivalent.

Mit Hilfe des oben genannten Programms wurden die Abstände der phenolischen *OH*-Gruppen voneinander (*O-O*-Abstand) untersucht. Diese betragen beim Dihydrochlorid **68** 6.4-6.52 Å und für die Base **68** 7.08 Å. Dieser Abstand ist unter anderem essentiell für die estrogenen Wirkung. Für das Monomer wurden geringfügige Abweichungen von 6.21-6.39 Å festgestellt [Gust, 96].

Die C-Atome der But-1,4-diyl-Alkylkette liegen aufgrund ihrer sp³-Hybridisierungen tetraedrisch angeordnet vor. Die gestaffelte Form dieser Kette ist der energetisch günstige Zustand. Nur die C-Atome in 1- und 4-Position, welche benachbart zu den *N=C-NH*-Einheiten des Dihydrochlorid beziehungsweise der Base sind, können nicht die ideal gestaffelte Form beibehalten. Aufgrund der sp²-hybridisierten Amidin-C-Atome nehmen sie die nahezu gleiche planare Ebene der Heterozyklen an. Ihre Multipletts treten bei 1.91 und 2.83 ppm in Erscheinung.

4.2.2 1,4-Bis(meso-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)- decan (71)

Verbindung **71** besitzt eine identische räumliche Anordnung wie **68** (beide als Dihydrochlorid). Auch hier sind die Aromaten ekliptisch ausgerichtet und die *C*-Atome zeigen in entgegengesetzte Seiten der durch die 2-Imidazolinringe geformten Ebenen weg. **Abb. 4.2** zeigt eine hypothetisch mögliche Form des Dimers.

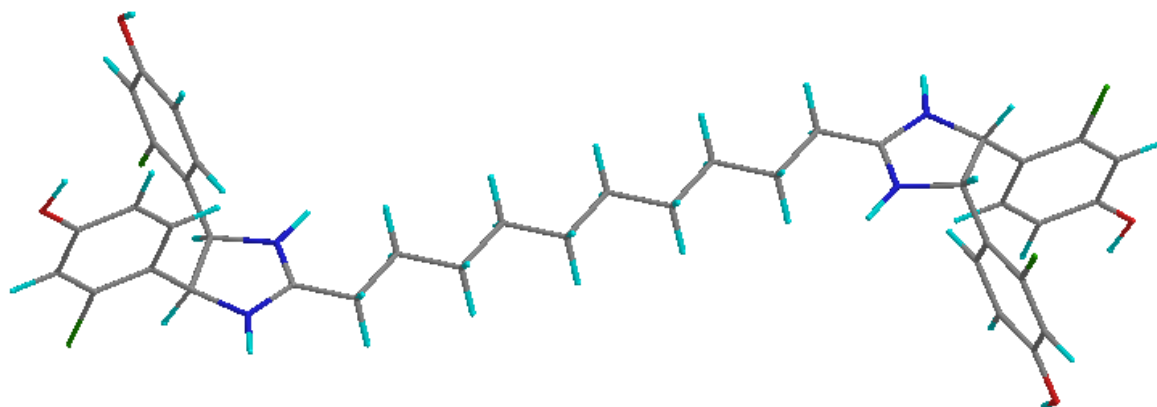


Abb. 4.2: **71** in seiner protonierten Form; Chloridionen sind nicht abgebildet.

Die Signalaufspaltungen von **71** sind identisch zu **68**. Die benzylichen Protonen befinden sich außerhalb der aromatischen Ringströme. Sie treten ebenfalls bei hohem Feld auf (5.93 ppm). Signale der aromatischen Protonen treten bei 6.57 (dd, Ar-*H*-3), 6.65 (d, Ar-*H*-5) und 6.96 ppm (d, Ar-*H*-6) auf. Eine Verlängerung des Alkylspacers von C4 zu C10 hat hinsichtlich ihrer chemischen Verschiebungen keinen Einfluss auf die *OH*-Gruppen (9.99 ppm) oder die *NH*-Gruppen (10.77 ppm). Die Protonen der Decan-1,10-diyl-Kette von **71** werden im Spektrum zu Multipletts bei 1.34 ppm (-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-CH₂-), 1.77 ppm (-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-CH₂-) und 2.77 ppm (-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-CH₂-) aufgespalten.

Da die räumliche Struktur der 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolinreste bei **68** und **71** identisch sind, dürfte sie bei **71** kein Grund für den Verlust der estrogenen Wirkung sein. Die Verlängerung des But-1,4-diyl- zum Dec-1,10-diyl-Spacers hat unter anderem Einfluss auf die Größe der Verbindung. **71** ist größer als **68**. Struktur-Aktivitäts-Studien (SAR-Studien) über eine mögliche Interaktion des C10-Dimers mit der Ligandenbindungsdomäne könnten Hinweise auf die Ursache des Wirkverlusts erbringen.

5

**Ermittlung der Sättigungslöslichkeit mittels
UV/Vis-Spektroskopie**

5.1 Theoretischer Hintergrund

Alle Verbindungen haben unterschiedliche zytotoxische Effekte an MCF-7 Mammakarzinom-Zellen und zeigen bis auf einige Ausnahmen keine estrogenen Wirkungen am Estrogenrezeptor. Verbindungen mit Methoxy- (**56-59**) oder Fluor-Substituenten (**60-63**) an den Aromaten wirken wachstumshemmend.

Für die Zelltestungen werden von den Substanzen Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) und aus diesen wiederum Verdünnungsreihen mit dem gleichen Lösungsmittel hergestellt. Sämtliche Substanzlösungen werden mit Zellmedium vermischt und die Zellen damit inkubiert. An dieser Stelle muss der Frage nachgegangen werden, ob die Testsubstanzen nach Zugabe zum Monolayer weiterhin gelöst vorliegen oder ob sie ausfallen. Sollte letzteres der Fall sein, wäre dies eine mögliche Erklärung für den Wirkverlust der jeweiligen Substanzen an MCF-7-Zellen. Deshalb soll die Sättigungslöslichkeit der einzelnen Dimere ermittelt werden. Für **60-63** sind sie auch für Untersuchungen auf Zellaufnahmen an MCF-7-Zellen interessant.

In dieser Versuchsreihe soll außerdem der Frage nachgegangen werden, inwiefern jeweils das Substitutionsmuster und die Kettenlänge der Verbindungen die Löslichkeit beeinflusst. Dazu werden **50, 54, 58, 62, 66** und **70** untersucht, um die Auswirkungen der Substituenten bei gleicher Kettenlänge (C-8) zu betrachten. Verbindungen **60-63** werden untersucht, um die Löslichkeit in Abhängigkeit steigender Kettenlänge (C = 4, 6, 8 und 10) bei gleichem Substitutionsmuster (4-Fluor) zu ermitteln.

5.2 Ermittlung der Sättigungslöslichkeit

Die Kalibrierung und Ermittlung der Sättigungslöslichkeiten erfolgt UV-photometrisch.

5.2.1 Herstellung der Untersuchungslösungen

Die Untersuchungslösungen werden nach einer Vorschrift von Schäfer [201] hergestellt. Hierzu wird eine Lösung von 0.1 % DMSO in DMEM_{sine} („Dulbecco's Modified Eagle Medium“; Zellmedium mit einem physiologischen pH-Wert von 7.4;

5 Ermittlung der Sättigungslöslichkeit mittels UV/Vis-Spektroskopie

ohne den Farbstoff Phenolrot) in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Darin gibt man so viel Substanz hinzu, bis sich ein Bodensatz bildet, der sich auch durch zwischenzeitliches Schütteln auf dem Vortex-Mixer nicht mehr auflöst. Alle Eppendorf-Gefäße werden dann für 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Nach Abkühlen zentrifugiert man die Proben für 5 Minuten in der Eppendorf-Ultrazentrifuge bei 37 °C und 15.000 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand der jeweiligen Probe wird vorsichtig vom Bodensatz abpipetiert. Diese Lösung stellt die gesättigte Untersuchungs-Stammlösung der jeweiligen Verbindung dar.

5.2.2 Erstellung der Kalibrierfunktion

Separat zu den Untersuchungslösungen (**Kap. 5.2.1**) werden Kalibrierlösungen von den Verbindungen für die Erstellung einer Kalibrierfunktion am UV-Photometer hergestellt. Dazu werden die Substanzen in Methanol gelöst. Aus diesen Kalibrierstammlösungen werden Verdünnungsreihen in PBS („phosphate buffered saline“; phosphatgepufferte Salzlösung mit einem konstanten pH-Wert = 7.4) erstellt. Am UV-Photometer bestimmt man ihre Absorptionsmaxima, welche sich zwischen 0.2 und 0.8 befinden müssen [Matter, 202]. Daraus werden Kalibriergeraden erstellt. Mit Hilfe dieser können anhand von Absorptionsmaxima der Untersuchungslösungen die Sättigungslöslichkeiten der Testverbindungen ermittelt werden.

5.3 Auswertung und Diskussion

Unten sind tabellarisch die Ergebnisse der Verbindungen gleicher Kettenlänge (**Tab. 5.1**) und gleicher Substitutionsmuster (**Tab. 5.2**) dargestellt.

5 Ermittlung der Sättigungslöslichkeit mittels UV/Vis-Spektroskopie

Verbindung	Substitutionsmuster	Sättigungslöslichkeit [μM]
50	3-OH	930
54	4-OH	670
58	4-OCH ₃	830
62	4-F	380
66	2-F-4-OH	190
70	2-Cl-4-OH	120

Tab. 5.1: Sättigungslöslichkeiten in μM gleicher Kettenlänge verschiedener Substitutionsmuster.

Verbindung	Kettenlänge	Sättigungslöslichkeit [μM]
60	C-4	390
61	C-6	390
62	C-8	380
63	C-10	390

Tab. 5.2: Sättigungslöslichkeiten in μM gleicher Substitutionsmuster verschiedener Kettenlänge.

Unter den Verbindungen hat **70** mit 120 μM die niedrigste Sättigungslöslichkeit in DMEM. Mit seinem *Cl*-Substituenten in der *ortho*-Position liegt eine höhere Lipophile als bei **66** vor, bei der statt einem Chlor-Atom ein Fluor-Atom substituiert ist. Dies hat zur Folge, dass **66** besser löslich ist (190 μM). Von **62** lässt sich die doppelte Menge

5 Ermittlung der Sättigungslöslichkeit mittels UV/Vis-Spektroskopie

Substanz mit maximal 380 μM lösen. Im Gegensatz zu dieser Verbindung hat **54** mit der *OH*-Gruppe einen hydrophilen Substituenten, weshalb die Löslichkeit bis auf 670 μM steigt. Interessanterweise lässt sich **58** besser lösen als **54**. Erwartungsgemäß sollte es genau umgekehrt sein. Verbindung **58** mit seinem lipophilen *OCH₃*-Substituenten hat eine bessere Sättigungslöslichkeit (830 μM). Eine Vermutung wäre, dass durch den positiv-induktiven Effekt der Methoxy-Gruppe ein leichter Anstieg der Basizität des 2-Imidazolinringes erfolgt. Durch den schiebenden Effekt ist die Elektronendichte des Heterozyklus gegenüber **54** leicht erhöht. Dadurch ließe sich mehr Hydrathüllen ausbilden. Bei einem Austausch des Substituenten gegen eine 3-*OH*-Gruppe (Verbindung **50**) steigt die Löslichkeitsgrenze um 100 μM ; sie liegt bei 930 μM (siehe **Tab. 5.3.1**). Mit Fluor in der *para*-Stellung an den Aromaten substituierte Verbindungen verschiedener Kettenlänge sind alle gleich gut löslich. Maximal 380 μM von **62** kann man in $\text{DMEM}_{\text{Sine}}$ lösen, bei **60**, **61** und **63** sind es 390 μM . Wie aus der **Tab. 5.3.2** zu sehen ist, hat die Verlängerung der Kettenlänge von 4 auf 10 hat keinen Einfluss auf die Löslichkeit der Substanzen.

Nur die in den **Tab. 5.3.1** und **5.3.2** aufgeführten 4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere wurden untersucht. Die Ergebnisse lassen aber vermuten, dass insgesamt betrachtet die Sättigungslöslichkeiten der in dieser Arbeit synthetisierten bivalenten Verbindungen nur durch die Substitutionsmuster beeinflusst werden. Die Kettenlängen spielen keine Rolle. Die UV-photometrische Untersuchungen ergaben, dass alle Testverbindungen unter Einhaltung der Bedingungen der pharmakologischen Zelltestungen löslich sind. Keine dieser Verbindungen fällt aus. Bei der Testung auf Zytotoxizität werden Konzentrationen bis zu maximal 50 μM und bei der Untersuchung auf Estrogenität 10 μM verwendet. Alle unter pharmakologischen Gesichtspunkten erlangten Ergebnisse sind verwertbar.

6

Ermittlung von pK_s -Werten ausgewählter

***meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere**

6.1 Der 2-Imidazolinring und die Amidin-Partialstruktur

Bei allen Verbindungen liegt die gleiche chemische Struktur als Grundgerüst vor. Der 2-Imidazolinring gehört zur Klasse der Heterozyklen. Es handelt es sich um eine fünfgliedrige zyklische Verbindung, die zwei nicht benachbarte N-Atome im Molekül trägt. Das Ringsystem ist ungesättigt. In diesem ist eine funktionelle Gruppe, die Amidinstruktur $N=C-NH$, eingebettet. Amidine besitzen schwach basische Eigenschaften und sollten deshalb protoniert werden können [Lankau, 203].

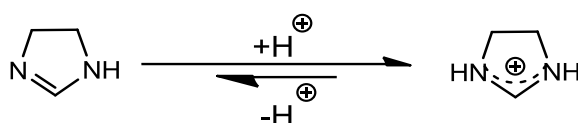


Abb. 6.1: Protonierung zum 2-Imidazoliniumion und Deprotonierung zur Base.

Alle pharmakologisch untersuchten bivalenten Verbindungen haben 2-Imidazolin-Teilstrukturen. Daher sollen ihre Basizitäten im Zellmedium bestimmt werden. Alle Dimere liegen bei pH = 7.4 gelöst vor (**Kap. 5**). Wichtig ist zu klären, ob sie bei physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen. In diesem Kapitel sollen deshalb ihre pK_s-Werte ermittelt werden. Die verschieden substituierten 4,5-Diaryl-2-imidazoline müssten eine schwache Basizität aufweisen. Daher sollten im Zellmedium protonierte 2-Imidazoliniumionen vorliegen. Sicherlich wird auch die Art der Substitutionsmuster die Basizitäten beeinflussen. Um diese Vermutungen zu überprüfen, werden die C8-Dimere **54**, **62** und **66**, die auch auf ihre Stabilitäten (siehe **Kap. 7**) untersucht wurden, herangezogen. Diese drei Verbindungen weisen jeweils verschiedene Substituenten unterschiedlicher Polaritäten auf: mit einer 4-Hydroxygruppe ein hydrophiles (**54**), mit 4-Fluor ein lipophiles (**62**) und mit 2-Fluor-4-hydroxy (**66**) ein amphiphiles Substitutionsmuster. Unterschiedliche Auswirkungen auf Basizitäten und Stabilitäten der Dimere (**Kap. 7**) sollten zu erwarten sein.

6.2 Versuchsmethode: UV/Vis

Die Ermittlung der pK_s-Werte erfolgt bei allen Substanzen photometrisch. Dank der aromatischen Reste und den 2-Imidazolin-Grundstrukturen kann die UV/Vis-Methode angewendet werden [Connors, 204]. Die Moleküle absorbieren im ultravioletten Spektralbereich [Connors, 204]. Je nach Protonierung oder Deprotonierung zeigen die zu untersuchenden Dimere verschiedene Absorptionen bei bestimmten Wellenlängen. Mit Hilfe von Titrationsspektren kann der isosbestrische Punkt bestimmt werden [Cohen, 205]. Hier ändert sich die gemessene Absorption während der Titration nicht. Die Ermittlung der pK_s-Werte einer Verbindung sollte somit möglich sein.

6.3 Versuchsdurchführung

Jeweils 1 mg der oben genannten Substanzen **54**, **62** und **66** werden in 100 ml H₂O bidest. gelöst. Vorgelegt werden 50 ml fürs Titrieren. Mit einer Glaselektrode wird der pH-Wert der entsprechenden Lösungen bestimmt. Dieser liegt zwischen pH = 6.0-6.6. Zu Beginn wird die zu untersuchende Substanzlösung mit zwei Tropfen HCl_{conc} auf pH = 2 eingestellt. Natronlauge unterschiedlicher Konzentrationen (0.1 N und 0.01 N für die Feineinstellung des pH-Wertes) wird tropfenweise zur sauren Lösung pipettiert. Nach einem pH-Wert-Anstieg um einen pH-Punkt wird aus der Lösung eine Probe entnommen und ihre Absorption photometrisch gemessen. Nach der Vermessung wird die Probe wieder zur Analysenlösung gegeben. Durch tropfenweises Pipetieren fährt man bis zum nächsthöheren pH-Wert fort. Bei pH = 12 wird der Versuch beendet.

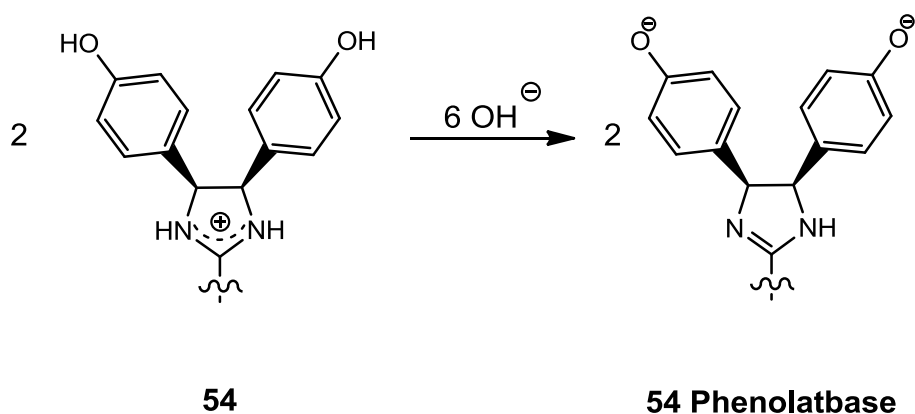
6.4 Meßergebnisse, Problematik und Diskussion

54, **62** und **66** lassen sich sehr gut in H₂O lösen. Die pH-Messungen über die Glaselektrode sind unproblematisch. Von jeder Probe können Spektren aufgenommen werden.

6 Ermittlung von pK_s -Werten ausgewählter *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere

Die eigentliche Problematik trat erst nach Auswertung von Titrationspektren der Testverbindungen auf. Die Kurven hätten so verlaufen müssen, dass alle einen gemeinsamen Schnittpunkt hätten haben müssen. Dieser wäre der isosbestrische Punkt gewesen, welcher aber bei keiner der Testverbindungslösung einheitlich vorlag. Ohne diesen kann kein Titrationspektrum ausgewertet werden [Cohen, 205]. Denn nur über diesen Punkt, bei der alle Untersuchungslösungen ein und selben Absorptionswert haben, ist eine Auswertung über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung möglich [Perkampus, 206]. Auch durch mehrmalige Versuchswiederholungen konnte nie ein isosbestrischer Punkt erhalten werden. Vermutlich können die Titrationspektren deshalb nicht ausgewertet werden, da aufgrund der Strukturen der Verbindungen komplexe Säure-Basen-Paare zugrunde liegen. **54** und **66** sind beispielsweise in der Lage, gleich sechs Protonen im basischen Millieu abzuspalten.

Abb. 6.2 zeigt jeweils beide protonierte 4,5-Diaryl-2-imidazolin-Teilstrukturen der beiden bivalenten Verbindungen **54** und **66**. Auf der linken Seite der Abbildungen liegen die Strukturen in ihrer Phenolform als Dihydrochloride vor. Rechts in den Abbildungen sind ihre korrespondierenden Phenolate der 2-Imidazolinbasen abgebildet. Generell liegen die pK_s -Werte von Phenolen je nach Substitutionsmuster in den Aromaten im Bereich von 10 [Rücker, 207]. Auch bei Diaryl-2-imidazolinen sollten ihre pK_s -Werte unverändert bleiben [Fernandez, 208]. Sicherlich wird die Azidität der Phenolstruktur bei **66** gegenüber **54** aufgrund der *ortho*-ständigen *F*-Atome leicht erhöht sein, welche einen ziehenden induktiven Effekt ausüben.



6 Ermittlung von pK_s -Werten ausgewählter *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere

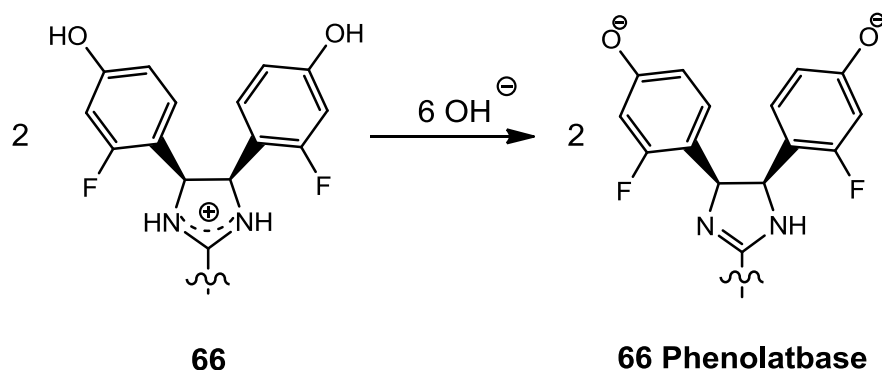


Abb. 6.2: **54** und **66** jeweils vollständig protoniert (links) und ihre korrespondierenden Phenolate (rechts).

Die phenolischen *OH*-Gruppen dürften das Gleichgewicht des Säure-Basen-Paars 2-Imidazolium - 2-Imidazolin erheblich stören. Deren pK_s -Werte sind daher nicht ermittelbar. Theoretisch dürfte sich bei **62** aufgrund fehlender *OH*-Substituenten das Problem nicht ergeben. Das erwähnte Säure-Basen-Paar sollte sich an dieser Stelle ungestört einstellen können. Das Titrationsspektrum lieferte allerdings auch hier keinen eindeutigen isobestrischen Punkt und war daher nicht auswertbar. Über die mögliche Ursache kann nur spekuliert werden. Eine Hydrolyse von **62** im alkalischen Milieu kann ausgeschlossen werden, da Stabilitätsuntersuchungen im Basischen über den gesamten Zeitraum von 96 Stunden eine sehr hohe Stabilität ergaben (**Kap. 7.5**). Bei **54** und **66** kommen neben bereits genannten Gründen auch Stabilitätsprobleme hinzu, die die Nichtauswertbarkeit ihrer Titrationsspektren mit sich bringen. Im Basischen beginnen sich die 4-*OH*- beziehungsweise 2-*F*-4-*OH*-substituierten Dimere schnell umzusetzen. Mögliche oxidative Prozesse könnten eventuell die Bestimmungen von Basizitäten stören (**Kap. 7**). Dennoch sollten annähernde Aussagen der pK_s -Werte für 4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere getroffen werden. Dazu wurde die Aziditätskonstante von *meso*-4,5-Bis(4-fluorphenyl)-2-imidazolin **42**, das reine Monomer der Verbindung **62** [Krüger, 178], bestimmt.

Die Titrationsbestimmung erfolgte entweder UV-photometrisch durch Zutropfen mit NaOH (0.1 und 0.01 N) oder mit einem Titrande. Vorteilhaft hier sind schnelle Messungen mit kleinen Proben und damit verbunden kann man möglichen oxidativen Reaktionen entgegenwirken. Für das Monomer **42** wurde nach mehrmaligen Titrationen ein pK_s -Wert von 8.79-8.96 ermittelt. Er liegt im schwach basischen

6 Ermittlung von pK_s-Werten ausgewählter *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere

Millieu. Im Zellmedium liegt die Verbindung zu 95.9-97.25 % protoniert vor [Krüger, 178].

In Bezug auf den pK_s-Wert von **42** dürfte das analoge Dimer **62** aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit eine nahezu identische Konstante aufweisen. Minimale Unterschiede sind sicherlich vorhanden. Der Alkylspacer des Dimers **62** übt an beiden C2-Atomen der 2-Imidazolinringe einen positiv-induktiven Effekt aus. Die Ladungsdichte in den Heterozyklen wird gegenüber dem des Monomers **42** leicht erhöht. Die Protonierbarkeit des Amidin-N-Atoms dürfte erleichtert sein. Somit sollte die Basizität geringfügig höher liegen als bei **42**. Der pK_s-Wert sollte etwas größer als 8.96 sein. Selbiges sollte auch bei **54** und **66** gelten. Aufgrund der positiv-induktiven Effekte der 4-OH-Gruppen bei **54** sollte der pK_s-Wert etwas größer liegen als bei **62** mit seinen 4-Fluor-Substituenten, welche aufgrund ihrer negativ-induktiven Effekte die Elektronendichte der 2-Imidazolinringe leicht erniedrigen. **66** mit seinen 2-F-4-OH-Substituenten dagegen ist ebenfalls wegen den *ortho*-ständigen Fluoratomen negativ-induktiven Effekten ausgesetzt. Die Ladungsdichte in den Heterozyklen ist niedriger, so dass diese weniger basisch als bei **54**, aber sehr identisch zu **62** sein sollten.

Ausgehend vom Monomer **42** ist anzunehmen, dass die pK_s-Werte der Dimere auch im Bereich von 9 liegen sollten. Im Zellmedium liegen physiologische Verhältnisse von pH = 7.4 vor. Bei Annahme von pK_s-Werten von 9 sind die 2-Imidazolinringe von **54**, **62** und **66** nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung zu 97.61 % protoniert. Außerdem liegen **54** und **66** zu 99.75 % als Phenolbasen im Zellmedium vor.

7

**Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter
Verbindungen**

7.1 Einleitung

In diesem Kapitel sollen ausgewählte Dimere hinsichtlich ihrer chemischen Stabilität näher untersucht werden. Die Ergebnisse der Zellversuche können nur dann aussagekräftig sein, wenn Verbindungen im Zellmedium über die gesamten Messzeiten stabil vorliegen. Andernfalls wären Aussagen über Ergebnisse nicht möglich, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Zersetzungsprodukte ebenfalls Effekte auf zelluläre Ebene auslösen könnten. Für die Untersuchung wurden Dimere der Alkylspacerlänge C8 gewählt. Der Einfluss verschiedener Substituenten an den Aromaten in Hinblick auf die Stabilität ist eine zentrale Frage. Deshalb werden **54**, **62** und **66** untersucht. Damit sollten Aussagen getroffen werden, inwiefern hydrophile 4-*OH*-Gruppen (**54**) beziehungsweise lipophile 4-*F*-Substitution (**62**) der Aromaten die Dimere hinsichtlich ihrer Stabilität beeinflussen. Eine Kombination von hydro- und lipophilen Substituenten beinhaltet **66** mit einer 2-*F*- und einer 4-*OH*-Gruppe.

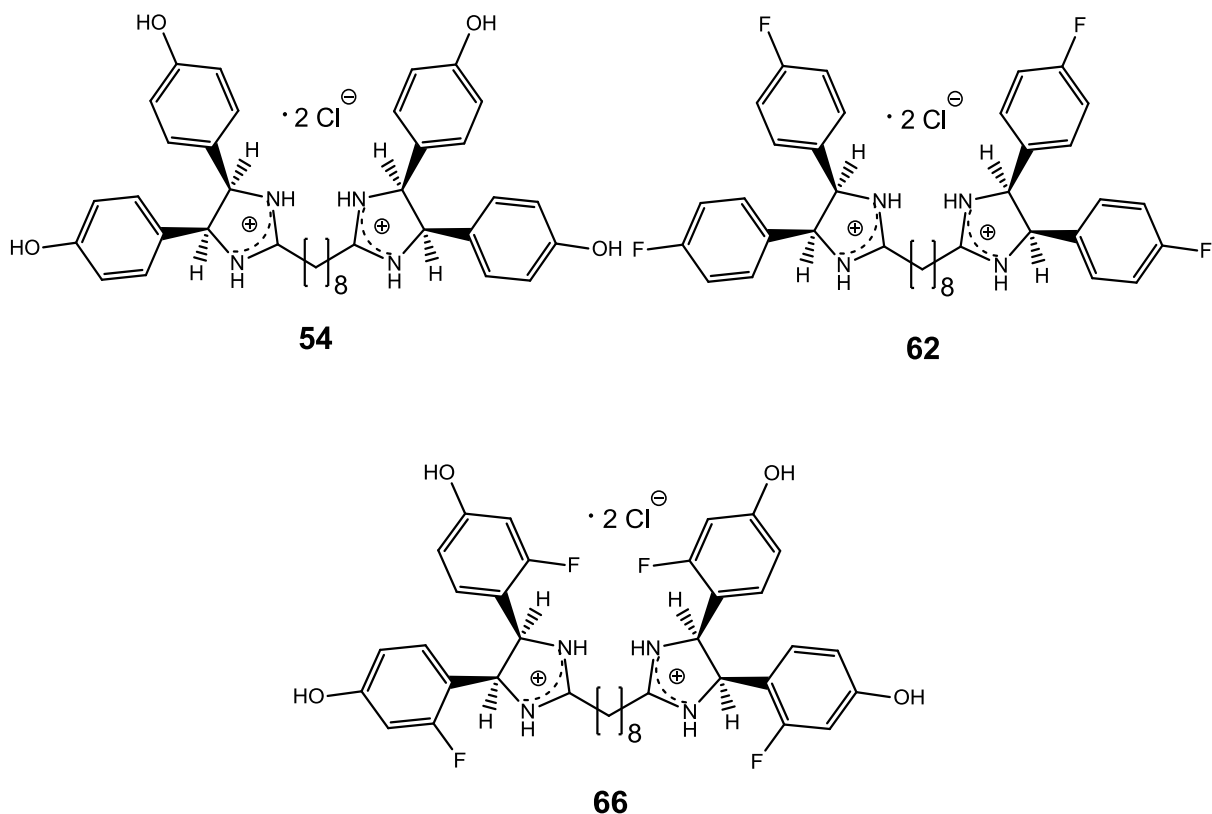


Abb. 7.1: Übersicht der getesteten Dimere **54**, **62** und **66**.

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

Die Untersuchungen zur chemischen Stabilität werden unter drei Bedingungen durchgeführt. Zur Nachahmung der Bedingungen der Zellversuche wird in PBS (pH = 7.4) getestet. Aufgrund der säure- beziehungsweise basenempfindlichen Amidin-Partialstruktur soll auch im salzsaurem (0.01 N, pH = 2) und im basischen Testmillieu (0.01 N NaOH, pH = 12) erfolgen.

7.2 Voruntersuchungen

Zur Stabilität von 2-Imidazolinen wurden bisher zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Watts [209] formulierte die hydrolytische Spaltung des Ringes zum Formamid im Wässrigen. Einflussfaktoren wie höhere Temperaturen und pH-Abhängigkeit spielen eine Rolle [Perillo, 210].

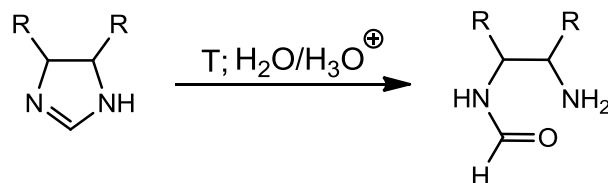
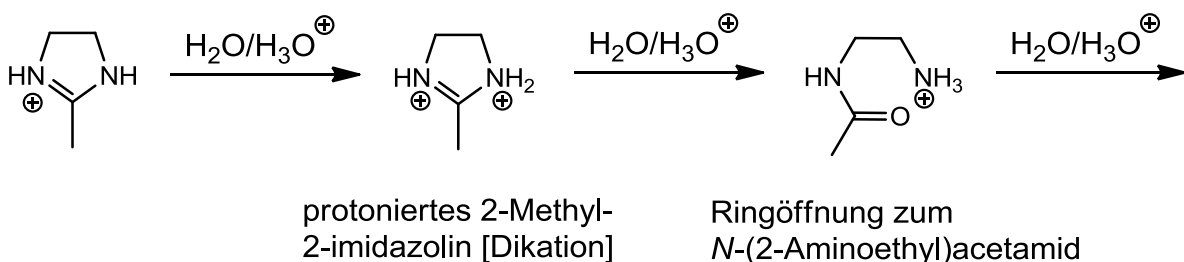
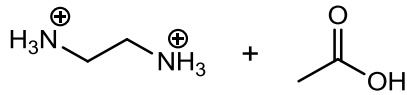


Abb. 7.2a: Zersetzung des 2-Imidazolins im Sauren bei hohen Temperaturen.

Haake [211], Limatibul und Watson [212] und de Savignac [213] beobachteten die Hydrolyse anhand des 2-Methyl-2-imidazolins im stark sauren Millieu und bei hohen Temperaturen. Das durch die Ringöffnung gebildete *N*-(2-Aminoethyl)acetamid zersetzt sich weiter zum Ethylendiamin und zur Essigsäure.



7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen



Ethylendiamin Essigsäure

Abb. 7.2b: Zersetzung im Säuren nach Watson und de Savignac.

Das Verhalten von 2-Imidazolinen im Basischen wurde von Harnsberger und Riebsommer [214] näher untersucht. Sie formulierten eine Ringaufspaltung des Heterozyklus. In einem ersten Schritt findet am Amidin-C-Atom ein reversibler, geschwindigkeitsbestimmender Angriff von Hydroxidionen zur Bildung eines Zwischenprodukts statt. Anschließend kommt es zur Aufspaltung des 2-Imidazolins. Das entstandene Säureamid ist gegen einen weiteren nucleophilen Angriff geschützt.

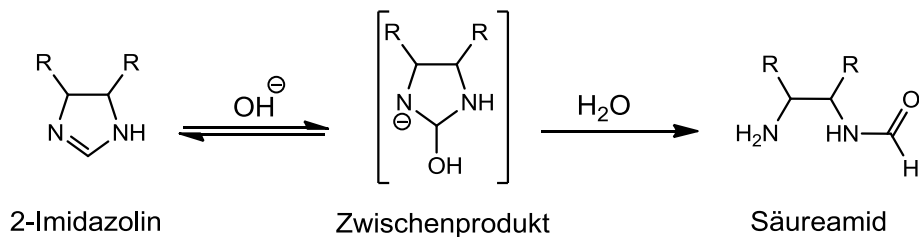


Abb. 7.2c: Basische Zersetzung nach Harnsberger und Riebsomer.

Salerno [215] berichtete über Zersetzungen von *N*-substituierten 2-Imidazolinen durch nucleophile Angriffe unter Aufspaltung der Heteroringe, bei der je nach Art der eingesetzten Nucleophile Strukturen mit Ethylendiamin- oder Formamideinheiten entstanden.

Mit dem Wissen aus diesen Vorarbeiten wurden im Arbeitskreis Gust bereits Untersuchungen durchgeführt. Die Stabilitäten von monomeren 4,5-Diaryl-2-imidazolinen wurden bereits jeweils in PBS und in H₂O mittels der HPLC untersucht [von Rauch, 99]. Alle dort untersuchten Verbindungen zeigten in beiden Medien ein identisches Zersetzungsverhalten. Allerdings verliefen diese in H₂O deutlich langsamer.

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

Die Art der Substituenten an den Aromaten und am 2-Imidazolinring bestimmt die Stabilität. *Para*-ständige *OH*-Gruppen erhöhten die Stabilität gegenüber den in *para*-Position methoxylierten Verbindungen. Sobald aber in *ortho*-Position ziehende Substituenten, beispielsweise das Chlor, vorhanden waren, wurden die untersuchten Verbindungen instabiler. So war das *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin wesentlich instabiler als das *meso*-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin.

Die Hydrolysegeschwindigkeit konnte verlangsamt werden, wenn die Imidazolinringe substituiert vorlagen. Die Hydrolyse bei *N*1-alkylierten Verbindungen verlief viel langsamer als fehlender *N*1-Alkylsubstitution. Bei am *C*2-Atom alkylierten Testverbindungen wurde schon gar keine Zersetzung mehr festgestellt.

7.3 Untersuchungen von Dimeren

Bei Dimeren stellt sich die Frage, ob gleiches Verhalten auftreten würde. Für diese Zwecke werden die drei erwähnten Dimere **54**, **62** und **66** mit jeweils gleicher Kettenlänge C₈ gewählt und deren chemische Stabilität in den oben genannten Medien über eine bestimmte Zeit von 96 Stunden beobachtet.

7.3.1 Die HPLC Methode

Da die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ein geeignetes Verfahren darstellt, um Substanzen beziehungsweise Zersetzungsprodukte voneinander zu trennen, wurde hier diese Methode zum Einsatz gebracht.

7.3.2 Versuchsbedingungen und Versuchszeiten

Die chemische Stabilität unter den drei genannten Bedingungen erfolgt immer bei 37 °C. Für jeden Versuch werden sieben Messpunkte gewählt: der Zeitpunkt zu Beginn des Versuchs (t_0), nach sechs (t_6), 12 (t_{12}), 24 (t_{24}), 48 (t_{48}), 72 (t_{72}) und 96 (t_{96}) Stunden. Somit sind auch die Messzeiten der Zellversuche abgedeckt.

Für die stationäre Phase wurde bei allen Testverbindungen eine RP-18-Säule gewählt. Die mobile Phase setzte sich aus 0.1 % TFA/MeOH (Trifluoressig-

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

säure/Methanol) mit unterschiedlichen Verhältnissen bei den Messungen der einzelnen Verbindungen zusammen: **54** (60:40), **62** (40:60) und **66** (55:45). In allen Fällen betrug die Flussrate 0.8 ml/min. Da die für die Absorptionen relevanten π - π^* -Übergänge der substituierten Aromaten bei 230 und 270 nm stattfinden [Ferm, 216], wurde für die Detektion dieser Verbindungen die Wellenlänge 268 nm, bei der die Absorptionen am stärksten waren, gewählt.

7.3.3 Herstellung der Messproben

Die methanolischen Stammlösungen von **54**, **62** und **66** werden in der Konzentration von 5 mM und pro Versuchsreihe von jeder Substanz-Stammlösung sieben Proben in Eppendorf-Cups zu je 1000 μ L und einer Konzentration entsprechend ihrer Sättigungslöslichkeit hergestellt. Je nach Art der Versuchsreihe wird die methanolische Stammlösung jeweils mit PBS, NaOH oder HCl entweder im Verhältnis von 1:10 (**54**), 1:13 (**62**) oder 1:26 (**66**) verdünnt.

Außer t_0 werden alle Proben sofort im Eppendorf Thermomixer auf 37 °C temperiert und bis Versuchsende bei 300 rpm (revolutions per minute) geschüttelt. Die Probe t_0 wird für die Vermessung schnell in die HPLC injiziert. Die anderen Proben werden nach entsprechenden Inkubationszeiten dem Thermomixer entnommen und ebenfalls sofort vermessen.

7.4 Stabilitätsuntersuchung analog den Bedingungen der

Zellversuche

Die Substanzen **54** und **66** zeigen über die gesamte Messdauer von t_0 bis t_{96} keine Flächenabnahme des jeweiligen Substanzpeaks. Während dieser Zeit treten keine zusätzlichen Peaks auf. **Abb. 7.3a** und **7.3b** stellen die jeweiligen Kurvenverläufe dar.

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

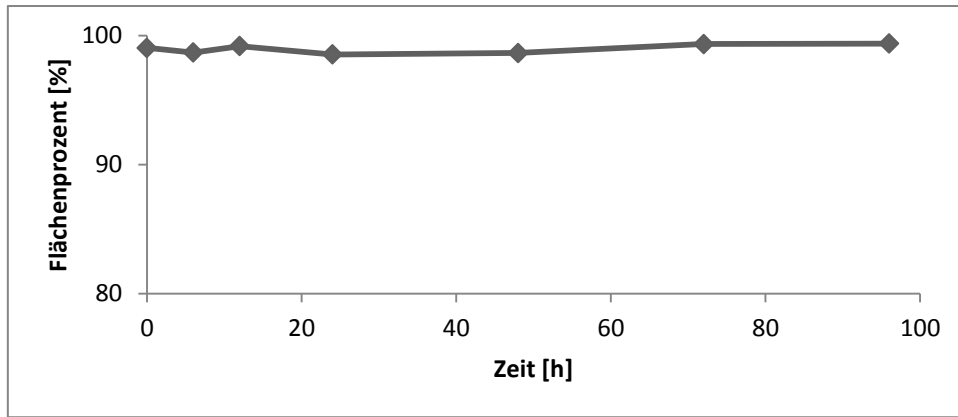


Abb. 7.3a: Verlauf von **54** in PBS nach insgesamt 96 h.

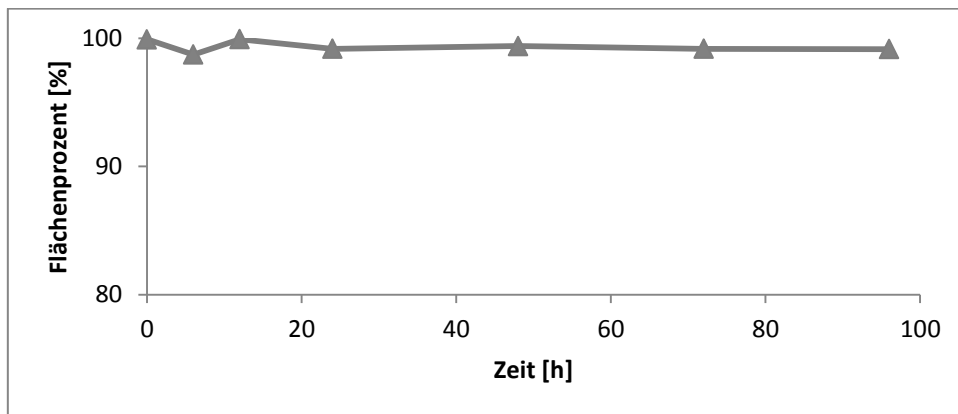


Abb. 7.3b: Verlauf von **66** in PBS nach einer Gesamtinkubationszeit von 96 h.

Bei der Untersuchung der Verbindung **62** von Beginn (t_0) bis 12 Stunden (t_{12}) beträgt die relative Fläche des Hauptpeaks 99 %. Nach weiteren 12 Stunden (t_{24}) lässt sich ein weiterer Peak mit einer relativen Fläche von 3 % detektieren. Nach insgesamt 96 Stunden (t_{96}) ist eine leichte Abnahme der relativen Fläche des Hauptpeaks gegenüber t_{12} erkennbar. Zum Versuchsende liegen 90 % vor. Im Vergleich zu **54** und **66** findet in PBS eine geringfügige Zersetzung von 10 % statt.

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

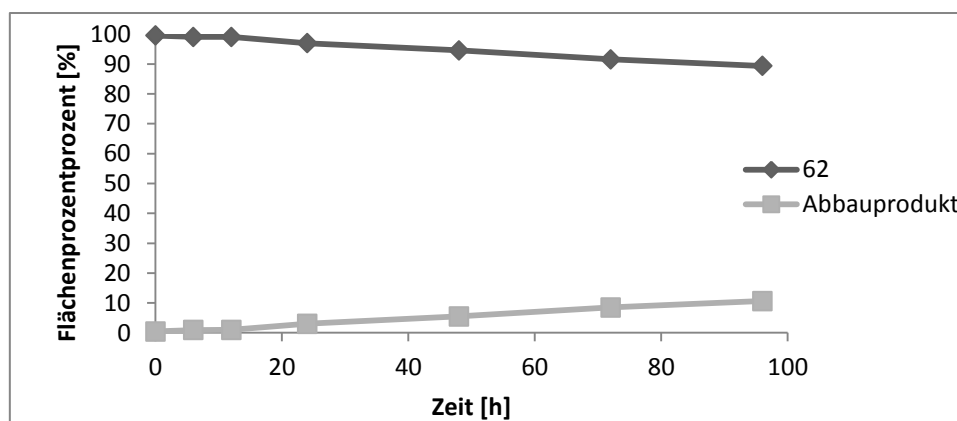


Abb. 7.4: Kurvenverlauf von **62** und seinem Abbauprodukt in PBS

7.5 Untersuchungen im alkalischen Milieu

Aufgrund der *OH*-Gruppen bei **54** und **66** und der Amidinpartialstruktur aller Verbindungen soll die Stabilität im basischen Milieu untersucht werden. Außer dem Inkubationsmedium bleiben Parameter dieser Versuchsreihe identisch zu denen aus den Messungen in PBS.

Die als Dihydrochloride vorliegenden Testverbindungen wurden sofort deprotoniert und liegen als Basen vor. Die phenolischen *OH*-Gruppen von **54** und **66** unterliegen ebenfalls einer Säure-Base-Reaktion. Beide Verbindungen treten in diesem Testmedium in ihren Phenolatstrukturen auf. Das im Alkalischen vorkommende Hydroxidion fungiert sowohl als Base als auch als Nucleophil, welches als solches deutlich stärker als das Wasser im PBS ist.

Anders als in PBS dürfte demnach eine veränderte Stabilität von **54**, **62** und **66** zu erwarten sein. Bei **54** und **66** ist im Vergleich zu **62** eine erhöhte Elektronendichte im 2-Imidazolinring aufgrund der vorliegenden Phenolatstruktur (+*M*-Effekt) zu erwarten.

Nach sechs Stunden kann eine Umsetzung der Verbindung **54** im basischen Milieu beobachtet werden. Zu Beginn der Messung wird der Substanzpeak nach 6.88 Minuten detektiert. Nach sechs Stunden beträgt die relative Peakfläche nur noch 41 %. Hier treten zwei große Nebenprodukte (NP) mit einer jeweiligen relativen Fläche von 13 % (I) und 36 % (II) auf. Zudem können zwei weitere Produkte III und IV mit jeweils kleinen Peakflächen detektiert werden. Allerdings tritt III bereits bei t_0 auf. IV mit 1 % Peakfläche tritt erst bei einer Retentionszeit von 20.87 min auf.

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

Bereits 24 Stunden nach Messbeginn beträgt die relative Fläche des Hauptpeaks nur noch 3.9 %. Die der Nebenprodukte I und II nehmen deutlich zu. Bei der Vermessung der Probe t_{24} wird der NP I mit einer relativen Fläche von 32 % bei einer Retentionszeit (t_R) von 8.55 min detektiert. NP II mit 56 % wird nach 8.87 min registriert. Bei der Vermessung der Probe t_{48} lässt sich der Hauptpeak nicht mehr detektieren. In der Zeit zwischen 24 und 48 Stunden hat sich **54** endgültig umgesetzt. Über die gesamten Messzeiten schwanken die relativen Flächen der Nebenprodukte NP I und NP II geringfügig zwischen 31 % bis 33 % beziehungsweise 53 % bis 56 %. Die detektierten Peakflächen der Produkte III und IV bleiben stets unter 5 %.

Verbindung **66** zeigte im alkalischen Milieu ebenfalls eine hohe Instabilität. Dabei entstehen fünf Nebenprodukte I-V (siehe **Abb. 7.5a** und **7.5b**). Anders als bei **54** lässt sich die Substanz auch noch bei t_{96} (0.34 %) nachweisen. Nach sechs Stunden Inkubation liegen nur noch 41 % der Fläche des Substanzpeaks bei t_0 vor. Bei der Probe t_{24} beträgt die relative Peakfläche vom Hauptpeak nur noch 16 %, bei der Probe t_{48} lediglich noch 2 %.

Die Abbauprodukte I-III sind bereits von Beginn an nachweisbar, die vermutlich erst bei der Probenzubereitung entstanden sein müssten. Eine Verunreinigung der Verbindung **66** ist ausgeschlossen, da sie vor ihrer Stabilitätsuntersuchung NMR- und HPLC-rein vorlag. Einen rasanten Zuwachs der Konzentration beobachtet man bei I und II. Während bei der Messprobe t_0 jeweils eine relative Peakfläche von 5 % (I) und 2 % (II) gemessen wird, erreichen sie ihre Maxima bei t_{72} (NP I: 38 %; NP II: 45 %). Produkt III bildet sich verstärkt innerhalb der ersten sechs Stunden und hat bei der Probe t_6 ein Maximum von 25 %. Interessanter Weise bleibt sie nicht konstant. Das Chromatogramm der Probe t_{12} zeigt bereits einen Abfall auf 8 %. Bei der Probe t_{24} werden von NP III nur noch 0.96 % detektiert. Die Abnahme nach sechs Stunden Inkubation bedeutet, dass Abbauprodukt III sich ebenfalls umsetzt. Am Ende der Stabilitätsuntersuchung ist es bei t_{96} nicht mehr nachweisbar.

NP IV dagegen bildet sich innerhalb der ersten sechs Stunden und ist im Chromatogramm der Probe t_6 bereits nachweisbar. Über die gesamte Zeit von 96 Stunden variiert die relative Fläche nur geringfügig (5-8 %). Bei der Vermessung der Probe t_{24} wird ein weiterer Peak (NP V) von 2.8 % ($t_R = 15.77$ min) nachgewiesen. In der Zeit zwischen 12-24 Stunden muss sich dieser gebildet haben. Nach 96 Stunden beträgt die relative Fläche mittlerweile 5 %. Ein weiterer Peak der relativen Fläche

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

von 4 % lässt sich nur im Chromatogramm der Probe t_0 nach 4.8 min detektieren, welcher ab t_6 nicht mehr vorhanden ist. Ob es sich allerdings um ein Abbauprodukt handelt, konnte nicht geklärt werden.

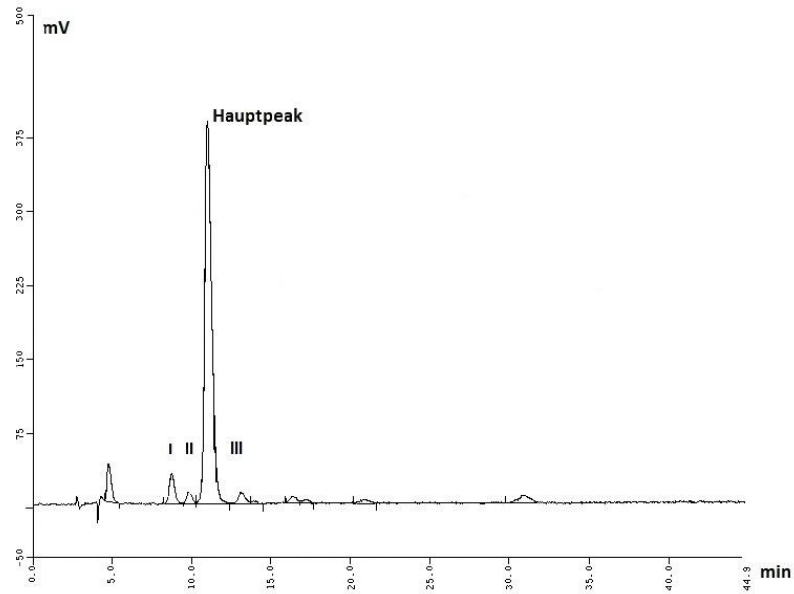


Abb. 7.5a: Chromatogramm der Verbindung **66** zum Zeitpunkt t_0 .

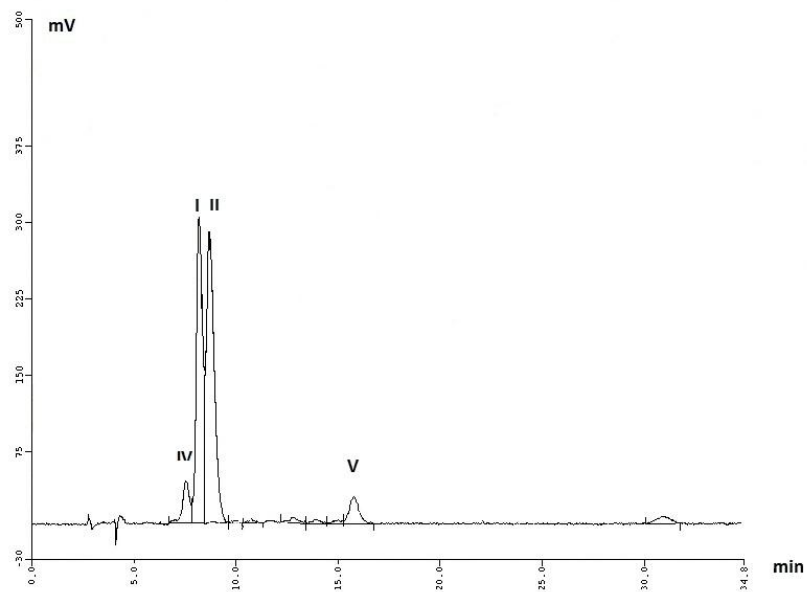


Abb. 7.5b: nach dem Zeitpunkt t_{96} werden hauptsächlich die Nebenprodukte **I** und **II** detektiert.

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

Nur Verbindung **62** liegt im Alkalischen stabil vor. In allen Chromatogrammen der Proben t_0 - t_{96} sieht man jeweils nur den Peak der Substanz, dessen Fläche über die gesamten Messzeiten unverändert bleibt. Zu keiner Zeit bilden sich Umsetzungsprodukte, welche als Nebenpeaks detektiert werden würden. Die Substitution der Phenolate durch 4-Fluoratome in den Aromaten wirkt sich positiv auf die Stabilität aus. Der 2-Imidazolinring bleibt unberührt, auch wenn dieser Substituent die Elektronendichte im Heterozyklus verringert und eine Umsetzung eher ermöglichen sollte als bei den Verbindungen **54** und **66**.

7.6 Chemische Stabilität: Untersuchung in 0.01 N HCl

Im Sauren liegen die Verbindungen als Dihydrochloride vor. Die Substanzen **54** und **66** liegen in ihren Phenolstrukturen vor. Für einen Angriff an der Amidinstruktur kommen Cl^- und H_2O als Nucleophile in Betracht. Die Stabilitätsuntersuchungen der Verbindungen **54**, **62** und **66** in 0.01 N HCl bei 37 °C liefern bei allen Proben t_0 - t_{96} ein vergleichbares Ergebnis. Bivalente 2-Imidazoline besitzen eine hohe Stabilität. Die jeweiligen Substanzpeaks bleiben in ihren Flächen stets konstant. Zu keinem Zeitpunkt kann eine Abnahme dieser Peaks festgestellt werden (**Abb. 7.6**).

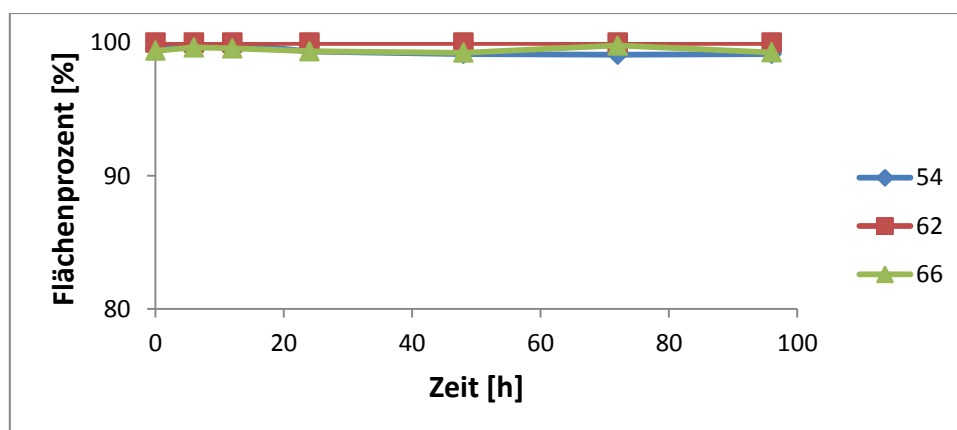


Abb. 7.6: **54**, **62** und **66** sind über den gesamten Inkubationszeitraum von 96 h stabil.

7.7 Diskussion der Ergebnisse aller Versuchsreihen

Die *OH*-Gruppen und die *C2*-Alkylierung am Heterozyklus bei **54** und **66** haben einen elektronenschiebenden Effekt (*+M-/+I*-Effekt). Die Elektronendichte im 2-Imidazolinring wird erhöht und die partiell positive Ladung am *C2*-Atom abgeschwächt. Die Phenolate von **54** und **66** können durch ihren positiven mesomeren Effekt noch stärker die Elektronendichte im Heterozyklus erhöhen. Die partiell positive Ladung am *C2* wird umso mehr abgeschwächt. **66** hat zusätzlich noch elektronenziehende *F*-Atome in *ortho*-Stellung. Vorstellbar wäre eine leichte Abschwächung der Elektronendichte. Die Heterozyklen bleiben vor Ringaufspaltungen verschont. Die Stabilität beider Verbindungen ist gewährleistet. **62** hat an den Aromaten *F*-Atome in *para*-Position. Diese üben einen ähnlichen elektronenziehenden Effekt wie die *ortho-F*-Atome von **66** aus. Anders als bei den vorherigen Verbindungen ist die Elektronendichte im Heterozyklus von **62** erniedrigt, wodurch die partiell positive Ladung am *C2* erhöht wird.

Betrachtet man den Zusammenhang der Substituenten und der angenommenen Elektronendichte im Heterozyklus, so sollte **54** die höchste Elektronendichte haben, gefolgt von **66** und **62**. Bei Betrachtung ihrer Signale in NMR-Spektren (siehe **Kap. 9**) wird dieser Zusammenhang bestätigt. Die *NH*-Atome im Heterozyklus sind bei **54** am stärksten abgeschirmt und erscheinen im Spektrum bei 10.61 ppm, bei **66** treten sie bei 10.73 ppm auf. **62** hat die niedrigste Elektronendichte und somit die am stärksten entschirmten *NH*-Atome (10.86 ppm). Somit wird für das *C2*-Atom bei der Verbindung **54** die geringste positive Partialladung und für **62** die höchste positive Partialladung vermutet.

Interessanterweise sind es ausgerechnet die Verbindungen **54** und **66**, die eine rasche Zersetzung im Basischen bei pH = 12 zeigen, obwohl deren Substituenten und *C2*-Alkylierungen die Stabilität durch Erhöhung der Elektronendichte gewährleisten müsste. Die Anwesenheit von Phenolatstrukturen führt zu einer vergleichsweise hohen Instabilität. Beobachtet wird eine schnellere Abnahme der Flächenprozent der Ausgangsverbindung **54** gegenüber **66**. Paradoxerweise ist aber **62** mit der geringsten Elektronendichte im Heterozyklus sehr stabil, obwohl hier ein Angriff des Nucleophils am wahrscheinlichsten sein sollte. Diese Resultate zeigen, dass die Zerfallsprozesse bei **54** und **66** nicht durch nucleophile Angriffe wahrscheinlich sind.

Vermutlich nehmen die *OH*-Gruppen bei den Dimeren eine wichtige Rolle ein. Während sie in PBS zur Stabilität der Verbindungen beitragen, führen sie im Alkalischen in ihren Phenolatstrukturen vorliegend zur Instabilität. Anders als in NaOH treten **54** und **66** in PBS fast ausschließlich und im Säuren nur in ihren Phenolstrukturen auf und sind daher ebenfalls stabil. Der pH-Wert des Testmediums beeinflusst die Stabilität wesentlich.

7.8 Interpretation und Produktanalyse von **54** und **66** im Alkalischen

Da nucleophile Angriffe im Alkalischen ausgeschlossen sind (**Kap. 7.7**), muss der Abbau von **54** und **66** anders begründet werden. Die 2-Imidazolinringe beider Testsubstanzen sind sehr elektronenreich. Solche Verbindungen neigen generell zu Oxidationen. Huang et al. [217] beschrieben eine oxidative Dehydrierung von 2-Imidazolin- zu Imidazol-Derivaten im stark Basischen. Es liegt nahe, dass **54** und **66** in Anwesenheit von Hydroxidionen ebenfalls oxidationsempfindlich sind. Diese Annahme kann durch die Oxidierbarkeit von 2,2'-Biimidazolin zu 2,2'-Biimidazol bestätigt werden [Duranti, 218]. Da die untersuchten Verbindungen Derivate der 2,2'-Biimidazoline sind, wäre eine oxidative Dehydrierung zu ihren 2,2'-Biimidazol-Derivaten vorstellbar. Generell sind Imidazole ebenfalls elektronenreiche und photosensitive Verbindungen [Allonas, 219], [Wöhrle, 220].

Die Produktanalyse von **54** und **66** dient der theoretischen Überlegungen möglicher oxidativen Zersetzungsprozesse. Eine Identifizierung der in den Chromatogrammen (**Abb. 7.5a** und **7.5b**) beobachteten Peaks etwaiger Zersetzungsprodukte ist nicht erfolgt.

7.9 Zusammenfassung

Die Stabilität ist abhängig vom pH-Wert des Mediums und vom Substitutionsmuster der getesteten Dimeren. Je basischer das Medium, desto höher ist der prozentuale Anteil an Phenolat, was möglicherweise zur Instabilität der Produkte führt. Dieser Sachverhalt ist mit großer Wahrscheinlichkeit unabhängig von der Spacerlänge der

7 Stabilitätsuntersuchungen ausgewählter Verbindungen

Dimere. Verbindungen mit kürzeren Kettenlängen sollten gleiche Ergebnisse hervorbringen.

8

Zusammenfassung und Ausblick

8 Zusammenfassung und Ausblick

Bivalente *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin Dihydrochloride unter anderem mit den Substitutionsmustern 2-Halo-4-hydroxy (**64-67**; **68-71**), 4-Hydroxy (**52-55**) und 4-Fluor (**60-63**) am Aromaten wurden synthetisiert. Hierbei wurden Alkylspacer der Kettenlänge $n = 4-10$ gewählt. Nach einer modifizierten Synthese nach Vögtle und Goldschmitt wurden die entsprechend substituierten *meso*-1,2-Diarylethylendiamine erhalten und diese mit Diiminodiethylester Dihydrochloriden verschiedener Kettenlänge ($n = 4-10$) zu den entsprechenden bivalenten *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolin Dihydrochloride umgesetzt. Außerdem konnte das Monomer *meso*-4,5-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid **45** synthetisiert werden.

2-Halo-4-hydroxy substituierte Verbindungen wurden auf ihre Zytotoxizität und Affinität zum ER α und β untersucht. Die Substanzen **64-67** mit einer 2-Fluor-4-hydroxy-Substitution zeigten keine zytotoxischen oder am ER agonistischen/antagonistischen Eigenschaften. Alle bivalenten 2-Chlor-4-hydroxy-2-imidazolin Dihydrochloride (**68-71**) wirkten nicht wachstumshemmend auf hormonabhängige MCF-7 Mammakarzinom-Zellen. An U2OS/ α - und U2OS/ β -Zellen konnte gezeigt werden, dass Dimere analog ihren Monomeren keine bessere Affinität zum ER α beziehungsweise β hatten. Nur das C4-Analogon **68** war in der Lage, die Luciferase-Expression zu aktivieren. Eine Antiestrogenität wurde nicht beobachtet.

Interessanterweise hatten die dimeren Verbindungen **68-71** Einfluss auf die ER α -Dichte in MCF-7- Zellen. **68** stimulierte die Dichte. Bei einer Konzentration von 1 und 10 μM konnten aber **69-71** die Rezeptordichte um knapp 65 % verringern. Keine dieser Testverbindungen zeigte eine Bindungsaffinität zu den ER-Subtypen.

Einzig das Monomer **45** zeigte eine beachtliche Wirksamkeit an U2OS-Zellen. Bei $3.88 \cdot 10^{-9}$ bzw. $4.7 \cdot 10^{-10}$ M an beiden Subtypen konnte eine 50 %ige Luciferase-Expression bezogen auf den natürlichen Liganden 17 β -Estradiol festgestellt werden. Damit war **45** der in dieser Arbeit erhaltene stärkste Agonist an beiden ER-Subtypen.

Dimere mit 4-Hydroxy-Substituenten am Aromaten (**52-55**) sind inaktiv. Eine anti-proliferative Wirkung an MCF-7- Zellen konnte auch bei einer Konzentration von über 20 μM nicht beobachtet werden. Durch das Fehlen von Halogensubstituenten in *ortho*-Stellung verlieren sie ihre Affinität zum ER α beziehungsweise ER β .

Mit 4-Fluor substituierte Dimere (**60-63**) wurden auf ihre Zytotoxizität und Zellaufnahme an hormonabhängigen MCF-7 Mammakarzinom-Zellen untersucht. Diese

wirken stark zytotoxisch. Ihre IC_{50} -Werte liegen im oberen nanomolaren Bereich [IC_{50} : **60** (630 nM) > **61** (430 nM) > **62** (260 nM) > **63** (240 nM)]. Mit steigender Kettenlänge nimmt dieser Effekt zu. Er korreliert mit einer sehr starken zellulären Anreicherung. Das monomere 2-Imidazolin **42** mit der *Fluor*-Substitution in *para*-Position am Aromaten dagegen ist weder zytotoxisch noch wird es ausgeprägt in der Zelle angereichert. Verfolgt wurden die zelluläre Anreicherung mit einer neu entwickelten Methode, der High-Resolution Continuum Source Atomabsorptionsspektroskopie. Ein Anreicherungsgrad von 219 kann bei **61** nach 60 Minuten Inkubation der Zellen mit 2 μ M beobachtet werden. Mit steigender Kettenlänge nimmt die Zellaufnahme dieser Verbindungen weiter zu. Bei gleicher Inkubationszeit und Konzentration erhöht sie sich bei **62** bereits auf einen Anreicherungsgrad von 275. **63** zeigt sogar bereits nach 40 Minuten einen Anreicherungsgrad auf 412. Allerdings konnte nicht mehr geklärt werden, ob die hohen Anreicherungsgrade von **61-63** intrazellulärer Natur sind oder ob sie sich auf der Zelloberfläche anreichern. Da kein pharmakologisches Testsystem für den membranständigen GPR30-Rezeptor vorhanden war, konnte seine Beteiligung an der Zellaufnahme nicht nachgewiesen werden.

Einen möglichen Hinweis auf intrazelluläre Anreicherung lieferten aber Untersuchungen mit Zellaufnahmehemmern. Nur in Anwesenheit von Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD) konnte eine starke Verringerung der Zellaufnahme der untersuchten Verbindung **63** beobachtet werden. Die intrazelluläre Fluorkonzentration konnte bis fast auf die Hälfte des Kontrollwertes auf 56 % reduziert werden. Der Einfluss des M- β -CD deutet womöglich auf eine Caveolin vermittelte Endozytose der Verbindungen hin.

Die ausgewählten dimeren Verbindungen **54**, **62** und **66** wurden auf ihre Stabilität in PBS (pH = 7.4, 37 °C) untersucht. Die genannten Verbindungen sind über den gesamten Zeitraum von 96 Stunden stabil und liegen im Zellmedium alle gelöst vor. Ihre Sättigungslöslichkeiten liegen bei 670 μ M (**54**), 380 μ M (**62**) und 190 μ M (**66**), die pK_s -Werte bei 9, so dass sie zu 97.61 % protoniert im Zellmedium (pH = 7.4) vorliegen.

N-alkylierte Monomere zeigten in vorherigen Arbeiten gegenüber unsubstituierten und *C2*-alkylierten 2-Imidazolininen eine Steigerung ihrer agonistischen Wirkungen an $ER\alpha$ und β . Untersuchungen ihrer Dimere an U2OS-Zellen auf mögliche Luciferase-

8 Zusammenfassung und Ausblick

Expression, als auch Molecular Modeling Studien zur Klärung der Interaktionen mit dem Estrogenrezeptor scheinen daher interessant zu sein und können noch einen Ansatzpunkt für weitere Forschungen sein.

8

Summary and Outlook

8 Summary and Outlook

Bivalent *meso*-4,5-diaryl-2-imidazoline dihydrochlorides were synthesized among others with 2-halo-4-hydroxy (**64-67**; **68-71**), 4-hydroxy (**52-55**) and 4-fluorine (**60-63**) substitution. Alkyl spacers with a chain length of $n = 4-10$ have been attached. Through a modified synthesis soon to be published by Vögtle and Goldschmitt *meso*-1,2-diarylethylenediamines, which were substituted accordingly, were obtained and converted with diiminodiethyl esters dihydrochlorides into bivalent *meso*-4,5-diaryl-2-imidazoline dihydrochlorides with various chain lengths ($n = 4-10$). Furthermore, the monomer *meso*-4,5-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline hydrochloride **45** has been synthesized.

2-Halo-4-hydroxy substituted organic compounds have been tested for affinity at ER α , β and cytotoxicity. **64-67** with 2-fluoro-4-hydroxy substitution showed neither cytotoxic nor agonistic/antagonistic effects on the ER. All bivalent 2-chloro-4-hydroxy-2-imidazoline dihydrochloride (**68-71**) caused no anti-proliferative effect on hormone dependent MCF-7 mammary carcinoma cells. Using U2OS/ α - and U2OS/ β -cells the interactions of the dimers with the ER α , β are similar to their analogues monomers. Only the C4-analogue activated luciferase expression. Anti-estrogenicity had not been observed.

Interestingly compounds **68-71** influenced ER α -density in MCF-7 mammary carcinoma cells. **68** stimulated the density. **68-71** reduced the receptor density about 65 % at concentrations of 1 and 10 μM . None of the tested compounds have a binding affinity to either one of the ER subtypes.

Only the monomer **45** showed considerable effect on U2OS cells. A luciferase expression of 50 % referred to the natural ligand estradiol has been ascertained at the two subtypes at concentrations of $3.88 \cdot 10^{-9}$ M as well as $4.7 \cdot 10^{-10}$ M. The compound **45** showed the strongest agonistic effect in this work.

4-Hydroxy substituted compounds (**52-55**) were inactive. Antiproliferative effects on MCF-7 cells could not be observed even at concentrations above 20 μM . The absence of a halogen substituent in the *ortho* position causes them a loss of ER α , β affinity.

4-Fluorine substituted dimers (**60-63**) were investigated for cytotoxicity and cell uptake at hormone dependent MCF-7 mammary carcinoma cells. They showed strong cytotoxic effects. Their IC₅₀-values are in an upper nanomolar range [IC₅₀: **60**

8 Summary and Outlook

(630 nM) > **61** (430 nM) > **62** (260 nM) > **63** (240 nM)]. With rising chain length this effect increased. This correlates with a very strong cellular accumulation. The 2-imidazoline monomer **42** with fluorine substitution in *para* position however showed neither cytotoxic effect nor a high cellular uptake. The cellular enrichment was assessed with a new-developed method, the high resolution continuum source atom absorption spectroscopy. An accumulation grade of 219 could be observed with compound **61** after 60 minutes incubation of the cells with 2 μ M. The effect becomes more potent with rising chain length. After the same incubation time for compound **62** cell admission increased an accumulation grade of 275. Furthermore an accumulation grade of 412 has been observed for compound **63** after 40 minutes of incubation. Nevertheless, it has not become clear whether the high degrees of enrichment from **61-63** are intracellular or whether they accumulate only on the cell membrane. Because no pharmacological test system of the membrane bounded GPR30 receptor exists, the participation in the cell admission could not be proven so far.

However, one possible evidence on intracellular enrichment can be delivered through investigations with cellular uptake inhibitors. In presence of methyl- β -cyclodextrine (M- β -CD) a strong reduction of cell admission of **63** could be observed. The intracellular fluorine concentration has been reduced to 56 % which is almost half of the control value. The influence of M- β -CD might indicate a caveolin-dependent endocytosis of this substance.

Selected dimers, **54**, **62** and **66** were tested for stability in PBS (pH = 7.4, 37 °C). They showed a good stability over 96 hours and can be found soluted in the cell medium. Its saturation solubility was 670 μ M (**54**), 380 μ M (**62**) and 190 μ M (**66**). Their pK_a values equal approximately 9, so that they are protonated in the cell medium to 97.61 % (pH = 7.4).

Previous works documented that monomers with *N*-alkylation compared to unsubstituted and *C2*-alkylated 2-imidazolines increase their agonistic effects on ER subtypes. Hence, investigations of their dimers at U2OS cells for possible luciferase expression and molecular modeling studies for clarification interactions with the estrogen receptor seem to be interesting for possible luciferase expression.

9

Experimenteller Teil

9.1 Allgemeine Angaben von Chemikalien und Geräten des synthetischen und analytischen Teils

9.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich, Fluka, abcr, VWR, Alfa Aesar, Lancaster, Merck und J.T.Baker.

9.1.2 Geräte

Allgemein:

Kryostat EK90	ThermoScientific
Kühlschrank Profiline Taurus	Nationallab GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries
FLASHScan S12	Analytikjena
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	IKA-Werk
Thermomixer	Eppendorf
Membran-Vakuumpumpe	Vakuubrand
Ultraschallbad eurolab	Merck
Ultraschallbad Bandalin sonorex TK52	Bandelin
SG-Labostar 2-DI/-UV für Aqua bidest.	SG

Schmelzpunktbestimmung:

Für die Bestimmung der Schmelzpunkte kamen zwei unterschiedliche Schmelzpunktapparaturen zum Einsatz. Neben dem Melting Point B-545 von Büchi kam auch der Melting-Point Meter KSP II von Krüss&Optronic zur Verwendung. Die gesamten Schmelzpunkte der Verbindungen sind unkorrigiert.

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$):

Alle Spektren wurden mit dem Gerät Avance/DPX 400 von Bruker Analytische Messtechnik GmbH aufgenommen. Alle Spektren dieser Arbeit wurden bei 400 MHz vermessen. Die zum Einsatz gekommenen deuterierten Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben. Tetramethylsilan (TMS) diente stets als interner Standard. Die chemische Verschiebung ist jeweils in ppm angegeben und geben die Verschiebung gegenüber TMS wieder. Mit dem schweren Wasser D_2O wurde der Austausch vorgenommen. Für die Zuordnung der Signale sind folgende Abkürzungen verwendet worden:

- s Singulett
- d Dublett
- dd Doppeldublett (Dublett vom Dublett)
- t Triplett
- q Quartett
- quin Quintett
- m Multiplett
- br broad (breite Bandenform)
- ^nJ Betrag der Kopplungskonstante über n Bindungen
- $^n\text{J}(\text{H}, \text{X})$ Kopplung über einen Kern X, der kein Proton ist

Massenspektroskopie (MS):

Es wurden verschiedene Massenspektroskopieverfahren benutzt. Mit einem CH-7A-Varian MAT (70eV) wurden Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI-MS) aufgenommen. Mit dem Agilent 6210 ESI-TOF von Agilent Technologies konnten Elektrospray-Ionisations-Flugzeit-Massenspektren (ESI-TOF; 4 $\mu\text{L}/\text{min}$: 4 kV) aufgenommen werden. Bei jeder Verbindung sind jeweils die Verdampfungstemperatur und die Signalintensität angegeben.

Elementaranalyse (CHN):

Die Elementaranalysen wurden an dem Vario EL von Elementar, Hanau durchgeführt.

Säulenchromatographie:

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 der Korngröße 0.063-0.1 mm der Firma Merck verwendet. Die verwendeten Fließmittel sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden Dünnschichtplatten von Merck eingesetzt, die mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtet waren. Die Detektion erfolgte bei 254 bzw. bei 366 nm. Hierbei fand die UV-Lampe der Firma Lamag ihre Anwendung.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Für analytische Zwecke wurde folgende HPLC mit seinen einzelnen Bestandteilen von Kontron Instruments verwendet:

Autosampler	HPLC Autosampler 465
Pumpen	HPLC Pump 422
Ofen	Column Oven 480
Detektor	Detector 430A

UV/VIS-Spektroskopie (UV/Vis):

Zur Bestimmung von Absorptionswerten wurde das Gerät UV-2101PC von Shimadzu verwendet.

9.2 Synthesevorschriften und analytische Daten

9.2.1 2-Halo-4-methoxybenzaldehyde

9.2.1.1 Synthese nach Olah und Arvanaghi

0.11 mmol des 3-Fluoranisols werden in 200 ml frisch absolutiertem THF gelöst und auf -80 °C runtergekühlt. Vorsichtig werden 110 ml einer 2.5 molaren n-Buthyllithium-Lösung in Hexan zugetropft und dabei stark gerührt. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Temperatur nicht über -50 °C steigt. 3 Stunden später wird sehr langsam 110 mmol *N*-Formylpiperidin zugetropft und nach beendeter Zugabe eine weitere Stunde bei -80 °C stark gerührt und anschließend über Nacht auf Raumtemperatur gebracht.

Unter Kühlung wird Eis zugegeben und die entstandene Suspension mit konzentrierter HCl versetzt, bis eine klare Lösung vorliegt. Die organische Phase wird abgetrennt, erst mit HCl_{conc}, dann dreimal gegen H₂O ausgeschüttelt.

Die wässrige Phase wird dreimal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt und alle organischen Phasen vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel eingeeengt. Das dunkelorange Öl wird erst mit Petrolether/Dichlormethan (10+1), dann mit Dichlormethan/Petrolether (2+1) chromatographisch gereinigt.

2-Fluor-4-methoxybenzaldehyd (2)

Aus 0.11 mol (16.52 g) 3-Fluoranisol:

Ausbeute: 6 mmol (0.88 g), 5.2 %

C₈H₇FO₂ (154.14 g/mol)

weiße Nadeln; Schmelzpunkt: 60.6 °C

¹**H-NMR**_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 3.94 (s, 3H, OCH₃); 7.15 (dd, ³J(H, F) = 12.4 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, ArH-3); 6.9 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, ArH-5); 7.76 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J(H, F) = 8.4 Hz, 1H, ArH-6); 10.26 (s, 1H, ArCHO).

9.2.1.2 Synthese nach Bai und Fanghänel

0.053 mol des korrespondierenden 3-Haloanisols werden in 100 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter starkem Rühren werden erst 0.18 mol Titan(IV)-Chlorid und anschließend sehr langsam 0.11 mol Dichlormethylmethylether innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird eine weitere Stunde bei gleicher Temperatur stark gerührt.

Nach Hydrolyse durch Eiszugabe wird die organische Phase abgetrennt und die wässrige dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen werden einmal gegen Wasser ausgeschüttelt, nach Trennung mit Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt.

Das Rohprodukt wird erst säulenchromatographisch mit Dichlormethan eluiert, um das Konstitutionsisomerenmisch vom Edukt und anderen Verunreinigungen zu trennen. Anschließend wird mehrmals entweder mit Ligroin, Isopropanol oder Ethanol umkristallisiert.

2-Fluor-4-methoxybenzaldehyd (2)

Aus 0.053 mol (6.7 g) 3-Fluoranol:

Die Umkristallisation erfolgt aus Ligroin.

Ausbeute: 0.009 mol (1.38 g), 17 %

Alle analytischen Daten sind bereits angegeben.

2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd (6)

Aus 0.053 mol (7.6 g) 3-Chloranol:

Die Umkristallisation erfolgt aus Ligroin.

Ausbeute: 0.0165 mol (2.8 g), 31 %

C₈H₇ClO₂ (170 g/mol)

weiße feine Nadeln; Schmelzpunkt: 63.3-64.4 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.89 (s, 3H, OCH_3), 7.08 (dd, 1H, $^3\text{J} = 8.7\text{ Hz}$ und $^4\text{J} = 2.2\text{ Hz}$, Ar-H), 7.19 (d, 1H, $^4\text{J} = 2.2\text{ Hz}$, Ar-H), 7.83 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.7\text{ Hz}$, Ar-H), 10.20 (s, 1H, CHO).

2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd (9)

Aus 0,14 mol (25g) 3,5-Dichloranisol:

Zur Umkristallisation wird wahlweise Isopropanol oder Ethanol verwendet.

Ausbeute: 0.015 mol (8,59 g), 10.7 %

$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_2$ (205.04 g/mol)

feine weiße Nadeln; Schmelzpunkt: 116 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 3.88 (s, 3H, OCH_3), 6.92 (s, 2H, Ar-H), 10.42 (s, 1H, CHO).

9.3 Synthese des 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyds über mehrere Stufen: Friedel-Crafts-Acylierung, Haloform-Reaktion, LiAlH_4 -Reduktion, Oxidation mit Braunstein

9.3.1 Synthese des 2-Chlor-4-methoxyacetophenon - Friedel-Crafts-Acylierung

0.75 mol (100 g) Aluminiumchlorid werden in 750 ml absolutem Dichlormethan suspendiert, heftig gerührt, 0.5 mol (71.3 g) des 3-Chloranisols zugetropft und mit Hilfe eines Eisbad auf 0-5 °C gekühlt. Sehr vorsichtig wird 0.5 mol (47.3 ml) Acetanhydrid zugetropft. Beim Zutropfen ist darauf zu achten, dass die Temperatur nicht über 5 °C ansteigt. Anschließend wird der dunkelrote Ansatz weiter bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Die Reaktion beendet man durch Hydrolyse mit Eis. Mit Dichlormethan schüttelt man den gelben Ansatz aus. Die vereinigten organischen Phasen werden erst mit 2 N NaOH, dann mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und bei niedrigem Druck das Lösungsmittel abdestilliert. Das Rohprodukt wird ohne Aufreinigung weiter verwendet.

2-Chlor-4-methoxyacetophenon (3)

Aus 0.5 mol (71.3 g) 3-Chloranisol:

Ausbeute: 0.3 mol (56.14 g), 60 %

$C_9H_9ClO_2$ (184.62 g/mol) als Konstitutionsisomerengemisch

olivgrünes Öl

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ ($CDCl_3$): δ [ppm] = 2.50-2.90 (m, 3H, CH_3CO); 3.60-4.20 (m, 3H, OCH_3); 6.70-7.30 (m, 2H, $ArH-3$, $ArH-5$); 7.60-8.00 (m, 1H, $ArH-6$).

9.3.2 Synthese der 2-Chlor-4-methoxybenzoesäure - Bromoform-Reaktion

Es werden zunächst 900 ml einer zwei molaren Natronlauge hergestellt (120 g NaOH in 900 ml Wasser). Zu dieser wird langsam 0.9 mol (143.83 g) elementares Brom zugetropft. Dabei darf die Temperatur nicht über 10 °C ansteigen. 0.3 mol (55.4 g) des Konstitutionsisomerengemisches von 2-Chlor-Acetophenon **3** werden zunächst in 200 ml Dioxan gelöst und langsam zur gelben wässrigen Lösung zugetropft. Nach vollendeter Zugabe rührt man heftig 1 Stunde weiter. Anschließend gibt man 10 g Na_2SO_3 zum Ansatz, um noch vorhandenes Brom zu reduzieren.

Das entstandene Bromoform wird abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit 37 %iger HCl solange angesäuert, bis kein weißer Niederschlag mehr ausfällt. Hierbei handelt es sich um das Isomerengemisch der 2-Chlor-Benzoesäuren. Diese werden abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen.

Das Konstitutionsisomerengemisch wird in Ethanol umkristallisiert. Die gewünschte 2-Chlor-4-methoxybenzoesäure fällt aus, das unerwünschte Isomer bleibt in Lösung.

2-Chlor-4-methoxybenzoesäure (4)

Aus 0.3 mol (55.4 g) des Konstitutionsisomerengemisches **3**.

Ausbeute: 0.2 mol (37.5 g), 67 %

$C_8H_7ClO_3$ (186.59 g/mol)

farbloses Pulver; Schmelzpunkt: 213.5 °C

1H -NMR_{400 MHz} ([Aceton-D₆]): δ [ppm] = 3.83 (s, 3H, OCH₃); 6.98 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, ArH-5); 7.82 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 1H, ArH-3); 7.09 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, ArH-6); 13 (s, 1H, COOH, austauschbar).

9.3.3 Synthese des 2-Chlor-4-methoxybenzylalkohols - LiAlH₄-Reduktion

0.4 mol (16.07 g) an frischem LiAlH₄ werden vorsichtig unter Eiskühlung in 500 ml absolutiertem Diethylether suspendiert. In kleinen Portionen werden insgesamt 0.2 mol (37.5 g) der 2-Chlor-4-methoxybenzoesäure **4** zugegeben. Es ist darauf zu achten, dass der Ether nicht anfängt zu sieden. Nach Beendigung rührt man ebenfalls unter Eiskühlung zunächst eine weitere Stunde, dann 1.5 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird der Ansatz für 4h refluxiert. Nach Erkalten wird zur Hydrolyse des Ansatzes Eis zugegeben. Der Niederschlag wird abgesaugt und mehrmals mit Diethylether und Dichlormethan gewaschen. Sämtliche organischen Phasen werden gesammelt und nach Trocknen mit Na₂SO₄ am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird zuerst mit Petrolether/Diethylether (4+1), anschließend mit Diethylether/Petrolether (2+1) gesäult.

2-Chlor-4-methoxybenzylalkohol (5)

Aus 0.2 mol (37.5 g) 2-Chlor-4-methoxybenzoesäure **4**:

Ausbeute: 0.064 mol (11.09 g), 32.12 %

$C_8H_9ClO_2$ (172.61 g/mol)

gelboranges Öl

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (CDCl_3): $\delta[\text{ppm}] = 2.13$ (s, 1H, CH_2OH , austauschbar); 3.81 (s, 3H, OCH_3); 4.71 (s, 2H, CH_2OH); 6.82 (dd, $^3\text{J} = 8.5\text{ Hz}$, $^4\text{J} = 2.5\text{ Hz}$, 1H, ArH-5); 6.94 (d, $^4\text{J} = 2.5\text{ Hz}$, 1H, ArH-3); 7.36 (d, $^3\text{J} = 8.5\text{ Hz}$, 1H, ArH-6).

9.3.4 Synthese des 2-Chlor-4-methoxybenzaldehydes - Oxidation mit Braunstein

20 g aktiv gefällter Braunstein werden unter Rückfluss in 300 ml Toluol 2h lang gekocht und nach Abkühlen 0.064 mol (11.09 g) 2-Chlor-4-methoxybenzylalkohols **5** zugesetzt und weitere 100 ml zum Ansatz gegeben. Dieser Ansatz wird für 24 h refluxiert. Mit Hilfe von DC-Proben (Dichlormethan/Petrolether [2+1]) wird in mehreren Zeitabständen der Verlauf der Reaktion verfolgt. Nach Erkalten der Reaktion wird der schwarze Rückstand abfiltriert und dreimal mit Toluol gewaschen. Das gelbe Filtrat trocknet man über Na_2SO_4 und engt vorsichtig das Lösungsmittel ein.

2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd (**6**)

Aus 0.064 mol (11.09 g) 2-Chlor-4-methoxybenzylalkohol **5**:

Nach der Synthese liegt das Produkt analysenrein vor.

Ausbeute: 0.06 mol (10.19 g), 91.9 %

Die analytischen Daten liegen bereits vor.

9.4 Synthese des 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd nach Karl

9.4.1 Vorschriften

Die Synthese zum gewünschten Endprodukt erfolgt in einigen Teilschritten. Für jede der Teilschritte sind die dafür vorgesehene Durchführungen und die analytischen Daten ihrer Zwischenprodukte angegeben.

2,6-Dichlor-4-methoxybenzylchlorid (7)

0.141 mol (25 g) 3,5-Dichloranisol werden zusammen mit 0.25 mol (7.575 g) Paraformaldehyd zu einer Mischung aus 375 ml $\text{HCl}_{\text{conc.}}$ und 3.8 ml $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{conc}}$ gegeben und bei 80 °C heftig für 7 h unter Rückfluss gerührt. Nach Erkalten wird der Ansatz in den Scheidetrichter überführt und die ölige organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase schüttelt man gegen Dichlormethan aus. Die erste organische Phase wird einmal gegen Wasser ausgeschüttelt. Alle organischen Phasen werden nun gesammelt, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel eingedampft.

2,6-Dichlor-4-methoxybenzylalkohol (8)

Ohne weitere Aufreinigung wird das erhaltene gelbe Öl, das Konstitutionsisomerenmisch der Benzylchloride **7**, in einer Mischung aus 133 ml Dioxan, 133 ml H_2O und 133 ml 2 N NaOH suspendiert und für 3 h refluxiert. Nach der Reaktion wird der Ansatz in den Scheidetrichter überführt und man trennt zunächst die ölige Phase ab. Die wässrige Phase wird dreimal mit Dichlormethan behandelt. Die Anfangs abgetrennte ölige Phase wird mit Wasser gewaschen und mit der organischen Phase vereint. Durch Zugabe von Chloroform fällt das Disubstitutionsprodukt aus, welches abfiltriert wird. Das Filtrat wird mit Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und eingeeengt.

Das gelbe Öl wird säulenchromatographisch gereinigt. Hierzu verwendet man ein Gemisch aus Diethylether und Petrolether (1+1).

Ausbeute: 0.168 mol (34.8 g), 30 %

$\text{C}_8\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (207.06 g/mol)

farblose Nadeln; Schmelzpunkt: 78-79 °C

$^1\text{H-NMR}_{400 \text{ MHz}}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1.95 (t, $^3\text{J} = 6.6 \text{ Hz}$, 1H, CH_2OH , austauschbar); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 4.92 (d, $^3\text{J} = 6.6 \text{ Hz}$, 2H, ArCH_2OH); 6.88 (s, 2H, ArH).

2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd (9)

Zur Oxidation des 2,6-Dichlor-4-methoxybenzylalkohols **8** mit aktiviertem Braunstein in Toluol wird analog der Oxidation des 2-Chlor-4-methoxybenzalkohols **5** verfahren.

Aus 0.168 mol (34.8 g) 2,6-Dichlor-4-methoxybenzylalkohol **8**: Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Methanol.

Ausbeute: 0.105 mol (18.0 g), 63 %

Die Angaben zur Aufreinigung und zu den analytischen Daten sind bereits angegeben.

9.5 Synthese der verschieden substituierten *meso*-1,2-Diarylethylendiamine

9.5.1 *meso*-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin (13)

meso-1,2-Diamino-*N,N'*-dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan (11)

2.4 mol (501.1 g) Benzil werden zunächst in 2 Liter Ethanol zum Lösen gebracht und auf 70 °C erwärmt. Sobald sich alles komplett gelöst hat, bringt man den Ansatz auf 50 °C. Nun werden 4.8 mol (582.5 g) Salicylaldehyd zugegeben. Nach beendeter Zugabe wird sehr vorsichtig über einen Zeitraum von 30 Minuten 500 ml einer 24 %igen Ammoniumhydroxid-Lösung zum Ansatz getropft und dabei heftig gerührt. Im Anschluß wird bei gleicher Temperatur zwei weitere Stunden erwärmt. Der entstandene voluminöse Niederschlag wird nach Erkalten der Reaktion abgesaugt und mehrmals mit kaltem Ethanol gewaschen. Zum Trocknen wird das Produkt **11** im Trockenschrank bei 100 °C getrocknet und anschliessend im Exsikkator aufbewahrt.

Ausbeute: 1.7 mol (774.22 g), 71 %

$C_{28}H_{24}N_2O_4$ (452.51 g/mol)

gelbes Pulver; Schmelzpunkt: 377.3 °C unter Zersetzung

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.87 (s, 2H, ArCH); 6.65-6.80 (m, 4H, ArH); 6.95-7.05 (m, 2H, ArH); 7.35-7.70 (m, 12H, ArH); 8.54 (s, 2H, CONH, austauschbar); 9.93 (s, 2H, ArOH, austauschbar).

***meso-O,O',N,N'*-Tetraacetyl-1,2-diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan (12)**

1.77 mol (797.93 g) des Eduktes **11** werden in 2.5 Liter frisch absolutiertem Acetanhydrid suspendiert und für 2 d unter Rückfluss erhitzt. Nach Abstoppen der Reaktion wird sehr langsam auf Raumtemperatur runtergekühlt. Anschließend wird die schwarze Suspension abgesaugt und solange mit eiskaltem Acetanhydrid gewaschen, bis der Rückstand eine weißgraue Farbe annimmt. Zum Abdampfen des restlichen Lösungsmittels im Rückstand wird dieser über Nacht offen im Abzug stehen gelassen.

Ausbeute: 0.8 mol (329.05 g), 45.2 %

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ (412.44 g/mol)

weißgraues feines Pulver; Schmelzpunkt: 225.6-229.5 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 1.75 (s, 6H, CH_3CON); 2.41 (s, 6H, CH_3COOAr); 5.58 (s, 2H, ArCH); 6.40 (s, 2H, NH, austauschbar); 7.0-7.40 (m, 8H, ArH).

meso-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin (13)

0.8 mol (329.05 g) an *meso-O,O',N,N'*-Tetraacetyl-1,2-diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **12** werden in 2 Liter einer 47 %igen HBr für 4 h unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird auf Raumtemperatur gekühlt und der graue Niederschlag vorsichtig abgesaugt und einige Male mit Eiswasser gewaschen. Falls an dieser Stelle in der Mutterlauge erneut ein Niederschlag ausfällt, wird dieser ebenfalls abgesaugt und zum ersten Rückstand addiert. Andernfalls wird die klare Mutterlauge solange mit 40 %iger Natronlauge behandelt, bis sich kein Niederschlag mehr bildet. Dieser wird ebenfalls abgesaugt und zu den vorherigen Rückständen hinzugefügt.

9 Experimenteller Teil

Alle vereinigten Rückstände werden in 70-80 °C heißem Wasser in Lösung gebracht. Die saure Lösung kühlt man ab und versetzt sie mit 40 %iger Natronlauge, bis sich der pH-Wert 9 eingestellt hat. Hierbei fällt die freie Base **13** aus. Die Lösung stellt man anschließend in den Kühlschrank, damit das Produkt **13** komplett ausfällt. Anschließend wird der Rückstand abfiltriert und mehrmals mit H₂O gewaschen, bei 100 °C im Trockenschrank getrocknet und im Exsikkator über P₂O₅ gelagert.

Ausbeute: 0.61 mol (147.8 g), 76.3 %

C₁₄H₁₆N₂O₂ (244.29 g/mol)

farbloses Pulver; Schmelzpunkt.: 180-184 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 3.35 (s, br, 4H, NH₂, austauschbar); 4.19 (s, 2H, ArCH); 5.30 (s, br, 2H, ArOH, austauschbar); 6.66 (m, 2H, ArH); 6.72 (m, 2H, ArH); 6.97 (m, 2H, ArH); 7.05 (m, 2H, ArH).

9.5.2 Synthese der *meso*-3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)- 2,5-diazahexa-1,5-diene

Allgemeine Vorschrift:

Verbindung **13** wird mit den jeweiligen Benzaldehyden (R= 4-OH; 3-MeO; 4-MeO; 4-F; 2-F-4-MeO; 2-Cl-4-MeO; 2-Cl-4-OH; 2,6-Cl₂-4-OH; 2,6-Cl₂-4-MeO) in 100 ml Acetonitril suspendiert und unter Reflux zur Reaktion gebracht. Bei den jeweiligen Verbindungen ist die eingesetzte Menge an **13** angegeben. Die Reaktionszeit unterscheidet sich. In Abhängigkeit des jeweiligen Substitutionsmuster des eingesetzten Benzaldehyden beträgt diese zwischen 1 und 48 Stunden.

Nach beendeter Reaktion wird der Ansatz auf Raumtemperatur runtergekühlt, vorsichtig das Lösungsmittel bis auf die Hälfte einrotiert und der Ansatz in den Kühlschrank gestellt, damit das Produkt über Nacht ausfällt. Der zitronengelbe Niederschlag wird abgesaugt, mit eiskaltem Diethylether gewaschen und über P₂O₅ getrocknet.

9 Experimenteller Teil

Bei allen Ansätzen wurde das jeweilige Produkt nicht aus seinem Ansatz isoliert, sondern wurde in einer Eintopfsynthese für den folgenden Syntheseschritt weiter verwendet. Es sind daher nur Reaktionszeiten angegeben. Die analytischen Daten sind nicht angegeben. Nur beim *meso*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-methoxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien **17** wurde zusätzlich die Wasserdampfdestillation angewendet. Alle Produkte haben jeweils eine zitronengelbe Farbe.

***meso*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(3-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (14)**

Aus 0.0082 mol (2 g) **13** und 0.0164 mol (2 g) 3-Hydroxybenzaldehyd:

Die Reaktionszeit beträgt 5 h.

***meso*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (15)**

Aus 0.0043 mol (1.05 g) **13** und 0.0086 mol (1.05 g) 4-Hydroxybenzaldehyd:

Die Reaktionszeit beträgt 36 h. Ohne Aufarbeitung wurde der Ansatz durch HCl_{conc}-Zugabe für die nächste Stufe verwendet.

***meso*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(3-methoxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (16)**

Aus 0.027 mol (6.6 g) **13** und 0.054 mol (9.8 g) 3-Methoxybenzaldehyd:

Die Reaktionszeit beträgt 24 h. Ohne Aufarbeitung wurde der Ansatz durch HCl_{conc}-Zugabe für die nächste Stufe verwendet.

***meso*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-methoxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (17)**

Aus 0.14 mol (34 g) **13** und 0.28 mol (38 g) 4-Methoxybenzaldehyd:

9 Experimenteller Teil

Die Reaktionszeit beträgt 30 h. Das entstandene Produkt wurde entweder für die Wasserdampfdestillation isoliert oder wurde ohne Aufarbeitung mit HCl_{conc} versetzt.

Ausbeute: 61.25 %

$\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ (480.55 g/mol)

zitronengelbes Pulver; Schmelzpunkt: 199-201 °C

$^1\text{H-NMR}_{400 \text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.7 (s, 6H, OCH_3); 4.98 (s, 2H, ArCHN); 6.86-7.23 (m, 16H, ArH , $\text{Ar}'\text{H}$); 8.43 (s, 2H, ArCH=N); 13.26 (s, 2H, ArOH).

meso-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-fluorphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (18)

Aus 0.08 mol (19.5 g) **13** und 0.16 mol (19.86 g) 4-Fluorbenzaldehyd:
Die Reaktionszeit beträgt 48 h. Ohne Isolierung des ausgefallenen Produktes wurde HCl_{conc} für den weiteren Syntheseschritt zugesetzt.

meso-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (19)

Aus 0.016 mol (3.9 g) **13** 0.032 mol und (4.9 g) 2-Fluor-4-methoxybenzaldehyd:

Die Reaktionszeit beträgt 30 h. Ohne Isolierung des ausgefallenen Produktes wurde HCl_{conc} für den weiteren Syntheseschritt zugesetzt.

meso-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (20)

Aus 0.0032 mol (0.8 g) **13** und 0.0064 mol (1 g) 2-Chlor-4-hydroxybenzaldehyd:
Die Reaktionszeit beträgt 2 h. Ohne Isolierung des ausgefallenen Produktes wurde HCl_{conc} für den weiteren Syntheseschritt zugesetzt.

***meso*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (21)**

Aus 0.002 mol (0.5 g) **13** und 0.004 mol (0.68 g) 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd:

Die Reaktionszeit beträgt 12 h. Ohne Isolierung des ausgefallenen Produktes wurde HCl_{conc} für den weiteren Syntheseschritt zugesetzt.

***meso*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (22)**

Aus 0.0026 mol (0.64 g) **13** und 0.0052 mol (1 g) 2,6-Dichlor-4-hydroxybenzaldehyd:

Die Reaktionszeit beträgt 1 h. Ohne Isolierung des ausgefallenen Produktes wurde HCl_{conc} für den weiteren Syntheseschritt zugesetzt.

***meso*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (23)**

Aus 0.008 mol (1.95 g) **13** und 0.016 mol (3.3 g) 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd:

Die Reaktionszeit beträgt 12 h. Ohne Isolierung des ausgefallenen Produktes wurde HCl_{conc} für den weiteren Syntheseschritt zugesetzt.

9.5.3 Darstellung der *meso*-1,2-Diarylethylendiamine aus 3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dienen

Allgemeine Vorschrift:

Die verschieden substituierten *meso*-1,2-Diarylethylendiamine werden direkt aus den jeweiligen Ansätzen, in der sich die Verbindungen **14-23** in Acetonitril bilden, im Sinne einer Eintopfsynthese gewonnen. Dazu gibt man direkt zu den Ansätzen konzentrierte HCl im Verhältnis 1:4 zu der Menge an Acetonitril. Anschließend erhitzt man zwei bis vier weitere Stunden unter Rückfluss oder rührt den Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur. Die Verbindung **19** lässt sich nur in der Siedehitze spalten.

9 Experimenteller Teil

Nach erfolgter Spaltung entstehen grau bis beige Suspensionen. Die jeweiligen Niederschläge sind die Hydrochloride der entsprechenden *meso*-1,2-Diarylethylendiamine. Diese saugt man ab und wäscht mehrmals mit Acetonitril. Die Rückstände löst man in 70-80 °C heißem Wasser, eventuell wird heiß filtriert. Nach Erkalten werden die freien Basen **25-34** durch Zutropfen 40 %iger Natronlauge ausgefällt. Unter Umständen ist je nach Substitutionsmuster darauf zu achten, dass der pH-Wert nicht größer als 9 ist. Im Anschluss wird der Ansatz zur kompletten Ausfällung für eine Stunde in den Kühlschrank gestellt, danach abfiltriert, der Rückstand mehrmals mit Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei 100 °C getrocknet. Die auf diese Weise synthetisierten Verbindungen liegen analysenrein vor und bedürfen keiner weiteren Aufreinigung.

Verbindung **24** konnte nur durch eine Methoxyspaltung mit BBr_3 von **26** erhalten werden. Zwar ließ sich die Vorstufe **14** synthetisieren, jedoch versagte hier die saure Spaltung in Acetonitril zum *meso*-1,2-Diarylethylendiamine **24**. Auch die Verbindung **29** wurde durch eine Methoxyspaltung von **30** dargestellt, da der nötige 2-Fluor-4-hydroxybenzaldehyd nicht käuflich zu erwerben war, sondern nur der 2-Fluor-4-methoxybenzaldehyd zur Verfügung stand. Die Methoxyspaltungen von **26** und **30** werden im folgenden **Kapitel 9.5.4** besprochen.

Die Wasserdampfdestillation wird nur bei der Darstellung von **27** neben der oben vorgestellten Methode angewendet. Dabei wird die Verbindung **17** in 300 ml 3 N H_2SO_4 suspendiert und zum Sieden erhitzt. Der abgespaltene Salicylaldehyd wird mittels einer Wasserdampfdestillation aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Die Reaktionszeit beträgt hierbei 4 h. Nach dieser Zeit wird mit der DC-Platte überprüft, ob noch Salicylaldehyd aus dem Ansatz freigesetzt wird. Eventuell wird noch weitere 2 h destilliert und danach die Reaktion beendet. Der heiße Ansatz wird mittels Eiswasser gekühlt und mit 40 %iger NaOH auf den pH-Wert 14 gebracht. Die freie Base fällt aus. Zur vollständigen Ausfällung stellt man den Ansatz für eine Stunde in den Kühlschrank und saugt den Niederschlag ab, wäscht ihn mit viel Wasser und trocknet das Produkt **27** im Trockenschrank bei 100 °C. Falls nötig, wird mit Ethanol umkristallisiert.

meso-1,2-Bis(3-hydroxyphenyl)ethylendiamin (24)

Darstellung durch Methylyspaltung von **26**. Die analytischen Daten sind im **Kapitel 9.5.4** angegeben.

meso-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin (25)

Aus **15** durch Rühren in salzsaurem Acetonitril bei Raumtemperatur oder Aufkochen für 4 h.

Ausbeute: 0.001 mol (0.25 g), 41.7 %

$C_{14}H_{16}N_2O_2$ (244.29 g/mol)

beigegraues Pulver; Schmelzpunkt: 205.4 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.4 (s, 4H, NH_2 , austauschbar); 3.7 (s, 2H, ArCH); 6.63 (d, AA'BB', $^3J = 8.6$ Hz, 4H, ArH-3, ArH-5); 7.03 (d, AA'BB', $^3J = 8.6$ Hz, 4H, ArH-2, ArH-6); 9.24 (s, 2H, ArOH, austauschbar).

meso-1,2-Bis(3-methoxyphenyl)ethylendiamin (26)

Aus **16** durch Rühren in salzsaurem Acetonitril bei Raumtemperatur oder Aufkochen für 4 h.

Ausbeute: 0.0195 mol (5.35 g), 72.23 %

$C_{16}H_{20}N_2O_2$ (272.34 g/mol)

graues Pulver; Schmelzpunkt: 123.9 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.56 (b, 4H, NH_2 , austauschbar); 3.67 (s, 6H, OCH_3); 3.86 (s, 2H, ArCH); 6.74 (dd, 2H, ArH-6); 6.76 (d, 2H, ArH-4); 6.8 (s, 2H, ArH-2); 7.16 (t, 2H, ArH-5).

meso-1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin (27)

Aus **17** durch Rühren in salzsaurem Acetonitril bei Raumtemperatur oder Aufkochen für 4 h. Alternativ über eine 4-6 h dauernde Wasserdampfdestillation.

Ausbeute (Acetonitril/HCl): 0.029 mol (7.96 g), 96 %

Ausbeute (Wasserdampfdestillation): 0.0067 mol (1.83 g), 68.37 %

$C_{16}H_{20}N_2O_2$ (272.34 g/mol)

weißgraues Pulver ; Schmelzpunkt: 149-151 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.46 (s, 4H, NH_2 , austauschbar); 3.72 (s, 6H, OCH_3); 3.79 (s, 2H, ArCH); 6.81 (d, AA'BB', $^3J = 8.6$ Hz, 4H, ArH-3, ArH-5); 7.12 (d, AA'BB', $^3J = 8.7$ Hz, 4H, ArH-2, ArH-6).

meso-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin (28)

Aus **18** durch Rühren in salzsaurem Acetonitril bei Raumtemperatur oder Aufkochen für 4 h.

Ausbeute: 0.077 mol (19.13 g), 94 %

$C_{14}H_{14}F_2N_2$ (248.47 g/mol)

weißgraues Pulver ; Schmelzpunkt: 98.2 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.67 (s, 4H, NH_2 , austauschbar); 3.92 (s, 2H, ArCH); 7.02 (t, AA'BB', $^3J = 8.9$ Hz, 4H, ArH-3, ArH-5); 7.12 (t, AA'BB', $^3J = 8.83$ Hz, 4H, ArH-2, ArH-6).

meso-1,2-Bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin (29)

Darstellung durch Methylspaltung von **30**. Die analytischen Daten sind im **Kapitel 9.5.4** angegeben.

meso-1,2-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin (30)

Aus **19** durch Spaltung in einer Mischung aus Acetonitril/HCl_{conc} (4+1). Produkt bildet sich nur in der Siedehitze unter Reflux in 4h.

Ausbeute: 0.011 mol (3.35 g), 68.75 %

C₁₆H₁₈F₂N₂O₂ (308.33 g/mol)

beigefarbenes Pulver; Schmelzpunkt: 127.2 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.76 (s, 4H, NH₂, austauschbar); 3.72 (s, 6H, OCH₃); 4.23 (s, 2H, ArCH); 6.6 (dd, ³J(H, F) = 12.3 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 2H, ArH-3); 6.65 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 2H, ArH-5); 7.2 (dd, ³J = 8.7 Hz, ⁴J(H,F) = 8.6 Hz, 2H, ArH-6).

meso-1,2-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin (31)

Aus **20** durch Rühren in salzsaurem Acetonitril bei Raumtemperatur oder Aufkochen für 4 h.

Ausbeute: 0.0025 mol (0.79 g), 78.8 %

C₁₄H₁₄Cl₂N₂O₂ (313.18 g/mol)

farbloses Pulver; Schmelzpunkt: 117.8 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.80 (s, 4H, NH₂, austauschbar); 4.38 (s, 2H, ArCH); 6.59-6.61 (m, 4H, ArH-3, ArH-5); 7.19 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, ArH-6); 9.58 (s, 2H, OH, austauschbar).

meso-1,2-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin (32)

Aus **21** durch Rühren in salzsaurem Acetonitril bei Raumtemperatur oder Aufkochen für 4 h.

Ausbeute: 0.014 mol (4.76 g), 77.8 %

C₁₆H₁₈Cl₂N₂O₂ (341.23 g/mol)

9 Experimenteller Teil

farbloses Pulver; Schmelzpunkt: 183.1 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.84 (s, 4H, NH_2 , austauschbar); 3.72 (s, 6H, OCH_3); 4.46 (s, 2H, ArCH); 6.78-6.81 (m, 4H, ArH-3 , ArH-5); 7.19 (d, $^3\text{J} = 8.5\text{ Hz}$, 2H, ArH-6).

meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin (33)

Aus **22** durch Rühren in salzsaurem Acetonitril bei Raumtemperatur oder Aufkochen für 4 h.

Ausbeute: 0.0021 mol (0.8 g), 80.5 %

$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (382.07 g/mol)

farbloses Pulver; Schmelzpunkt: 277.4-278.4 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.87 (s, 4H, NH_2 , austauschbar); 5.11 (s, 2H, ArCH); 6.81 (d, $^3\text{J} = 2.47\text{ Hz}$, 2H, ArH); 6.82 (d, $^3\text{J} = 2.47\text{ Hz}$, 2H, ArH'); 10.2 (s, 2H, OH , austauschbar).

meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin (34)

Aus **23** durch Rühren in salzsaurem Acetonitril bei Raumtemperatur oder Aufkochen für 4 h.

Ausbeute: 0.0055 mol (2.24 g), 68.75 %

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (410.12 g/mol)

farbloses Pulver; Schmelzpunkt: 207.2 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.95 (s, 4H, NH_2 , austauschbar); 3.80 (s, 6H, OCH_3); 5.18 (s, 2H, ArCH); 7.05 (d, $^3\text{J} = 2.6\text{ Hz}$, 2H, ArH); 7.06 (d, $^3\text{J} = 2.6\text{ Hz}$, 2H, ArH').

9.5.4 Methoxyspaltungen von 26 und 30

Allgemeine Vorschrift zur Spaltung der Methoxygruppen mittels Bortribromid:

Das *meso*-1,2-Bis(3-methoxyphenyl)ethylendiamin **26** beziehungsweise das *meso*-1,2-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin **30** wird zunächst in 50 ml absolutem Dichlormethan gelöst und die Lösung auf -70 °C runtergekühlt. Unter starkem Rühren wird vorsichtig eine Lösung von BBr₃ in 10 ml absolutem Dichlormethan über einen Zeitraum von 30 Minuten zugetropft. Für die zwei Methoxygruppen der jeweiligen Verbindung werden 5.5 Äquivalente an BBr₃ eingesetzt. Nach beendeter Zugabe wird in der Kälte weitere 60 Minuten stark gerührt. Der Ansatz wird über Nacht sehr langsam auf Raumtemperatur gebracht und weiter über 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Suspension unter Eiskühlung dreimal mit Methanol versetzt und nach jeweiliger Zugabe am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird mit 20 %iger NaOH aufgenommen und die Lösung mit verdünnter HCl solange angesäuert, bis die freie Phenolbase **24** bzw. **29** ausfällt. Zur Kompletten Fällung stellt man den Ansatz für eine Stunde in den Kühlschrank, saugt den Niederschlag ab, wäscht ihn mehrmals mit Wasser und trocknet im Exsikkator über P₂O₅.

meso-1,2-Bis(3-hydroxyphenyl)ethylendiamin (**24**)

Aus 0.0037 mol (1 g) **26**. Aufarbeitung nach 4 d. Produkt liegt analysenrein vor.

Ausbeute: 0.0033 mol (0.81 g), 90 %

C₁₄H₁₆N₂O₂ (244.29 g/mol)

graues Pulver; Schmelzpunkt: 230 °C unter Zersetzung

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.47 (s, 4H, NH₂, austauschbar); 3.72 (s, 2H, ArCH); 6.59-6.61 (dd, 2H, ArH-6); 6.68 (d, 2H, ArH-4); 6.71 (s, 2H, ArH-2); 7.05 (t, 2H, ArH-5); 9.20 (s, 2H, ArOH, austauschbar).

meso-1,2-Bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin (29)

Aus 0.0041 mol (1.26 g) **30**. Aufarbeitung nach 4 d. Produkt liegt analysenrein vor.

Ausbeute: 0.00375 mol (1.05 g), 91.38 %

$C_{14}H_{14}F_2N_2O_2$ (280.27 g/mol)

beigefarbenes Pulver; Schmelzpunkt: 194.4 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.79 (s, 4H, NH_2 , austauschbar); 4.15 (s, 2H, ArCH); 6.34 (dd, $^3J(H, F) = 12.2\text{ Hz}$, $^4J = 2.3\text{ Hz}$, 2H, ArH-3); 6.47 (dd, $^3J = 8.5\text{ Hz}$, $^4J = 2.3\text{ Hz}$, 2H, ArH-5); 7.05 (dd, $^3J = 8.6\text{ Hz}$, $^4J(H, F) = 8.6\text{ Hz}$, 2H, ArH-6); 9.59 (s, 2H, OH, austauschbar).

9.6 Synthese der mono- und disubstituierten Iminoester Hydrochloride

9.6.1 Monosubstituierte Iminoester Hydrochloride

9.6.1.1 Formimidsäureethylester Hydrochlorid

Allgemeine Vorschrift nach Taylor:

0.4 mol (31.2 g) fein gemörseretes Ammoniumacetat werden in 0.2 mol (30 g; 33.67 ml) Orthoameisensäuretriethylester suspendiert und für 3 h unter Reflux erhitzt. In der Hitze entsteht eine klare Lösung und nach Beendigung der Reaktion fällt das Produkt aus. Der Kolbeninhalt wird am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der weiße Rückstand wird anschließend in Ethanol umgerührt und abgesaugt.

Die freie Base ist bei Raumtemperatur sehr instabil. Zur Erhöhung der Stabilität wird sie deshalb in das Hydrochlorid überführt. Die freie Base wird in etherischer HCl suspendiert und stark gerührt, abgesaugt und bei -20 °C gelagert.

Ausbeute: 0.085 mol (6.23 g), 42.62 %

$C_3H_8NO \cdot HCl$ (109.55 g/mol)

weiß poröses Pulver; Schmelzpunkt: 163 °C als freie Base, 143.3 °C als Hydrochlorid

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm]_{Base} = 1.06 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); 2.24 (s, 1H, $H-C=NH$); 3.42 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); 9.81 (b, 1H, NH, austauschbar).

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm]_{Hydrochlorid} = 1.06 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); 3.42 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); 8.20 (s, 1H, $H-C=NH$); 11.60 (b, 1H, NH, austauschbar); 12.1 (b, 1H, NH, austauschbar).

9.6.1.2 Synthese von Heptanimidsäureethylester Hydrochlorid (36)

Allgemeine Vorschrift:

Die Synthese des Produktes **36** gelingt mit Hilfe des Kipp'schen Apparates. 90 mmol (10 g) Heptannitril werden zusammen mit 90 mmol (4.15 g) absolutem Ethanol vermischt. Unter Eiskühlung wird Chlorwasserstoff-Gas eingeleitet. Das Gas wird durch Zutropfen konzentrierter H_2SO_4 zu einer Suspension von NaCl in konzentrierter HCl freigesetzt. Über vier hintereinander geschaltete Waschflaschen, wobei die erste und die vierte jeweils mit konzentrierter H_2SO_4 befüllt ist, wird das Gas getrocknet und so in den Ansatz eingeleitet. Nach 1.5 h werden zusätzlich weitere 5 ml absoluter Ethanol zum Ansatz gegeben. Nach Beendigung der Reaktion nach 3 h wird der Kolbeninhalt am Rotationsverdampfer eingeeengt und anschließend dicht verschlossen ins Eisfach gestellt. Über Nacht wird die zähe Masse weiß und fest. Diese wird mit eiskaltem Et_2O gewaschen, die ausfallende weiße feste Substanz abgesaugt und im Exsikkator über KOH-Plättchen aufbewahrt.

Ein alternativer Weg zur Darstellung ist der Verzicht auf den Einsatz der Kipp'schen Apparatur. In einem Rundkolben werden 90 mmol (12.35 ml) des Heptanonitrils zusammen mit einem leichten Überschuss als die berechnete Menge an absolutem Ethanol (90 mmol; 5.24 ml) in 100 ml etherischer HCl gelöst. Der Ansatz wird dicht verschlossen und für 2 h im Eisbad heftig gerührt. Der Ansatz wird genauso aufgereinigt wie oben beschrieben.

Ausbeute: 0.022 mol (4.18 g), 24 %

$C_9H_{19}NO \cdot HCl$ (193.71 g/mol)

weiß poröses Pulver; Schmelzpunkt: 59.9 °C

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 0.86 (t, $^3J = 6.90$ Hz, 3H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$); 1.26 (m, 6H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$); 1.34 (t, $^3J = 7.02$ Hz, 3H, OCH_2CH_3); 1.59 (quin, 2H, $^3J = 7.64$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$); 2.60 (t, $^3J = 7.72$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$); 4.40 (q, $^3J = 6.99$ Hz, 2H, OCH_2CH_3); 11.23 (br, 1H, NH); 11.59 (br, 1H, NH).

9.6.2 Diiminoester Dihydrochloride

Allgemeine Vorschrift:

Die entsprechenden Alkyldinitrile werden jeweils mit der zweifachen Menge an absolutem Ethanol vermischt und in 200 ml absolutem Diethylether gelöst und unter Eiskühlung heftig gerührt. Unter Einsatz der Kipp'schen Apparatur wird jeweils zuvor getrocknetes HCl-Gas eingeströmt. Es wird solange Gas eingeleitet, bis jeweils eine feste Substanz ausfällt. In der Regel dauert die jeweilige Reaktion 4-12 h. Nur Verbindung **40** fällt nicht als feste Substanz aus. Nach 12 h Chlorwasserstoffgas-Einleitung bildet sich eine zähe Masse, die sich über Nacht im Tiefkühler verfestigt. Das jeweilige Produkt wird nach beendeter Reaktion abgesaugt, mehrmals in kaltem Diethylether gewaschen und im Exsikkator über KOH-Plättchen gelagert.

1,6-Hexandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid (37)

Aus 0.88 mol (96 g) 1,6-Hexandinitril und 1.76 mol (81.77 g) absolutem Ethanol. Die Reaktionszeit beträgt 2 h.

Ausbeute: 0.85 mol (232.44 g), 96.7 %

$C_{10}H_{20}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (273.2 g/mol)

weißes poröses Pulver; Schmelzpunkt: 116.5 °C

9 Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.35 (t, $^3\text{J} = 7.0$ Hz, 6H, OCH_2CH_3); 1.67 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.71 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.45 (q, $^3\text{J} = 6.99$ Hz, 4H, OCH_2CH_3); 11.29 (br, 2H, NH); 12.45 (br, 2H, NH).

1,8-Octandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid (38)

Aus 0.68 mol (93 g) 1,8-Octandinitril und 1.36 mol (62.6 g) absolutem Ethanol. Die Reaktionszeit beträgt 3 h.

Ausbeute: 0.64 mol (193.17 g), 94.3 %

$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ (301.25 g/mol)

hellbraunes poröses Pulver; Schmelzpunkt: 110 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.31 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.35 (t, $^3\text{J} = 7.05$ Hz, 6H, OCH_2CH_3); 1.61 (quin, $^3\text{J} = 6.5$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.64 (t, $^3\text{J} = 7.6$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.43 (q, $^3\text{J} = 7$ Hz, 4H, OCH_2CH_3); 11.17 (br, 2H, NH); 12.15 (br, 2H, NH).

1,10-Decandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid (39)

Aus 0.03 mol (5 g) 1,10-Decandinitril und 0.06 mol (2.8 g) absolutem Ethanol. Die Reaktionszeit beträgt 6 h.

Ausbeute: 0.034 mol (11.3 g), 98.84 %

$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ (329.31 g/mol)

weißes feines Pulver; Schmelzpunkt: 108.1 °C

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.25 (s, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.32 (t, $^3\text{J} = 7$ Hz, 6H, OCH_2CH_3); 1.58 (quin, $^3\text{J} = 6.7$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.61 (t, $^3\text{J} = 7.5$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.40 (q, $^3\text{J} = 7$ Hz, 4H, OCH_2CH_3); 11.14 (br, 2H, NH); 12.10 (br, 2H, NH).

1,12-Dodecandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid (40)

Aus 0.026 mol (5 g) 1,12-Dodecandinitril und 0.052 mol (2.4 g) absolutem Ethanol.
Die Reaktionszeit beträgt 12 h.

Ausbeute: 0.016 mol (5.73 g), 61.5 %

$C_{16}H_{32}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (357.36 g/mol)

weißes feines Pulver; Schmelzpunkt: 92.8 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.26 (s, 12H, $CH_2CH_2-(CH_2)_6-CH_2CH_2$); 1.35 (t, $^3J = 7$ Hz, 6H, OCH_2CH_3); 1.60 (quin, $^3J = 6.8$ Hz, 4H, $CH_2CH_2-(CH_2)_6-CH_2CH_2$); 2.61 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 4H, $CH_2CH_2-(CH_2)_6-CH_2CH_2$); 4.40 (q, $^3J = 7$ Hz, 4H, OCH_2CH_3); 11.02 (br, 2H, NH); 11.90 (br, 2H, NH).

9.7 Synthese der monomeren *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazolinen

9.7.1 Synthese nach Martin mit Orthoameisensäuretriethylester

Allgemeine Vorschrift zur Synthese:

10 mmol des jeweiligen *meso*-1,2-Diarylethylendiamine **41-44** werden in 20 ml Orthoameisensäuretriethylester (Triethylorthoformiat) suspendiert und darin unter starkem Rühren 1.25 ml HCl_{conc} zugetropft. Bei abweichenden Ansatzgrößen sind die Mengen entsprechend angepasst. Die Suspension wird unter Rückfluss gekocht.

Die genauen Angaben der Reaktionszeiten sind jeweils angegeben.

Nach beendeter Reaktion erkaltet man den Ansatz und versetzt ihn mit 100 ml Chloroform und säuert anschließend mit 2 N HCl auf pH 1. Man trennt die organische Phase ab, schüttelt die wässrige zweimal gegen Chloroform und vereint alle organischen Phasen. Diese wird einmal gegen H_2O ausgeschüttelt. Mittels der DC wird überprüft, ob die Hydrochloride der 2-Imidazoline in die Wasserphase übertreten.

Wenn sie in der wässrigen sind, wird diese mit $NaHCO_3$ -Lösung entsäuert, bis es nicht mehr zur CO_2 -Entwicklung kommt (pH = 8-9). Im Folgenden wird dreimal gegen Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen einmal gegen H_2O

9 Experimenteller Teil

ausgeschüttelt. Im Anschluss wird über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Bleiben trotz saurem Milieu die 2-Imidazoline in der organischen Phase, so wird diese Phase nur noch über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel eingeeengt. Die Aufreinigung ist bei den Verbindungen jeweils angegeben. Alle Verbindungen (**41-44**) sind in der *meso*- beziehungsweise in der (**4R,5S**)/(**4S,5R**)-Konfiguration.

meso-4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (41)

Aus 10 mmol (2.72 g) *meso*-1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin **27** und Triethylorthoformiat:

Die Reaktionsdauer beträgt 8 h.

Das Produkt taucht bei der Aufarbeitung in der Wasserphase auf.

Aufarbeitung durch Erhitzen in Methanol; nach Erkalten Zugabe von etherischer HCl, bis das Hydrochlorid komplett ausfällt.

Ausbeute: 4.8 mmol (1.36 g), 48 %

C₁₇H₁₈N₂O₂·HCl (318.8 g/mol)

beiges Pulver; Schmelzpunkt: 245 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 3.63 (s, 6H, OCH₃); 5.66 (s, 2H, ArCH); 6.69 (AA'BB', ³J = 8.6 Hz, 4H, ArH-3, ArH-5); 6.92 (AA'BB', ³J = 8.6 Hz, 4H, ArH-2, ArH-6); 8.94 (s, 1H, N=CH-N); 10.75 (b, 2H, NH).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 283.1441 gefunden: 283.1451

CHN: berechnet: C 64.05 H 6.01 N 8.79 gefunden: C 64.08 H 6.07 N 8.79

meso-4,5-Bis(4-fluorphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (42)

Aus 20 mmol (5 g) *meso*-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin **28** und Triethylorthoformiat:

Die Reaktionszeit beträgt 24 h.

Das Produkt taucht bei der Aufarbeitung in der Wasserphase auf.

Die Aufarbeitung erfolgt erst mit Methanol und etherischer HCl. Nach Eindampfen des Ethers wird zur methanolischen Lösung soviel Diethylether hinzugegeben, bis das Hydrochlorid vollständig ausfällt.

Ausbeute: 15 mmol (4.42 g), 75 %

$C_{15}H_{12}F_2N_2 \cdot HCl$ (294.07 g/mol)

beiges Pulver; Schmelzpunkt: 250 °C

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.79 (s, 2H, ArCH); 6.96 (t, AA'BB', $^3J = 8.8$ Hz, 4H, ArH-3, ArH-5); 7.06 (t, AA'BB', $^3J = 8.5$ Hz, 4H, ArH-2, ArH-6); 8.99 (s, 1H, N=CH-N); 10.94 (b, 2H, NH).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[M+H]^+$: berechnet: 259.1041 gefunden: 259.1058

CHN: berechnet: C 61.13 H 4.45 N 9.5 gefunden: C 61.21 H 4.42 N 9.62

meso-4,5-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (43)

Aus 8 mmol (2.5 g) *meso*-1,2-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin **30** und Triethylorthoformiat:

Nach einer Reaktionszeit von 96 h befindet sich die Substanz sowohl in der wässrigen als auch in der organischen Phase. Die Rückstände der wässrigen und der organischen Phase werden jeweils mit etherischer HCl versetzt und anschließend am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel eingedampft.

Die Fraktion der wässrigen Phase wird mit Ethylacetat versetzt, heftig gerührt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der weiße Bodensatz wird abgesaugt und mit Diethylether gewaschen.

9 Experimenteller Teil

Die aus der organischen Phase erhaltene Fraktion wird in kaltem Chloroform gelöst und mit viel Diethylether versetzt. Die trübe Lösung wird über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der ausfallende Schlamm wird von der Lösung abgetrennt, wieder mit Chloroform/Diethylether versetzt und wie vorher beschrieben behandelt. Dieser Vorgang wird sehr oft wiederholt, bis sich ein feiner Niederschlag bildet. Alle vom Schlamm abgetrennten überstehende Lösungen werden gesammelt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der dunkelrote ölige Rückstand wird mit wenig Chloroform/Diethylether/Petrolether behandelt und in den Kühlschrank gestellt. Über Nacht bildet sich ein feiner Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Diethylether gewaschen und über P_2O_5 getrocknet wird. Zur Überführung in das Hydrochlorid wird die trockene Substanz für einige Minuten in etherischer HCl gerührt, der Diethylether eingedampft und über KOH-Plättchen im Exsikkator gelagert.

Ausbeute: 5.2 mmol (1.84 g), 64.83 %

$C_{17}H_{16}F_2N_2O_2 \cdot HCl$ (354.78 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 183-188 °C

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.66 (s, 6H, OCH_3); 5.86 (s, 2H, ArCH); 6.59 (dd, $^3J(H, F) = 12.6\text{ Hz}$, $^4J = 2.3\text{ Hz}$, 2H, ArH-3); 6.63 (dd, $^3J = 7.6\text{ Hz}$, $^4J = 2.5\text{ Hz}$, 2H, ArH-5); 7.05 (dd, $^3J = 7.6\text{ Hz}$, $^4J(H, F) = 8.7\text{ Hz}$, 2H, ArH-6); 8.98 (s, 1H, N=CH-N); 10.95 (b, 2H, NH).

meso-4,5-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin (44)

Aus 8.8 mmol (3 g) *meso*-1,2-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin **32** und Triethylorthoformiat:

Die Reaktionszeit beträgt 65 h.

Die Substanz befindet sich sowohl in der wässrigen als auch in der organischen Phase. Das dunkelrote poröse Rohprodukt der organischen und wässrigen Phase wird in etherischer HCl gerührt und das Lösungsmittel eingedampft. Die weitere Aufreinigung beider Phasen entspricht der Aufreinigung von **43**. Anschließend

9 Experimenteller Teil

werden alle gesammelten Rückstände in einer Chloroform/Ethylacetat-Mischung (1:1) gelöst, mit sehr viel Diethylether versetzt und in den Kühlschrank gestellt. Der saubere Rückstand wird abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und über P_2O_5 getrocknet. Zur Überführung in das Hydrochlorid wird dieser Rückstand für einige Minuten in etherischer HCl gerührt, das Lösungsmittel eingedampft und die Substanz über KOH-Plättchen im Exsikkator gelagert.

Ausbeute: 8.25 mmol (3.2 g), 93.75 %

$C_{17}H_{16}Cl_2N_2O_2 \cdot HCl$ (387.69 g/mol)

beiges Pulver; Schmelzpunkt: 146 °C

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.68 (s, 6H, OCH_3); 6.01 (s, 2H, ArCH); 6.78 (dd, $^3J = 8.8\text{ Hz}$, $^4J = 2.6\text{ Hz}$, 2H, ArH-5); 6.88 (d, $^4J = 2.6\text{ Hz}$, 2H, ArH-3); 7.14 (d, $^3J = 8.7\text{ Hz}$, 2H, ArH-6); 8.99 (s, 1H, N=CH-N); 10.94 (b, 2H, NH).

9.7.2 Synthese nach Boykin mit Ethylformimidat Hydrochlorid

Allgemeine Vorschrift:

1 mmol des jeweiligen *meso*-1,2-Diarylethylendiamins **28**, **30**, **32-34** werden mit 1 mmol Ethylformimidat Hydrochlorid **35** in 50 ml trockenem Ethanol unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionszeiten liegen zwischen 60-96 Stunden. Bei abweichenden Ansatzgrößen sind die eingesetzten Mengen entsprechend. Bei der Synthese von **45-46** wurde allerdings die vierfache Menge an **35** verwendet. Nach beendeter Reaktion wird der Ansatz auf Raumtemperatur runtergekühlt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wird umkristallisiert.

***meso*-4,5-Bis(4-fluorphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (42)**

Aus 2 mmol (0.5 g) *meso*-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin **28** und 2 mmol

(0.22 g) Ethylformimidat Hydrochlorid **35**:

9 Experimenteller Teil

Die Reaktionszeit beträgt 60 h.

Das Rohprodukt wird zum Hydrochlorid überführt und anschließend mit Methanol/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.374 mmol (0.11 g), 18.7 %

Die analytischen Daten liegen bereits vor.

***meso*-4,5-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (43)**

Aus 1.6 mmol (0.5 g) *meso*-1,2-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin **30** und 1.6 mmol (0.178 g) Ethylformimidat Hydrochlorid **35**:

Die Reaktionszeit beträgt 75 h.

Das Rohprodukt wird zum Hydrochlorid überführt und anschließend mit Methanol/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.73 mmol (0.26 g), 45.8 %

Die analytischen Daten liegen bereits vor.

***meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (44)**

Aus 2.9 mmol (1 g) *meso*-1,2-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin **32** und 2.9 mmol (0.178 g) Ethylformimidat Hydrochlorid **35**:

Die Reaktionszeit beträgt 68 h.

Das Rohprodukt wird zum Hydrochlorid überführt und anschließend mit Methanol/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 1.22 mmol (0.47 g), 42 %

Die analytischen Daten liegen bereits vor.

meso-4,5-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (45)

Aus 1.83 mmol (0.7 g) *meso*-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **33** und 7.33 mmol (0.8 g) Ethylformimidat Hydrochlorid **35**:

Die Reaktionszeit beträgt 90 h.

Das Rohprodukt wird zum Hydrochlorid überführt und anschließend mit Methanol/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.51 mmol (0.22 g), 28 %

$C_{15}H_{10}Cl_4N_2O_2 \cdot HCl$ (428.53 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 332-334 °C unter Zersetzung

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 6.22 (s, 2H, ArCH); 6.77 (d, 4H, ArH-3, ArH-5); 8.92 (s, 1H, N=CH-N); 9.2 (s, 2H, ArOH, austauschbar) 10.94 (b, 2H, NH).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H] $^+$: berechnet: 392.9539 gefunden: 392.9532

CHN: berechnet: C 62.04 H 2.59 N 4.54 gefunden: C 62.04 H 2.60 N 4.54

meso-4,5-Bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin Hydrochlorid (46)

Aus 2.4 mmol (1 g) *meso*-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-methoxyphenyl)ethylendiamin **34** und 9.6 mmol (1.05 g) Ethylformimidat Hydrochlorid **35**:

Die Reaktionszeit beträgt 96 h.

Das Rohprodukt wird zum Hydrochlorid überführt und anschließend mit Methanol/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 1.8 mmol (0.82 g), 74.8 %

$C_{17}H_{14}Cl_4N_2O_2 \cdot HCl$ (456.58 g/mol)

beiges Pulver; Schmelzpunkt: 224 °C

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 6.22 (s, 2H, ArCH); 6.77 (d, 4H, ArH-3, ArH-5); 8.92 (s, 1H, N=CH-N); 9.2 (s, 2H, ArOH, austauschbar) 10.94 (b, 2H, NH).

9.7.3 Synthese des *meso*-4,5-Bis(4-fluorphenyl)-2-hexyl-2-imidazolin Hydrochlorid (47)

Vorschrift:

52 mmol (1.3 g) *meso*-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin **28** werden zusammen mit 52 mmol (1 g) Heptanimidsäureethylester Hydrochlorid **36** in 50 ml absolutem Ethanol suspendiert, der Ansatz mit einer Spatelspitze Na₂SO₄ versetzt und 72 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung vom Rückstand abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt von **47** wird mit Methanol/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 2.46 mmol (0.93 g), 47.2 %

C₂₁H₂₄F₂N₂·HCl (378.89 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 204 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 0.91 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃); 1.35 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃); 1.43 (quin, ³J = 8.2 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃); 1.81 (quin, 2H, ³J = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃); 2.78 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃); 5.79 (s, 2H, ArCH); 6.99 (t, AA'BB', ³J = 8.8 Hz, 4H, ArH-3, ArH-5); 7.05 (t, AA'BB', ³J = 8.8 Hz, 4H, ArH-2, ArH-6); 10.81 (br, 2H, NH).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 343.1980 gefunden: 343.1973

CHN: berechnet: C 66.57 H 6.65 N 7.39 gefunden: C 66.48 H 6.66 N 7.52

9.8 Synthese der C-Alkyl-(4*R*/5*S*)/(4*S*/5*R*)-4,5-diaryl-2-imidazolin-Dimere

Allgemeine Vorschrift:

Zwei Äquivalente des entsprechenden *meso*-1,2-Diarylethylendiamine **24-25**, **27-29** und **31** werden jeweils mit einem Äquivalent eines Alkyldiimid säurediethylester Dihydrochlorids **37-40** in 50 ml absolutem Ethanol suspendiert und unter Rückfluss

9 Experimenteller Teil

erhitzt. Die Ansatzgrößen und ihre Reaktionszeiten sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

Nach beendeter Reaktion wird der jeweilige Ansatz am Rotationsverdampfer eingengt, der Rückstand entweder umkristallisiert oder in einem organischen Lösungsmittel gewaschen. Die sauberen Produkte **48-71** werden über P₂O₅ im Exsikkator getrocknet. Alle Verbindungen sind **(4R,5S)/(4S,5R)**-konfiguriert.

1,4-Bis(meso-4,5-bis(3-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)butan Dihydrochlorid (48)

Aus 0.82 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(3-hydroxyphenyl)ethylendiamin **24** und 0.41 mmol (0.112 g) 1,6-Hexandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **37**:

Die Reaktionszeit beträgt 100 h.

Das Rohprodukt wird erst in Aceton, danach in Dichlormethan gewaschen.

Ausbeute: 0.013 mmol (0.0085 g), 1.63 %

C₃₄H₃₄N₄O₄·2HCl (635.58 g/mol)

beigefarbenes Pulver; Schmelzpunkt: 270 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.92 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.83 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.64 (s, 4H, ArCH); 6.43 (dd, 4H, ArH-6); 6.44 (d, 4H, ArH-4); 6.50 (s, 4H, ArH-2); 6.93 (t, 4H, ArH-5); 9.39 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.85 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 563.2653 gefunden: 563.2681

CHN: berechnet: C 64.25 H 5.71 N 8.82 gefunden: C 63.97 H 6.08 N 8.82

1,6-Bis(*meso*-4,5-bis(3-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)hexan Dihydrochlorid (49)

Aus 0.82 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(3-hydroxyphenyl)ethylendiamin **24** und 0.41 mmol (0.123 g) 1,8-Octandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **38**:

Die Reaktionszeit beträgt 120 h.

Das Rohprodukt wird erst in Aceton, danach in Dichlormethan gewaschen.

Ausbeute: 0.23 mmol (0.155 g), 28.48 %

$C_{36}H_{38}N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot (2H_2O)$ (698.26 g/mol)

hellbraunes Pulver; Schmelzpunkt: 364 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.54 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.89 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.81 (t, $^3J = 8.1$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.63 (s, 4H, ArCH); 6.43 (dd, 4H, ArH-6); 6.44 (d, 4H, ArH-4); 6.50 (s, 4H, ArH-2); 6.93 (t, 4H, ArH-5); 9.39 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.83 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[M+H]^+$: berechnet: 591.2966 gefunden: 591.2987

CHN: berechnet: C 61.80 H 6.34 N 8.01 gefunden: C 61.49 H 6.27 N 8.46

1,8-Bis(*meso*-4,5-bis(3-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)octan Dihydrochlorid (50)

Aus 0.82 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(3-hydroxyphenyl)ethylendiamin **24** und 0.41 mmol (0.14 g) 1,10-Decandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **39**:

Die Reaktionszeit beträgt 160 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Waschen mit Aceton.

Ausbeute: 0.45 mmol (0.31 g), 55 %

$C_{38}H_{42}N_4O_4 \cdot 2HCl$ (691.69 g/mol)

weißgraues Pulver; Schmelzpunkt: 322 °C

9 Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ _{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.45 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.85 (quin, $^3\text{J} = 7.6$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.77 (t, $^3\text{J} = 7.7$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 5.62 (s, 4H, ArCH); 6.43 (dd, 4H, ArH-6); 6.44 (d, 4H, ArH-4); 6.50 (s, 4H, ArH-2); 6.92 (t, 4H, ArH-5); 9.37 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.76 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet: 619.3279 gefunden: 619.3275

CHN: berechnet: C 65.98 H 6.41 N 8.10 gefunden: C 66.01 H 6.54 N 8.02

1,10-Bis(meso-4,5-bis(3-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)decan Dihydrochlorid (51)

Aus 0.82 mmol (0.2 g) meso-1,2-Bis(3-hydroxyphenyl)ethylendiamin **24** und 0.41 mmol (0.146 g) 1,12-Dodecandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **40**:

Die Reaktionszeit beträgt 160 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Reinigen in Aceton.

Ausbeute: 2.1 mmol (0.15 g), 25.42 %

$\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 2\text{HCl}$ (719.74 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 280.3 °C

$^1\text{H-NMR}$ _{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.37 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.45 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.45 (quin, $^3\text{J} = 7.6$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.75 (t, $^3\text{J} = 7.6$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 5.62 (s, 4H, ArCH); 6.42 (dd, 4H, ArH-6); 6.44 (d, 4H, ArH-4); 6.50 (s, 4H, ArH-2); 6.92 (t, 4H, ArH-5); 9.38 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.72 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet: 647.3592 gefunden: 647.3606

CHN: berechnet: C 66.75 H 6.72 N 7.78 gefunden: C 66.68 H 6.75 N 7.84

1,4-Bis(*meso*-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)butan Dihydrochlorid (52)

Aus 0.82 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **25** und 0.41 mmol (0.123 g) 1,6-Hexandiimidssäurediethylester Dihydrochlorid **37**:

Die Reaktionszeit beträgt 105 h.

Die Reinigung erfolgt durch Waschen in Aceton.

Ausbeute: 0.055 mmol (0.035 g), 6.72 %

$C_{34}H_{34}N_4O_4 \cdot 2HCl$ (635.58 g/mol)

beigefarbenes Pulver; Schmelzpunkt: 227 °C unter Zersetzung

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.94 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.85 (m, 4H $CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.59 (s, 4H, ArCH); 6.52 (d, AA'BB', $^3J = 8.5$ Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 6.79 (d, AA'BB', $^3J = 8.5$ Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 9.38 (s, 4H, ArOH, austauschbar); 10.66 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[M+H]^+$: berechnet: 563.2653 gefunden: 563.2683

CHN: berechnet: C 64.25 H 5.71 N 8.82 gefunden: C 64.21 H 5.66 N 8.86

1,6-Bis(*meso*-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)hexan Dihydrochlorid (53)

Aus 0.82 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **25** und 0.41 mmol (0.123 g) 1,8-Octandiimidssäurediethylester Dihydrochlorid **38**:

Die Reaktionszeit beträgt 120 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Umrühren in Aceton.

Ausbeute: 0.23 mmol (0.15 g), 27.56 %

$C_{36}H_{38}N_4O_4 \cdot 2HCl$ (663.63 g/mol)

beigefarbenes Pulver; Schmelzpunkt: 307 °C

9 Experimenteller Teil

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.50 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.84 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.77 (t, ³J = 7.6 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.58 (s, 4H, ArCH); 6.52 (d, AA'BB', ³J = 8.4 Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 6.77 (d, AA'BB', ³J = 8.4 Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 9.38 (s, 4H, ArOH, austauschbar); 10.59 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 591.2966 gefunden: 591.2987

CHN: berechnet: C 65.15 H 6.08 N 8.44 gefunden: C 64.99 H 6.11 N 8.43

1,8-Bis(*meso*-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)octan Dihydrochlorid (54)

Aus 2 mmol (0.5 g) *meso*-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **25** und 1 mmol (0.37 g) 1,10-Decandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **39**:

Die Reaktionszeit beträgt 150 h.

Das Rohprodukt wird in Aceton umgerührt.

Ausbeute: 3.2 mmol (0.22 g), 16 %

C₃₈H₄₂N₄O₄·2HCl (691.69 g/mol)

graues Pulver; Schmelzpunkt: 322 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.42 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.82 (quin, ³J = 8.5 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.75 (t, ³J = 7.7 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.57 (s, 4H, ArCH); 6.52 (d, AA'BB', ³J = 8.6 Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 6.76 (d, AA'BB', ³J = 8.6 Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 9.39 (s, 4H, ArOH, austauschbar); 10.61 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 619.3279 gefunden: 619.3275

CHN: berechnet: C 65.98 H 6.41 N 8.10 gefunden: C 65.64 H 6.56 N 7.98

1,10-Bis(*meso*-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)decan Dihydrochlorid (55)

Aus 2.5 mmol (0.5 g) *meso*-1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **25** und 1.2 mmol (0.37 g) 1,12-Dodecandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **40**:

Die Reaktionszeit beträgt 160 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Umkristallisieren mit Methanol. Anschließend wird der Rückstand erst in Aceton, dann in Dichlormethan gewaschen.

Ausbeute: 0.32 mmol (0.23 g), 12.8 %

$C_{40}H_{46}N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot (2H_2O)$ (754.33 g/mol)

weißgraues Pulver; Schmelzpunkt: 255 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.36 (m, 8H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.43 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.80 (quin, $^3J = 8.6$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.73 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.56 (s, 4H, ArCH); 6.51 (d, AA'BB', $^3J = 8.4$ Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 6.76 (d, AA'BB', $^3J = 8.4$ Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 9.37 (s, 4H, ArOH, austauschbar); 10.55 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 647.3592 gefunden: 647.3584

CHN: berechnet: C 63.57 H 6.94 N 7.41 gefunden: C 63.26 H 7.11 N 7.69

1,4-Bis(*meso*-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)butan Dihydrochlorid (56)

Aus 1.47 mmol (0.4 g) *meso*-1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin **27** und 0.73 mmol (0.2 g) 1,6-Hexandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **37**:

Die Reaktionszeit beträgt 115 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Umkristallisieren in Methanol. Danach wird der Niederschlag in Aceton gewaschen.

Ausbeute: 0.19 mmol (0.13 g), 24.4 %

9 Experimenteller Teil

$C_{38}H_{42}N_4O_4 \cdot 2HCl$ (691.69 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 320.7 °C

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.98 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.88 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2$); 3.62 (s, 12H, OCH_3); 5.69 (s, 4H, ArCH); 6.67 (AA'BB', $^3J = 8.7$ Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 6.93 (AA'BB', $^3J = 8.7$ Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 10.74 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESITOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 619.3279 gefunden: 618.3282

CHN: berechnet: C 65.98 H 6.41 N 8.10 gefunden: C 65.66 H 6.40 N 8.05

1,6-Bis(meso-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)hexan Dihydrochlorid (57)

Aus 0.74 mmol (0.2 g) meso-1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin **27** und 0.37 mmol (0.11 g) 1,8-Octandiimid säurediethylester Dihydrochlorid **38**:

Die Reaktionszeit beträgt 125 h.

Die Aufarbeitung erfolgt erst durch Waschen in Aceton. Danach wird mit Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0.21 mmol (0.150 g), 28.6 %

$C_{40}H_{46}N_4O_4 \cdot 2HCl$ (719.74 g/mol)

blassgelbes Pulver; Schmelzpunkt: 304.6 °C

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.54 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.89 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.83 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 3.62 (s, 12H, OCH_3); 5.68 (s, 4H, ArCH); 6.68 (AA'BB', $^3J = 8.7$ Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 6.92 (AA'BB', $^3J = 8.7$ Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 10.86 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 647.3592 gefunden: 647.3600

CHN: berechnet: C 66.75 H 6.72 N 7.78 gefunden: C 66.79 H 6.79 N 7.75

1,8-Bis(*meso*-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)octan Dihydrochlorid (58)

Aus 1.8 mmol (0.5 g) *meso*-1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin **27** und 0.92 mmol (0.33 g) 1,10-Decandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **39**:

Die Reaktionszeit beträgt 155 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Waschen in Aceton.

Ausbeute: 0.74 mmol (0.5 g), 41.1 %

$C_{42}H_{50}N_4O_4 \cdot 2HCl$ (747.79 g/mol)

weißgraues Pulver; Schmelzpunkt: 265 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.44 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.46 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.84 (quin, $^3J = 7.6$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.77 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 3.62 (s, 12H, OCH_3); 5.68 (s, 4H, ArCH); 6.68 (AA'BB', $^3J = 8.7$ Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 6.92 (AA'BB', $^3J = 8.7$ Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 10.86 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 675.3905 gefunden: 675.3916

CHN: berechnet: C 67.46 H 7.01 N 7.49 gefunden: C 67.44 H 7.11 N 7.16

1,10-Bis(*meso*-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)decan Dihydrochlorid (59)

Aus 1.84 mmol (0.5 g) *meso*-1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin **27** und 0.92 mmol (0.33 g) 1,12-Dodecandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **40**:

Die Reaktionszeit beträgt 165 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Reinigen in Aceton und Dichlormethan.

Ausbeute: 0.26 mmol (0.2 g), 14 %

$C_{44}H_{54}N_4O_4 \cdot 2HCl$ (775.85 g/mol)

9 Experimenteller Teil

hellbraunes Pulver; Schmelzpunkt: 268.2-269.3 °C unter Zersetzung

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.37 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.43 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.83 (quin, ³J = 7.5 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.78 (t, ³J = 7.7 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 3.63 (s, 12H, OCH₃); 5.66 (s, 4H, ArCH); 6.69 (AA'BB', ³J = 8.7 Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 6.91 (AA'BB', ³J = 8.7 Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 10.85 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 703.4218 gefunden: 703.4166

CHN: berechnet: C 68.12 H 7.28 N 7.22 gefunden: C 68.33 H 7.25 N 7.33

1,4-Bis(meso-4,5-bis(4-fluorphenyl)-2-imidazolin-2-yl)butan Dihydrochlorid (60)

Aus 0.8 mmol (0.2 g) meso-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin **28** und 0.4 mmol (0.11 g) 1,6-Hexandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **37**:

Die Reaktionszeit beträgt 120 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Reinigen in Aceton mit anschließender Umkristallisation in Ethanol/Petrolether.

Ausbeute: 0.078 mmol (0.05 g), 9.6 %

C₃₄H₃₀F₄N₄·2HCl (643.54 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 365 °C unter Zersetzung

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.99 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.89 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.79 (s, 4H, ArCH); 6.98 (t, AA'BB', ³J = 8.7 Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 7.07 (t, AA'BB', ³J = 8.5 Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 10.95 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 571.2479 gefunden: 571.2461

CHN: berechnet: C 63.46 H 5.01 N 8.71 gefunden: C 63.77 H 5.09 N 8.72

1,6-Bis(*meso*-4,5-bis(4-fluorphenyl)-2-imidazolin-2-yl)hexan Dihydrochlorid (61)

Aus 0.8 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin **28** und 0.4 mmol (0.122 g) 1,8-Octandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **38**:

Die Reaktionszeit beträgt 130 h.

Das Rohprodukt wird jeweils in Aceton, Dichlormethan und Ethanol gewaschen.

Ausbeute: 0.19 mmol (0.13 g), 23.5 %

$C_{36}H_{34}F_4N_4 \cdot 2HCl$ (671.60 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 294 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.55 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.92 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.86 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.83 (s, 4H, ArCH); 7.02 (t, AA'BB', $^3J = 8.7$ Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 7.08 (t, AA'BB', $^3J = 8.6$ Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 10.96 (b, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 599.2792 gefunden: 599.2789

CHN: berechnet: C 64.38 H 5.40 N 8.34 gefunden: C 64.65 H 5.32 N 8.63

1,8-Bis(*meso*-4,5-bis(4-fluorphenyl)-2-imidazolin-2-yl)octan Dihydrochlorid (62)

Aus 2 mmol (0.5 g) *meso*-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin **28** und 1 mmol (0.33 g) 1,10-Decandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **39**:

Die Reaktionszeit beträgt 160 h.

Das Rohprodukt wird mit Methanol/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.19 mmol (0.13 g), 9.3 %

$C_{38}H_{38}F_4N_4 \cdot 2HCl$ (699.65 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 255.6 °C

9 Experimenteller Teil

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.44 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.46 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.85 (quin, ³J = 7.6 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.08 (t, ³J = 7.8 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.79 (s, 4H, ArCH); 6.99 (t, AA'BB', ³J = 8.8 Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 7.10 (t, AA'BB', ³J = 8.8 Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 10.86 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 627.3105 gefunden: 627.3120

CHN: berechnet: C 65.32 H 5.76 N 8.01 gefunden: C 65.33 H 5.70 N 8.11

1,10-Bis(meso-4,5-bis(4-fluorphenyl)-2-imidazolin-2-yl)decan

Dihydrochlorid (63)

Aus 8 mmol (0.2 g) meso-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin **28** und 4 mmol (0.14 g) 1,12-Dodecandiimid säure diethylester Dihydrochlorid **40**:

Die Reaktionszeit beträgt 165 h.

Erst wird in Aceton und Dichlormethan gewaschen, dann in Ethanol/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.17 mmol (0.12 g), 2.1 %

C₄₀H₄₂F₄N₄·2HCl (727.70 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 295 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.42 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.82 (quin, ³J = 7.4 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.77 (t, ³J = 7.6 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.77 (s, 4H, ArCH); 6.99 (t, AA'BB', ³J = 8.7 Hz, 8H, ArH-3, ArH-5); 7.05 (t, AA'BB', ³J = 8.6 Hz, 8H, ArH-2, ArH-6); 10.76 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 656.3418 gefunden: 656.3496

CHN: berechnet: C 66.02 H 6.09 N 7.70 gefunden: C 66.13 H 6.14 N 7.79

1,4-Bis(meso-4,5-bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)butan Dihydrochlorid (64)

Aus 0.7 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **29** und 0.36 mmol (0.007 g) 1,6-Hexandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **37**:

Die Reaktionszeit beträgt 130 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Umrühren in heißem Aceton.

Ausbeute: 0.057 mmol (0.04 g), 8.14 %

$C_{34}H_{30}F_4N_4O_4 \cdot 2HCl$ (707.54 g/mol)

weißgraues Pulver; Schmelzpunkt: 338 °C unter Zersetzung

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.92 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.82 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.80 (s, 4H, ArCH); 6.33 (dd, $^3J(H, F) = 12.3\text{ Hz}$, $^4J = 2.0\text{ Hz}$, 4H, ArH-3); 6.44 (dd, $^3J = 8.5\text{ Hz}$, $^4J = 2.2\text{ Hz}$, 4H, ArH-5); 6.96 (dd, $^3J = 8.7\text{ Hz}$, $^4J(H, F) = 8.7\text{ Hz}$, 4H, ArH-6); 9.95 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.82 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[M+H]^+$: berechnet: 635.2276 gefunden: 635.2305

CHN: berechnet: C 57.72 H 4.56 N 7.92 gefunden: C 57.66 H 4.50 N 7.90

1,6-Bis(meso-4,5-bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)hexan Dihydrochlorid (65)

Aus 0.7 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **29** und 0.36 mmol (0.12 g) 1,8-Octandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **38**:

Die Reaktionszeit beträgt 144 h.

Das Rohprodukt wird in heißem Aceton und danach in kaltem Ethanol umgerührt.

Ausbeute: 0.068 mmol (0.05 g), 9.7 %

$C_{36}H_{34}F_4N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot (2H_2O)$ (770.23 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 357.6 °C unter Zersetzung

9 Experimenteller Teil

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.49 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.81 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.74 (t, 4H, ³J = 7.7 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.77 (s, 4H, ArCH); 6.32 (dd, ³J(H, F) = 12.3 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 4H, ArH-3); 6.45 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 4H, ArH-5); 6.94 (dd, ³J = 8.9 Hz, ⁴J(H, F) = 8.7 Hz, 4H, ArH-6); 9.95 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.76 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 663.2589 gefunden: 663.2598

CHN: berechnet: C 56.04 H 5.23 N 7.26 gefunden: C 56.87 H 5.54 N 7.24

1,8-Bis(meso-4,5-bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)octan Dihydrochlorid (66)

Aus 0.7 mmol (0.2 g) meso-1,2-Bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **29** und 0.36 (0.118 g) 1,10-Decandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **39**:

Die Reaktionszeit beträgt 168 h.

Erst wird in heißem Aceton gerührt und heiß filtriert, danach wird mit Ethanol/Petrolether gewaschen.

Ausbeute: 0.14 mmol (0.11 g), 20 %

C₃₈H₃₈F₄N₄O₄·2HCl·(H₂O) (780.25 g/mol)

weißgraues Pulver; Schmelzpunkt: 277 °C

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.40 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.44 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.79 (quin, ³J = 7.4 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.71 (t, ³J = 7.7 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.79 (s, 4H, ArCH); 6.32 (dd, ³J(H, F) = 12.3 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 4H, ArH-3); 6.45 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 4H, ArH-5); 6.93 (dd, ³J = 8.9 Hz, ⁴J(H, F) = 8.9 Hz, 4H, ArH-6); 9.96 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.73 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 691.2902 gefunden: 691.2911

CHN: berechnet: C 58.39 H 5.42 N 7.17 gefunden: C 58.73 H 5.71 N 7.30

1,10-Bis(meso-4,5-bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)decan Dihydrochlorid (67)

Aus 0.7 mmol (0.2 g) *meso*-1,2-Bis(2-fluor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **29** und 0.36 mmol (0.13 g) 1,12-Dodecandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **40**:

Die Reaktionszeit beträgt 165 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Waschen in heißem Aceton. Noch im heißem wird abfiltriert und anschließend mit Methanol/Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.09 mmol (0.08 g), 13 %

$C_{40}H_{42}F_4N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot (H_2O)$ (808.28 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 301.8 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.35 (m, 8H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.41 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.76 (quin, $^3J = 8.4$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.69 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.77 (s, 4H, ArCH); 6.31 (dd, $^3J(H, F) = 12.3$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, 4H, ArH-3); 6.44 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, 4H, ArH-5); 6.92 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J(H, F) = 8.9$ Hz, 4H, ArH-6); 9.93 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.63 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[M+H]^+$: berechnet: 719.3215 gefunden: 719.3207

CHN: berechnet: C 59.33 H 5.73 N 6.92 gefunden: C 59.31 H 5.86 N 7.10

1,4-Bis(meso-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)butan Dihydrochlorid (68)

Aus 0.48 mmol (0.15 g) *meso*-1,2-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **31** und 0.24 mmol (0.065 g) 1,6-Hexandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **37**:

Die Reaktionszeit beträgt 125 h.

In heißem Aceton wird gewaschen und heiß filtriert, anschließend in Ethanol/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.078 mmol (0.06 g), 16.25 %

$C_{34}H_{30}Cl_4N_4O_4 \cdot 2HCl$ (773.36 g/mol)

weißes Pulver; Schmelzpunkt: 330 °C unter Zersetzung

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.92 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.83 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.94 (s, 4H, ArCH); 6.58 (dd, $^3J = 8.6$ Hz, 4H, ArH-3); 6.65 (d, $^3J = 2.4$ Hz, 4H, ArH-5); 7.00 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H, ArH-6); 10.00 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.81 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[M+H]^+$: berechnet: 701.4458 gefunden: 701.1126

CHN: berechnet: C 52.80 H 4.17 N 7.24 gefunden: C 52.41 H 4.19 N 7.24

1,6-Bis(meso-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)hexan Dihydrochlorid (69)

Aus 0.48 mmol (0.15 g) meso-1,2-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **31** und 0.24 mmol (72.3 g) 1,8-Octandiimid säurediethylester Dihydrochlorid **38**:

Die Reaktionszeit beträgt 140 h.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Umrühren in heißem Aceton. Das saubere Produkt wird heiß filtriert.

Ausbeute: 0.11 mmol (0.09 g), 23 %

$C_{36}H_{34}Cl_4N_4O_4 \cdot 2HCl$ (801.41 g/mol)

weißgraues Pulver; Schmelzpunkt: 324 °C unter Zersetzung

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.49 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.83 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.77 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.94 (s, 4H, ArCH); 6.58 (dd, $^3J = 8.6$ Hz, 4H, ArH-3); 6.66 (d, $^3J = 2.5$ Hz, 4H, ArH-5); 6.98 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H, ArH-6); 10.05 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.77 (br, 4H, NH, austauschbar).

9 Experimenteller Teil

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 729.4990 gefunden: 729.1408

CHN: berechnet: C 53.95 H 4.53 N 6.99 gefunden: C 53.99 H 4.79 N 7.09

1,8-Bis(*meso*-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)octan

Dihydrochlorid (70)

Aus 1.4 mmol (0.43 g) *meso*-1,2-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **31** und 0.7 mmol (0.23 g) 1,10-Decandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **39**:

Die Reaktionszeit beträgt 160 h.

Das Rohprodukt wird in Aceton gewaschen und danach in Ethanol/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.52 mmol (0.43 g), 37.14 %

C₃₈H₃₈Cl₄N₄O₄·2HCl (829.47 g/mol)

beigefarbenes Pulver; Schmelzpunkt: 300 °C unter Zersetzung

¹H-NMR_{400 MHz} (DMSO-d₆): δ[ppm] = 1.39 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.43 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.78 (quin, ³J = 8.2 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂); 2.73 (t, ³J = 7.6 Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂-CH₂CH₂CH₂CH₂); 5.93 (s, 4H, ArCH); 6.57 (dd, ³J = 8.6 Hz, 4H, ArH-3); 6.65 (d, ³J = 2.4 Hz, 4H, ArH-5); 6.97 (d, ³J = 8.6 Hz, 4H, ArH-6); 10.01 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.67 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 757.5571 gefunden: 757.1729

CHN: berechnet: C 53.92 H 4.88 N 6.62 gefunden: C 53.68 H 5.20 N 6.75

1,10-Bis(*meso*-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-2-yl)decan

Dihydrochlorid (71)

Aus 0.27 mmol (0.085 g) *meso*-1,2-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin **31** und 0.135 mmol (0.048 g) 1,12-Dodecandiimidsäurediethylester Dihydrochlorid **40**:

Die Reaktionszeit beträgt 165 h.

Erst wird jeweils in heißem Aceton und Dichlormethan gewaschen und heiß filtriert, anschließend mit Ethanol/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.002 mmol (0.0015 g), 0.65 %

$C_{40}H_{42}Cl_4N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot (2H_2O)$ (889.16 g/mol)

hellbraunes Pulver; Schmelzpunkt: 257 °C

1H -NMR_{400 MHz} (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.34 (m, 8H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.41 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 1.76 (quin, $^3J = 7.0$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 2.71 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$); 5.93 (s, 4H, ArCH); 6.57 (dd, $^3J = 8.7$ Hz, 4H, ArH-3); 6.65 (d, $^3J = 2.4$ Hz, 4H, ArH-5); 6.96 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H, ArH-6); 9.99 (s, 4H, OH, austauschbar); 10.62 (br, 4H, NH, austauschbar).

MS(+)-ESI-TOF: m/z $[M+H]^+$: berechnet: 785.6053 gefunden: 785.2012

CHN: berechnet: C 53.83 H 5.31 N 6.28 gefunden: C 53.61 H 5.54 N 6.57

9.9 Synthese der *N*-Alkyl-(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-diaryl-2-imidazolin-Dimere

Allgemeine Vorschrift:

1 mmol des entsprechenden 2-Imidazolin Hydrochlorids wird in 50 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und mittels eines Kryostaten auf -80 °C runtergekühlt. 880 μ l einer 2.5 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan werden langsam über einen Zeitraum von 10 Minuten zugetropft. Man lässt nach beendeter Zugabe weitere 20 Minuten rühren, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Im Folgenden wird über eine Zeitspanne von 30 Minuten eine Lösung von 0.55 M Alkyldihalogenid in 5 ml absolutem Tetrahydrofuran zum Ansatz zugetropft. Nach zwei Stunden heftigem Rühren bei -80 °C wird der Ansatz ausgeschaltet und sehr langsam über Nacht auf Raumtemperatur gebracht.

9 Experimenteller Teil

Zum Reaktionsansatz werden 30 ml Wasser gegeben. Dabei bilden sich zwei Phasen. Dreimal wird mit Chloroform ausgeschüttelt, um die ölige Phase zu extrahieren. Alle vereinten organischen Phasen werden einmal gegen Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die jeweiligen Rohprodukte sind ölig. Alle Verbindungen liegen in der **(4R,5S)/(4S,5R)**-Konfiguration vor. Die angegebenen Substanzen konnten erfolgreich synthetisiert und mittels hochauflösender Massenspektroskopie identifiziert werden. Allerdings konnten die Rohprodukte nicht mehr aufgereinigt werden, daher sind nur die Ausbeuten der Rohprodukte angegeben. Analytische Daten wie Schmelzpunkt, NMR und der CHN fehlen folglich.

1,4-Bis(*meso*-4,5-bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-1-yl)butan (72)

Aus 1 mmol (0.355 g) *meso*-4,5-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **43** und 0.55 mmol (66 µl; 0.12 g) 1,4-Dibrombutan und 880 µl einer 2.5 molaren n-Butyllithium-Lösung in Hexan.

Vom Rohprodukt konnten 0.49 g erhalten werden. Es ist ein gelbes Öl.

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 691.2902 gefunden: 691.2163

1,6-Bis(*meso*-4,5-bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-1-yl)hexan (73)

Aus 1 mmol (0.355 g) *meso*-4,5-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **43** und 0.55 mmol (85 µl; 0.134 g) 1,6-Dibromhexan und 880 µl einer 2.5 molaren n-Butyllithium-Lösung in Hexan.

0.5 g Rohprodukt konnten isoliert werden. Bei dem Rohprodukt handelt es sich um ein gelboranges Öl.

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 719.3215 gefunden: 719.3139

1,8-Bis(*meso*-4,5-bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-1-yl)octan (74)

Aus 1 mmol (0.355 g) *meso*-4,5-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **43** und 0.54 mmol (110 μ l; 0.2 g) 1,8-Diiodooctan und 880 μ l einer 2.5 molaren *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan.

Das Rohprodukt ist ein dunkelgelbes Öl und 0.54 g konnten isoliert werden.

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 747.3528 gefunden: 747.3443

1,10-Bis(*meso*-4,5-bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-1-yl)decan (75)

Aus 1 mmol (0.355 g) *meso*-4,5-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **43** und 0.55 mmol (0.165 g) 1,10-Dibromdecan und 880 μ l einer 2.5 molaren *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan.

Vom Rohprodukt konnten 0.43 g erhalten werden. Es ist ein gelbes Öl.

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 775.3841 gefunden: 775.3798

1,4-Bis(*meso*-4,5-bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-1-yl)butan (76)

Aus 1 mmol (0.39 g) *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **44** und 0.55 mmol (66 μ l; 0.12 g) 1,4-Dibrombutan und 880 μ mol einer 2.5 molaren *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan.

Vom Rohprodukt konnten 0.87 g isoliert werden. Es ist ein orangefarbenes Öl.

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 757.5521 gefunden: 757.1798

1,6-Bis(*meso*-4,5-bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-1-yl)hexan (77)

Aus 1 mmol (0.39 g) *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **44** und 0.55 mmol (85 μ l; 0.134 g) 1,6-Dibromhexan und 880 μ mol einer 2.5 molaren *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan.

9 Experimenteller Teil

Vom Rohprodukt konnten 0.49 g isoliert werden. Es ist ein orangegelbes Öl.

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 785.6053 gefunden: 785.1948

1,8-Bis(*meso*-4,5-bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-1-yl)octan (78)

Aus 1 mmol (0.39 g) *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **44** und 0.55 mmol (110 µl; 0.2 g) 1,8-Diiodohexan und 880 µmol einer 2.5 molaren n-Butyllithium-Lösung in Hexan.

Das Rohprodukt ist rotorange. 0.53 g konnten erhalten werden.

MS(+)-ESI-TOF: m/z [M+H]⁺: berechnet: 813.6584 gefunden: 813.2237

1,10-Bis(*meso*-4,5-bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin-1-yl)decan (79)

Aus 1 mmol (0.39 g) *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **44** und 0.55 mmol (0.165 g) 1,10-Dibromdecan und 880 µmol einer 2.5 molaren n-Butyllithium-Lösung in Hexan.

Vom Rohprodukt konnten 0.62 g isoliert werden. Es ist ein orangefarbenes Öl.

MS(+)-ESI: m/z [M+H]⁺: berechnet: 841.7116 gefunden: 841.2580

9.10 Biochemischer und pharmakologischer Teil

9.10.1 Eingesetzte Zelllinien

MCF-7:

Michigan Cancer Foundation Zellkultur; hormonabhängige, Estrogenrezeptor α exprimierende Mammakarzinom-Zellen

MDA-MB-231:

M. D. Anderson Cancer Center; nicht hormonabhängige Mammakarzinom-Zellen; exprimieren keine Estrogenrezeptoren

U2OS:

humane Osteosarkom-Zellen; exprimieren keine Estrogenrezeptor-Subtypen; werden für pharmakologische Testungen mit dem für die Estrogenrezeptoren codierenden Plasmid stabil transfiziert.

9.10.2 Verwendete Geräte, Chemikalien und Lösungen

9.10.2.1 Allgemein:

Kühlschrank Profiline Taurus	Nationallab GmbH
Kryostat EK90	ThermoScientific
Analysenwaage BP211D	Sartorius
Autoklav 2540ELV Dampf-Sterilisator	Tutthauer
CO ₂ -Begasungsbrutschrank Hera cell240	ThermoScientific
Einmal- und Mehrkanal-Pipetten	Eppendorf/Brand
Inversmikroskop Axiovert 25	Zeiss
Multipette® plus	Eppendorf
pH-Meter 605	Metrohm
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Schüttelmaschine LS10	Gerhardt
Spektralphotometer UVIKON 930	Kontron Instruments
Steril-Werkbank Lamin Air®	HeraSafe

9 Experimenteller Teil

Ultraschallbad	Kontron
Vacusaft Handoperator	Integra
Vakuumpumpe	KNF
Wasserbad Haake Fisons W26	Haake Fisons
Zentrifuge Megafuge [®] 1.0 R	Heraeus

Estrogenrezeptoraffinitätsbestimmung (HAP-Test):

Multifuge 3SR+	Heraeus; ThermoScientific
Microbeta Trilux	Perkin Elmer
Ultra-Turrax	Janke&Kunkel

Luciferase-Assay:

Tillix Schüttler	Edmund Bühler
Victor ²	Perkin Elmer

Zellaufnahme und Zellhaufnahmehemmung:

High-Resolution Continuum Source Atom- absorptionsspektrometer contrAA [®] 700	Analytik Jena AG, Jena -Software: ASpect, Rev.: 1.72 -Geräte-Software: HW-Version PCB:05 FPGA:4f CCD:02
--	--

9 Experimenteller Teil

9.10.2.2 Verbrauchsmaterialien:

Einmalkanülen	Braun
Einmalspritzen	Braun
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polystyrol-Einmalküvetten mit Verengung	Sarstedt
Reagiergefäß 1.5 ml EASY CAP	Sarstedt
Reagiergefäß 2 ml EASY CAP	Sarstedt
Spritzen für Multipette® plus	Eppendorf
RotiLabo-Spritzenfilter, steril, 0.22 µm	Roth
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
Alu-Folie für Autoklaven	Roth
6-Well-Makroplatten (steril)	TPP
96-Well-Mikrotiterplatten weiß für Chemolumineszenzmessung	Nunc
Zentrifugenröhrchen konisch 15 ml, 50ml, 100 ml	Falcon, TPP, Sarstedt
Zellkulturflaschen 25 cm ² (steril), 75 cm ² (steril)	Sarstedt

9.10.2.3 Chemikalien und Lösungen

Kristallviolett-Assay:

Seren:	FCS (fetales Kälberserum)	BioChrom
---------------	---------------------------	----------

9 Experimenteller Teil

Zellkulturmedien: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) PAA

Trypsinreagenz: 0.05 % Trypsin, 0.02 % EDTA Boehringer

PBS-Puffer:

8.0 g NaCl, 1.0 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0.15 g NaH₂PO₄·H₂O, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Estrogenrezeptoraffinitätsbestimmung

(HAP-Test: Rezeptordichte-Assay):

Estradiol, [2,4,6,7-³H(N)] Perkin Elmer

Optiphase Supermix Szintillationsflüssigkeit Perkin Elmer

Tris-Puffer, pH = 7.5: 10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, 3.0 mM Na₃N

Estrogenrezeptoraffinitätsbestimmung und Luciferase-Assay:

17β-Estradiol Sigma

Luciferase-Assay:

Seren: FCS (fetales Kälberserum) BioChrom

Zellkulturmedien: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) PAA

Trypsinreagenz: 0.05 % Trypsin, 0.02 % EDTA Boehringer

Cell Culture Lysis Reagent 5x

Promega

Luciferase-Assay

Reagenz:

- | | | |
|----|---|---------|
| 1) | Bright-Glo™ Luciferase Assay Buffer
(im Kühlschrank gelagert) | Promega |
| 2) | Bright-Glo™ Luciferase Assay Reagent
(Tablette, bei -20 °C gelagert) | Promega |

Die Lösung und die Tablette werden fertig gemischt.

Kohlesuspension:

0.8 % Norit A, 0.008 % Dextran 60 in Tris-Puffer pH = 7.4

PBS-Puffer:

8.0 g NaCl, 1.0 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0.15 g NaH₂PO₄·H₂O, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Tris-Puffer, pH = 7.4: 0.1 mM Tris-HCl, 0.1 mM NaCl

9.11 Zelltestungen

9.11.1 Zytotoxizitätstestungen - Kristallviolett-Assay

9.11.1.1 Methoden

In diesem Arbeitskreis werden zwei unterschiedliche Testungen auf Zytotoxizitäten der synthetisierten Verbindungen durchgeführt. Durch die Zweipunktbestimmung kann man einen Hinweis finden, ob sich Substanzen toxisch (T/C_{corr} -Wert $\leq 50\%$) auf die Zellen auswirken. Toxische Wirkungen werden durch einen kombinierten, einem zeit- und konzentrationsabhängigen Zytotoxizitätstest getestet. Alle Substanzen werden an MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen durchgeführt. In allen Tests wird Cisplatin als Referenz mitgeführt.

9.11.1.2 Zweipunktbestimmung - Zweipunkt-Kristallviolett-Assay

Alle Testsubstanzen werden in einer Konzentration von 10 und 20 μM getestet. Die Referenzlösung besteht aus in DMF gelöstem Cisplatin.

9.11.1.2.1 Zellaussaat

Das Medium wird aus der Zellkulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gespült. Trypsin wird in die Flasche pipettiert, über die Zellen laufen gelassen und abgesaugt. Die Kulturflasche wird im Brutschrank für 2 min inkubiert. Die Zellen werden mit frischem Medium vom Boden gespült und durch mehrmaliges Auf- und Absaugen vereinzelt.

Die Zellen werden unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die gewünschte Zellzahl/well beträgt bei MCF-7 750 und bei MDA-MB-231 500. Das Zählen kann durch Trypanblaufärbung erleichtert werden. Bei dieser Methode werden 50 μl Trypanblaulösung, 350 μl PBS und 100 μl Zellsuspension vermischt und die hellen Zellen gezählt. Tote Zellen werden blau angefärbt. Man bildet den Quotienten aus der Anzahl an hellen und dunklen Zellen. Beim Berechnen der Zellzahl wird der Verdünnungsfaktor 5 multipliziert.

9 Experimenteller Teil

Die Zellsuspension wird zusammen mit der berechneten Menge an DMEM-Nährmedium durchmischt. Es werden zwei 96-Loch-Platten vorgelegt. Beide Platten werden mit jeweils 100 μl Zellmedium pro well belegt. Die erste Platte ist die Substanz-Platte. Hier werden die Stammlösungen der Testsubstanzen aufgetragen. Die zweite Platte ist die t_0 -Platte und dient als Blindwert. Anschließend werden beide Platten für 72 h im Brutschrank inkubiert.

9.11.1.2.2 Substanzzugabe und Abstoppen der t_0 -Platte

Für jeweils eine zu testende Verbindung werden 5 ml DMEM und 10 μl der Stammlösung gemischt, so dass die Endkonzentration 10 μM ist. Für eine 20 μM Endkonzentration werden 20 μl Stammlösung mit 5 ml DMEM verdünnt.

Auch die Lösungsmittel DMF und DMSO sowie die verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen werden mit 5 ml DMEM verdünnt.

In der ersten Reihe werden in den ersten vier well reines DMF aufgetragen. Direkt darunter werden in die nächsten Reihen zu jeweils vier well Cisplatin-Verdünnungen der Reihenfolge 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 und 20 μM zugegeben. DMSO wird in einer Konzentration von 10 und 20 μM in der ersten und zweiten Reihe der nächsten vier well pipettiert. In den verbleibenden Reihen werden die Verdünnungen der Testverbindungen in jeweils vier well aufgetragen. Pro well werden 100 μl jeweiliger Verdünnung aufgetragen. Die Substanz-Platte wird in den Brutschrank gestellt und für 96 h inkubiert. Im Folgenden wird die t_0 -Platte nach 72 h abgestoppt. Erst wird das Nährmedium abgesaugt, pro well mit 100 μl einer 1 %ige Glutardialdehyd-Lösung in PBS versetzt, für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach ausgeschüttelt. Zuletzt wird die Platte mit jeweils 180 μl PBS pro well versetzt und in den Kühlschrank gestellt, bis die Substanzplatte ebenfalls abgestoppt wird.

9.11.1.2.3 Abstoppen und Anfärben der Substanzplatte

Nach 96 h Inkubation wird die Substanz-Platte abgestoppt. Das Abstoppen erfolgt genauso wie bei der t_0 -Platte. Das PBS beider Platten wird ausgeschüttelt und

jeweils 100 µl/well Kristallviolett-Lösung (0.02 %) pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird die Kristallviolett-Lösung ausgeschüttelt und beide Platten für 15 min mit Leitungswasser in einer Wanne gewaschen und die Platten danach trocken geklopft. Zum Schluss werden 180 µl/well 70 %iger Ethanol dazu gegeben und für 3 h auf dem Schüttler geschüttelt. Danach werden beide Platten UV-photometrisch bei 590 nm vermessen.

9.11.1.3 Zeit- und konzentrationsabhängiger Zytotoxizitätstest - Kombiniertes Kristallviolett-Assay

Alle Verbindungen, die bei 20 µM oder geringerer Konzentration einen T/C_{corr} -Wert ≤ 50 % zeigen, werden bei dieser Versuchsreihe näher untersucht. Die Testsubstanzen werden ausgehend von der höchsten Konzentration in der Zweipunktbestimmung in 1:2-Verdünnungen getestet. Es werden 5 Verdünnungen verwendet. Auch hier wird die Cisplatin-Verdünnungsreihe verwendet.

Die Durchführung der Aussaat, die Substanzzugabe, das Abstoppen und Anfärben wurde bereits unter der Zweipunktbestimmung beschrieben. Allerdings werden hier neben einer t_0 -Platte 5 gleiche Substanzplatten eingesetzt, die jeweils nach einem bestimmten Zeitpunkt abgestoppt werden. Das Abstoppen erfolgt im Abstand von 24 h, beginnend 48, 72, 96, 120 und 144 h nach Substanzzugabe.

9.11.2 Der HAP-Test: Bestimmung der relativen Bindungsaffinität (RBA)

9.11.2.1 Einführung

Die Durchführung dieses Testsystems erfolgt in mehreren Schritten. Zu allererst werden die Zellversuchsplatten mit HAP (Hydroxylapatit) beschichtet. Anschließend folgt die Herstellung von $ER\alpha$, β -Lösungen und der Verdünnungsplatte für die Testverbindungen. Nach der Substanzzugabe folgen das Aufarbeiten und die Vermessung. Alle Vorgänge des Testsystems, bei denen zentrifugiert werden muss, erfolgen immer für 15 min bei 4 °C und 300 rpm (revolutions per minutes).

9.11.2.2 Durchführung

9.11.2.2.1 Plattenbeschichtung - Herstellung der HAP-Platten

In einer Flasche wird eine Suspension aus 6.4 g HAP und 38.4 ml Tris-Puffer hergestellt. Diese Suspension wird zwei Minuten geschüttelt und 10 Minuten stehen gelassen. Nach 12 Minuten saugt man den Überstand vorsichtig ab und gibt wieder 38.4 ml Tris-Puffer dazu. Der auch als Rehydrierung bezeichnete Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Nur beim dritten Durchgang wird der Überstand nicht mehr abgesaugt. Unter ständigem Schwenken werden je 100 µl/well der Suspension in eine 96 well-Platte pipettiert. Danach wird die Platte zentrifugiert.

9.11.2.2.2 Herstellung der Rezeptorlösungen für ER α , β

Alle Schritte zur Herstellung der Rezeptorlösung, nachfolgend immer „R-Lösungen“ genannt, erfolgen für die Subtypen ER α und ER β . Nur die Mengenangaben der Reagenzien variieren.

9.11.2.2.2.1 R α -Lösung

Die käuflich erworbene Stammlösung mit isoliertem ER α , die bei -80 °C gelagert werden muss, wird im Eisbad sehr langsam auf 4 °C erwärmt. 15.9 µl der aufgetauten Lösung werden mit 3.7 ml Tris-Puffer gemixt, so dass die Endkonzentration 10 pmol/well sein muss. Der Überstand der HAP-Platte wird abgesaugt. 50 µmol/Loch der ER α -Lösung wird auf die Platte mit der Multipette gegeben, 30 min bei 4 °C inkubiert und in dieser Zeit alle fünf Minuten geschüttelt. Im Anschluss wird zentrifugiert.

9.11.2.2.2.2 R β -Lösung

Die Herstellung erfolgt nach gleicher Vorgehensweise wie unter **9.11.2.2.2.1** vorgestellt, nur dass hier 8.2 µl Rezeptorstammlösung mit 3.7 ml Puffer verdünnt werden.

9 Experimenteller Teil

9.11.2.2.3 Verdünnungsplatte

Die Verdünnungsplatte dient zur Herstellung von Substanzlösungen in den notwendigen Konzentrationen. Eine Standardlösung einer Verbindung hat eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-8}$ bis $2 \cdot 10^{-5}$ M. Pro Loch werden 50 μ l pipettiert. Nach Zugabe dieser Untersuchungslösungen in die Verdünnungsplatte kommen anschließend 50 μ l einer $2 \cdot 10^{-5}$ molaren [3 H]-E2-Lösung dazu. Für diese Konzentration mischt man 10 μ l [3 H]-E2-Stammlösung mit 4.8 ml Tris-Puffer. Die Endkonzentration dieser Mischlösung aus Untersuchungsverbindung und radioaktiv markiertem E2 beträgt nun 10^{-5} M.

9.11.2.2.4 Plattenbelegung

Für eine HAP-Platte werden 2/3 mit der entsprechenden R-Lösung und Substanz-/ [3 H]-E2-Mischung (aus der Verdünnungsplatte, **9.11.2.2.3**) belegt. Das restliche 1/3 wird nur mit der Pufferlösung belegt, zu der später die Substanzlösungen ergänzt werden. Sie dienen zur Messung der „Nicht Spezifischen Bindung (NSB)“, quasi als Negativkontrolle. Es gelten folgende Abkürzungen: [3 H]-E2 = mit Tritium radioaktiv markierter Estradiol; Tris = Tris-Puffer; US1-6 = Untersuchungssubstanz 1-6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
		10^{-5}												A
		10^{-6}	US1		US3		US5							B
		10^{-7}												C
		10^{-8}												D
[3 H]-E2		10^{-9}							T	R	I	S		E
		10^{-10}	US2		US4		US6							F
		10^{-11}												G
Tris	Tris													H

9.11.2.2.5 Substanzzugabe

In die Spalten 1+2 A-G werden radioaktive E2-Lösungen der Konzentrationen 10^{-5} bis 10^{-11} M in jedes well pipettiert, in die letzten zwei Löchern dieser Reihe kommt nur Puffer. Pro Platte können sechs Substanzen untersucht werden, für die je zwei Spalten zu vier Zeilen zur Verfügung stehen. Spalte 9-12 A-H kommt nur Puffer rein (siehe Plattenbelegung, 9.11.2.2.4). Aus der Verdünnungsplatte werden jeweils 40 μ l entnommen und in die HAP-ER α - und HAP-ER β -Platte pipettiert. Nach Ende der Substanzzugabe bleiben die Untersuchungsplatten bei Raumtemperatur für 3.5 h stehen, die danach zentrifugiert werden.

9.11.2.2.6 Aufarbeitung

Der Testpuffer wird abgesaugt und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer besteht aus 306.9 ml Tris-Puffer und 3.1 ml Tween 80. Bei jedem Waschvorgang pipettiert man 200 μ l pro well und zentrifugiert. Den Überstand saugt man ab und in die trockenen Platten werden 40 μ l/well Ethanol 96 % pipettiert und dann die Platten für 30 min in den Kühlschrank gestellt und zentrifugiert. Anschließend entnimmt man jeweils 20 μ l/well und pipettiert es in die Meßplatte. Zum Vermessen wird jedes Loch mit 80 μ l Szintillationsflüssigkeit versetzt.

9.11.2.2.7 Messung und Auswertung

Die Messung erfolgt mit dem β -Counter, der die Intensitäten der durch die radioaktiv markierten E2 in EtOH ausgestrahlten β -Strahlung registriert. Nach folgender Beziehung werden die RBA-Werte ermittelt:

$$\text{RBA} = \frac{\text{IC}_{50}([\text{}^3\text{H}]\text{-E2})}{\text{IC}_{50}(\text{Ligand})} \cdot 100 \%$$

9.11.3 Luciferase-Assay - Testung auf Estrogenität und Antiestrogenität

9.11.3.1 Durchführung

9.11.3.1.1 Kultivierung und Aussaat

Für diese Testreihe werden humane Osteosarkomzellen, die U2OS-Zelllinie verwendet. Diese Zellen werden unter allgemeinen Kultivierungsbedingungen herangezüchtet. Bereits vier Tage vor einen durchzuführenden Luciferase-Assay wird für das Passagieren phenolrotfreies DMEM mit 5 % ct-FCS und 1 % Natriumpyruvat verwendet. Zur Aussaat finden weiße 96-Well-Platten ihren Einsatz. Pro well werden 10.000 Zellen in 60 µl ausgesät und die Platten 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

9.11.3.1.2 Transfektion

Die Angaben zur Herstellung der Mischungen für die Transfektion beziehen sich auf eine Platte. Nach erfolgter Aussaat wird genau 24 Stunden später die Transfektion vorgenommen. 52.1 µl PBS und 10.8 µl Transfektionsreagenz Mirus (TransIT) vermischt man miteinander. Das ist die erste Mischung. Parallel dazu wird eine Zweite angefertigt, die aus folgenden Bestandteilen besteht: 31.8 µl PBS, 5.3 µl Reporterplasmid p(ERE)₂-luc⁺ und 1.06 µl pSG5-ER_α oder 1.06 µl pSG5-ER_β. Beide Mischungen werden miteinander vermischt und 20 Minuten unter der Laminar Air Flow-Box (LAF-Box) inkubiert. Nach dieser Zeit setzt man 6.254 ml DMEM zu und vermischt ordentlich. Jeweils 60 µl/well dieser Endmischung werden auf die Zellen, die in der weißen Platte bereits ausgesät wurden, hinzupipettiert.

9.11.3.1.3 Substanzzugabe

Die Substanzzugabe beginnt 30 Stunden nach der Aussaat beziehungsweise sechs Stunden nach der Transfektion. Das alte Medium wird aus der Platte abgesaugt und durch Frisches zusammen mit den Testsubstanzverdünnungen ersetzt.

9.11.3.1.4 Herstellen der Verdünnungsplatte

Parallel zur Platte für die Substanzzugabe (Substanzplatte) wird eine weitere, die Verdünnungsplatte, hergestellt. Diese Platte dient zur Herstellung von Verdünnungen der Testverbindungen aus der Substanzplatte. 90 µl PBS pro well werden in die Verdünnungsplatte vorgelegt. In einer Konzentration von 10^{-5} M Estradiol-Stamm-lösung werden 10 µl in den ersten drei Wells der Reihe A pipettiert. Die verbleibenden Wells dieser Reihe werden mit jeweils 10 µl der 10^{-2} molaren Testverbindungslösungen belegt. Pro Substanz werden drei Spalten benötigt. Die Verdünnungen der Reihe A werden mittels einer 12-Kanal-Pipette gut durchmischt. Pro Well entnimmt man 10 µl, überträgt diese in die Reihe B und durchmischt ebenfalls. Nach diesem Schema wird bis zur letzten Reihe H eine 1:10 Verdünnung erstellt. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass nach Wechsel der jeweiligen Reihe die Pipettenspitzen ausgewechselt werden.

9.11.3.1.5 Übertragen der Verdünnungsplatte auf die Substanzplatte

Das alte Medium wird aus der Testplatte abgesaugt und mit 90 µl Frischem gleicher Volumina versetzt. Reihe A beinhaltet eine 1:100 verdünnte DMSO-Lösung, jeweils 10 µl dieser Verdünnung wurden vorher zu 90 µl/well PBS pipettiert. Ab Reihe B bis H werden die Verdünnungen der Testverbindungen übertragen, die auf der Verdünnungsplatte hergestellt wurden. 10 µl pro well werden zupipettiert. Somit werden diese Verdünnungen nochmals 1:10 verdünnt.

Für Estradiol liegen Konzentrationen von 10^{-14} M bis 10^{-8} M vor. Bei den Testverbindungen sind diese 10^{-11} bis 10^{-5} M. Die Testung auf Estrogenität erfolgt nach diesem Schema. Pro Platte können vier Substanzen untersucht werden. Nach Substanzzugabe wird im Brutschrank inkubiert.

Die Untersuchung auf Antiestrogenität erfolgt in gleicher Weise wie oben beschrieben. Der einzige Unterschied gegenüber der Testung auf Estrogenität ist nur die zusätzliche Beimischung einer gewissen Menge an Estradiol zum frischen Medium, welches zu Anfang pipettiert wurde. Die Testung am ER α erfolgt bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-11}$ M, beim ER β sind es $3 \cdot 10^{-12}$ M.

9.11.3.1.6 Abstoppen des Luciferase-Assays

51 Stunden nach Aussaat wird abgestoppt. Das Medium wird abgesaugt. Die Zellen werden durch Zugabe von Cell Culture Lysis Reagent lysiert. 30 µl pro well werden pipettiert und 20 Minuten lang geschüttelt. Anschließend werden 30 µl/well Luciferaseassay-Reagenz hinzugefügt und sehr schnell die Lumineszenz am Luminometer, angegeben in relative light units RLU, gemessen.

9.11.3.1.7 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Estrogenität erfolgt in Prozent, die sich auf die Positivkontrolle Estradiol der Konzentration $3 \cdot 10^{-9}$ M bezieht. Mit Hilfe von OriginPro 8.5 ergibt sich eine sigmoidale Kurve. Das Plateau wird als 100 % festgelegt.

9.11.4 Bestimmung der Rezeptordichte

9.11.4.1 Allgemeine Durchführung

9.11.4.1.1 Aussaat

Für diese Testreihe werden MCF-7-Zellen verwendet. Unter allgemeinen Kultivierungsbedingungen wird diese Zelllinie herangezüchtet und ausgesät. Hierfür werden weiße 96-Loch-Platten mit klarem Boden verwendet. Pro Well werden 20.000 Zellen für die Aussaat eingesetzt. 2.4 ml der Zellsuspension und 7.1 ml DMEM vermischt man. Anschließend werden 90 µl/well dieser Mischung in die weiße klare Platte pipettiert. Die Angaben beziehen sich auf eine Platte. Nach beendeter Aussaat wird die Platte für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

9.11.4.1.2 Substanzzugabe

Die Substanzzugabe erfolgt in ähnlicher Weise wie bei dem Luciferase-Assay. Hier findet keine Transfektion statt. Auch hier wird neben der Substanzplatte die Verdünnungsplatte verwendet. Die Vorschrift zur Herstellung dieser Platten und das Übertragen der Testverbindungs-lösungen kann unter **Kap. 9.11.3** entnommen werden.

Bei dieser Substanzzugabe hat die Estradiol-Stammlösung eine Konzentration von 10^{-2} M. In der Substanzplatte liegen Estradiol-Verdünnungen der Konzentration 10^{-6} M und 10^{-5} M vor. Auf eine Platte können gleichzeitig 14 Verbindungen untersucht werden. Diese liegen ebenfalls in einer Konzentration von 10^{-6} M und 10^{-5} M vor. Nach beendeter Zugabe wird die Platte für 24 Stunden im Brutschrank bebrütet.

9.11.4.1.3 Abstoppen der Rezeptordichte-Bestimmung

Nach 24 Stunden Bebrüten werden die Lösungen, die in der Platte vorhanden sind, abgesaugt. Jetzt werden 50 μ l radioaktiv markierte [3 H]-Estradiollösung in jedes well pipettiert und 45 min im Brutschrank inkubiert. Danach wird wieder abgesaugt, dreimal mit PBS gewaschen und gründlich getrocknet. Im Anschluss müssen die Zellen lysiert werden. Dazu werden 30 μ l/well 0.3 N NaOH pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dieser Zeit werden in jedes well noch 70 μ l/well Szintillationsflüssigkeit zugesetzt, weitere 10 Minuten geschüttelt und danach vermessen.

9.11.4.1.4 Auswertung der Daten

Die Verwertung der Daten erfolgt mit dem Programm OriginPro 8.5.

9.11.5 Zellaufnahme und Zellaufnahmehemmung

9.11.5.1 Testung der Zellaufnahme von 4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimeren

9.11.5.1.1 Probenvorbereitung

Die Stammlösungen der Verbindungen werden in Aqua bidest. hergestellt und haben eine Konzentration von 20 mM. Ausgehend von dieser Stammlösung wird erst eine 1:100 Vorverdünnung erstellt. Aus dieser werden 150 μ l entnommen und auf 15 ml FCS-freies DMEM gegeben. Die Konzentration beträgt nun 2 μ M.

In 75 cm² Zellkulturflaschen werden MCF-7-Zellen bebrütet und nach einer Konfluenz von 70-80 % saugt man das FCS-haltige DMEM-Zellkulturmedium ab. In diese Zellkulturflaschen werden sodann 15 ml substanzhaltiges, FCS-freies DMEM

pipettiert. Nach Zugabe des FCS-freien Mediums wird für eine gute Benetzung der Zellen gesorgt und fünfmal geschwenkt. Die Messungen erfolgen von Anfang an bis über einen Zeitraum von einer Stunde, in dem die Inkubationen nach 0 (t_0), 10 (t_{10}), 20 (t_{20}), 40 (t_{40}) und 60 (t_{60}) Minuten beendet werden. Für den t_0 -Wert wird weniger als einer Minute die Zellkulturflasche mit substanzhaltigem, FCS-freiem DMEM geschwenkt.

Nach der jeweiligen Inkubation saugt man das FCS-freie DMEM ab. Mit jeweils 5 ml PBS werden die Zellen dreimal gewaschen. Anschließend wird trypsinisiert, um die Zellen von der Zellwand abzulösen. 10 ml FCS-haltiges DMEM werden hinzugegeben, der gesamte Inhalt in Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 2000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Nach diesen fünf Minuten wird zweimal mit jeweils 10 ml PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Im letzten Waschvorgang wird das überstehende PBS vorsichtig abdekantiert, nochmals zentrifugiert und das restliche überstehende PBS vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Das zurückbleibende Zellpellet wird vorsichtig und kurz mit Aqua bidest. gewaschen. Damit sollen noch restliche Anteile an Phosphat, welches vom PBS stammt, herausgewaschen werden.

9.11.5.1.2 Messung der Proben

Die Methode der High-Resolution Continuum Source Atomabsorptionsspektroskopie (HR-CS AAS) wird für die Messungen der gesamten Proben eingesetzt. Dabei wird das Gerät contrAA[®]700 verwendet. Die Kalibrierung der Eichgerade erfolgt mit Hilfe der Matrixangleichung, das heißt, dass die jeweilige Substanz in Zellsuspension vermessen wird. Für die Messung verwendet man einen Magnesium-Modifizier.

9.11.5.2 Zellaufnahmehemmung der 4,5-Diaryl-2-imidazolin-Dimere

Vorbereitung der Messungen

Auch hier beträgt die Stammlösung 20 mM und die Untersuchungslösung 2 μ M. In 75 cm² Zellkulturflaschen werden MCF-7-Zellen ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80 % wird das FCS-haltige Medium abgesaugt und durch 15 ml FCS-freies DMEM ersetzt. Folgende Zellaufnahme-Hemmstoffe werden jeweils zugesetzt:

- Oubain (500 μM)
- Na-Glykocholat (500 μM)
- Cimetidin (500 μM)
- Tetraethylammoniumchlorid (500 μM)
- Chlorpromazin (10 $\mu\text{g/L}$)
- Amilorid (1 mM)
- 5-(*N*-Ethyl-*N*-isopropyl)amilorid (0.1 mM)
- Methyl- β -Cyclodextrin (10 mM)
- Nystatin (25 $\mu\text{g/ml}$)
- Cytochalasin D (10 μM)

Mit den Zusätzen werden die Zellen für 30 Minuten inkubiert und danach das Medium abgesaugt. Die in DMEM gelöst vorliegende Untersuchungssubstanz (2 μM) wird in die Zellkulturflaschen pipettiert und die Kulturflaschen für eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Eine weitere Probe ohne einen Hemmstoff stellt man in den Kühlschrank bei 4 °C. Nach Ablauf einer Stunde werden die Flascheninhalte abgesaugt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zusatz von Trypsin werden die Zellen pelletiert und zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird jeweils zweimal mit kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Mit Aqua bidest. wird restliches Phosphat herausgewaschen. Die erhaltenen Zellpellets werden bis zu ihrer Messung bei -18 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Parallel zur Herstellung der Untersuchungspellets werden drei Zellkulturflaschen, die nur mit Untersuchungssubstanz inkubiert sind, als Negativkontrolle mitgeführt. Sie enthalten keine Zusätze von Zellaufnahme-Hemmstoffen.

9.11.5.3 Geräte und analytische Angaben der HR-CS AAS-Messungen

- Gerät:
High-Resolution Continuum Source Atomabsorptionsspektrometer contrAA@700
Analytik Jena AG, Jena

- Software: ASpect, Rev.: 1.72

9 Experimenteller Teil

- Geräte-Software: HW-Version: PCB:05 FPGA:4f CCD:02

- Detektion: 211, 248 nm
- Untergrundkorrektur: breitbandig und simultan
- Injektionsvolumen: 15 µL
- Signalauswertung: zeitintegrierte Absorption, summiert über 3 Pixel (CP±1)
- Graphitrohr: IC-Standardrohr ohne und mit integrierter PIN-Plattform, Analytik Jena
- AG: Jena, Deutschland
- Schutzgas: Argon 5.0, Alphagaz 1, Air Liquide, Berlin, Deutschland
- Temperaturprogramm für Galiumfluorid (GaF):

Programmschritt	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Haltezustand [s]
Trocknung	80	10	20
Trocknung	90	15	10
Trocknung	110	10	10
Trocknung	140	100	15
Pyrolyse	700	300	15
Molekülbildung	1700	300	7
Ausheizen	2500	1000	4

Gearbeitet wird meistens mit Graphitrohren mit jeweils integrierter PIN-Plattform. Wenn ein neues Graphitrohr eingesetzt werden soll, wird vor der Verwendung zweimal mit 40 µmol eines permanenten Modifiers vorbehandelt. Dieser Modifier besteht aus einer Wolfram-Lösung der Konzentration 10 g/L. Aufgrund des großen Volumens ist darauf zu achten, vorsichtig die Trocknungsschritte einzuleiten. Bei der Handhabung einiger käuflich zu erwerbenden Zirkonium-Standardlösungen ist auf den Fluorwasserstoff-Zusatz zu achten. Generell werden 5 µl eines 0.5-1 %igen Magnesium-Modifier für die Fluor-Bestimmungen eingesetzt. Das Galium für die

9 Experimenteller Teil

Galiumfluorid-Bildung bezieht man aus dem käuflich zu erwerbende Galiumnitrat, aus dem man eine 0.5-1 %ige Galium-Lösung herstellt und 5 μl davon dosiert.

10

Literaturverzeichnis

- [1] Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerock, W., Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, Thieme Verlag, **2005**.
- [2] Riggs, B. L., Spelsberg, T. C., Turner, R. T., *Endocr. Rev.*, **1994**, 15, 275-300.
- [3] Migliaccio, S., Davis, V. L., Korach, K. S., Munson, P. L., *Princip. Pharm. Bas. Conc. Clin. Appl.*, **1994**.
- [4] Karas, R. H., Aronovitz, M. K. S., Sullivan, T. R., Lubahn, D. B., O'Donnell, T. F., Korach, K. S., Mendelson, M. F., Iafrati, M. D., *Nat. Med.*, **1997**, 3, 545-548.
- [5] Lavigne, M. C., Ramwell, P. W., Farhat, M. Y., *FASEB J.*, **1996**, 10, 615-624.
- [6] Inoue, S., Muramatsu, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 270, 1-10.
- [7] Inoue, S., Ogawa, S. I. Y., Hiroi, H., Ikeda, K., Orimo, A., Muramatsu, M., Watanabe, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 236, 140-145.
- [8] Leclercq, G., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2002**, 80, 259-272.
- [9] Brandenberger, A. W., Tee, M. K., Lee, J. Y., Chao, V., Jaffe, R. B., *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **1997**, 82(10), 3509-3512.
- [10] Gustafson, J. A., *J. Endocrinol.*, **1999**, 163, 379-383.
- [11] King, W. J., Greene, G. L., *Nature*, **1984**, 307, 745-747.
- [12] Welshorns, W. V., Lieberman, M. E., Groski, J., *Nature*, **1984**, 307, 747-749.
- [13] Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R., Hager, G. L., *Mol. Bio. Cell.*, **1999**, 10, 471-486.
- [14] Matthews, J., Gustafsson, J. A., *Molecular Interventions*, **2003**, 3, 281-292.
- [15] Jakobsen, H. I., Jensen, E. V., *Recent Prog. Horm. Res.*, **1962**, 18, 387-414.
- [16] Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M. B. A., Hort, Y., Shine, J., *Science*, **1986**, 320, 134-139.
- [17] Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., Chambon, P., *Nature*, **1986**, 320, 134-139.
- [18] Kuiper, G. G., Enmark, J. M., Peltö-Huikko, M., Nilson, S. Gustafson, J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, 93, 5935-5930.

- [19] Shi, J. F., Li, X. J., Si, X. X., Li, A. D., Ding, H. J., Han, X., Sun, Y. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2012**, 427, 47-53.
- [20] Power, K. A., Thompson, L. U., *Breast Canc. Res. Treat.*, **2003**, 81: 209-221.
- [21] Hayashi, S. I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yoshida, N., Yamaguchi, Y., *Endocr. Relat. Cancer*, **2003**, 10, 193-202.
- [22] Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P. H., Murphy, L. C., *Canc. Res.*, **1998**, 58, 3197-3201.
- [23] Speirs, V., Atkin, S. L., Fox, J. N., Carleton, P. J., Walton, D. S., Kerin, M. J., Parkes, A. T., *Canc. Res.*, **1999**, 59, 525-528.
- [24] Kong, E. H., Pike, A. C. W., Hubbard, R. E., *Biochem. Soc. Trans.*, **2003**, 31, 56-59.
- [25] Kumar, V., Green, S., Staub, A., Chambon, P., *EMBO J.*, **1986**, 5, 2231-2236.
- [26] Dutertre, M., Smith, C. L., *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, **2000**, 295, 431-437.
- [27] Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C., *Biochemie & Pathobiochemie*, **2007**, 7.Auflage.
- [28] Norris, J. D., Fan, D., Kerner, S. A., McDonnell, D. P., *Mol. Endocrinol.*, **1997**, 11, 747-754.
- [29] Giguere, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G., Evans, R. M., *Cell*, **1986**, 46, 645-652.
- [30] Godowski, P. J., Picard, D., Yamamoto, K. R., *Science*, **1988**, 241, 812-816.
- [31] Weigel, N. L., Zhang, Y., *J. Mol. Med.*, **1998**, 76, 469-479.
- [32] Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., Picard, D., *EMBO J.*, **1996**, 15, 2174-2183.
- [33] Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, E., Metzger, D., Chambon,

- P., *Science*, **1995**, 270, 1491-1494.
- [34] Tremblay, G. B., Tremblay, A., Labrie, F., Giguere, V., *Mol. Cell. Biol.*, **1999**, 19, 1919-1927.
- [35] Tremblay, A., Tremblay, G. B., Labrie, F., Giguere, V., *Mol. Cell.*, **1999**, 3, 513-519.
- [36] Aronica, S. M., Katzenellenbogen, B. S., *Mol. Endocrinol.*, **1993**, 7, 743-752.
- [37] Lees, J. A., Fawell, S. E., Parker, M. G., *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 5477-5488.
- [38] Jordan, V. C., MacGregor Schafer, J., Levenson, A. S., Liu, H., Pease, K. M., Simons, L. A., Zapf, J. W., *Cancer Res.*, **2001**, 61, 6619-6623.
- [39] Tedesco, R., Thomas, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., *Chemistry & Biology*, **2001**, 8, 277-287.
- [40] Anstead, G. M., Carlson, K. E., Katzenellenbogen, J. A., *Steroids*, **1997**, 62, 268-303.
- [41] Beato, M., Sanchez-Pacheco, A., *Endocr. Rev.*, **1996**, 17, 587-609.
- [42] Tzukerman, M. T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M. G., Stein, R. B., Pike, J. W., McDonnell, D. P., *Mol. Endocrinol.*, **1994**, 8, 21-30.
- [43] Berry, M., Metzger, D., Chambon, P., *EMBO J.*, **1990**, 9, 2811-2818.
- [44] Gronemeyer, H., *Annu. Rev. Genet.*, **1991**, 25, 89-123.
- [45] Evans, R.M., *Science*, **1988**, 240, 889-895.
- [46] Freedman, L. P., *Endocr. Rev.*, **1992**, 13, 129-145.
- [47] Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., Sigler, P. B., *Nature*, **1991**, 352, 497-505.

- [48] Tsai, M. J., O'Malley, B. W., *Annu. Rev. Biochem.*, **1994**, 63, 451-486.
- [49] Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H., Chambon, P., *Nature*, **1989**, 338, 271-274.
- [50] Jackson, T. A., Richer, J. K., Bain, D. L., Takimoto, G. S., Tung, L., Horwitz, K. B., *Mol. Endocrinol.*, **1997**, 11, 693-705.
- [51] Hansen, R. K., Fuqua, S. A. W., *Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenesis and Therapeutics*, Humana Press, Bowcock, A. M., Totowa, New Jersey, **1999**, 1-6.
- [52] Gronemeyer, H., Benhamou, B., Berry, M., Bocquel, M. T., Gofflo, D., Garcia, T., Lerouge, T., Metzger, D., Meyer, M. E., Tora, L., Vergezac, A., Chambon, P., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1992**, 41, 217-221.
- [53] Green, S., Chambon, P., *Nature*, **1986**, 324, 615-617.
- [54] Schlenk, M., Dissertation, Freie Universität Berlin, **2006**.
- [55] Mosselman, S., Polman, J., Dijkema, R., *FEBS Lett.*, **1996**, 392, 49-53.
- [56] Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **1998**, 243, 122-126.
- [57] Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M., *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 3505-3512.
- [58] Renoir, J. M., Bouchou, T., Baulieu, E. E., *Biochemistry*, **1986**, 25, 6405-6413.
- [59] Evans, R. M., Chen, J. D., *Nature*, **1995**, 377, 454-457.
- [60] Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., *Nature*, **1995**, 377, 397-404.
- [61] Guichon-Mantel, A., Delabre K., Leskop, P., Milgron, E., *J. Steroid Mol. Bio.*, **1996**, 56, 1-6.

- [62] Bagchi, M. K., O'Malley, B. W., Tsai, S. Y., Tsai, M., *Mol. Cell, Biol.*, **1991**, 11, 4998-5004.
- [63] Le Goff, P., Katzenellenbogen, B. S., Scholin, D. J., Montano, M. M., *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 4458-4466.
- [64] Denton, R. R., Notides, A. C., Koszewski, N. J., *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 7263-7268.
- [65] Jungblut, P. W., Wagner, R. K., Meyer, H. H., *Bresciani*, **1980**, 37. Edition.
- [66] Littl, M., Jungblut, P. W., Szendro, P. I., *Z. physiol. Chem.*, **1973**, 354, 1599-1610.
- [67] Khan, S. A., Wang, H., Ip, W., Tang, M., Zeng, X., Peters, G. A., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 233222-23329.
- [68] Katzenellenbogen, J. A., Tamrazi, A., Hurth, K. M., Daniels, J. R., Carlson, K. E., *Mol. Endocrinol.*, **2002**, 16, 2706-2719.
- [69] Klinge, C. M., *Steroide*, **2000**, 65, 227-251.
- [70] Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Rose, D. W., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1996**, 9, 222-232.
- [71] Ding, X. F., Ma, H., et al., Anderson, C. M., *Mol. Endocrinol.*, **1998**, 12, 302-313.
- [72] Wagner, R. L., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., West, B. L., McGrath, M. E., Apriletti, J. W., *Nature*, **1995**, 378, 690-697.
- [73] Renaud, J. P., Ruff, M., Rochel, N., *Nature*, **1995**, 378, 681-689.
- [74] Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., Moras, D., *Nature*, **1995**, 375, 377-382.
- [75] Leers, J., Treuter, E., Gustafsson, J. A., *Mol. Cell. Biol.*, **1998**, 18, 6001-6013.
- [76] Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C., Brown, M., *Science*, **1994**, 264, 1455-1458.
- [77] Leo, C., Chen, J. D., *Gene*, **2000**, 245, 1-11.
- [78] Struhl, K., *Genes Dev.*, **1998**, 12, 599-606.

- [79] Sternglanz, R., *Trends Biochem. Sci.*, **1996**, 21, 357-358.
- [80] Tsukiyama, C., Wu, T., *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **1997**, 7, 182-191.
- [81] Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., *Science*, **1998**, 279, 703-707.
- [82] Greenblatt, J., *Cell*, **1991**, 66, 1067-1070.
- [83] Klein-Hitpass, L., Ryffel, G. U., Wagner, U., Schorpp, M., *Cell*, **1986**, 46, 1053-1061.
- [84] Nikolov, D. B., Burley, S. K., Roeder, R. G., Lee, D. K., Hisatake, K., Usheva, A. A., Halay, E. D., Chen, H., *Nature*, **1995**, 377, 119-128.
- [85] Usheva, A. E., Aloni, Y., Houbavi, D., Lu, H., Goldring, A., Maldonado, E., *Cell*, **1992**, 69, 871-881.
- [86] Buratowski, S., *Cell*, **1994**, 77, 1-3.
- [87] Ing, N.H., O'Malley, B. W., Tsai, M. J., Tsai, S. Y., Beekman, J. M., *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 17617-17623.
- [88] Berger, L. S., Wang, L., Mizzen, C., Ying, C., Candau, R., Barlev, N., Brownell, J., Allis, C. D., *Mol. Cell. Biol.*, **1997**, 17, 519-527.
- [89] Korzus, E., Rose, D. W., Torchia, J., *Science*, **1998**, 279, 303-307.
- [90] Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Bain, D. L., Richer, J. K., Takimoto, G. S., Tung, L., *Mol. Endocrinol.*, **1996**, 10, 1167-1177.
- [91] Lavinsky, R. M., Jepsen, K., Heinzl, T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 2920-2925.
- [92] Dettmann, S., Dissertation, Freie Universität Berlin, **2006**.
- [93] Katzenellenbogen, B. S., Montano, M. M., Ekena, K., Herman, M. E., McInerney, E. M., *Breast Cancer Res. Treat.*, **1997**, 44, 23-38.
- [94] MacGregor, J. I., Jordan, V. C., *Pharmacol. Rev.*, **1998**, 50, 151-196.

- [95] Shiau, A. K., Greene, G. L., Agard, D. A., Kushner, P. S., Cheng, L., Loria, P. M., Barstad, D., *Cell*, **1998**, 95, 927-937.
- [96] Gust, R., Keilitz, R., Schmidt, K., *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 1963-1970.
- [97] Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. W., Bonn, T., Engström, O., Oehman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. Å., Carlquist, M., *Nature*, **1997**, 389, 753-758.
- [98] Pike, A. C. W., Brzozowski, A. M., Hubbard, R. E., Bonn, T., Thorsell, A. G., *EMBO J.*, **1999**, 18, 4608-4618.
- [99] von Rauch, M., Dissertation, Freie Universität Berlin, **2003**.
- [100] Pike, A. C. W., Brzozowski, A. M., Walton, J., Hubbard, R., Thorsell, A. G., Li, Y. L., Gustafsson, J. A., Carlquist, M., *Structure*, **2001**, 9, 145-153.
- [101] Shiau, A. K., Barstad, D., Radek, J. T., Meyer, M., Nettles, K. W., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., Agard, D. A., Greene, G. L., *Nature Struct. Biol.*, **2002**, 9, 359-364.
- [102] Filardo, E. J., Quinn, J. A., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., Thomas, P., *Mol. Endocrinol.*, **2000**, 14, 1649-1660.
- [103] Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M. M., Mizukami, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 346, 904-910.
- [104] Rae, J. M., Johnson, M. D., *Breast Cancer Res.*, **2005**, 7, 243-244.
- [105] Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., Prossnitz, E. R., *Science*, **2005**, 307, 1625-1630.
- [106] Otto, C., Rohde-Schulz, B., Schwarz, G., Fuchs, I., Klewer, M., Brittain, D., Langer, G., Bader, B., Prella, K., Nubbemeyer, R., Fritzemeier, K.-H., *Endocrin.*

- Soc., **2008**, 1-41.
- [107] Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., Dong, J., *Endocrin.*, **2005**, 146(2), 624-632.
- [108] Thomas, P., Dong, J., *J. Steroids Biochem. Mol. Biol.*, **2006**, 102, 175-179.
- [109] Graeme, W., *Mol. Cell. Endocr.*, **2012**, 351, 269-278.
- [110] Ho, K. J., Liao, J. K., *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, **2002**, 22, 1952-1961.
- [111] Hazell, G. G. J., Yao, S. T., Roper, S. A., Prosnitz, E. R., O'Carroll, A. M., Lolait, S. J., *J. Endocrin.*, **2009**, 202(2), 223-236.
- [112] Filardo, E. J., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2002**, 80, 231-238.
- [113] Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T. I., Prosnitz, E. R., Musti, A. M., Ando, S., Maggiolini, M., *Cancer Res.* **2007**, 67, 1859-1866.
- [114] Notas, G., Kampa, M., Pelekanou, V., Castanas, E., *Steroids*, **2012**, 77, 943-950.
- [115] Wappes, B., Jennerwein, M., von Angerer, E., Schönenberger, H., Engel, J., Berger, M., Wrobel, K. H., *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 1280-1286.
- [116] von Angerer, E., Egginger, G., Kranzfelder, G., Bernhauer, H., Schönenberger, H., *J. Med. Chem.*, **1982**, 25, 832-837.
- [117] Schönenberger, H., Wappes, B., Jennerwein, M., Berger, M., *Cancer Treat. Rep.*, **1984**, 11, 125-130.
- [118] Karl, J.; Gust, R., Spruss, T., Schneider, M. R., Schönenberger, H., Engel, J., Wrobel, K. H., Lux, F., Häberlin, S. T., *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 72-83.
- [119] Gust, R., Burgemeister, T., Mannschreck, A., Schönenberger, H., *J. Med.*

- Chem.*, **1990**, 33, 2535-2544.
- [120] Gust, R., Schönenberger H., *Arch. Pharm.*, **1993**, 326, 405-413.
- [121] Gust, R., Niebler, K., Schönenberger, H., *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 2070-2079.
- [122] Berube, G., Rabouin, D., Perron, V., N'Zemba, B., Gaudreault., R.-C., Parent, S., Asselin, E., *Steroids*, **2006**, 71, 911-921.
- [123] Rabouin, D., Perron, V., N'Zemba, B., Gaudreault., R.-C., Berube, G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 557-560.
- [124] Bergmann, K. E., Wooge, C. H., Carlson, K. E., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A. J., *Steroid Biochem. Mol.*, **1994**, 49, 139-152.
- [125] Groleau, S., Nault, J., Lepage, M., Couture, M., Dallaire, N., Berube, G., Gaudreault., R.-C., *Bioorg. Chem.*, **1999**, 27, 383-394.
- [126] Shan, M., Carlson, K. E., Bujotzek, A., Wellner, A., Gust, R., Weber, M., Katzenellenbogen, J. A., Haag, R., *ACS Chem. Biol.*, **2013**, 8, 707-715.
- [127] Kapp, T., Dissertation, Freie Universität Berlin, **2005**.
- [128] Dullin, A., Dissertation, Freie Universität Berlin, **2006**.
- [129] Kapp, T., Dullin, A., Gust, R., *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 1182-1190.
- [130] Kapp, T., Müller, S., Gust, R., *ChemMedChem.*, **2006**, 1(5), 560-564.
- [131] Olah, G. A., Arvanaghi, M., *Angew. Chem.*, **1981**, 93, 10.
- [132] Bai, Z., Dissertation, Freie Universität Berlin, **2006**.
- [132] Fanghänel, E., Bartossek, H., Lochter, Th., Baumeister, U., Hartung, H., *J. Prakt. Chem.*, **1997**, 339, 277-283.
- [134] Gust, R., Burgemeister, T., Mannschreck, A., Schöneberger, H., *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 2535-2544.
- [135] Hünig, S., Märkl, G., Sauer, J., „Integriertes organisches Praktikum“, Verlag Chemie, Weinheim, **1979**, 90 und 452.
- [136] Japp, F. R., Hooker, S. C., *Chem. Ber.*, **1884**, 17, 2402-2411.

- [137] Vögtle, F., Goldschmitt, E., *Chem. Ber.*, **1976**, 109, 1-40.
- [138] Kim, H., Nguyen, Y., Pai-Hui Yen, C., Chagal, L., Lough, A. J., Moon Kim, B., Chin, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 12184-12191.
- [139] Benton, F. L., Dielon, T. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1942**, 64, 1128-1129.
- [140] Pinner, A., *Chem. Ber.*, **1883**, 16, 1643-1655.
- [141] Dalko, P. I., Langlois, Y., *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 8107-8117.
- [142] Tuck, L. D., Nematollahi, J., *J. Pharm. Sci.*, **1967**, 56, 684-687.
- [143] Taylor, E.C., Ehrhart, W.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82 (12), 3138-3141.
- [144] Martin, P. K., Matthews, H. R., Rapoport, H., Thyagarajan, G., *J. Org. Chem.*, **1968**, 33, 3758-3761.
- [145] Boykin, B. C., Francesconi, I., Wilson, D., Tanious, F. A., Hall, J. E., Bender, B. C., Tidwell, R. R., McCurdy, D., *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 2260-2265.
- [146] Keilitz, R., Dissertation, Freie Universität Berlin, **1999**.
- [147] Kyrides, L. P., Zienty, F. B., Steahly, G. W., Morrill, H. L., *J. Org. Chem.*, **1947**, 12, 577-586.
- [148] Gruseck, U., Heuschmann, M., *Chem. Ber.*, **1987**, 120, 2053-2064.
- [149] Horwitz, K. B., Costlow, M. E., McGuire, W. L., *Steroids*, **1975** 26(6), 785-795.
- [150] Stoica, A., Pentecost, E., Martin, M. B., *Endocrinology*, **2000**, 141(10), 3595-3602.
- [151] Engel, L. W., Young, N. A., *Cancer Res.*, **1978**, 38, 4327-4339.
- [152] Mathew, A. C., Rajah, T. T., Hurt, G. M., Abidi, S. M. A., Dmytryk, J. J., Pento, J. T., *Clinical & Experimental Metastasis*, **1997**, 15 (4), 393-399.
- [153] Gillies, R. J., N. Didier et al. *Anal. Biochem.*, **1986**, 159 (1), 109-113.
- [154] Carlson, K. E., Choi, I., Gee, A., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., *Biochemistry*, **1997**, 36, 14897.
- [155] Stauffer, S. R., Sun J., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A.,

- Bioorg. & Med. Chem.*, **2000**, 8, 1293-1316.
- [156] Gust, R., Keilitz, R., Schmidt, K., v. Rauch, M., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45 (16), 3356-3365.
- [157] Strohmeier, J., von Angerer, E., *Archiv der Pharmazie*, **1985**, 318(5), 421-31.
- [158] Hartmann, R., Kranzfelder, G., von Angerer, E., Schönenberger, H., *J. Med. Chem.*, **1980**, 23, 841-848.
- [159] Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., Carlquist, M., *Nature*, **1997**, 389(6652), 753-758.
- [160] Meyer, T., Koop, R., von Angerer, E., Schönenberger, H., Holler, E., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1994**, 120, 359-364.
- [161] Ponten, J., Saksela, E., *Int. J. Cancer*, **1967**, 2, 434-447.
- [162] Engel, L. W., Young, N. A., *Cancer Res.*, **1978**, 38, 4327-4339.
- [163] Meyer, T., Diplomarbeit, **1992**, Universität Regensburg.
- [164] DeLuca M., McElroy, W. D., *Methods Enzymol.*, **1978**, 57, 3-15.
- [165] Hafner, F., Holler, E., von Angerer, E., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **1996**, 58, 385-393.
- [166] von Angerer, E.; Biberger, C., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, 64, 277-285.
- [167] de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., Subramani, S., *Mol. Cell. Biol.*, **1987**, 7, 725-737.
- [168] Hofmann, K. H., *Biologie in unserer Zeit*, **1981**, 11, 97-106.
- [169] von Rauch, M., Schlenk, M., Gust, R., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 915-927.
- [170] Berube, G., Rabouin, D., Perron, V., N'Zemba, B., Gaudreault, R. C.,

- Parent, S., Asselin, E., *Steroids*, **2006**, 71, 911-921.
- [171] Shan, M., Carlson, K. E., Bujotzek, A., Wellner, A., Gust, R., Weber, M., Katzenellenbogen, J. A., Haag, R., *ACS Chem. Biol.*, **2013**, 8, 707-715.
- [172] Bergmann, K. E., Wooge, C. H., Carlson, K. E., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., *Steroid Biochem. Mol.*, **1994**, 49, 139-152.
- [173] Kekenes-Huskey, P. M., Muegge, I., von Rauch, M., Gust, R., Knapp, E.-W., *Bioorg. & Med. Chem.*, **2004**, 12, 6527-6537.
- [174] Burger, A., Seth, A. K., *Eur. J. Cancer*, **2004**, 40, 2217-2229.
- [175] Minorics, R., Ducza, E., Marki, A., Paldy, E., Falkay, G., *Mol. Rep. Develop.*, **2004**, 68, 463-468.
- [176] Kiang, D. T., Kollander, R. E., Thomas, T., Kennedy, B. J., *Cancer Res.*, **1989**, 49, 5312-5316.
- [177] Esslimani, S. M., Kramar, A., Simony-Lafontaine, J., Warner, M., Gustafsson, J. A., Rochefort, H., *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11, 3170-3174.
- [178] Krüger, M., Dissertation, Freie Universität Berlin, **2013**.
- [179] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M., *Spectrochim. Acta*, **2006**, Part B, 61, 572-578.
- [180] Fry, R. C., Northway, S. J., Brown, R. M., Hughes, S. K., *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 1716-1722.
- [181] Chiba, K., Yoshida, K., Tanabe, K., Ozaki, M., Haraguchi, H., Winefordner, J. D., Fuwa, K., *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 761-764.
- [182] Okamoto, Y., Yasukawa, N., Fujiwara, T., Iwamoto, J., *J. Anal. At. Spectrom.*, **2000**, 15, 809-811.
- [183] Tsunoda, K. I., Fujiwara, K., *Anal. Chem.*, **1977**, 49, 2035-2039.

- [184] Dittrich, K., Vorberg, B., Funk, J., Beyer, V., *Spectrochim. Acta*,
1984, B 39, 349-363.
- [185] Tsunoda, K. I., Chiba, K., Haraguchi, H., Fuwa, K., *Anal. Chem.*, **1979**, 2059-
2061.
- [186] Welz, B., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Wiley-VCH, Weinheim,
2005.
- [187] Heitmann, U., Schütz, M., Becker-Ross, H., Florek, S., *Spectrochim. Acta*,
1996, B 51, 1095-1105.
- [188] Leistner, E., Breckle, S. W., Lehrbuch der „Pharmazeutische Biologie“, **2008**,
7.Auflage.
- [189] Plattner, H., Hentschel, J., Zellbiologie. Thieme Verlag, **2002**.
- [190] Karp, G., Molekulare Zellbiologie. Springer Verlag, **2005**.
- [191] Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K.,
Walter, P., Wiley-VCH Verlag, **2005**.
- [192] Levin, E. R., *Steroids*, **2002**, 67, 471-475.
- [193] Tarasenko, A. S., Sivko, R. V., Krisanova, N. V., Himmelreich, N. H., Borisova,
T. A., *J. Mol. Neurosc.*, **2010**, 41, 358-367.
- [194] Byfield, F. J., Aranda-Espinoza, H., Romanenko, V. G., Rothblat, G. H.,
Levitan, I., *Biophys. J. Vol.*, **2004**, 87, 3336-3343.
- [195] Samarzija, I., Guttler, Z., *Farm. Glas.*, **2011**, 67, 373-388.
- [196] Toselli, M., Biella, G., Taglietti, V., Cazzaniga, E., Parenti, M., *Biophys. J.*,
2005, 89, 2443-2457.
- [197] Lajoie, P., Nabi, I. R., Stan, R. V., *J. Cell. Mol. Med.*, **2007**, 11, 644-653.

- [198] Sato, K., Nagai, J., Mitsui, N. Yumoto, R., Takano, M., *Life Sciences*, **2009**, 85, 800-807.
- [199] Sharma, D. K., Brown, J., C., Choudhury, A., Peterson, T. E., Holicky, E., Marks, D. L., Simari, R., Parton, R. G., Pagano, R. E., *Mol. Biol. Cell*, **2004**, 15, 3114-3122.
- [200] Gronert, S., Shurvell, H. F., Lightner, D. A., Pearson Studium, **2012**.
- [201] Schäfer, A., Dissertation, Freie Universität Berlin, **2010**.
- [202] Matter, L., Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der Spektrometrie, Wiley-VCH Verlag, **1995**.
- [203] Lankau, T., Yu, C.-H., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, 12758-12769.
- [204] Connors, K. A., Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability, Wiley-VCH Verlag, **1987**.
- [205] Cohen, M. D., Fischer, E., *J. Chem. Soc.*, **1962**, 3044.
- [206] Perkampus, H. H., UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen, Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York, **1986**.
- [207] Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **2007**.
- [208] Fernandez, B., Perillo, I., Lamdan, S., <http://pubs.rsc.org>, **1973**.
- [209] Watts, M. M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1990**, 67, 993-995.
- [210] Perillo, I. A., *J. Heterocycl. Chem.*, **1987**, 24, 1717.
- [211] Haake, P., Watson, J. W., *J. Org. Chem.*, **1970**, 35, 4063-4068.
- [212] Limatibul, S., Watson, J. W., *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 3803-3805.
- [213] de Savignac, A., Kabbage, T., Dupin, P., Calmon, M., *J. Heterocycl. Chem.*, **1978**, 15, 897-905.
- [214] Harnsberger, B. G., Riebsommer, J. L., *J. Heterocycl. Chem.*, **1964**, 1, 229-232.

- [215] Salerno, A., Ceriani, V., Perillo, I. A., *J. Heterocycl. Chem.*, **1997**, 34(3), 709-716.
- [216] Ferm, R. J., Riebsomer, J. L., Martin, E. L., Daub, G. H., *J. Org. Chem.*, **1953**, 18, 643-648.
- [217] Huang, Y., Zu, X., Wu, F., Xu, J., Wu, X., Yao, H., *Tetrahedron*, **2012**, 68, 3123-3128.
- [218] Duranti, E., Balsamini, C., *Communications*, **1974**, 815-816.
- [219] Allonas, X., Obeid, H., Fouassier, J.-P., Kaji, M., Ichihashi, Y., Murakami, Y., *J. Photopolymer Sci. Techn.*, **2003**, 16, 123-128.
- [220] Wöhrle, D., Tausch, M. W., Stohrer, W.-D., *Photochemie*, **1998**, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

11

Anhang

11.1 Abkürzungen

Å	Ångström (0.1 nm)
Abb.	Abbildung
AF-1	Aktivierungsfunktion 1 des Estrogenrezeptors
AF-2	Aktivierungsfunktion 2 des Estrogenrezeptors
AG	Anreicherungsgrad
Akt	„serin-threonine kinase“
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure/Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BBr ₃	Bortribromid
BL-OHT	Bivalente Liganden des 4-Hydroxytamoxifens
CCD	Charge Coupled Devices-Detektoren
CHN	Elementaranalyse
DEMON	Double Echelle Monochromator
DES	Diethylstilbestrol
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMEM _{sine}	Dulbecco´s Modified Eagle Medium (ohne Phenolrot)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid, 6-fach deuteriert

11 Anhang

DNA	deoxyribonucleic acid
E2	17 β -Estradiol
[³ H]-E2	17 β -Estradiol, radioaktiv markiert
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EGF	epidermal growth factor
EIPA	5-(<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -isopropyl)amilorid
ER	Estrogenrezeptor
ERE	estrogen response elements
FCS	fetales Kälberserum
GF	growth factor
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GPR30-R	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 30
H12	Helix 12
HAP	Hydroxylapatit
HAT-Aktivität	Histonacetyltransferaseaktivität
HES	<i>meso</i> -Hexestrol
HR-CS AAS	High-Resolution Continuum Source Atomabsorptionsspektroskopie
His	Histidin
HSP90	heat shock protein 90
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ile	Isoleucin
IGF-1	insulin-like growth factor

11 Anhang

kDa	Kilodalton
LBD	Ligandenbindungsdomäne
Leu	Leucin
luc	Luciferase
Lys	Lysin
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation, humane hormonabhängige Mammakarzinomzelllinie
MDA-MB-231	Monroe D. Anderson, metastatic breast cancer, humane nichthormonabhängige Mammakarzinomzelllinie
MeOH	Methanol
Met	Methionin
mRNA	messenger ribonucleic acid
M- β -CD	Methyl- β -Cyclodextrin
NCoR	nuclear receptor corepressor
NLS	nuclear localisation signal
NO	Stickstoffmonoxid
n-BuLi	n-Buthyllithium
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
O-O-Abstand	Abstand der Hydroxygruppen eines Liganden des Estrogenrezeptors
PBS	phosphate buffered saline
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase

11 Anhang

PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
P ₂ O ₅	Phosphorpentoxid
ppm	parts per million
RAL	Raloxifen
Ras	Ras-Kinasen
RBA	relative Bindungsaffinität
RLU	relative light units
RP-18-Säule	reversed phase 18 Säule
rpm	revolutions per minute
RTP	relative Transkriptionspotenz
RTK	Rezeptor-Thyrosin-Kinasen
SAR-Studien	structure activity relations-Studien; Struktur-Wirkungsbeziehungen-Studien
SERM	Selektiver Estrogenrezeptor Modulator
SMRT	silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors
Src	nonreceptor tyrosin kinase
Tab.	Tabelle
TAM	Tamoxifen
TATA	Basensequenz TATAAA innerhalb des Promoters
TAF	TATA-assoziierte Faktoren
TBP	TATA-bindendes Protein

11 Anhang

T/C _{corr} -Wert	Wert zur Beurteilung des zellproliferationshemmenden Effekts
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TFIIB, D, F	Transkriptionsfaktoren
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
t _R	Retentionszeit
U2OS	humane Osteosarkom-Zelllinie
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System

11.2 Posterpräsentationen

Synthese von Spacer-verbrückten, bivalenten Estrogenanaloga und deren DNA-Modulation. Berichtposter der Teamprojektleiter Prof. Dr. Ronald Gust und Prof. Dr. Rainer Haag für den SFB 765 (Teilprojekt B6), Mai 2011.

Synthesis and Cytotoxicity of Bivalent 4,5-Diaryl-imidazolines with Different Substitution Pattern. Murat Üstünel, Prof. Dr. Ronald Gust. International Symposium of the Collaborative Research Center SFB 765 (Teilprojekt B6) in Zeuthen, Oktober 2010.

Imidazolin-Dimere als Liganden des GPR30-Rezeptors. Murat Üstünel, Magnus Krüger, Prof. Dr. Ronald Gust. Tag der Pharmazie der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG an der Freien Universität Berlin - Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Juli 2010.

Synthesis of Spacer-Linked Bivalent Estrogen Analogues and their DNA Modulation. Anja Wellner, Murat Üstünel, Min Shan, Prof. Dr. Rainer Haag, Prof. Dr. Ronald Gust. Doktoranden-Symposium des SFB 765 (Teilprojekt B6) in Rheinsberg, September 2009.

Spacer-Linked Estrogen-Analogues based on 1,2-Diarylethylendiamines. Murat Üstünel, Anja Wellner, Prof. Dr. Ronald Gust. Tagung des SFB 765 (Teilprojekt B6) an der Freien Universität Berlin, Februar 2009.

