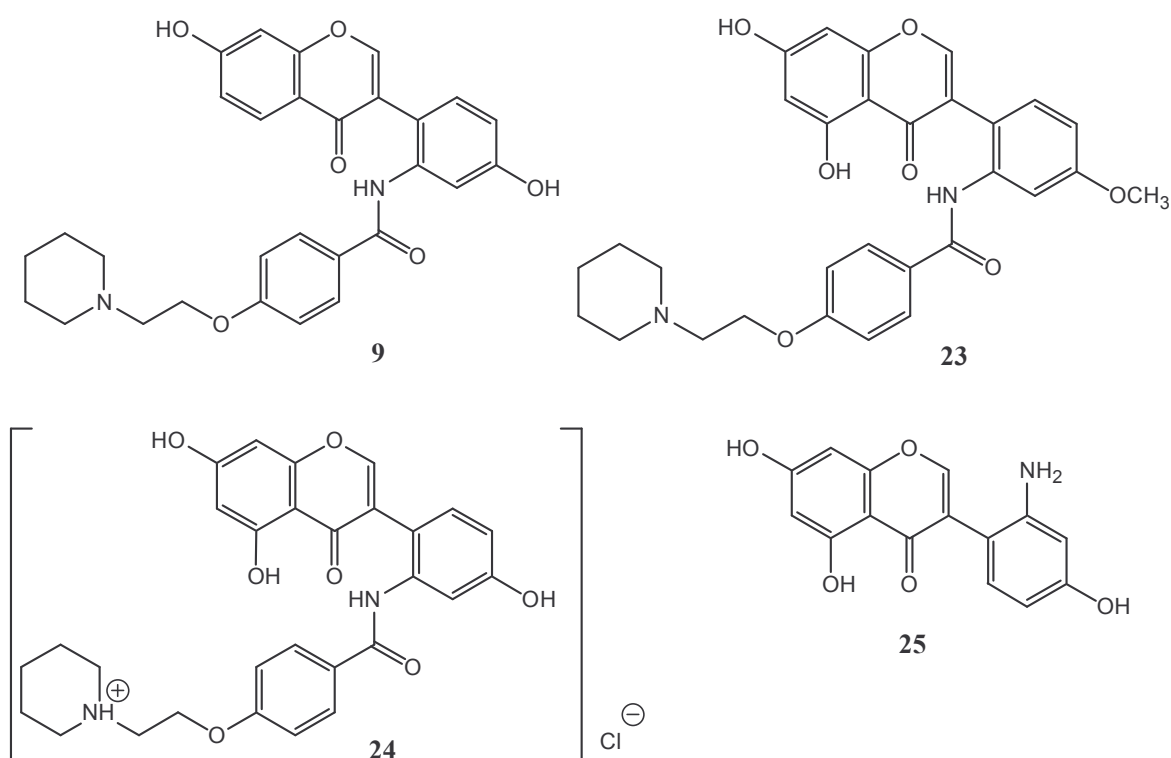


## 4 Pharmakologischer Teil

### 4.1 *In vitro*-Zytotoxizitätstest an der MCF-7-Zelllinie

#### 4.1.1 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

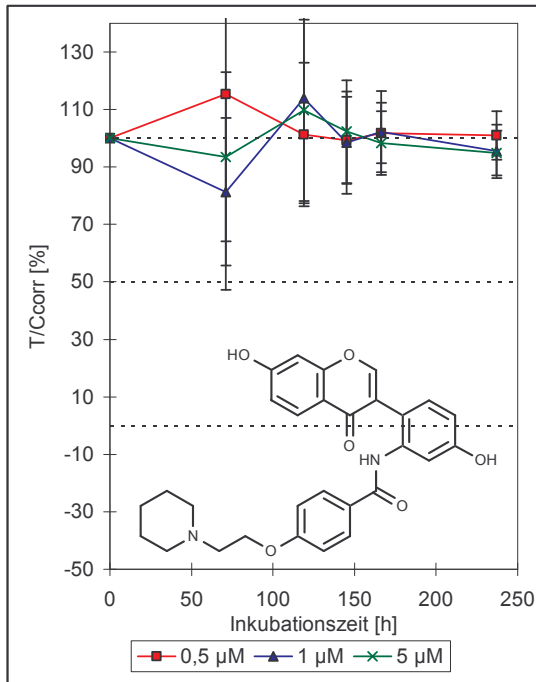
Die in der Abbildung 4.1 dargestellten Verbindungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Gust nach der in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Methode auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht [208, 209].



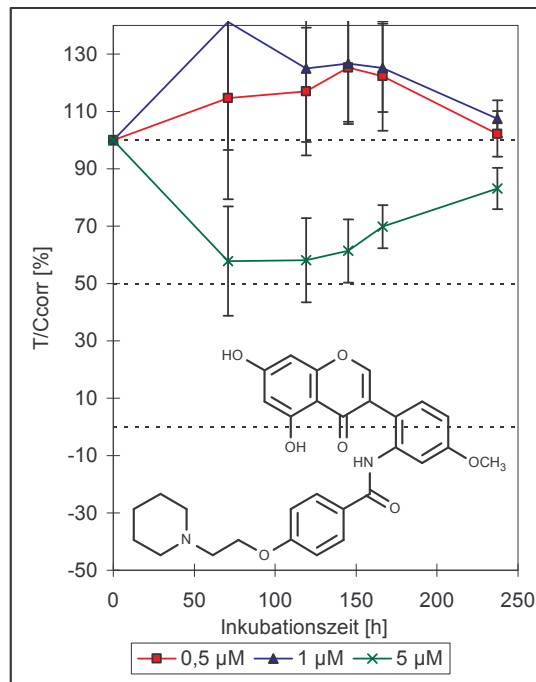
**Abb. 4.1:** Übersicht der Substanzen, die auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht wurden.

Die Untersuchungen wurden an der MCF-7-Brustkrebszelllinie durchgeführt, die aufgrund ihres hohen Gehalts an Steroidrezeptoren als hormonabhängig eingestuft wird.

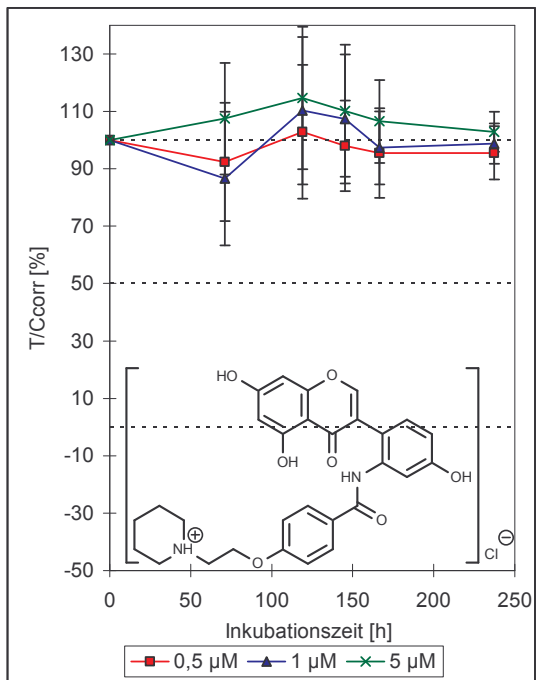
Die Ergebnisse der *In vitro*-Zytotoxizitätstests der Verbindungen **9**, **23**, **24** und **25** sind in der Abbildung 4.2 graphisch dargestellt. Als Maß für die Zytotoxizität werden dabei die ermittelten  $T/C_{\text{kor}}$ -Werte [%] in Abhängigkeit von der Inkubationszeit [h] herangezogen. Die Substanzen wurden jeweils in den Konzentrationen 0.5, 1 und 5  $\mu\text{M}$  getestet.



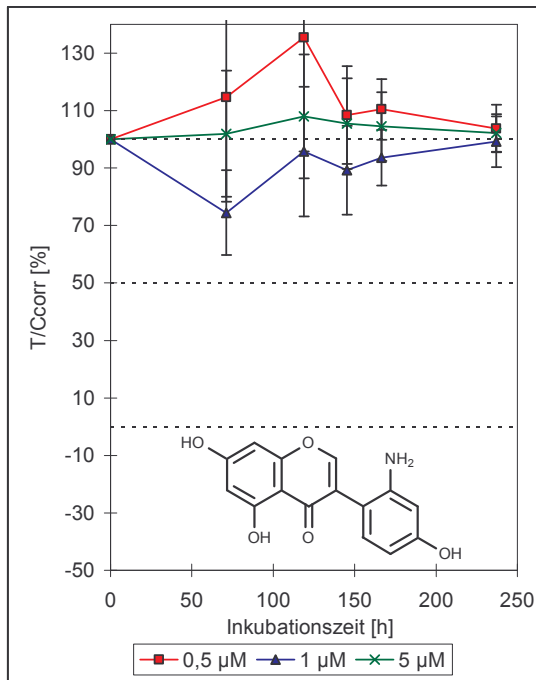
a) Verbindung 9



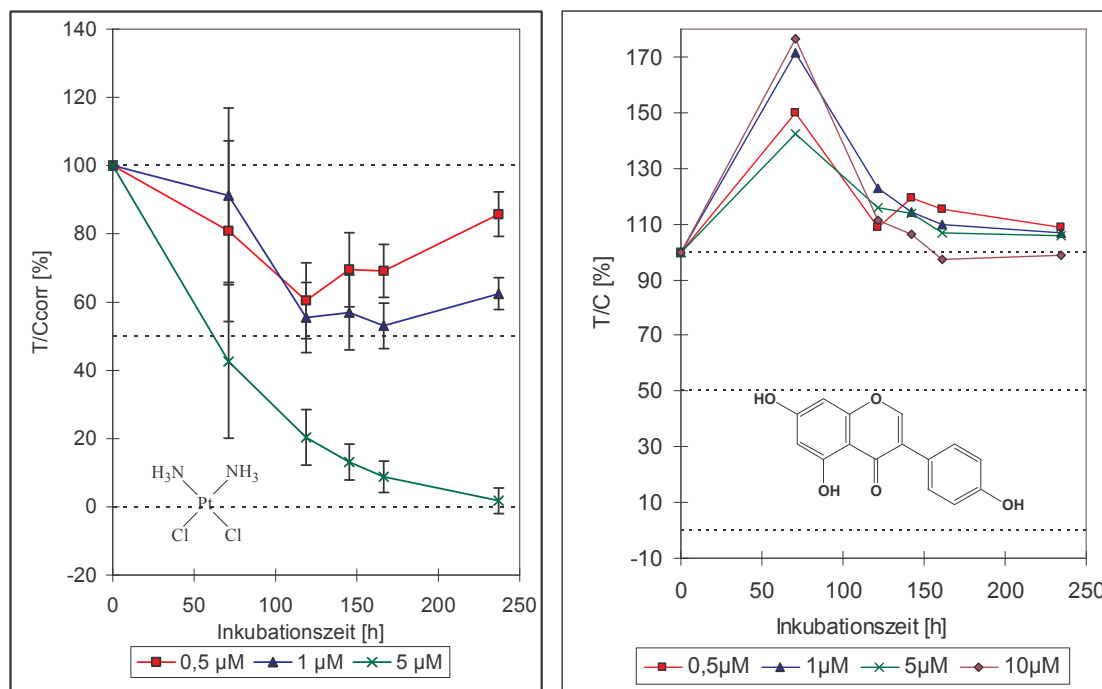
b) Verbindung 23



c) Verbindung 24



d) Verbindung 25



e) Cisplatin

f) Genistein

**Abb. 4.2:** Effekte der Verbindungen a) **9**, b) **23**, c) **24**, d) **25**, e) Cisplatin und f) Genistein auf MCF-7-Zellen. Die Testergebnisse des Genisteins stammen aus einem anderen Testdurchlauf.

In demselben Testdurchlauf wurde auch Cisplatin getestet, das aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften als Vergleich dient.

Das Cisplatin zeigt in der getesteten Konzentration von 5 µM zytotoxische Eigenschaften. Das Zellwachstum wird nach einer Inkubationszeit von 250 Stunden komplett gehemmt; der  $T/C_{\text{korrr}}$ -Wert geht gegen 0 %. Die Substanz zeigt bei den getesteten Konzentrationen von 0,1 µM und 1 µM antiproliferative Eigenschaften.

Die vier Testsubstanzen **9**, **23**, **24** und **25** zeigen keine bis schwache antiproliferative Wirkungen. Zeitweilig wird das Zellwachstum sogar stimuliert.

Das Daidzeinderivat **9** führt in der Konzentration von 0,5 µM nach ungefähr 60 Stunden Inkubation zu einem verstärkten Zellwachstum, das bei längerer Inkubation jedoch wieder abschwächt.

Das Biochanin A-Derivat **23** zeigt in der Konzentration von 5 µM bei einer Inkubationszeit von ungefähr 100 Stunden eine 40 %ige Hemmung des Zellwachstums; eine weitere Inkubation führt jedoch wieder zu einem vermehrten Zellwachstum. Bei einer Inkubationszeit von 250 Stunden liegt der  $T/C_{\text{korrr}}$ -Wert wieder bei 90 %. In den Konzentrationen von 0,5 µM

und 1  $\mu\text{M}$  stimuliert es das Zellwachstum um bis zu 30 % (1  $\mu\text{M}$ ). Das vermehrte Zellwachstum normalisiert sich hingegen zum Ende der Inkubationszeit wieder.

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität des Genisteinderivats **24** zeigen, dass diese Verbindung über keine antiproliferativen Eigenschaften verfügt. Bei den getesteten Konzentrationen schwanken die  $T/C_{\text{kor}}$ -Werte zwischen 90 % und 100 %. Die Verbindung **24** führt in der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nach einer Inkubationszeit von 60 Stunden zu einem schwachen Zellwachstum. In einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  hemmt es hingegen anfänglich das Zellwachstum. Diese Beobachtungen können jedoch durch die natürliche Schwankungsbreite biologischer Testmodelle erklärt werden.

Das 2'-Aminogenistein **25** weist ebenfalls keine zytotoxischen Eigenschaften auf. Es stimuliert in einer Konzentration von 0.5  $\mu\text{M}$  anfänglich das Zellwachstum um bis zu 30 %. Dieser Wert normalisiert sich hingegen auf den Ausgangswert zum Ende der Inkubationszeit. In einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  führt es zuerst zu einer Hemmung des Zellwachstums um 30 % (60 Stunden Inkubation), jedoch reguliert sich dieser Wert ebenfalls wieder auf den Ausgangswert der Zellzahl.

Keine der getesteten Substanzen zeigt nach einer Inkubationszeit von 250 Stunden antiproliferative Eigenschaften.

Interessant ist jedoch die Beobachtung, dass das Biochanin A-Derivat **23** in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  bis zu einer Inkubationszeit von 150 Stunden anfänglich antiproliferativ wirkt. Dieser Effekt kann bei den Verbindungen **9**, **24** und **25** nicht beobachtet werden. Insbesondere das Genisteinderivat **24** zeigt keine zytotoxischen Eigenschaften, wohingegen das Phytoestrogen Genistein in höheren Konzentrationen sehr wohl zytotoxisch wirkt [161, 162, 175]. Worin dieser Unterschied begründet ist, kann nicht eindeutig geklärt werden. Die beiden Benzamidderivate **23** und **24** unterscheiden sich nur durch die zusätzliche Methoxy-Gruppe von **23**. Im Allgemeinen wird angenommen, dass diese  $\text{OCH}_3$ -Gruppe nur für eine Abnahme der Affinität zum Estrogenrezeptor verbunden ist [157].

Inwiefern sich diese zusätzliche Methoxy-Gruppe auf die zytotoxischen Eigenschaften des Phytoestrogens Biochanin A auswirkt, ist nicht näher untersucht worden.

#### 4.1.2 Vergleich der Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit den zytotoxischen Eigenschaften Genisteins

Das Phytoestrogen Genistein wirkt sowohl in hormonabhängigen als auch in hormonunabhängigen Brustkrebszelllinien tumorhemmend [150, 151].

In hormonabhängigen MCF-7-Zellen kann nach der Gabe von Genistein in Konzentrationen  $< 10 \mu\text{mol/L}$  zuerst eine Stimulation des Zellwachstums beobachtet werden. In höheren Konzentrationen hemmt Genistein hingegen das Zellwachstum [160, 161].

Im Rahmen der Arbeit von *Witzel* erfolgte eine Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften des Genisteins in den Konzentrationen von 0,5, 1, 5 und  $10 \mu\text{M}$  an MCF-7-Zellen [186]. In der Abbildung 4.2 sind die Effekte des Genisteins auf das Zellwachstum graphisch dargestellt.

Innerhalb der Inkubationszeit von 250 Stunden zeigt Genistein keine zytotoxischen Wirkungen. Gegenteilig dazu regt es das Wachstum in allen getesteten Konzentrationen um bis zu 80 % ( $10 \mu\text{M}$ ) an.

Dieser Umstand lässt durchaus die Annahme zu, dass durch die Ernährung zugeführtes oder als Nahrungsergänzungsmittel aufgenommenes Genistein das Zellwachstum vorhandener Brustkrebszellen stimulieren kann, zumal bisher nicht abschließend geklärt ist, inwieweit sich Genistein im Brustgewebe anreichert und welche tatsächlichen Gewebekonzentrationen sich daraus ergeben [163, 164]. Insofern ist es natürlich von besonderer Wichtigkeit, dass Wirkstoffe, die sich strukturell vom Genistein ableiten, nicht ebenfalls zu einer Stimulation von Krebszellen führen.

In Anbetracht dieses Umstandes sind die Zytotoxizitätsstudien der Substanzen **9**, **23**, **24** und **25** positiv zu bewerten. Bis auf eine Stimulation des Zellwachstums um 40 % durch das Biochanin A-Derivat **23** ( $1 \mu\text{M}$ ) und um 30 % durch 2'-Aminogenistein **25** ( $0,5 \mu\text{M}$ ) erfolgt keine Proliferation der MCF-7-Zellen. Über einen längeren Inkubationszeitraum schwächt die Stimulation des Zellwachstums ab und die Zellzahl nähert sich wieder dem Ausgangswert an. Insbesondere das Genisteinderivat **24** führt allenfalls zu sehr geringen Steigerungen des Zellwachstums, die aber durchaus auch auf die Schwankungsbreite natürlicher Testsysteme zurückzuführen sein können. Die Verbindung **24** besitzt somit wesentliche Vorteile gegenüber Genistein in Hinblick auf eine Stimulierung des Zellwachstums.

## 4.2 Radioligandbindungsstudien am Estrogenrezeptor

Die Radioligandbindungsstudien an den Estrogenrezeptoren ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  wurden von der Firma MDS Pharma Services-Discovery, Taipei, Taiwan (R.O.C.) durchgeführt.

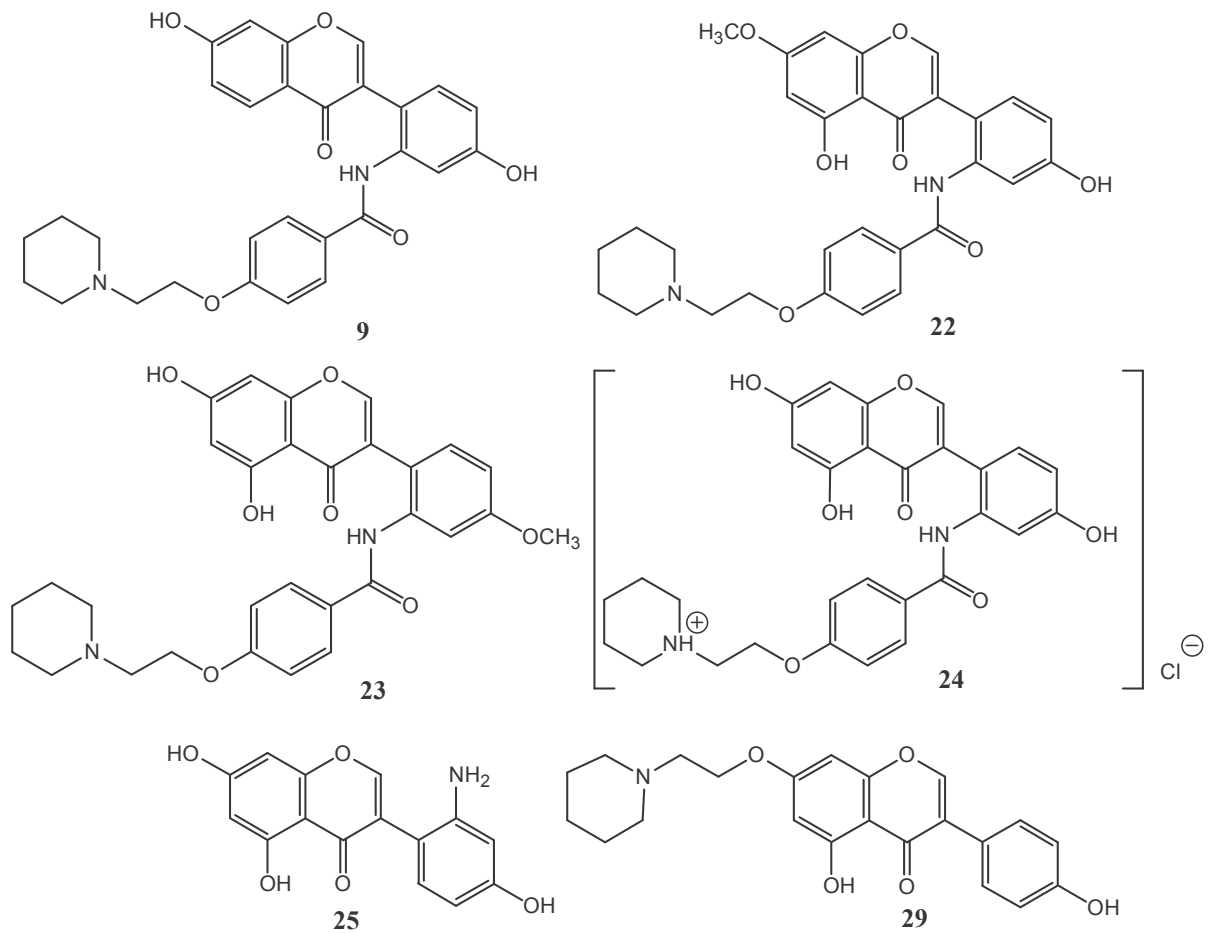
Bei diesen Studien wurde die Affinität der Testsubstanzen zu den beiden ER bestimmt. Auf Grund dieser Studien können jedoch keine Aussagen getroffen werden, ob es sich bei der getesteten Substanz um einen Agonisten oder Antagonisten handelt.

Für die Studien wurden Rezeptoren aus humanrekombinanten Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* (Sf9-Zellen) verwendet. Die Gewinnung der Rezeptoren erfolgt durch gentechnische Methoden. Dabei erfolgt der Einbau des hER-cDNA-Fragments in das Baculovirus, welches in die Sf9-Zellen eingebracht wird [210].

Das Prinzip der Radioligandbindungsstudien beruht auf der kompetitiven Verdrängung eines radioaktiv markierten Liganden durch die Testsubstanz. Als Radioligand wird [ $^3\text{H}$ ]Estradiol verwendet, als Kontrolle dient Diethylstilbestrol.

Die Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien werden als prozentuale Verringerung der spezifischen Bindung des Liganden am ER angegeben.

Die folgenden Verbindungen wurden von MDS Pharma Services-Discovery getestet (Abb. 4.3):



**Abb. 4.3:** Übersicht über die Substanzen, die Radioligandbindungsstudien unterzogen wurden

#### 4.2.1 Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien

Die Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien sind in der Tabelle 4.1 dargestellt.

Angegeben ist neben den Testkonzentrationen der Verbindungen auch die prozentuale Hemmung der Bindung des radioaktiv markierten Estradiols durch die Testsubstanzen. Je größer der Wert der Hemmung, desto mehr Estradiol wurde durch die Testverbindung am Rezeptor verdrängt, das heißt, umso größer ist die Affinität der Testsubstanz zu dem ER.

Verbindung	Konzentration	ER- $\alpha$ (Hemmung in %)	ER- $\beta$ (Hemmung in %)
<b>9</b>	10 $\mu$ M	94	24
<b>22</b>	10 $\mu$ M	nicht getestet	23
<b>23</b>	1 $\mu$ M	84	18
<b>23</b>	10 $\mu$ M	nicht getestet	66
<b>24</b>	1 $\mu$ M	79	55
<b>24</b>	0.1 $\mu$ M	26	25
<b>25</b>	1 $\mu$ M	41	73
<b>29</b>	1 $\mu$ M	9	66

**Tab. 4.1:** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien

#### 4.2.1.1 Radioligandbindungsstudien am ER- $\alpha$

Das Daidzeinderivat **9**, das Biochanin A-Derivat **23**, das Genisteinderivat **24** und das 2'-Aminogenistein **25** wurden auf ihre Affinität zu ER- $\alpha$  untersucht.

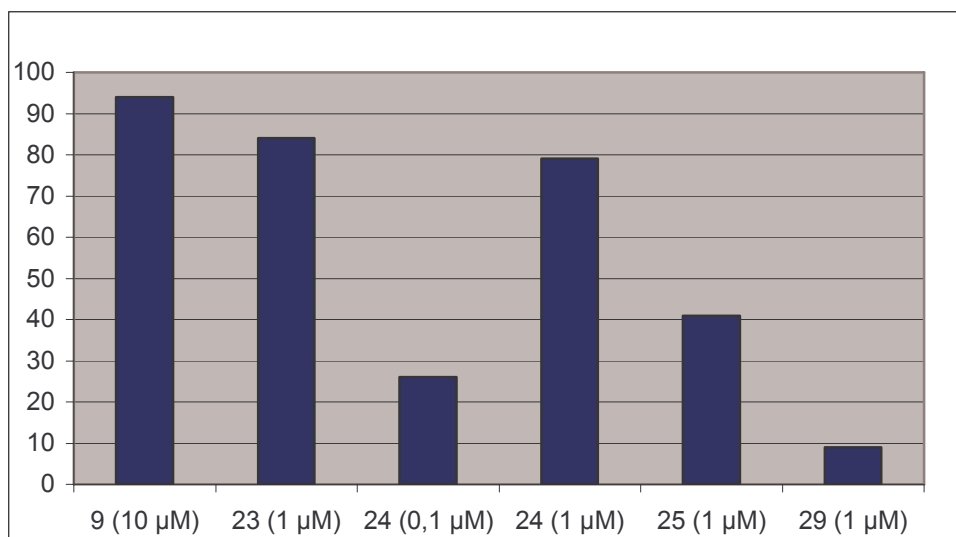
In einer Konzentration von 10  $\mu$ M verdrängt **9** 94 % des Radioliganden vom Rezeptor und verfügt damit in der getesteten Konzentration über eine gute Affinität zum ER.

In der Testkonzentration von 1  $\mu$ M zeigt **23** eine Verdrängung des Radioliganden am ER- $\alpha$  um 84 %. Bei derselben Konzentration zeigt die Verbindung **24** eine Verdrängung des [ $^3$ H]Estradiols um 79 %. Beide Substanzen zeigen eine gute Affinität zum ER- $\alpha$ . In der Konzentration von 0.1  $\mu$ M verdrängt das Genisteinderivat **23** noch 26 % des Radioliganden am ER.

Das Aminogenistein **25** zeigt ebenfalls Affinität zum ER- $\alpha$ . In einer Konzentration von 1  $\mu$ M führt es zu einer Verdrängung von 41 % des Radioliganden.

Das Genisteinderivat **29** zeigt im Vergleich mit den anderen Testsubstanzen mit einem Wert von 9 % bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M nur geringe Affinität zum ER- $\alpha$  (Abb. 4.4).





**Abb. 4.4:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien am ER- $\alpha$  der Verbindungen **23**, **24**, **25** und **29**. Angaben der Testkonzentrationen in Klammern

Die Derivate des Biochanin A **23** und des Genisteins **24** zeigen bei der untersuchten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  erstaunlicherweise dieselbe Affinität zu ER- $\alpha$ . Die unsubstituierten Isoflavone Genistein und Biochanin A (Abb. 1.14) hingegen binden mit unterschiedlichen Affinitäten an ER- $\alpha$ .

Nach *Kuiper* besitzt Genistein am ER- $\alpha$  eine relative Bindungsaffinität (RBA) von 4, wohingegen Biochanin A eine RBA  $< 0.01$  aufweist [158]. Die geringere RBA des Biochanin A wird durch die zusätzliche 4'-Methoxy-Gruppe des Biochanin A erklärt. Das Vorhandensein der Methoxy-Gruppe verhindert die Ausbildung von WBB zwischen der phenolischen Partialstruktur und den Aminosäuren innerhalb der Rezeptorbindungstasche. Die Einführung der basischen Seitenkette in die Isoflavonstruktur scheint den negativen Einfluss der 4'-Methoxy-Gruppe des Biochanin A auf die Affinität zu ER- $\alpha$  aufzuheben. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist, dass durch die Seitenkette, insbesondere durch die basische Piperidin-Partialstruktur, neue Möglichkeiten der Wechselwirkung zwischen Substanz und Rezeptor ermöglicht werden, die für die Affinität der Substanz zu dem Rezeptor bedeutender sind als die Ausbildung einer WBB durch eine 4'-OH-Gruppe eines Isoflavons.

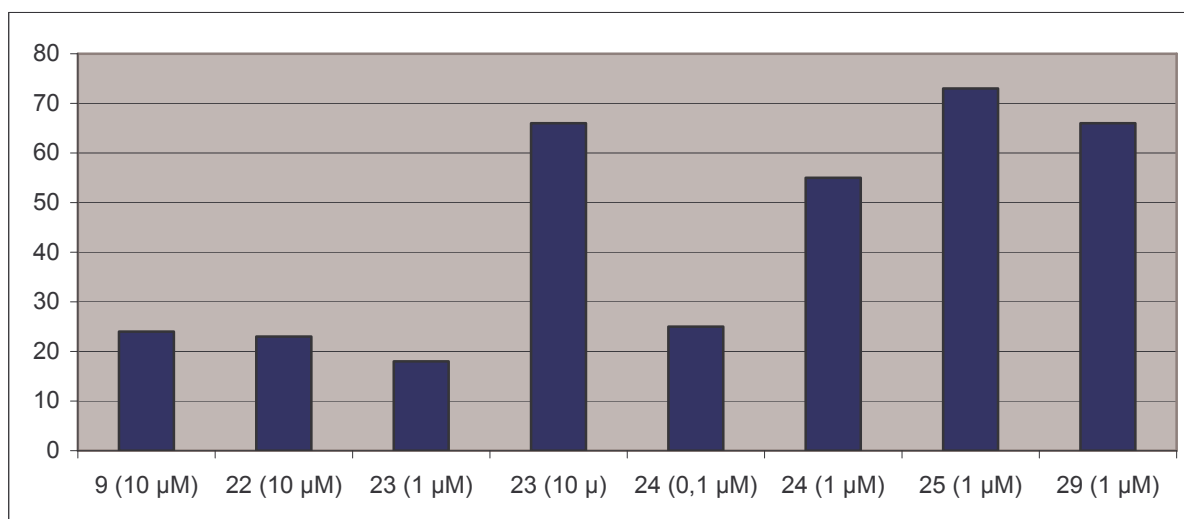
#### 4.2.1.2 Radioligandbindungsstudien am ER- $\beta$

Die oben erwähnten Testsubstanzen wurden auch auf ihre Affinität zu ER- $\beta$  untersucht.

Das Daidzeinderivat **9** zeigt in der Konzentration von 10  $\mu$ M nur eine Verdrängung des Radioliganden von 24 %.

Das Testergebnis des Prunetinderivats **22** entspricht dem der Verbindung **9** mit 23 % bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M. Das Biochanin A-Derivat **23**, das in einer Konzentration von 10  $\mu$ M immerhin noch 66 % des Radioliganden am ER verdrängen kann, weist in der Konzentration von 1  $\mu$ M nur noch einen Wert von 18 % auf. Das Genisteinderivat **24** zeigt in der Konzentration von 1  $\mu$ M eine vergleichsweise gute ER- $\beta$ -Affinität. Es verdrängt 55 % des Radioliganden. In der Konzentration von 0.1  $\mu$ M hingegen weist es nur noch einen Wert von 25 % auf.

Das Aminogenistein **25** zeigt bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine Verdrängung des Radioliganden am ER von 73 %. Das Genisteinderivat **29** besitzt ebenfalls Affinität zum ER- $\beta$ . Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M zeigt es eine Verdrängung des Radioliganden um 66 % (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien am ER- $\beta$  der Verbindungen **9**, **22**, **23**, **24**, **25** und **29**. Angabe der Testkonzentrationen in Klammern

*Kuiper* bestimmte die RBA der unsubstituierten Isoflavone Daidzein, Biochanin A, Prunetin und Genistein am ER- $\beta$  (Abb. 1.15). Sie betrug im Falle des Genisteins 87, für Biochanin A  $<0.01$  und für Daidzein 0.5. Für Prunetin liegt leider kein Wert vor [158].

Die gefundenen Werte der Radioligandbindungsstudien spiegeln dieses Verhältnis wider. So bindet von den Benzamidderivaten **9**, **22**, **23** und **24** das Genisteinderivat **24** mit der höchsten Affinität an ER- $\beta$  (55 %, 1  $\mu\text{M}$ ). Das Biochanin A-Derivat **23** (18 %, 1  $\mu\text{M}$ ) zeigt eine höhere Affinität für den ER- $\beta$  als das Daidzeinderivat **9** (24 %, 10  $\mu\text{M}$ ) und das Prunetinderivat **22** (23 %, 10  $\mu\text{M}$ ). Das Genisteinderivat **29** weist ebenfalls eine hohe Affinität zu ER- $\beta$  (66 %, 1  $\mu\text{M}$ ) auf, die mit der des 2'-Aminogenisteins **25** vergleichbar ist.

#### 4.2.1.3 Vergleich der Radioligandbindungsstudien

Vergleicht man die Affinitäten der Testverbindungen zu ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ , so weist das 2'-Aminogenistein **25** ebenso wie das Genisteinderivat **29** eine höhere Affinität zum ER- $\beta$  auf. Sie verhalten sich damit wie Genistein, welches als eine der wenigen natürlichen Substanzen mit höherer Affinität zum ER- $\beta$  gilt.

An den Benzamiden **9**, **23** und **24** wird deutlich, dass durch die Einführung der basischen Seitenkette die Affinität zum ER- $\alpha$  deutlich erhöht wird. Die Verbindungen zeigen eine niedrigere Affinität zum ER- $\beta$ .

Die Verbindungen **23** und **24** binden jeweils mit vergleichbarer Affinität an ER- $\alpha$ . **24** besitzt jedoch eine zehnfach höhere Affinität zum ER- $\beta$  als **23** und eine hundertfach höhere Affinität als **9**.

Aus dem Isoflavon Genistein mit einer Präferenz für ER- $\beta$  wird durch die Einführung der Seitenkette eine Verbindung mit einer Präferenz für ER- $\alpha$ . Dieser Befund kann als ein erster Schritt zur Entwicklung eines SERM angesehen werden. Vergleicht man die Bindungsaffinitäten im Handel befindlicher SERM zu den beiden ER, so wird deutlich, dass die SERM ebenfalls über eine höhere Affinität zu ER- $\alpha$  als zu ER- $\beta$  verfügen [142]. So weisen Raloxifen, Pibendoxifen und Bazedoxifen (Abb. 1.9, Abb. 1.11) niedrigere  $\text{IC}_{50}$ -Werte für ER- $\alpha$  als für ER- $\beta$  auf. In diesem Fall ist der  $\text{IC}_{50}$ -Wert diejenige Konzentration einer Testverbindung, bei der es zu einer 50 %igen Hemmung der [ $^3\text{H}$ ]Estradiol-Rezeptorbindung kommt. Je kleiner der  $\text{IC}_{50}$ -Wert ist, umso größer ist die Affinität zum Rezeptor. Da für die Verbindungen **23** und **24** nicht ausreichend Testwerte vorliegen, um die  $\text{IC}_{50}$  für diese Substanzen bestimmen zu können, ist ein direkter Vergleich mit den bekannten SERM leider

nicht möglich. Die Testergebnisse der Radioligandbindungsstudien sind jedoch richtungweisend.

Weitere Testungen *in vitro* zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte der Isoflavonderivate sind notwendig, um das Potential der Benzamide **9**, **23** und **24** als SERM abzuklären. *In vivo*-Tests zur Bestimmung des Einflusses der Substanzen auf Knochen und Uterus sind ebenso von Interesse.

Von besonderer Bedeutung ist auch die siebenfach höhere Affinität des Genisteinderivats **29** zum ER-β. Die Einführung der Seitenkette in Position 7 des Genisteins führt nicht zu einer Umkehrung der Affinität hin zum ER-α, wie es bei den Benzamidderivaten **9**, **23** und **24** der Fall ist. Es ist somit gelungen, eine deutlich ER-β-selektive Verbindung herzustellen.

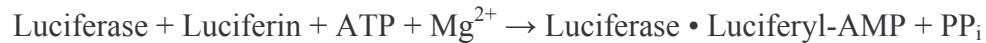
Fügt man **29** in das Modell der Rezeptorbindungstasche des ER-β ein (Abb. 3.43), so bindet der Piperidin-Stickstoff wahrscheinlich über eine WBB an die Asparaginsäure 303, die 4'-OH-Gruppe an Arginin 346 und Glutaminsäure 305, u. U. auch an Histidin 475. Inwiefern diese Konfiguration für die ER-β-Selektivität verantwortlich ist, kann nicht eindeutig erklärt werden. Die Verbindung **29** ist zu lang gestreckt, um wie die Agonisten Estradiol und Genistein an die Rezeptoren zu binden. Durch die lineare Molekülstruktur wird es jedoch auch nicht wie Raloxifen an drei Rezeptorpositionen binden können. Ob es die oben dargelegte Position in der Ligandenbindungstasche oder eine völlig andere Orientierung einnimmt, kann nicht definitiv bestimmt werden. Weitere Untersuchungen zu der Wirkung dieser Substanz erscheinen jedoch viel versprechend zu sein.

### **4.3 Bestimmung der estrogenen Wirkung**

#### **4.3.1 Allgemeines**

Ob es sich bei einer Substanz um einen Agonisten oder Antagonisten der Estrogenrezeptor handelt, wird im *In vitro*-Luciferase-Assay getestet (zur Durchführung, siehe Kapitel 5.4.2). Der Assay basiert darauf, dass ein DNA-Plasmid, das Fragmente mit Enhancer- bzw. Promotor-Aktivität enthält, die an ein Reporterogen gekoppelt sind, auf eukaryontische Kulturzellen transfiziert ist. Man erhält so die stabil transfizierte MCF-7-2a-Zelllinie. Die Aktivität des durch das Reporterogen codierten Proteins wird anschließend gemessen. Es handelt sich dabei um eine Luciferaseexpression, die in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz bestimmt wird [211]. Hierzu werden die Zellen mit verschiedenen

Konzentrationen der Testsubstanz für 50 h inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen zerstört. Das Lysat, ein Proteinextrakt, wird vermessen. Die Detektion der im Extrakt enthaltenen Luciferasemengen erfolgt mit einem Luciferase-Assay-Reagenz. Die Luciferase katalysiert eine Chemolumineszenz-Reaktion [212]:



Die Lichtemission setzt unmittelbar ein und klingt sehr schnell ab. Im Substrat enthaltenes Coenzym A steigert die gesamte Lichtausbeute um ein Vielfaches [213]. Der Wellenlängenbereich des emittierten Lichts erstreckt sich von 490-630 nm [214]. Die Luciferase-Aktivität wird in RLU<sub>10s</sub>, „relative light units bei 10 Sekunden Messzeit“, bestimmt. Die gemessenen RLU<sub>10s</sub> werden dann auf die Zellmasse bezogen.

#### 4.3.2 Ermittlung der agonistischen Wirkung

Um Kenntnis über die estrogenen Wirkung einer Substanz zu erhalten, bestimmt man die konzentrationsabhängige Stimulierung der Luciferaseexpression und erstellt eine Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 4.6).

Die MCF-7-2a-Zellen werden mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen für 50 h inkubiert. Zur Kontrolle dienen nur mit Lösungsmittel (Background) bzw. mit einer festen Estradiolkonzentration (Kontrolle, 10<sup>-8</sup> M) inkubierte Zellen.

Die gemessene Luciferase-Aktivität wird auf die vermessene Zellmasse umgerechnet.

Um die Testergebnisse vergleichen zu können, bezieht man die Aktivität der Testsubstanzen auf die Aktivität des Estradiols. Alle Ergebnisse lassen sich nun in % Aktivierung ausdrücken (Abb. 4.6).

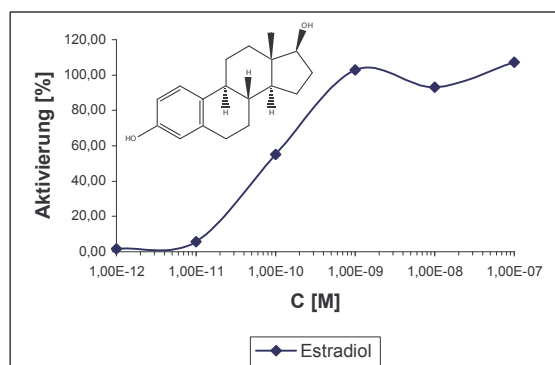


Abb. 4.6: Dosisabhängige Luciferase-Aktivierung durch 17β-Estradiol

Die Testung der Verbindungen **23** und **24** erfolgte im Arbeitskreis Prof. Dr. R. Gust durch Frau S. Bergemann.

Die beiden Benzamide **9** und **24** wurden auf ihre estrogenen Wirkung untersucht. Die Abbildung 4.7 zeigt die überraschenden Testergebnisse der beiden Substanzen.

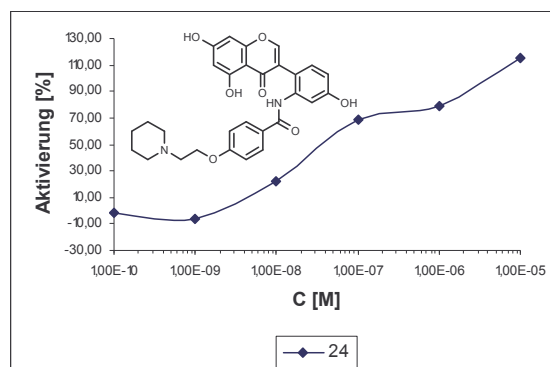
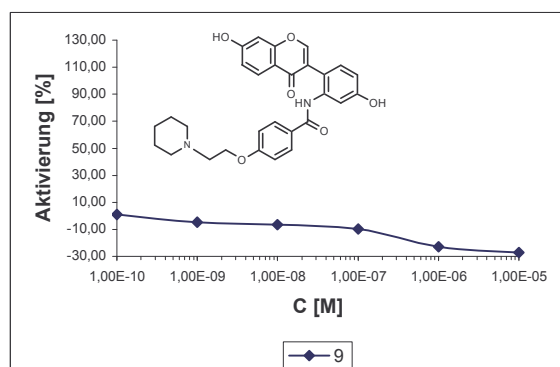


Abb. 4.7: Ergebnisse des Luciferase-Assay und die Strukturformeln der Benzamide **9** und **24**

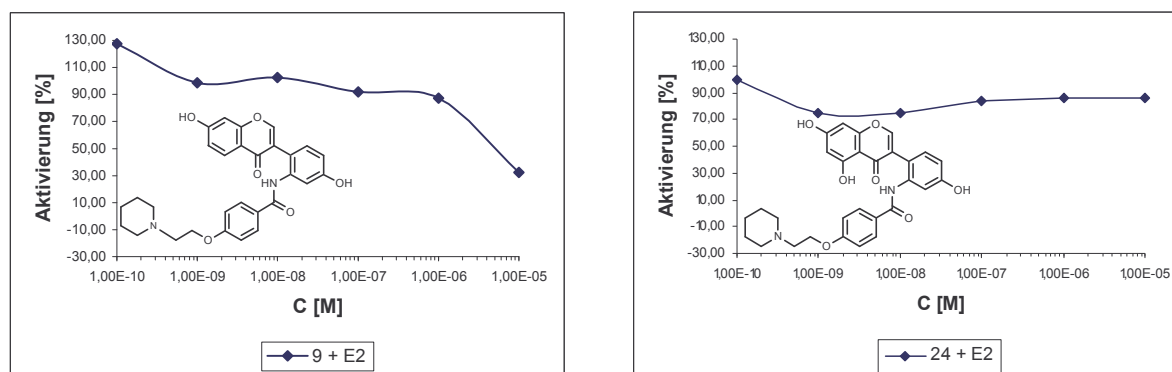
Die Konzentrations-Aktivierungskurve der Verbindung **9** zeigt keine Aktivierung der Luciferase bei den gemessenen Konzentrationen von  $10^{-10}$  M bis  $10^{-5}$  M. Sie besitzt somit keine estrogenen Wirkung.

Dahingegen zeigt die Konzentrations-Aktivierungskurve von **24** einen deutlichen Anstieg. In den getesteten Konzentrationen von  $10^{-10}$  M und  $10^{-9}$  M weist **24** noch keine Aktivierung auf. Ab einer Konzentration von  $10^{-8}$  M hingegen steigt die Kurve an. Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M beträgt die Aktivierung über 100 %. Das Genisteinderivat **24** wirkt somit estrogen.

### 4.3.3 Ermittlung der antagonistischen Wirkung

Die antagonistischen Eigenschaften einer Substanz werden im selben Testmodell bestimmt. Dazu werden die MCF-7-2a-Zellen zusätzlich zu den Testsubstanzen mit einer festen Estradiolkonzentration ( $10^{-9}$  M) inkubiert, um die maximal mögliche Luciferaseexpression bei geringst möglicher Estradiolkonzentration zu stimulieren. Antagonistisch wirksame Verbindungen können die durch den Estradiolzusatz verursachte Aktivierung der Luciferaseexpression abschwächen.

Die Benzamide **9** und **24** sollen nun auch auf ihre antagonistischen Wirkungen untersucht werden.



**Abb. 4.8:** Ergebnisse der Testung der antiestrogenen Wirkung der Benzamide **9** und **24**

Die Konzentrations-Aktivierungskurve von **9** zeigt ab einer Konzentration von  $10^{-6}$  M einen schwachen Abfall. Das Benzamid **9** hemmt die estradiolbedingte Luciferaseexpression. Dieser Umstand kann darauf hindeuten, dass **9** ab einer Konzentration von  $10^{-6}$  M antagonistische Eigenschaften besitzt (Abb. 4.8). Da die Konzentrations-Aktivierungskurve jedoch erst bei relativ hohen Konzentrationen abfällt, könnte dieser Abfall jedoch auch eine andere Ursache haben. Unter Umständen wirkt **9** in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  antiproliferativ, allerdings konnten in dem Kristallviolett-Assay dieser Verbindung bis zu einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  keine wachstumshemmenden Eigenschaften detektiert werden.

Die Konzentrations-Aktivierungskurve von **24** fällt hingegen nur bei den Konzentrationen von  $10^{-9}$  M und  $10^{-8}$  M geringfügig ab (Abb. 4.8). Das Benzamid **24** zeigt in den getesteten Konzentrationen somit keine antiestrogene Wirkung.

#### 4.3.4 Auswertung der Luciferase-Assays

Das erstaunliche Ergebnis des Luciferase-Assays zeigt, dass die Benzamide **9** und **24**, die sich nur in einer Hydroxy-Gruppe der Isoflavonstruktur unterscheiden, gänzlich unterschiedliche estrogene Aktivität besitzen. Das Daidzeinderivat **9** besitzt keine Estrogen-agonistischen Eigenschaften, wohingegen das Genisteinderivat **24** ein Agonist am ER ist.

Wodurch dieser Unterscheid zu Stande kommt, ist nicht sicher. Das Phytoestrogen Daidzein besitzt eine geringere estrogene Aktivität als Genistein, jedoch sollte die Einführung der basischen Seitenkette theoretisch beide Isoflavone in Antagonisten umwandeln. Dieses wurde von *Grese* am Beispiel des Phytoestrogens Coumestrols demonstriert [178]. Die Einführung einer Seitenkette wandelte Coumestrol in ein SERM um.

Die SERM Bazedoxifen, Pipendoxifen und Raloxifen verhalten sich im MCF-7-ERE-tk-Luciferase-Assay ebenfalls wie Antagonisten [142, 215]. Es ist überraschend, dass das Benzamid **24** trotz der Seitenkette agonistische Eigenschaften besitzt.

Allerdings verhalten sich die beiden Benzamide in Bezug auf ihre Bindungsaffinitäten zu den ER wie die oben erwähnten SERM. Pipendoxifen, Raloxifen und Bazedoxifen besitzen eine höhere RBA für ER- $\alpha$ . Auch **9** und **24** zeigen mehr Affinität zu ER- $\alpha$ , obwohl die korrespondierenden Phytoestrogene mehr Affinität zu ER- $\beta$  aufweisen.

Ob die agonistische Wirkung der Verbindung **24** durch die zusätzliche OH-Gruppe bedingt ist, ist nicht sicher. Die Seitenkette der SERM zwingt durch Wechselwirkungen mit der Asparaginsäure 303 des ER- $\beta$  bzw. Asparaginsäure 351 des ER- $\alpha$  die H12 des Rezeptors in eine Position, die der durch Antagonisten verursachten Position der H12 gleicht. Ob die zusätzliche OH-Gruppe von **24** jedoch eine für Agonisten typische Konformation der Ligandenbindungstasche des Rezeptors bewirkt, müsste durch Kristallisation der Verbindung zusammen mit dem Rezeptor geklärt werden.

#### 4.4 Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen

Die Auswertung der Zytotoxizitätsstudien, der Radioligandbindungsstudien und des Luciferase-Assays führte zu sehr interessanten Erkenntnissen.

Das Phytoestrogen Genistein besitzt in Konzentrationen über 10  $\mu\text{M}$  antiproliferative Eigenschaften, wohingegen es in niedrigeren Konzentrationen das Zellwachstum stimuliert.



Diese Wirkungen auf die MCF-7-Zelllinie konnten durch strukturelle Veränderungen bei den Verbindungen **9**, **23**, **24** und **25** verringert bzw. eliminiert werden.

Die Benzamide **9** und **24** zeigten ebenso wie das 2'-Aminogenistein **25** weder zytotoxische noch proliferative Eigenschaften. Interessanterweise führte das Biochanin A-Derivat **23** in höheren Konzentrationen zu einer anfänglichen Wachstumshemmung, wohingegen niedrigere Konzentrationen zur Proliferation führten. Ob diese Eigenschaften von der zusätzlichen 4'-Methoxy-Gruppe abhängig sind, kann nicht eindeutig geklärt werden.

Die Radioligandbindungsstudien zeigen, dass die Benzamide **9**, **23** und **24** eine höhere Affinität zu ER- $\alpha$  besitzen, obwohl ihre korrespondierenden Isoflavone Daidzein, Biochanin A und Genistein eine höhere Affinität zu ER- $\beta$  aufweisen. Die Substitution mit einer basischen Seitenkette in Position 2' bewirkt somit eine Änderung der Rezeptorselektivität. Am deutlichsten ist dieser Effekt bei den Benzamiden **9** und **23**, die eine vierfach höhere Affinität zu ER- $\alpha$  aufweisen, zu erkennen. Das Genisteinderivat **24** hat hingegen eine vergleichbare Affinität zu beiden ER, jedoch ist auch hier die Affinität zu ER- $\alpha$  geringfügig erhöht.

Eine höhere Affinität zu ER- $\beta$  besitzen sowohl das 2'-Aminogenistein **25** als auch das 7-(Piperidinoethoxy)-genistein **29**. Die Verbindung **29** verdrängt nur 9 % des Radioliganden an ER- $\alpha$ , wohingegen es 66 % an ER- $\beta$  verdrängt. Mit der Verbindung **29** ist es somit gelungen, eine deutlich  $\beta$ -selektive Substanz herzustellen. Die Einführung des Piperidinoethyl-Elements in das Genistein ändert dessen Präferenz für ER- $\beta$  nicht. Eine weitergehende Untersuchung der estrogenen Eigenschaften dieses Genisteinderivats ist notwendig. Von besonderem Interesse ist dabei auch die Orientierung der Verbindung **29** innerhalb der Ligandenbindungstasche des ER- $\beta$ .

Die überraschenden Ergebnisse des Luciferase-Assays zeigen, dass das Daidzeinderivat **9** keine estrogenen Eigenschaften besitzt, wohingegen das Genisteinderivat **24** estrogen wirkt. Die beiden Verbindungen unterscheiden sich nur in einer Hydroxy-Gruppe. Inwieweit diese zusätzliche 5-OH-Gruppe der Verbindung **24** für die estrogenen Wirkung wichtig ist, kann bisher nicht eindeutig geklärt werden. Diesem widersprüchlichen Ergebnis sollte in jedem Fall weiter nachgegangen werden, da eine Klärung dieser Frage zu neuen Erkenntnissen über die Ligandenbindungstaschen der ER und über die Bindungsmodi der Agonisten bzw. Antagonisten führen könnte.

Weitere Untersuchungen zu diesen Verbindungen sind nötig, um ihre äußerst interessante Pharmakologie zu untersuchen. Die ersten pharmakologischen Testungen sind trotz der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse sehr viel versprechend.