

## **Zusammenfassung**



## 10 Zusammenfassung

Angelehnt an das Antiestrogen Raloxifen wurden strukturanaloge Benzimidazole mit basischer Seitenkette synthetisiert, die neben ER-Affinität ausreichende Fluoreszenzeigenschaften aufweisen sollen, um zum Studium von z.B. ER-Ligand-Interaktionen eingesetzt werden zu können. Bereits die Gruppe der 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole zeigte in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M die Abnahme der E2-induzierten Luciferase-Expression, die aber eher auf zytotoxische als auf antiestrogene Eigenschaften zurückzuführen ist. Durch Einführung einer zusätzlichen Hydroxygruppe in 5- oder 6-Position des Benzimidazolrings konnte eine antiestrogene Wirkung erreicht werden, während die zytotoxischen Eigenschaften auf MCF-7 Zellen im Vergleich zu den 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazolen geringer waren. Es wurde gezeigt, dass die Stellung der 5-(6)-Hydroxygruppe keinen nennenswerten Einfluss auf die antiestrogenen Eigenschaften ausübte. Die 4'-OH-Gruppe spielte für die Antiestrogenität eine untergeordnete Rolle. Keine der Verbindungen konnte eine agonistische Wirkung im Luciferase-Assay an MCF-7 2a Zellen entfalten. Aufgrund der durchgeführten Molecular Modeling Untersuchungen lässt sich ein Raloxifen-analoger Bindungsmodus der 5-(6)-OH-Benzimidazole, mit Wasserstoffbrücken der Hydroxygruppe des Benzimidazolgerüsts zu den Aminosäuren Glu 353 und Arg 394 und einem konservierten Wassermolekül sowie der phenolischen Hydroxygruppe zum His 524 des ER $\alpha$  vermuten. Die basische Seitenkette bildet dabei eine Salzbrücke zur Carboxylatgruppe des Asp 351 aus.

Alle neu synthetisierten Benzimidazole zeigten ausgeprägte antiproliferative Eigenschaften an der MCF-7 Zelllinie, die nicht mit der Antiestrogenität am ER in Einklang zu bringen sind. Einzelne Verbindungen erwiesen sich zusätzlich an der MDA-MB 231 Zelllinie als zytotoxisch. Auf intrazellulärer Ebene spielen hierbei möglicherweise DNA-Wechselwirkungen, die durch Fluoreszenzlöschung bei Zugabe einer DNA-Lösung zur Substanzlösung belegt werden konnten, eine entscheidende Rolle. Eine interkalierende Wirkung konnte mittels DNA-Schmelzpunktbestimmung nicht belegt werden. Vielmehr bestätigte diese Untersuchung eine nicht-

interkalierende Substanz-DNA-Interaktion. Für Verbindung **57b** konnte in einem Radioligand-Bindungsassay eine selektive Affinität zum A<sub>1</sub>-AR nachgewiesen werden, die ebenfalls die Proliferation der MCF-7 Zellen beeinflussen kann. Für diese Verbindung wurde ein K<sub>i</sub>-Wert von 3.7 μM ermittelt.

Alle Verbindungen zeigten ausgeprägte Fluoreszenzeigenschaften. Die Einführung der Hydroxygruppe am Benzimidazolgerüst führte zu einer deutlichen bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums (≈400 nm) im Vergleich zu den am Benzimidazol unsubstituierten Verbindungen. Als besonders geeignet für weiterführende pharmakologische Arbeiten stellte sich das 6-OH-Isomer der Verbindung **57a** heraus, das ein zweites längerwelliges Emissionsmaximum (490 nm) in PBS mit ausreichender Intensität außerhalb der Zellfluoreszenz aufwies. Für diese Verbindung konnte die Substanzaufnahme in die Zelle mittels Fluoreszenzmessungen belegt werden.

Die Bestimmung von Protein-Fluorophor-Wechselwirkungen ist prinzipiell möglich, da die Fluoreszenz der Benzimidazole durch Proteine nicht beeinflusst wird. Weiterführende Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und FKS erfordern eine Verbesserung der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften (Absorption und Emission im längerwelligen Bereich, Erhöhung der Fluoreszenzintensität).

## Summary

Raloxifene is a well known ligand for the estrogen receptor. It was the intention of this thesis to synthesize analogous benzimidazoles with basic side chains. These compounds should have good affinity to the estrogen receptor and additionally sufficient fluorescence properties to be used in studies of ER-ligand interactions.

The group of 2-(4-hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazoles showed already a reduction of the E2-induced luciferase-expression in concentrations of  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M. This observation could be explained by cytotoxic properties rather than by antiestrogenic activity. An additional hydroxy-substitution at the 5- or 6-position of the benzimidazole resulted in antiestrogenic activity whereas the cytotoxic effects against ER-positive MCF-7 cells were reduced. The difference between the 5- and 6-hydroxybenzimidazoles in the inhibition of gene activation of breast cancer MCF-7 2a cells was not very pronounced. Also the para-hydroxylation in the 2-arylring did not increase the antagonistic effects. No compound possessed agonistic properties on ER mediated gene activation. As a result of molecular modeling studies a binding mode similar to raloxifene can be assumed. The 5-(6)-OH-benzimidazoles interact at the LBD via hydrogen bonds between the 5-(6)-OH-group and the Glu 353 and Arg 394 and a structurally conserved water molecule. The phenolic hydroxy forms a second H-bond to His 524. The basic side chain binds to the carboxylate group of Asp 351.

All of the new synthesized benzimidazoles exhibited significant antiproliferative properties on MCF-7 cells which do not correlate with the antiestrogenic activity on the estrogen receptor. Some of the compounds also inhibited the growth of the hormone-independent MDA-MB 231 cell line.

A possible explanation for the cytotoxicity is the interaction with the DNA. The fluorescence quenching by addition of calf thymus DNA (CT-DNA) to the benzimidazole solution supported this assumption. In fact, the CT-DNA studies suggest that the compounds do not intercalate between the base-pairs.

A selective affinity ( $K_i = 3.7 \mu\text{M}$ ) of compound **57b** on the  $A_1$ -adenosine receptor was confirmed using radioligand-binding assays. The adenosine receptor also plays an important role in regulating cell death and proliferation.

All of the compounds showed marked fluorescence properties. Compared to the 2-(4-hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazoles the introduction of an additional hydroxy-group in the benzimidazole core led to a significant shift of the emission maximum to higher wavelength ( $\approx 400 \text{ nm}$ ). Especially suitable for further pharmacological investigations was compound **57a** with a second emission maximum in PBS at higher wavelength (490 nm) and good intensity out of the cellular autofluorescence. Cellular uptake was confirmed by fluorescence measurements.

Principally, the determination of protein-fluorophor-interactions is possible because proteins do not influence the emission of the benzimidazoles. Nevertheless, for a routinely use of the novel benzimidazoles in fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence microscopy further improvement of the absorption- and fluorescence properties is needed (absorption and emission at higher wavelengths, increase in fluorescence intensity).