

Freie Universität  Berlin

**Struktur-Wirkungs-Studien an estrogen wirksamen
Verbindungen mit
1,2-Diarylethan-Strukturelement**

Untersuchungen von Typ-I- und Typ-II-Estrogenen an ER α und ER β

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

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

vorgelegt von

Sandra Vera Busch
aus Frankfurt am Main

Februar, 2006

Dekan

1. Gutachter

2. Gutachter

Datum der Disputation

Prof. Dr. H. Hilger

Prof. Dr. R. Gust

Prof. Dr. H. Pertz

17.05.2006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2002 bis Februar 2006 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gust angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. R. Gust für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und die großzügige Freiheit bei dessen Bearbeitung,

Herrn Dr. K.-H. Fritze der Schering AG und seinen Mitarbeitern, insbesondere bei Frau K. Steiner-Hahn, Frau J. Pankrath und Herrn Dr. A. Walter für die Einarbeitung in Zelllabortechniken, fachlichen Diskussion und großzügigen Überlassung von diversen Materialien,

Frau Prof. Dr. M. Schäfer-Korting für die freundliche Aufnahme in ihr Zelllabor während der Umbaumaßnahmen im Institut und Bereitstellung diverser Geräte,

Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitskreise von Frau Prof. Dr. M. Schäfer-Korting und Herrn PD Dr. B. Kleuser für das angenehme Arbeitsklima im Zelllabor, ihre Hilfsbereitschaft und regen wissenschaftlichen Austausch, insbesondere bei Frau H. Gonska, Frau Dr. A.-K. Haberland, Frau Dr. S. Hammer, Frau Dr. I. Spiker und Herrn Dr. R. Vogler,

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, die mir durch ihre Hilfe und Gedankenaustausch eine wertvolle Unterstützung waren sowie eine freundliche Atmosphäre schufen, insbesondere bei Frau Dr. V. Lubczyk, Frau A. Moritz, Frau D. Posselt, Herrn Dr. M. v. Rauch und Frau U. Römmel sowie bei Frau S. Bergemann und Frau I. Schnautz für ihre tatkräftige Unterstützung und die angenehme Zeit zusammen,

den Assistentinnen und Assistenten des Praktikums im 1. Semester für die gute Arbeitsatmosphäre und breiten Meinungsaustausch,

und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	14
1.1	Der Estrogenrezeptor	14
1.1.1	Allgemeines	14
1.1.2	Aufbau des Estrogenrezeptors	15
1.1.3	Rezeptortransformation	19
1.1.4	Genaktivierung.....	20
1.1.5	Koregulatoren	21
1.1.6	Phosphorylierung des ER und <i>cross-talk</i> mit Wachstumsfaktoren ..	23
1.1.7	Physiologie des Estrogenrezeptors	23
1.2	Liganden des Estrogenrezeptors	26
1.2.1	Physiologischer Ligand	26
1.2.2	Nicht-steroidale Agonisten	28
1.2.3	Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM)	30
1.2.4	Antagonisten.....	34
1.2.5	Verbindungen mit selektiver Wirkung an ER α bzw. ER β	37
1.3	Vom Konzept des estrogenrezeptorvermittelten <i>drug-targeting</i> zu neuen Estrogenen	41
1.3.1	Estrogenrezeptorvermitteltes <i>drug-targeting</i>	41
1.3.2	Konformation der 1,2-Diarylethaneinheit im freien Neutralliganden und Pt-Komplex	43
1.3.3	Estrogene mit 1,2-Diarylethan-Pharmakophor und Problemstellung	46
2	Aufbau ER-subtypeselektiver Testsysteme	52
2.1	Allgemeines	52
2.2	Verwendete Reagenzien, Zelllinien, Assays und Plasmide	53
2.2.1	Transfektionsreagenz	53
2.2.2	U-2OS-Zelllinie	53
2.2.3	ER α - und ER β -Expressionsplasmid	54
2.2.4	Luciferaseassay und Reporterplasmid.....	54
2.2.5	Gerätespezifische Messbereiche für Luciferasemessung.....	55

2.2.6	β -Galactosidaseplasmid und -assays.....	57
2.3	Optimierung der Transfektionseffizienz.....	60
2.3.1	Lipid/DNA-Ratio	60
2.3.2	Zelldichte.....	63
2.3.3	Transfektionsdauer.....	64
2.3.4	Einfluss der Trypsinierung.....	66
2.3.5	Up-Scale und Trypsinierung.....	66
2.4	Optimierung des ERα- und ERβ-Assays	67
2.4.1	Verhältnis zwischen Rezeptor- und Reporterplasmid.....	68
2.4.2	Expressionskinetik der Luciferaseaktivität.....	69
2.4.3	Basalaktivität	70
2.5	Bezug der RLU auf die Zellmasse.....	71
2.6	ER-subtypselektive Transaktivierungsassays	72
3	Pharmakologische Untersuchungen am Estrogenrezeptor	76
3.1	Testsysteme	76
3.1.1	Testung der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung auf molekularer Ebene in Transaktivierungsassays	77
3.1.1.1	Testung an der stabil transfizierten MCF-7-2a-Zelllinie	77
3.1.1.2	Testung mit transient transfizierten U-2OS-Zellen an ER α /ER β	79
3.1.1.3	Ermittlung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven.....	80
3.1.1.4	Bestimmung der agonistischen und antagonistischen Wirkung	81
3.1.2	<i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest.....	83
3.1.2.1	MCF-7-Zelllinie.....	85
3.1.2.2	MDA-MB-231-Zelllinie	85
3.2	Testergebnisse am Estrogenrezeptor	86
3.2.1	Untersuchung estrogen wirksamer Verbindungen	86
3.2.2	Untersuchung antiestrogen wirksamer Verbindungen.....	88
3.2.3	Untersuchung antiestrogen wirksamen Verbindungen auf Zytotoxizität	90

3.2.4	Untersuchung verschiedener Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement	93
3.2.4.1	Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie.....	95
3.2.4.2	Agonistische Wirkung an ER α	97
3.2.4.3	Agonistische Wirkung an ER β	99
3.2.4.4	Zusammenfassung	100
3.2.5	Untersuchung von 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-	102
3.2.6	Untersuchung von (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)/(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Diarylpiperazin-Derivaten mit verschiedenen Substituenten am Heterozyklus	104
3.2.6.1	Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie.....	105
3.2.6.2	Agonistische Wirkung an ER α	106
3.2.6.3	Agonistische Wirkung an ER β	108
3.2.6.4	Zusammenfassung	109
3.2.7	Untersuchung von (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- mit basischer Seitenkette	112
3.2.7.1	Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie.....	113
3.2.7.2	Agonistische Wirkung an ER α	114
3.2.7.3	Agonistische Wirkung an ER β	115
3.2.7.4	Antagonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie.....	116
3.2.7.5	Antagonistische Wirkung an ER α	117
3.2.7.6	Antagonistische Wirkung an ER β	118
3.2.7.7	Zusammenfassung	118
3.3	Diskussion der Testergebnisse.....	120
3.3.1	Unterschied in den auf ER α basierenden Transaktivierungsassays	120
3.3.2	Bindungsmodell für Typ-I-Estrogene	121
3.3.3	Bindungsmodell für Typ-II-Estrogene	128

4	Zusammenfassung.....	148
5	Experimenteller Teil	154
5.1	Verwendete Materialien	154
5.1.1	Geräte	154
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	155
5.1.3	Chemikalien	156
5.1.4	Puffer, Lösungen	156
5.1.5	Biologische Materialien	158
5.1.6	Kulturmedien	159
5.2	Molekularbiologische Methoden zur Plasmidgewinnung.....	160
5.2.1	Anzucht und Kultivierung von Bakterien.....	160
5.2.2	Transformation von E. coli.....	161
5.2.3	Plasmidaufreinigung.....	161
5.2.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA.....	162
5.3	Allgemeine Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	162
5.3.1	Allgemeine Kulturbedingungen	162
5.3.2	Passage der Zellen	163
5.3.3	Kryokonservierung der Zellen	163
5.3.4	Auftauen der Zellen.....	163
5.3.5	Bestimmung der Zellkonzentration.....	164
5.3.6	Dextran/Kohlebehandlung von FCS.....	164
5.3.7	Allgemeine Transfektion mit Fugene 6 [®]	165
5.4	Bestimmung der Zellmasse mittels Kristallviolettffärbung	165
5.4.1	Aussaat und Abstoppen	165
5.4.2	Anfärben der Zellen.....	166
5.5	Luciferaseassay	166
5.6	X-Gal-Assay	167
5.7	ONPG-Assay.....	168
5.8	Transiente Transfektion im Rahmen der Optimierung der Transfektionseffizienz.....	169
5.8.1	Transiente Transfektion mit Kontrollvektor	169

5.8.1.1	Lipid/DNA-Ratio	170
5.8.1.2	Zelldichte	170
5.8.1.3	Transfektionsdauer	171
5.8.1.4	Einfluss der Trypsinierung	171
5.8.1.5	Up-Scale mit und ohne Trypsinierung.....	171
5.8.2	Transiente Transfektion mit Rezeptor- und Reporterplasmid	172
5.8.2.1	Verhältnis zwischen ER α - bzw. ER β - und Reporterplasmid	172
5.8.2.2	Inkubationszeit für Testsubstanzen	173
5.8.2.3	Bestimmung der Basalaktivität	173
5.9	Transiente Transfektion zur Vorbereitung des Transaktivierungsassays	173
5.9.1	Anzucht der Zellen vor einem Test	173
5.9.2	Aussaat der Zellen.....	174
5.9.3	Transfektion	174
5.10	Transaktivierungsassay im 96-Loch Maßstab.....	175
5.10.1	Anzucht der Zellen vor einem Test	175
5.10.2	Aussaat in Testplatten	175
5.10.3	Verdünnungsreihe	175
5.10.4	Substanzzugabe	177
5.10.5	Zellernte und Zelllyse.....	177
5.10.6	Anlegen von Kontrollplatten.....	177
5.10.7	Auswertung.....	178
5.10.8	Testung auf antagonistische Wirkung	178
5.11	Zytotoxizitätstests	179
5.11.1	Aussaat der Zellen.....	179
5.11.2	Substanzzugabe und Messpunktnahme.....	179
5.12	Generationszeitbestimmung	182
5.12.1	Durchführung.....	182
5.12.2	Auswertung.....	182
6	Anhang	186

6.1	Quellen der Testverbindungen.....	186
6.1.1	Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement.....	186
6.1.2	4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline	186
6.1.3	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)/(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Diarylpiperazin-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Heterozyklus	187
6.1.4	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette	187
6.2	Konzentrations-Wirkungskurven der Transaktivierungsassays	188
6.2.1	Untersuchung estrogen wirksamer Verbindungen	188
6.2.2	Untersuchung antiestrogen wirksamer Verbindungen.....	189
6.2.3	Untersuchung verschiedener Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement.....	190
6.2.4	Untersuchung von 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)- 2-imidazolinen	194
6.2.5	Untersuchung von (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)/(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Diarylpiperazin-Derivaten mit verschiedenen Substituenten am Heterozyklus.....	194
6.2.6	Untersuchung von (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette	197
6.3	Zeit-Wirkungskurven der Zytotoxizitätstests.....	201
6.3.1	Untersuchung antiestrogen wirksamen Verbindungen auf Zytotoxizität	201
6.4	Wachstumskurve von U-2OS-Zellen.....	205
7	Literaturverzeichnis	208

Häufig verwendete Abkürzungen

Å	Angström; 1 Å=0.1 nm
AF (-1; -2; -2a; -2b)	Aktivierungsfunktion (-1; -2; -2a; -2b)
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
ct-FCS	<i>Charcoal treated FCS</i> ; mit Dextran/Kohle behandeltes FCS
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DES	<i>E</i> -Diethylstilbestrol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	17β-Estradiol
E2-BSA	E2-BSA-Konjugat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER (α/ β)	Estrogenrezeptor (α/ β)
ERE	<i>Estrogen Response Element</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> ; fetales Kälberserum
FUL	Fulvestrant
GEN	Genistein
HAT	Histonacetyltransferase
Heg0	Gen des Wildtyps des humanen ERα
HEX	<i>meso</i> -Hexestrol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; Hochleistungsflüssigchromatographie
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> ; Hitzeschockprotein
<i>lacZ</i>	Gen der bakteriellen β-Galactosidase
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LM	Lösungsmittel

<i>luc</i> ⁺	Gen der Leuchtkäferluciferase
LXXLL-Motiv	leucinhalige Aminosäuresequenz (L= Leu, X = beliebige Aminosäure)
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
mER	membran-assoziiertes Estrogenrezeptor
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NR-Box	Bindungsstelle für AF-2 in Kofaktoren mit LXXLL-Motiv
OHT	4-Hydroxytamoxifen
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
RAL	Raloxifen
RBA	relative Bindungsaffinität
RT	Raumtemperatur
RTP	relative Transkriptionspotenz
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
SHP	<i>Short Heterodimerization Partner</i>
SHR	Steroidhormonrezeptor
TAF	TBP-assoziiertes Faktor
TAM	Tamoxifen
TATA	Basensequenz TATAAA innerhalb des Promotors
TBP	TATA-bindendes Protein
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
THC	(<i>R,R</i>)-Tetrahydrochrysen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Z	Zelle(n)

Struktur-Wirkungs-Studien an estrogen wirksamen Verbindungen mit 1,2-Diarylethan-Strukturelement

Untersuchungen von Typ-I- und Typ-II-Estrogenen an ER α und ER β

Estrogene vermitteln ihre Wirkung über den Estrogenrezeptor (ER), einen ligandeninduzierten Transkriptionsfaktor. Seit 1996 ist bekannt, dass es zwei Rezeptorsubtypen (ER α und ER β) mit unterschiedlichem Verteilungsmuster im menschlichen Organismus und gegenseitiger Beeinflussung gibt. Sie regulieren neben der weiblichen Reproduktionsendokrinologie Zellproliferation und -differenzierung in vielen weiteren Geweben, auch beim Mann. Physiologischer Ligand beider ER-Subtypen ist Estradiol (E2). Neben diesem sind weitere steroidale und eine Reihe nicht steroidaler Verbindungen mit agonistischer und antagonistischer Wirkung auf ER α und ER β bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Ergänzung des Testsystems mit ER α -abhängigen MCF-7-2a-Zellen ER-subtypselektive Transaktivierungsassays auf Basis transienter Transfektion genuin ER-negativer U-2OS-Zellen aufgebaut.

Die Testsysteme mit U-2OS-Zellen reagierten sowohl auf Agonisten als auch Antagonisten empfindlicher als MCF-7-2a-Zellen. Verantwortlich dafür wurden estrogenaffine Strukturen ohne Transkriptionsaktivität im Bereich der Zellmembran der MCF-7-2a-Zellen gemacht (membranständiger ER).

Verschiedene Verbindungen mit dem von Hexestrol abgeleiteten 1,2-Diarylethan-Strukturelement wurden auf ihre Wirkung am ER untersucht. Als wichtiges Merkmal stellte sich eine *para*-Hydroxygruppe in beiden Arylresten heraus. Nur Verbindungen mit zusätzlichen hydrophoben Strukturkomponenten wie Azidgruppen oder Diiodoplatineinheiten zeigten trotz *para*-Methoxygruppen estrogen Aktivität.

Eine (*R,S*)/(*S,R*)-Konfiguration des 1,2-Diarylethan-Strukturelements erwies sich bei allen Substanzklassen als überlegen gegenüber den diastereomeren Verbindungen.

Auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu E2 wurden offenkettige 1,2-Diazido- und 1,2-Diamino-1,2-diarylethane als Typ-I-Estrogene klassifiziert. Ihr Bindungsmodell geht von einer zu E2-analogen Assoziation im ER aus. (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-1,2-Diamino-1-(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hy-

droxyphenyl)ethan (**21 a**) war an ER α ca. 10-mal wirksamer als an ER β (EC₅₀: ER α = 2.8 nM; ER β = 31 nM). Sterische Behinderungen zwischen einer Aminogruppe und der Seitenkette von Met³³⁶ in ER β könnten hierfür verantwortlich sein.

In Abhängigkeit ihrer Grundstruktur zeigten (*R,S*)/(*S,R*)-konfigurierte zyklische Typ-II-Estrogene unterschiedliche estrogenische Wirkungen. Neben dem Prototyp dieser Klasse, den [1,2-Diamino-1,2-diarylethan]Pt(II)-Komplexen, zeigten 4,5-Diaryl-2-imidazoline eine gute estrogenische Wirksamkeit. Diese konnte bei 4,5-Diaryl-2-imidazolinen durch Steigerung der Lipophilie über Erhöhung des Chlorierungsgrades in den Arylresten, N-Alkylierung und teilweise durch N,N'-Dialkylierung verstärkt werden. Eine Alkylierung von C-2 führte hingegen zu einer Abnahme der estrogenischen Wirksamkeit.

Als wirksamste Verbindung zeigte sich (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-N-Ethyl-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**53**) (EC₅₀: MCF-7-2a-Zellen = 11 nM; ER α = 0.42 nM; ER β = 3.1 nM). Ihre 7-fach höhere Wirksamkeit an ER α kann in geringeren sterischen Behinderungen in der etwas größeren LBD begründet liegen. Im Vergleich zu **53** lag die Wirkung von E2 nur - abhängig vom Testsystem - zwischen dem Faktor 240 und 310 höher.

4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette zeigten an der MCF-7-2a-Zelllinie weder agonistische noch antagonistische Eigenschaften. An den ER-Subtypen dagegen kam es zu unterschiedlich starker Reduktion der agonistischen Eigenschaften. Derivate mit zusätzlicher Ethylgruppe an C-2 zeigten schließlich auch antagonistische Wirkungen. (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-2-Ethyl-4-(4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**49**) zeigte an ER α nur antagonistische Effekte (ER α : IC₅₀ = 62 nM), während an ER β noch agonistische Aktivität festgestellt wurde (ER β : EC₅₀ = 510 nM; IC₅₀ = 8000 nM).

Durch die gewinkelte Strukturgeometrie musste für Typ-II-Estrogene ein zu E2 unterschiedliches Bindungsmodell angenommen werden. Ihre Strukturanalogie zu SERM ließ vermuten, dass der zweite Arylrest den β -Kanal in der LBD besetzt.

Structure-Activity-Relationship of Estrogenic Compounds with 1,2-Diarylethane Moiety

Examinations of Type-I- and Type-II-Estrogens on ER α and ER β

Estrogens mediated their effects via the estrogen receptor (ER) - a ligand-induced transcriptional factor. Since 1996 two receptor subtypes (ER α and ER β) are known. They show different distribution patterns within human organism and influence each other. Besides female reproduction they regulate proliferation and differentiation of cells within both man and woman. Additional to the physiological ligand estradiol (E2) other steroidal and numerous non-steroidal compounds exert agonistic and antagonistic effects on ER α and ER β . In order to complete the test system with ER α -depending MCF-7-2a-cells, new ER-subtype selective transactivation assays based on transient transfection of genuine ER-negative U-2OS-cells were established.

The test systems with U-2OS-cells turned out to be the more sensitive assays for agonists and antagonists by comparison with MCF-7-2a-cells.

Different compounds bearing the 1,2-diarylethane moiety derived from Hexestrol have been assayed on the ER. *Para*-hydroxy groups in both aryl residues proofed to be essential for estrogenic activity. Compounds with additional hydrophobic residues such as azido groups or a diiodoplatinum unit mediated estrogenic effects in spite of *para*-methoxy group. Throughout all classes of compounds (*R,S*)/(*S,R*)-configuration of the 1,2-diarylethane moiety showed better effects than the diastereomeric compounds.

Non-cyclic 1,2-diazido- and 1,2-diamino-1,2-diarylethanes show structural similarity to E2. It is the reason why they were classified as type-I-estrogens and their binding mode to the ER was assumed to be analogous to E2. (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-1,2-Diamino-1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-(2-chloro-4-hydroxyphenyl)ethane (**21 a**) showed a 10-time higher potency on ER α than on ER β (EC₅₀: ER α = 2.8 nM; ER β = 31 nM). This might be based on sterically hindrances between one amino group and the side chain of Met³³⁶ in ER β .

Depending on the basic structure (*R,S*)/(*S,R*)-configured cyclic type-II-estrogens showed different estrogenic activity. Besides [1,2-diamino-1,2-diarylethane]Pt(II) complexes - the prototype of type-II-estrogens - 4,5-diaryl-2-

imidazolines exerted efficient estrogenic activity. Estrogenic potency of 2-imidazolines was enhanced by increasing their lipophilic character. With the number of chlorine atoms in the aryl residues, N-alkylation and partly N,N'-dialkylation estrogenic potency improved. However C-2-alkylation caused a decrease of estrogenic response.

The most potent compound in this study was (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-N-ethyl-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline (**53**) (EC_{50} : MCF-7-2a-cells = 11 nM; ER_{α} = 0.42 nM; ER_{β} = 3.1 nM). Its 7-time higher potency on ER_{α} might be caused by less sterically hindrances in the slightly larger LBD. Depending on the test system, E2 was only 240- to 310-time more active compared to **53**.

Derivatives of 4,5-diaryl-2-imidazolines with basic side chains showed neither agonistic nor antagonistic effects. On the ER-subtypes a different reduction of agonistic activity was achieved. At last antagonistic effects were seen by derivatives with an additional C-2-ethyl group. (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-Ethyl-4-(4-(2-piperidine-1-ylethoxy)phenyl)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline (**49**) showed only antagonistic effects on ER_{α} (ER_{α} : IC_{50} = 62 nM) whereas on ER_{β} agonistic activity was still established (ER_{β} : EC_{50} = 510 nM; IC_{50} = 8000 nM). According to their different spatial structure to E2 a different binding mode was assigned to type-II-estrogens. Due to their structural analogy to SERM the second aryl residues was supposed to occupy the β -canal of the LBD.

Freie Universität  Berlin

**Struktur-Wirkungs-Studien an estrogen wirksamen
Verbindungen mit
1,2-Diarylethan-Strukturelement**

Untersuchungen von Typ-I- und Typ-II-Estrogenen an ER α und ER β

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

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

vorgelegt von

Sandra Vera Busch
aus Frankfurt am Main

Februar, 2006

Dekan

1. Gutachter

2. Gutachter

Datum der Disputation

Prof. Dr. H. Hilger

Prof. Dr. R. Gust

Prof. Dr. H. Pertz

17.05.2006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2002 bis Februar 2006 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gust angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. R. Gust für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und die großzügige Freiheit bei dessen Bearbeitung,

Herrn Dr. K.-H. Fritze der Schering AG und seinen Mitarbeitern, insbesondere bei Frau K. Steiner-Hahn, Frau J. Pankrath und Herrn Dr. A. Walter für die Einarbeitung in Zelllabortechniken, fachlichen Diskussion und großzügigen Überlassung von diversen Materialien,

Frau Prof. Dr. M. Schäfer-Korting für die freundliche Aufnahme in ihr Zelllabor während der Umbaumaßnahmen im Institut und Bereitstellung diverser Geräte,

Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitskreise von Frau Prof. Dr. M. Schäfer-Korting und Herrn PD Dr. B. Kleuser für das angenehme Arbeitsklima im Zelllabor, ihre Hilfsbereitschaft und regen wissenschaftlichen Austausch, insbesondere bei Frau H. Gonska, Frau Dr. A.-K. Haberland, Frau Dr. S. Hammer, Frau Dr. I. Spiker und Herrn Dr. R. Vogler,

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, die mir durch ihre Hilfe und Gedankenaustausch eine wertvolle Unterstützung waren sowie eine freundliche Atmosphäre schufen, insbesondere bei Frau Dr. V. Lubczyk, Frau A. Moritz, Frau D. Posselt, Herrn Dr. M. v. Rauch und Frau U. Römmel sowie bei Frau S. Bergemann und Frau I. Schnautz für ihre tatkräftige Unterstützung und die angenehme Zeit zusammen,

den Assistentinnen und Assistenten des Praktikums im 1. Semester für die gute Arbeitsatmosphäre und breiten Meinungsaustausch,

und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	14
1.1	Der Estrogenrezeptor	14
1.1.1	Allgemeines	14
1.1.2	Aufbau des Estrogenrezeptors	15
1.1.3	Rezeptortransformation	19
1.1.4	Genaktivierung.....	20
1.1.5	Koregulatoren	21
1.1.6	Phosphorylierung des ER und <i>cross-talk</i> mit Wachstumsfaktoren ..	23
1.1.7	Physiologie des Estrogenrezeptors	23
1.2	Liganden des Estrogenrezeptors	26
1.2.1	Physiologischer Ligand	26
1.2.2	Nicht-steroidale Agonisten	28
1.2.3	Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM)	30
1.2.4	Antagonisten.....	34
1.2.5	Verbindungen mit selektiver Wirkung an ER α bzw. ER β	37
1.3	Vom Konzept des estrogenrezeptorvermittelten <i>drug-targeting</i> zu neuen Estrogenen	41
1.3.1	Estrogenrezeptorvermitteltes <i>drug-targeting</i>	41
1.3.2	Konformation der 1,2-Diarylethaneinheit im freien Neutralliganden und Pt-Komplex	43
1.3.3	Estrogene mit 1,2-Diarylethan-Pharmakophor und Problemstellung	46
2	Aufbau ER-subtypeselektiver Testsysteme	52
2.1	Allgemeines	52
2.2	Verwendete Reagenzien, Zelllinien, Assays und Plasmide	53
2.2.1	Transfektionsreagenz	53
2.2.2	U-2OS-Zelllinie	53
2.2.3	ER α - und ER β -Expressionsplasmid	54
2.2.4	Luciferaseassay und Reporterplasmid.....	54
2.2.5	Gerätespezifische Messbereiche für Luciferasemessung.....	55

2.2.6	β -Galactosidaseplasmid und -assays.....	57
2.3	Optimierung der Transfektionseffizienz.....	60
2.3.1	Lipid/DNA-Ratio	60
2.3.2	Zelldichte.....	63
2.3.3	Transfektionsdauer.....	64
2.3.4	Einfluss der Trypsinierung.....	66
2.3.5	Up-Scale und Trypsinierung.....	66
2.4	Optimierung des ERα- und ERβ-Assays	67
2.4.1	Verhältnis zwischen Rezeptor- und Reporterplasmid.....	68
2.4.2	Expressionskinetik der Luciferaseaktivität.....	69
2.4.3	Basalaktivität	70
2.5	Bezug der RLU auf die Zellmasse.....	71
2.6	ER-subtypselektive Transaktivierungsassays	72
3	Pharmakologische Untersuchungen am Estrogenrezeptor	76
3.1	Testsysteme	76
3.1.1	Testung der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung auf molekularer Ebene in Transaktivierungsassays	77
3.1.1.1	Testung an der stabil transfizierten MCF-7-2a-Zelllinie	77
3.1.1.2	Testung mit transient transfizierten U-2OS-Zellen an ER α /ER β	79
3.1.1.3	Ermittlung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven.....	80
3.1.1.4	Bestimmung der agonistischen und antagonistischen Wirkung	81
3.1.2	<i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest.....	83
3.1.2.1	MCF-7-Zelllinie.....	85
3.1.2.2	MDA-MB-231-Zelllinie	85
3.2	Testergebnisse am Estrogenrezeptor	86
3.2.1	Untersuchung estrogen wirksamer Verbindungen	86
3.2.2	Untersuchung antiestrogen wirksamer Verbindungen.....	88
3.2.3	Untersuchung antiestrogen wirksamen Verbindungen auf Zytotoxizität	90

3.2.4	Untersuchung verschiedener Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement	93
3.2.4.1	Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie.....	95
3.2.4.2	Agonistische Wirkung an ER α	97
3.2.4.3	Agonistische Wirkung an ER β	99
3.2.4.4	Zusammenfassung	100
3.2.5	Untersuchung von 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin-	102
3.2.6	Untersuchung von (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)/(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Diarylpiperazin-Derivaten mit verschiedenen Substituenten am Heterozyklus	104
3.2.6.1	Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie.....	105
3.2.6.2	Agonistische Wirkung an ER α	106
3.2.6.3	Agonistische Wirkung an ER β	108
3.2.6.4	Zusammenfassung	109
3.2.7	Untersuchung von (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- mit basischer Seitenkette	112
3.2.7.1	Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie.....	113
3.2.7.2	Agonistische Wirkung an ER α	114
3.2.7.3	Agonistische Wirkung an ER β	115
3.2.7.4	Antagonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie.....	116
3.2.7.5	Antagonistische Wirkung an ER α	117
3.2.7.6	Antagonistische Wirkung an ER β	118
3.2.7.7	Zusammenfassung	118
3.3	Diskussion der Testergebnisse.....	120
3.3.1	Unterschied in den auf ER α basierenden Transaktivierungsassays	120
3.3.2	Bindungsmodell für Typ-I-Estrogene	121
3.3.3	Bindungsmodell für Typ-II-Estrogene	128

4	Zusammenfassung.....	148
5	Experimenteller Teil	154
5.1	Verwendete Materialien	154
5.1.1	Geräte	154
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	155
5.1.3	Chemikalien	156
5.1.4	Puffer, Lösungen	156
5.1.5	Biologische Materialien	158
5.1.6	Kulturmedien	159
5.2	Molekularbiologische Methoden zur Plasmidgewinnung.....	160
5.2.1	Anzucht und Kultivierung von Bakterien.....	160
5.2.2	Transformation von E. coli.....	161
5.2.3	Plasmidaufreinigung.....	161
5.2.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA.....	162
5.3	Allgemeine Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	162
5.3.1	Allgemeine Kulturbedingungen	162
5.3.2	Passage der Zellen	163
5.3.3	Kryokonservierung der Zellen	163
5.3.4	Auftauen der Zellen.....	163
5.3.5	Bestimmung der Zellkonzentration.....	164
5.3.6	Dextran/Kohlebehandlung von FCS.....	164
5.3.7	Allgemeine Transfektion mit Fugene 6 [®]	165
5.4	Bestimmung der Zellmasse mittels Kristallviolettffärbung	165
5.4.1	Aussaat und Abstoppen	165
5.4.2	Anfärben der Zellen.....	166
5.5	Luciferaseassay	166
5.6	X-Gal-Assay	167
5.7	ONPG-Assay.....	168
5.8	Transiente Transfektion im Rahmen der Optimierung der Transfektionseffizienz.....	169
5.8.1	Transiente Transfektion mit Kontrollvektor	169

5.8.1.1	Lipid/DNA-Ratio	170
5.8.1.2	Zelldichte	170
5.8.1.3	Transfektionsdauer	171
5.8.1.4	Einfluss der Trypsinierung	171
5.8.1.5	Up-Scale mit und ohne Trypsinierung.....	171
5.8.2	Transiente Transfektion mit Rezeptor- und Reporterplasmid	172
5.8.2.1	Verhältnis zwischen ER α - bzw. ER β - und Reporterplasmid	172
5.8.2.2	Inkubationszeit für Testsubstanzen	173
5.8.2.3	Bestimmung der Basalaktivität	173
5.9	Transiente Transfektion zur Vorbereitung des Transaktivierungsassays	173
5.9.1	Anzucht der Zellen vor einem Test	173
5.9.2	Aussaat der Zellen.....	174
5.9.3	Transfektion	174
5.10	Transaktivierungsassay im 96-Loch Maßstab.....	175
5.10.1	Anzucht der Zellen vor einem Test	175
5.10.2	Aussaat in Testplatten	175
5.10.3	Verdünnungsreihe	175
5.10.4	Substanzzugabe	177
5.10.5	Zellernte und Zelllyse.....	177
5.10.6	Anlegen von Kontrollplatten.....	177
5.10.7	Auswertung.....	178
5.10.8	Testung auf antagonistische Wirkung	178
5.11	Zytotoxizitätstests	179
5.11.1	Aussaat der Zellen.....	179
5.11.2	Substanzzugabe und Messpunktnahme.....	179
5.12	Generationszeitbestimmung	182
5.12.1	Durchführung.....	182
5.12.2	Auswertung.....	182
6	Anhang	186

6.1	Quellen der Testverbindungen.....	186
6.1.1	Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement.....	186
6.1.2	4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline	186
6.1.3	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)/(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Diarylpiperazin-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Heterozyklus	187
6.1.4	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette	187
6.2	Konzentrations-Wirkungskurven der Transaktivierungsassays	188
6.2.1	Untersuchung estrogen wirksamer Verbindungen	188
6.2.2	Untersuchung antiestrogen wirksamer Verbindungen.....	189
6.2.3	Untersuchung verschiedener Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement.....	190
6.2.4	Untersuchung von 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)- 2-imidazolinen	194
6.2.5	Untersuchung von (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)/(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Diarylpiperazin-Derivaten mit verschiedenen Substituenten am Heterozyklus.....	194
6.2.6	Untersuchung von (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette	197
6.3	Zeit-Wirkungskurven der Zytotoxizitätstests.....	201
6.3.1	Untersuchung antiestrogen wirksamen Verbindungen auf Zytotoxizität	201
6.4	Wachstumskurve von U-2OS-Zellen.....	205
7	Literaturverzeichnis	208

Häufig verwendete Abkürzungen

Å	Angström; 1 Å=0.1 nm
AF (-1; -2; -2a; -2b)	Aktivierungsfunktion (-1; -2; -2a; -2b)
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
ct-FCS	<i>Charcoal treated FCS</i> ; mit Dextran/Kohle behandeltes FCS
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DES	<i>E</i> -Diethylstilbestrol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	17β-Estradiol
E2-BSA	E2-BSA-Konjugat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER (α/ β)	Estrogenrezeptor (α/ β)
ERE	<i>Estrogen Response Element</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> ; fetales Kälberserum
FUL	Fulvestrant
GEN	Genistein
HAT	Histonacetyltransferase
Heg0	Gen des Wildtyps des humanen ERα
HEX	<i>meso</i> -Hexestrol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; Hochleistungsflüssigchromatographie
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> ; Hitzeschockprotein
<i>lacZ</i>	Gen der bakteriellen β-Galactosidase
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LM	Lösungsmittel

<i>luc</i> ⁺	Gen der Leuchtkäferluciferase
LXXLL-Motiv	leucinhalige Aminosäuresequenz (L= Leu, X = beliebige Aminosäure)
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
mER	membran-assoziiertes Estrogenrezeptor
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NR-Box	Bindungsstelle für AF-2 in Kofaktoren mit LXXLL-Motiv
OHT	4-Hydroxytamoxifen
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
RAL	Raloxifen
RBA	relative Bindungsaffinität
RT	Raumtemperatur
RTP	relative Transkriptionspotenz
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
SHP	<i>Short Heterodimerization Partner</i>
SHR	Steroidhormonrezeptor
TAF	TBP-assoziiertes Faktor
TAM	Tamoxifen
TATA	Basensequenz TATAAA innerhalb des Promotors
TBP	TATA-bindendes Protein
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
THC	(<i>R,R</i>)-Tetrahydrochrysen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Z	Zelle(n)

1 Einleitung

1 Einleitung

1.1 Der Estrogenrezeptor

1.1.1 Allgemeines

Estrogene spielen als Sexualhormone eine essentielle Rolle in der Entwicklungsphysiologie der weiblichen Geschlechtsmerkmale und in der Reproduktionsendokrinologie der Frau. Aus diesem Grund konzentrierte man sich zu Beginn der Forschung über die Natur der Estrogene auf Gewebe des weiblichen Reproduktionssystems wie Brüstdrüsen, Ovarien und Uterus. Untersuchungen über die spezifische Bindung von 17β -Estradiol (E2) führte 1962 zur Entdeckung des Estrogenrezeptors (ER), der für die physiologischen Effekte von E2 verantwortlich gemacht wird [1].

Der ER ist ein lösliches, thermolabiles und proteaseempfindliches Protein [2]. Sein Abbau erfolgt über Ubiquitinligasen in Proteasomen. Dabei liegt seine Halbwertszeit ohne Ligandenbindung bei fünf Tagen und sinkt auf drei Stunden bei Liganden/ER-Komplexen. [3-5]

1986 gelang es, den ER zu klonieren [6, 7]. Bis 1996 ging man davon aus, dass nur dieser ER für die physiologischen und pharmakologischen Effekte von E2, synthetischen Estrogenen und Antiestrogenen verantwortlich sei. Mit der Klonierung eines zweiten ER-Subtyps ergab sich eine neue Nomenklatur [8]. Heute wird der 1986 klonierte ER als $ER\alpha$ und der 1996 beschriebene ER als $ER\beta$ bezeichnet. $ER\alpha$ und $ER\beta$ sind keine zwei Splicevarianten eines Genprodukts, sondern werden von unterschiedlichen Genen codiert. Die Geninformation für $ER\alpha$ liegt auf Chromosom 6, die für $ER\beta$ auf Chromosom 14 [7, 9].

Innerhalb der großen Familie der Kernrezeptoren gehören beide ER-Subtypen zu den Steroidhormonrezeptoren (SHR). Sie kommen hoch konserviert in verschiedenen Spezies vor.

Ein dritter neben $ER\alpha$ und $ER\beta$ vorliegender ER-Subtyp - $ER\gamma$ - wurde bis jetzt nur aus Geweben von Fischarten kloniert. In humanen Geweben konnte er bisher noch nicht nachgewiesen werden [10-12].

1.1.2 Aufbau des Estrogenrezeptors

Das Rezeptormolekül von ER α besteht aus 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66 kDa. Das Proteinmolekül von ER β ist kleiner, umfasst 530 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 59 kDa [7, 13]. Wie alle SHR besteht auch der ER^a aus sechs funktionellen Einheiten. Sein schematischer Aufbau mit Homologieangaben zwischen den Rezeptorsubtypen ist in Abbildung 1.1.1 dargestellt.

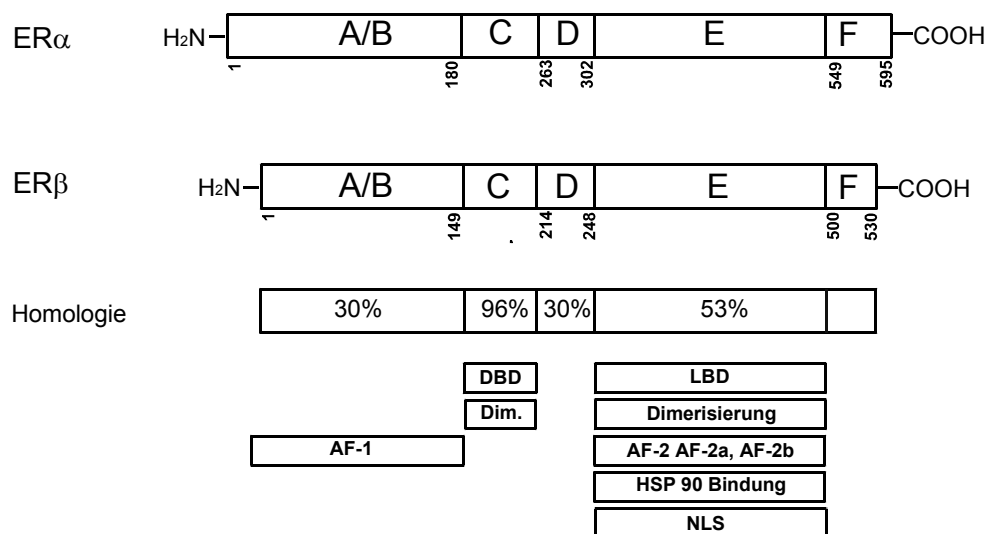


Abbildung 1.1.1 Funktionelle Domänen der humanen ER-Subtypen mit Angaben der Aminosäurenummern nach Green [14], Gronemeyer [15] und Tsai [16]; Homologie nach Dutertre [17]; NLS: *Nuclear Localisation Signal*; HSP 90: Hitzeschockprotein 90; AF: Aktivierungsfunktion; DBD: DNA-Bindungsdomäne; LBD: Ligandenbindungsdomäne; Dim: Dimerisierungseinheit

Am N-Terminus des Rezeptormoleküls befindet sich die A/B Domäne. Innerhalb der SHR besteht hier eine hohe Variabilität, die sich in Größenunterschieden innerhalb der SHR widerspiegelt. In diesem Bereich liegt die konstitutive, ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion-1 (AF-1). Sie wirkt aktivierend auf die Transkription, indem sie mit dem Präinitiationskomplex oder Koaktivatoren in Wechselwirkung tritt [18, 19]. Die Aktivität der AF-1 ist abhängig von Promotor und Zelltyp [20]. AF-1 ist bei Protein-Protein-Interaktionen beteiligt und zeigt im

^a Die Abkürzung ER ohne weitere Bezeichnung bezieht sich im Folgenden auf beide Rezeptorsubtypen.

ER α eine hohe Aktivität. Zwei verschiedene Abschnitte von AF-1 sind nötig, um eine agonistische Wirkung, z.B. von E2, an ER α zu vermitteln [21]. Bei ER β dagegen ist die Rolle von AF-1 noch wenig geklärt. Die Aktivität von AF-1 in ER β ist sehr gering und zeigt keine duale Funktion [22, 23].

Die anschließende hydrophile Domäne C ist die am höchsten konservierte Region innerhalb der SHR. Auch zwischen ER α und ER β besteht hier mit 96 % eine hohe Homologie: nur drei Aminosäuren sind verschieden [24, 25]. Ihr kommt eine zentrale Rolle zu, da sie die DNA-Bindungsdomäne (DBD) enthält. Hier sind zwei Zinkfinger motive lokalisiert, die von jeweils vier Cysteinmolekülen, die sich tetraedrisch an ein Zinkion koordinieren, gebildet werden (siehe Abbildung 1.1.2) [26].

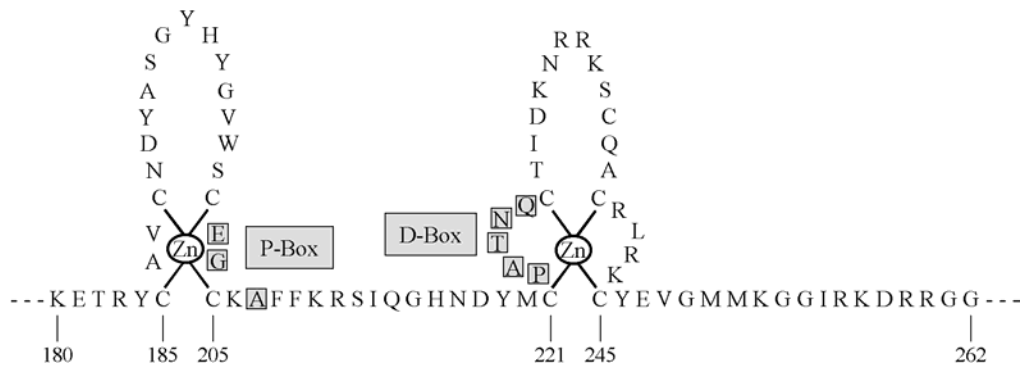


Abbildung 1.1.2 Zinkfinger motive des humanen ER α nach Green und Chambon [27], Fuller [28] und Tsai [16]; Abkürzungen der Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code

Nach Dimerisierung bindet der ER innerhalb der Promotoren von estrogenabhängigen Zielgenen an *Estrogen Response Elements* (EREs). EREs sind Palindrome mit einer Nukleotidsequenz von 5'AGGTCA_nTTGACCT3' [25]. Die spezifische und selektive Erkennung des ERE wird durch die sogenannte P-Box (proximale Box = Glu (E), Gly (G), Ala (A)), hervorgehoben in Abbildung 1.1.2 an der Basis des ersten Zinkfinger motives vermittelt [16, 29]. Mutationsstudien haben gezeigt, dass der Austausch dieser drei Aminosäuren durch Gly, Ser und Val zur Erkennung des GRE (*Glucocorticoid Response Element*) durch diesen ER-Mutanten führt [30, 31]. Der zweite Zinkfinger enthält die sogenannte D-Box (distale Box), eine Aminosäuresequenz, die zwei Cysteinreste miteinander ver-

bindet. Sie vermittelt eine unspezifische DNA-Erkennung und die Rezeptordimerisierung [32].

Der DBD folgt die Domäne D oder auch *hinge*-Domäne (*hinge* (engl.) = Gelenk) genannt. Domäne D ist eine hochvariable Region, die noch nicht sehr weit charakterisiert ist. Durch ihre hohe Beweglichkeit ermöglicht sie Konformationsänderungen, die der Ligandenbindung am ER folgen. Sie stellt eventuell eine Bindungsstelle für Koaktivatoren dar und scheint wichtig für die maximale Bindung von Liganden zu sein [16, 33].

Die angrenzende Domäne E ist die größte Region im ER und verfügt über eine funktionelle Komplexität. In ihr sind Regionen verschiedener Funktionen wie die Ligandenbindungsdomäne (LBD), Teile der Dimerisierungsregion, Bindungsstellen für Hitzeschockproteine (HSP) und Kofaktoren sowie ein ligandenabhängiges *nuclear localisation signal* (NLS) enthalten. [34-37]

Die LBD bestimmt die Ligandenspezifität [38]. Die Homologie zwischen den LBDs von ER α und ER β beträgt ca. 53 % [17]. Dies entspricht ungefähr derjenigen zwischen den LBDs von Glucocorticoidrezeptor und Progesteronrezeptor - zwei SHRs mit unterschiedlichen Liganden.

Die LBD besteht aus 12 α -Helices und zwei kurzen β -Faltblattstrukturen, die eine hydrophobe Tasche ausbilden (siehe Abbildung 1.1.3). Im Falle des ER α wird diese Bindungstasche aus Teilen von Helix 3 (Met³⁴² – Leu³⁵⁴), der Haarnadelschleife S1/ S2 (Leu⁴⁰⁴ - Leu⁴¹⁰), Helix 6 (Trp³⁸³ – Arg³⁹⁴), Helix 8 und der vorangehenden Schleife (Val⁴¹⁸ – Leu⁴²⁸) und Helix 11 (Met⁵¹⁷ – Met⁵²⁸) gebildet [39].

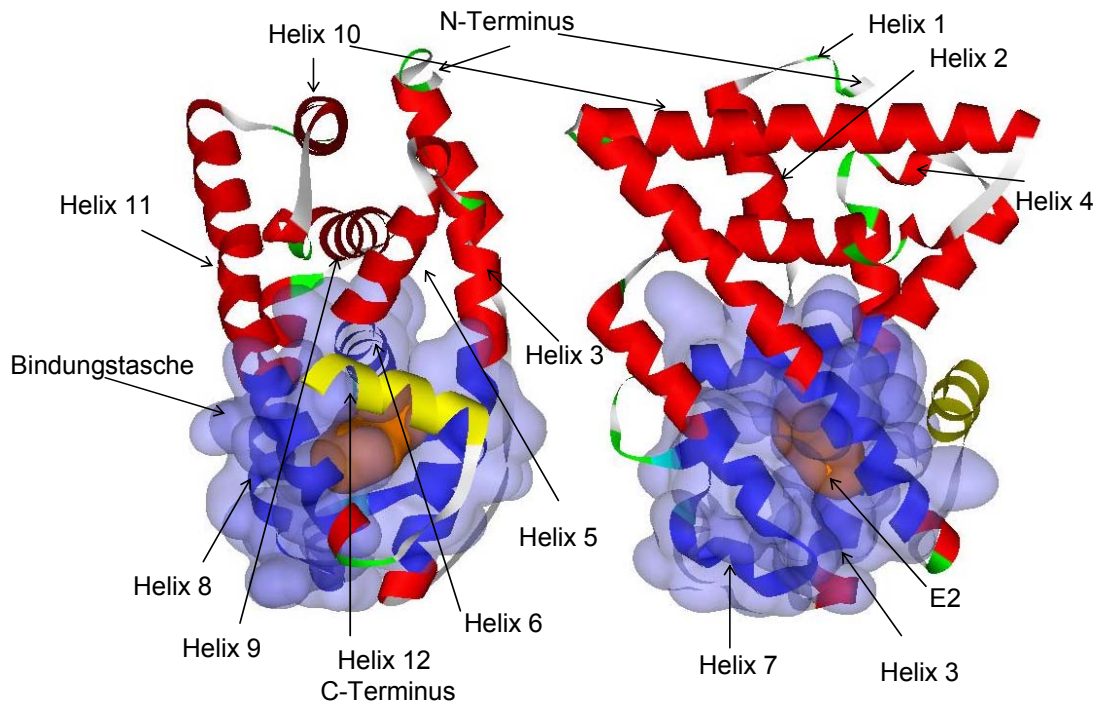


Abbildung 1.1.3 Röntgenkristallstruktur der LBD des ER α /E2-Monomers nach Brzozowski [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 1ERE]; eingefärbt nach Sekundärstruktur, gelb: Helix 12, blau mit Van-der-Waals-Oberfläche: Bindungstasche, orange: E2 mit Van-der-Waals-Oberfläche dargestellt; links Aufsicht auf Helix 12; rechts: um 90 ° nach links gedreht, Aufsicht auf die Dimerisierungsregion

In der LBD liegen neben der ligandenabhängigen Aktivierungsfunktion-2 (AF-2) die autonome AF-2a [40] und eine AF-2b [41]. Sie sind Bindungsstellen für Kofaktoren. AF-2 enthält am C-terminalen Ende eine essentielle und hoch konservierte amphiphile α -Helix - Helix 12 [38].

AF-1 und AF-2 können die Transkription unabhängig von einander aktivieren. Bei ER α wirken sie in der Regel synergistisch [20, 42] und vermitteln die Aktivierung der Genexpression, die nach Bindung des Liganden/ ER-Komplexes an EREs folgt [43].

Am C-Terminus befindet sich schließlich die wenig konservierte Domäne F, für die bis heute noch keine eindeutige Funktion nachgewiesen werden konnte [16]. Sie scheint jedoch die Transaktivierungsstärke von AF-1 und AF-2 zu beeinflussen [44] und hält die optimale Konformation für Protein-Protein-Interaktionen aufrecht [45].

1.1.3 Rezeptortransformation

Ein Modell der Transaktivierung durch den ER ist in Abbildung 1.1.4 dargestellt. In Abwesenheit von Liganden ist der ER im Zellkern lokalisiert. Gebunden an HSP 90 und andere Cochaprone wie p23 und Immunophiline liegt er dort als physiologisch inaktive Form vor. Durch Assoziation an den ligandenungebundenen ER sorgt HSP 90 für die korrekte posttranslationale Faltung und verhindert den Abbau des ER in Proteasomen. HSP 90 stabilisiert den ER und bereitet ihn optimal für eine Ligandenbindung vor. [46]

Liganden des ER durchdringen die Zellmembran durch passive Diffusion und gelangen so ins Zytoplasma der Zelle. Ihr Weg in den Nukleus erfolgt durch passive Diffusion durch einen Kanal bzw. eine Kernpore. Er kann aber auch durch aktiven Transport, der durch das NSL des ER vermittelt wird, erfolgen. Im Nukleus treffen Ligand und ER aufeinander. [47]

Durch die Ligandenbindung kommt es beginnend mit der Abspaltung von HSP 90 zu mehreren aufeinander folgenden wichtigen Veränderungen am ER [48]. Der Phosphorylierungsgrad des ER nach Bindung von ER-Liganden steigt um das 3- bis 4-fache [49]. Damit verbunden ist eine Steigerung der Affinität zu bestimmten DNA-Sequenzen und der Transaktivierungsstärke. [50]

Ligandeninduzierte Konformationsänderungen - vor allem im Bereich der Helix 12 der LBD - sind wichtige Voraussetzungen für eine ER-Aktivierung. E2 und ER-Agonisten induzieren eine Repositionierung von Helix 12, in deren Verlauf die Koaktivatorbindungsstelle AF-2 ausgebildet und exponiert wird [39]. Konformationsänderungen durch Agonisten ermöglichen weiterhin die Dimerisierung des Rezeptors, wobei Homo- oder Heterodimere aus ER α und ER β gebildet werden [22, 51-53]. Die Rezeptordimere binden anschließend mit den Zinkfingern an EREs der Zielgene (vgl. Kapitel 1.1.2 Seite 15 ff.). Verschiedene Liganden des ER induzieren unterschiedliche Konformationsänderungen in der LBD. Die Art der Konformationsänderung bestimmt die Effektivität und Art der nachfolgenden Signaltransduktion (vgl. Kapitel 1.2 Seite 26 ff.).

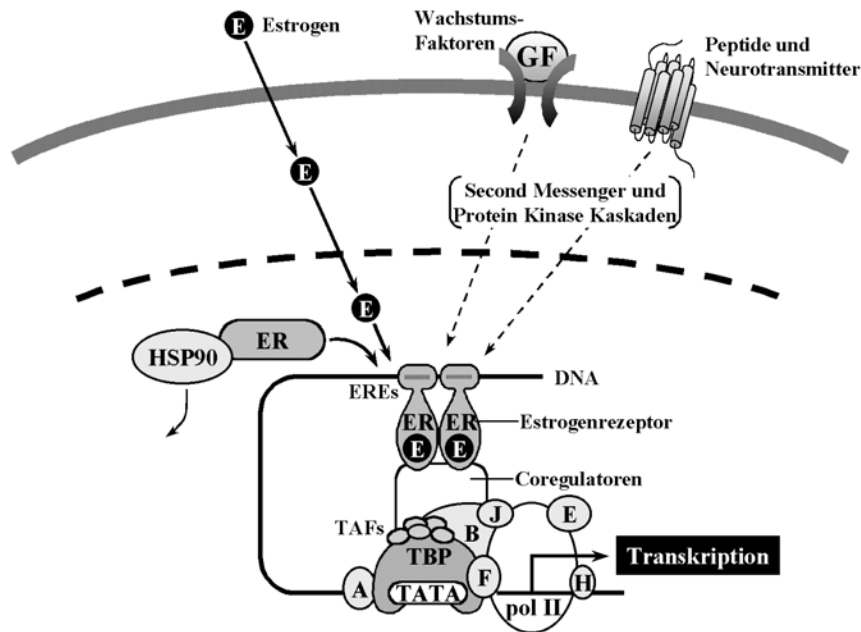


Abbildung 1.1.4 Modell der Transkriptionsaktivierung durch den ER nach Katzenellenbogen [54] und Tsai [16]; TATA: Basensequenz TATAAA innerhalb des Promotors; ERE: *Estrogen Responsive Element*; HSP 90: Hitzeschockprotein 90; TBP: TATA-bindendes Protein; TAF: TBP-assoziierte Faktoren; pol II: RNA-Polymerase II; A/B/E/F/H/J: Transkriptionsfaktoren der RNA Polymerase II

1.1.4 Genaktivierung

Der ER ist ein ligandeninduzierbarer Transkriptionsfaktor. Die Wirkung des ER wird über die Regulierung der Aktivierung von Zielgenen vermittelt. Zentrales Enzym der Transkription ist die RNA-Polymerase II. Im Gegensatz zur DNA-Polymerase benötigt sie zur Ablesung der DNA keinen Primer, ist aber stattdessen auf die Mitwirkung von Proteinfaktoren, sog. Transkriptionsfaktoren angewiesen (siehe Abbildung 1.1.4). Mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren bindet die RNA-Polymerase II in dem Promotor des Zielgens an eine spezifische DNA-Sequenz, die aufgrund ihrer Nukleotidsequenz TATA-Box genannt wird. Sie liegt in der Regel 25 Basenpaare oberhalb des Initiationscodons. Durch Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) in einer bestimmten Reihenfolge wird der minimale Präinitiationskomplex gebildet, der der RNA-Polymerase II die Ablesung der DNA ermöglicht [55, 56]. Zunächst bindet TFIID im Bereich der TATA-Box. TFIID selbst ist ein Komplex aus TBP (TATA-bindendes Protein) und mehr als zehn anderen TBP-assoziierte Faktoren (TAF). Als nächstes bindet oberhalb dieses Abschnittes TFIIA. TFIIIB bindet dann im Bereich des Transkriptionsbeginns. Nach dieser Vorbereitung bindet die RNA-Polymerase II im Bereich von

TFIIB. Die Transkription beginnt, nachdem weitere TFs (TFIIE/F/H/J) einen Komplex mit RNA-Polymerase II und DNA gebildet haben. [57]

In diesem Präinitiationskomplex ist TFIIB ein Verbindungsglied, das Wechselwirkungen mit der DNA ober- und unterhalb der TATA-Box, mit TBP, RNA-Polymerase II, TFIIF und AF-2 des ER eingeht [58]. Konformationsänderungen in TFIIB bewirken ein Auflösen von intramolekularen Interaktionen innerhalb von TFIIB, so dass neue Bindungsstellen zu anderen basalen Faktoren des Präinitiationskomplexes freigelegt werden. [56, 59]

EREs, die Bindungsstellen für den aktivierten ER, sind *Enhancer*-Elemente, die die Initiation der Transkription im Promotor regulieren. Durch sie werden die AF des ER in eine räumliche Nähe zum Transkriptionsapparat gebracht und ihre Einflussnahme auf die Transkription ermöglicht.[37, 60, 61]

1.1.5 Koregulatoren

Koaktivatoren sind Kernfaktoren, die unspezifisch als Transkriptionsmediatoren für verschiedene Kernrezeptoren wirken und dadurch deren Transkriptionsaktivität potenzieren. Es sind Proteine, die sich zu größeren Komplexen zusammenschließen und über enzymatische Aktivitäten verfügen. Sie sind Vermittler zwischen ER und Chromatinkomponenten wie Histonen und/ oder der basalen Transkriptionsmaschinerie. Koaktivatoren werden durch Kernrezeptoren in einer liganden- und AF-2-abhängigen Art und Weise rekrutiert. Die Wechselwirkung erfolgt nur mit einem Agonist/ ER-Komplex über AF-2 und LBD des ER. Die meisten Koaktivatoren binden an der LBD, die damit nicht nur eine wichtige Rolle in der Ligandenbindung sondern auch in der Signaltransformation einnehmen. Weit verbreitet sind AF-2-Kofaktoren (AF-2-bindende Proteine). Sie enthalten eine oder mehrere charakteristische amphiphile α -helikale leucinhaltige Struktur motive, die sog. NR-Box mit der Aminosäuresequenz LXXLL (L = Leu, X = beliebige Aminosäure). Die Koaktivatorbindungsstelle am ER ist in der LBD lokalisiert. Die Kontaktoberfläche in der LBD besteht aus einer zur NR-Box des Koaktivators komplementären 10 Å langen und 6 Å breiten hydrophoben Furche, die durch die Helices 3, 4, 5 und 12 gebildet wird. Diese Tasche befindet sich in AF-2 und ist für ER α und ER β identisch. Die NR-Box des Koaktivators bindet an die Koaktivatorbindungsstelle des ER, wobei alle drei Leucinreste der NR-Box Kontakt zur LBD des ER bekommen. Eine Ladungsklammer, gebil-

det durch einen Glutaminrest in Helix 12 und einem Leucinrest am C-Terminus von Helix 3 stabilisieren die Konformation des Koaktivators. Die Integrität und Zugänglichkeit der Koaktivatorbindungsstelle ist sehr stark abhängig von der Orientierung und Positionierung von Helix 12 im Liganden/ER-Komplex.

Koaktivatoren wirken über das Prinzip der Destabilisierung von Nukleosomen stabilisierend auf die Aktivator-DNA-Bindung. Sie weisen eine Histonacetyltransferase-Aktivität (HAT) auf und katalysieren die Acetylierung von Lysinresten am N-Terminus der Histone 3 und 4 im Chromatin. Dies führt zu einer schwächeren Assoziation der Histone mit der DNA in den Nukleosomen, so dass die Bildung eines stabilen Präinitiationskomplexes gesteigert und die Transkription durch RNA-Polymerase II erleichtert wird. [62, 63]

Korepressoren sind Proteine, die eine Reduktion der Transkriptionsaktivität bewirken.

Eine direkte Wechselwirkung von Korepressoren mit dem ER findet nur mit freiem ER oder im Falle von SHP (*short heterodimerization partner*) mit Antagonisten/ER-Komplexen statt. Der agonistengebundene ER interagiert nicht mit den klassischen Korepressoren. [22]

Korepressoren binden ebenfalls mit einem LXXLL-Motiv an Koaktivatorbindungsstellen des ER. So kann das agonistische Signal von manchen Antagonisten durch Korepressoren unterdrückt werden, oder einem potentiellen Agonisten steht kein bindungsbereiter ER zur Verfügung.[22]

Eine Unterdrückung des Transaktivierungssignals eines aktivierten ER erfolgt nicht über direkten Kontakt des Korepressors mit dem Agonisten/ER-Komplex. Es kommt zur Competition an der DNA, in dem Korepressoren den Zugang für den aktivierten ER zu den EREs unterbinden. Korepressoren können aber auch über Wechselwirkungen mit anderen DNA-Abschnitten das ER-Signal unterdrücken oder die basale Transkriptionsaktivität reduzieren.

Einige Korepressoren bewirken durch ihre intrinsische Histondeacetylaseaktivität – eine der HAT von Koaktivatoren entgegengerichteten Aktivität – eine Chromatinumstrukturierung und damit eine Unterdrückung der Transkription.

1.1.6 Phosphorylierung des ER und *cross-talk* mit Wachstumsfaktoren

Eine Aktivierung des ER ist neben der Bindung eines Agonisten in der LBD und daraus resultierenden Konformationsänderung mit der Phosphorylierung bestimmter Regionen im ER verknüpft. Der Phosphorylierungsgrad nach Bindungen eines Agonisten steigt bis auf das 3- bis 4-fache. An ER α ist dies besser untersucht als an ER β . Die Phosphorylierung beeinflusst u. a. die Ligandenbindung (Tyr⁵⁷³ in ER α) [64-66], die Rezeptordimerisierung (Ser²³⁶ in ER α) [67] und die DNA-Bindungs Kapazität (Ser¹⁶⁷ in ER α) [22, 50]. Eine Phosphorylierung im Bereich der AF-1 von Ser¹¹⁸ in ER α bzw. Ser¹⁰⁶ in ER β führt zur Potenzierung der Koaktivatorwirkung von p68 [68].

Extrazelluläre Signale von Wachstumsfaktoren können über ihre Rezeptoren zur Phosphorylierung des ER und damit zum *cross-talk* zwischen den beiden Signalwegen führen. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren sind membranäre Rezeptoren mit ligandeninduzierbarer Kinaseaktivität (i. d. R. Tyr-Kinasen oder Ser/Thr-Kinasen). Hierzu gehören EGF- und TGF β -Rezeptor, die mit ER α interagieren. Aber auch Interleukin-2 und Dopamin als einziger Neurotransmitter greifen in die ER-Signalkaskade mittels Phosphorylierung ein. [22, 69, 70]

Eine physiologisch wichtige hormonunabhängige Aktivierung des ER bei Brustkrebs kann über den Heregulinrezeptor-2 (HER-2) erfolgen. Bei Expression von HER-2 in der Tumorzelle kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung des ER und schließlich zu hormonunabhängigem Tumorwachstum. Diese ER-vermittelte Prozess spricht nicht auf antiestrogene Therapieschemata an. [22, 71]

1.1.7 Physiologie des Estrogenrezeptors

Die physiologischen Wirkungen des endogenen E2 werden über beide ER-Subtypen vermittelt. ER α und ER β sind im Organismus unterschiedlich verteilt (siehe Abbildung 1.1.5) und vermitteln verschiedene Wirkungen. Ihre Aktivität ist von verschiedenen Faktoren wie Zellkontext, Promotor des Zielgens oder Koaktivatoren abhängig [72]. Daraus ergeben sich unterschiedliche physiologische Bedeutungen beider Subtypen. Teilweise liegen sie in Geweben oder Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen nebeneinander vor und beeinflussen sich gegenseitig.

In vitro Studien an einem Reportergensystem zeigen, dass ER α und ER β gegenläufige Effekte haben. Dabei wirkt ER β als dominanter Repressor auf ER α -induzierte Transaktivierung. Eine Erklärung wird in der Bildung von Heterodimeren gesehen [51, 73-75]. Von Interesse ist die Rolle von ER β cx, einer Splicevariante von ER β mit fehlender LBD und AF-2, die trotz intakter DBD nicht an EREs binden kann. ER β cx bildet bevorzugt Heterodimere mit ER α und wirkt damit als negativer Regulator auf ligandeninduzierte Genaktivierung von ER α [76].

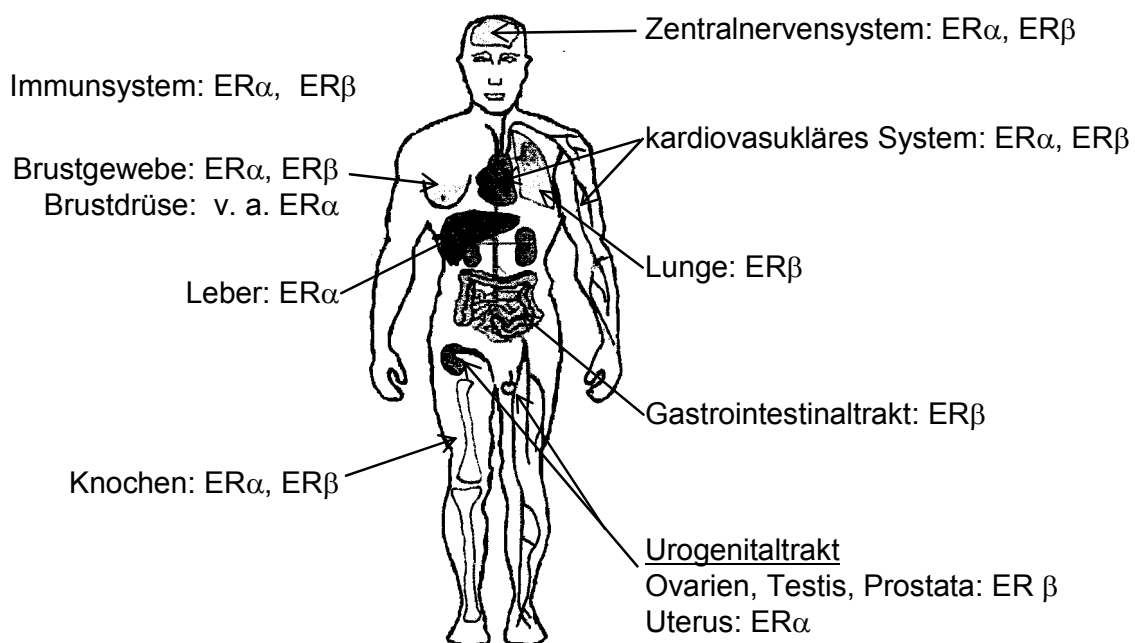


Abbildung 1.1.5 Verteilung von ER α und ER β im menschlichen Organismus nach Gustafsson [77]

ER α wird vor allem in den so genannten Zielgeweben (*target tissues*) – Geweben des Reproduktionssystems wie im Uterus und in den Brustdrüsen – exprimiert. Er reguliert Reproduktionsphysiologie und -verhalten bei Mann und Frau sowohl auf lokaler Ebene, als auch in übergeordneten Hirnregionen [78]. Der Lipidstoffwechsel in der Leber wird überwiegend durch den ER α -Subtyp beeinflusst.

ER β ist in menschlichen Geweben weit verbreitet. Dabei wird angenommen, dass ihm die Hauptrolle vor allem in den Geweben zukommt, die nicht zu den traditionellen Zielgeweben zählen (*non-target tissues*). ER β wird vor allem in

den Ovarien, den Hoden und der Prostata sowie im Gastrointestinaltrakt und den Lungen gebildet [79]. Im ZNS, im kardiovaskulären System, im Knochengewebe, im Immunsystem, im Urogenitaltrakt und auch in der Brust kommen beide ER-Subtypen nebeneinander vor, wobei ER β dominiert [77].

ER β werden protektive Einflüsse zugeschrieben wie sie unter postmenopausaler Hormonersatztherapie beobachtet werden Dazu zählen u. a. die Linderung von Inkontinenz, Steigerung der Knochendichte und damit Reduktion der osteoporosebedingten Frakturen sowie Minderung der Rate der koronaren Herzerkrankungen bei Frauen. [77]

In manchen Geweben wirkt ER β der proliferationsfördernden Wirkung von ER α entgegen. Signifikante Verschiebungen im Verhältnis der beiden Subtypen bzw. eine verstärkte Stimulation von ER α führen zu veränderten Proliferationsmustern dieser Gewebe.

Eine Verschiebung hin zu verstärkter ER α -Stimulation nach *down*-Regulation von ER β , gefolgt von Gewebswachstum, wird bei der Entwicklung von estrogenrezeptorabhängigen Mammakarzinomen [80, 81] sowie bei der uterotrophen Wirkung von E2 nach der Pubertät beobachtet [82, 83]. Auch die Genese von benigner Prostatahyperplasie wird mit dieser Verschiebung in der Aktivität der beiden ER-Subtypen in Zusammenhang gebracht [84].

Die protektive Wirkung von Estrogenen vor manchen Krebsarten wie z.B. Prostata- und Colonkarzinom wird deshalb der Vermittlung über ER β zugeschrieben. Die Proliferationshemmung erfolgt indirekt über eine negative Regulation der ER α -Aktivität.

Weitere protektive Effekte entwickelt ER β durch seine Mitwirkung an der Genexpression von antioxidativ wirksamen Enzymen [85, 86].

Durch die Nachbarschaft der Gene für ER β und einem Gen, das für das frühe Einsetzen der Alzheimer Erkrankung verantwortlich gemacht wird, verspricht man sich eine Möglichkeit der Einflussnahme auf das Erkrankungsrisiko. Unter Hormonersatztherapie wurde eine Reduktion des Erkrankungsrisikos beobachtet [87].

Seit der Entdeckung des zweiten und wohl auch physiologisch bedeutenderen ER β ist die Komplexität estrogener Wirkungen im menschlichen Organismus offensichtlicher. Die Entwicklung neuer selektiver (Anti-)Estrogene verspricht

neue Ansätze in der Therapie bzw. Prophylaxe beispielsweise kardiovaskulärer Erkrankungen, der Alzheimererkrankung, von Prostatakrebs, Colonkarzinom und Mammakarzinom.

1.2 Liganden des Estrogenrezeptors

Durch intensive Forschung am ER sind verschiedene natürliche und synthetische Verbindungen mit endokrinem Wirkprofil und unterschiedlicher Affinität zum ER bekannt. Von zentralem Interesse ist die Ableitung von Strukturvoraussetzungen zur Entwicklung ER-subtypeselektiver Wirkstoffe zur gezielten Einflussnahme und Minderung der Nebenwirkungen.

Verschiedene Liganden konnten, gebunden in der LBD, mit dem ER kristallisiert werden. Mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse dieser Kristalle wurden Einblicke in den Wirkmechanismus der Substanzen gewonnen. Es konnten Konformation, Wechselwirkungen und Bindungsmodi innerhalb der Liganden/ER-Komplexe aufgeklärt werden.

1.2.1 Physiologischer Ligand

Der natürliche Ligand 17β -Estradiol (E2) (siehe Abbildung 1.2.1) ist ein Steroid und weist zu beiden ER-Subtypen ungefähr die gleiche Bindungsaffinität auf [88].

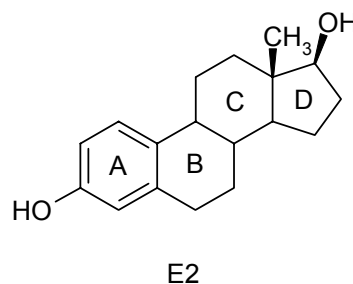


Abbildung 1.2.1 Struktur des physiologischen ER-Liganden E2

1997 konnte mit der Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse die Wechselwirkung zwischen dem natürlichen Agonisten E2 und der LBD von ER α geklärt werden (siehe Abbildung 1.2.2). Nach der Bindung von E2 in der hydrophoben Bindungstasche kommt es zu Konformationsänderungen. Helix 12 (Leu⁵³⁹ – His⁵⁴⁷) legt sich mit ihrer hydrophoben Oberfläche über die Bindungstasche und schließt den Agonisten in der Kavität ein. Dabei tritt sie selbst nicht mit dem Li-

ganden in Kontakt. Durch diese Konformationsänderung von Helix 12 wird die AF-2 aus Teilen der Helices 3, 5, 6, 11 und 12 vollständig formiert und durch Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Glu⁵⁴² und Lys³⁶² stabilisiert. An dieser Konformation des ER können Koaktivatoren mit ihrer NR-Box spezifisch an die exponierte AF-2 binden (vgl. Kapitel 1.1.5 Seite 21 ff). Die exakte Positionierung von Helix 12 ist Voraussetzung für die Vermittlung einer agonistischen Wirkung am ER [39].

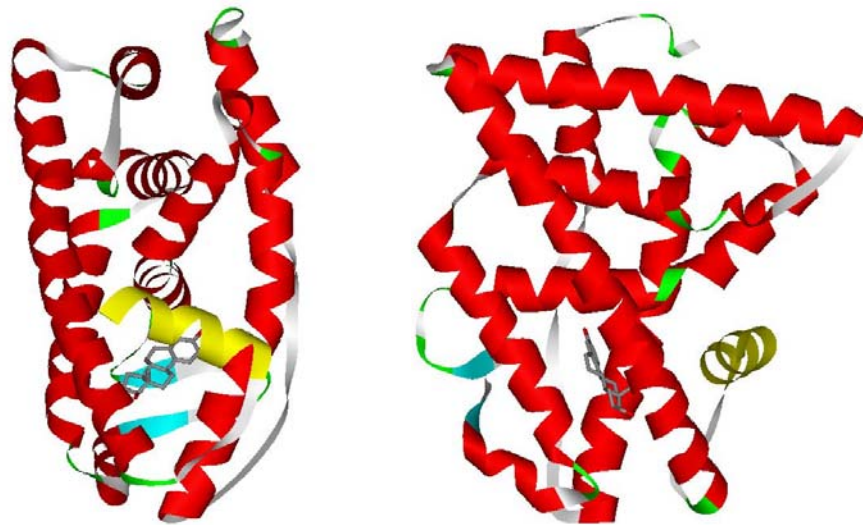


Abbildung 1.2.2 Wechselwirkungen von E2 in der LBD des ER α nach Brzozowski [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 1ERE]; Röntgenkristallstruktur der LBD eines Monomers, eingefärbt nach Sekundärstruktur, gelb: Helix 12; links: Aufsicht auf Helix 12; rechts: um 90° nach links gedreht, Aufsicht auf die Dimerisierungsregion

Die Interaktionen von E2 in der LBD des ER α erfolgen sowohl durch Wasserstoffbrückenbindungen als auch durch hydrophobe Kontakte (siehe Abbildung 1.2.3). Die phenolische Hydroxygruppe in Position 3 des E2 geht Wasserstoffbrückenbindungen mit der γ -Carboxylgruppe von Glu³⁵³, dem Guanidiniumrest von Arg³⁹⁴ und einem Wassermolekül ein. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird zwischen der Hydroxygruppe in 17 β -Position des E2 und dem N-3 des Imidazolrings des His⁵²⁴ ausgebildet. Hydrophobe Van-der-Waals-Kontakte erfolgen hauptsächlich zwischen A- und B-Ring des E2 und der hydrophoben Seitenketten von Ala³⁵⁰ und Leu³⁸⁷ auf der β -Seite und Phe⁴⁰⁴ und Leu³⁹¹ auf der α -Seite des Moleküls. Am distalen Ende der Bindungstasche erfolgen sie zwischen dem D-Ring, Ile⁴²⁴, Gly⁵²¹ und Leu⁵²⁵ [39].

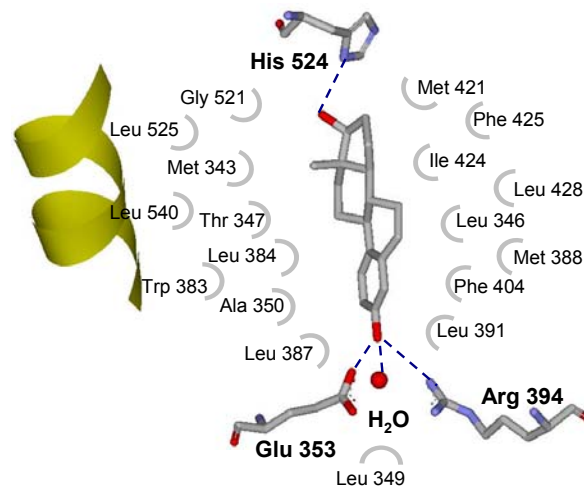


Abbildung 1.2.3 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von E2 in der LBD des ER α sowie Position von Helix 12 (gelb) nach Brzozowski [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 1ERE]

Aus den Untersuchungen mit E2 wurde geschlossen, dass Agonisten zu E2 analoge Wechselwirkungen mit dem ER eingehen können müssen, um eine identische Ausrichtung der Helix 12 zu ermöglichen. Dazu müssen sie eine vergleichbare planare Molekülstruktur besitzen. Zur Ausbildung der wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu³⁵³, Arg³⁹⁴ und einem Wassermolekül sowie zu His⁵²⁴ müssen die Verbindungen zwei Hydroxygruppen in einem Abstand von 10.9 Å (O-O-Abstand von E2) enthalten.

1.2.2 Nicht-steroidale Agonisten

1938 wurden die ersten nicht steroidal synthetischen Estrogene *E*-Diethylstilbestrol (DES) und *meso*-Hexestrol (HEX) entwickelt (siehe Abbildung 1.2.4).

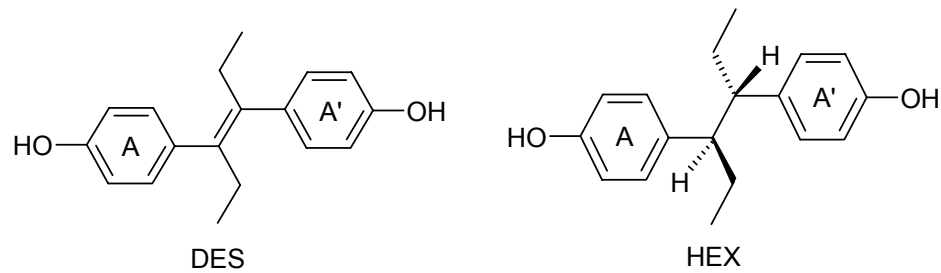


Abbildung 1.2.4 Strukturen nicht steroidaler Estrogene

Der Bindungsmodus des Stilbenderivats DES mit $ER\alpha$ konnte 1998 mittels Röntgenkristallstruktur aufgeklärt werden (siehe Abbildung 1.2.5). Danach bindet DES analog zu E2 in der LBD des $ER\alpha$ und vermag Konformationsänderungen der LBD analog zu E2 zu induzieren. Helix 12 legt sich dabei über die Bindungstasche und schließt den Liganden darin ein.

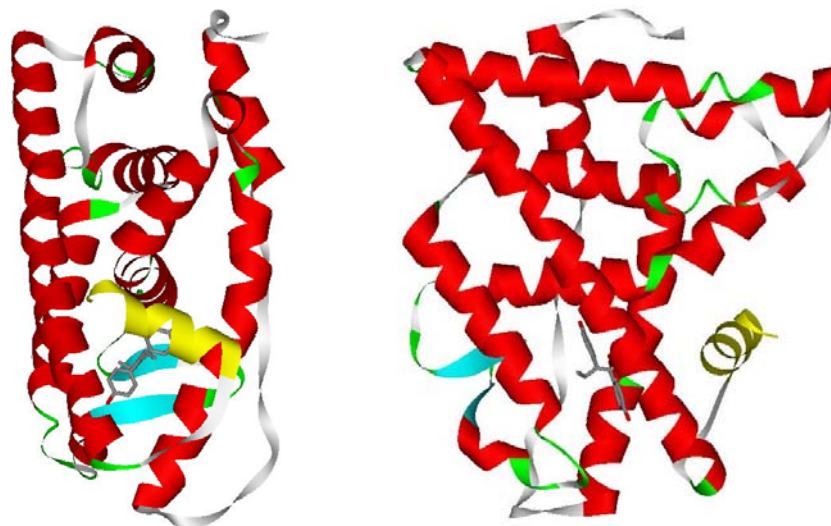


Abbildung 1.2.5 Wechselwirkungen von DES mit der LBD des $ER\alpha$ nach Shiau [89] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 3ERD]; Röntgenkristallstruktur eines Monomers, eingefärbt nach Sekundärstruktur, gelb: Helix 12; links: Aufsicht auf Helix 12; rechts: um 90 ° nach links gedreht, Aufsicht auf die Dimerisierungsregion

Es kommt zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einer der phenolischen Hydroxygruppen und Glu^{353} , Arg^{394} und einem Wassermolekül. Obwohl der O-O-Abstand zwischen den beiden Hydroxygruppen in DES 12.1 Å beträgt und damit um 1.2 Å größer ist als die entsprechende Distanz in E2, wird auch die zweite Wasserstoffbrückenbindung zu His^{524} ausgebildet (siehe Abbildung 1.2.6). Die Position der Hydroxygruppe, die der 17 β -Hydroxy-

gruppe des E2 entspricht, ist dadurch aber um 1.7 Å verschoben. Unter Beteiligung der beiden Ethylseitenketten geht DES mehr hydrophobe Kontakte mit der LBD ein als E2. Die Ethylseitenketten ragen dabei in hydrophobe Seitentaschen, die von E2 unbesetzt bleiben, und gehen Wechselwirkungen mit Ala³⁵⁰, Leu³⁸⁴, Phe⁴⁰⁴ und Leu⁴²⁸ ein [89].

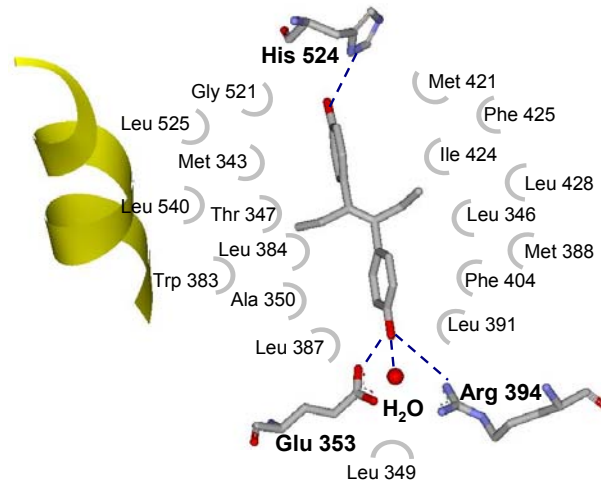


Abbildung 1.2.6 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von DES in der LBD des ER α sowie Position von Helix 12 (gelb) nach Shiau [89] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 3ERD]

1.2.3 Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM)

Ein interessantes Wirkprofil weisen selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM) wie Raloxifen (RAL) und Tamoxifen (TAM) sowie sein aktiver Metabolit 4-Hydroxytamoxifen (OHT) auf (siehe Abbildung 1.2.7). Ihre Wirkung ist je nach Gewebe, in dem sie wirken, agonistischer oder antagonistischer Natur. Sie werden zur Osteoporoseprophylaxe oder zur Therapie bzw. Prophylaxe von Brustkrebs eingesetzt. Auf Knochen, Fettstoffwechsel und Endometrium üben sie agonistische Effekte aus, in Brustgewebe wirken sie antagonistisch. [90, 91]

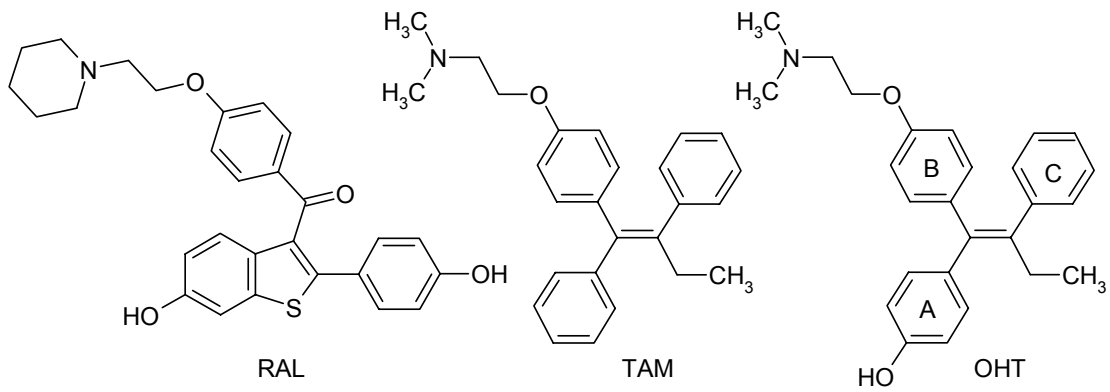


Abbildung 1.2.7 Strukturen verschiedener SERM

SERM sind nicht steroidale Verbindungen, die als gemeinsames Strukturelement eine basische Seitenkette enthalten. Durch die basische Seitenkette weisen sie ein größeres Van-der-Waals-Volumen als die ER-Agonisten E2 und DES auf. Trotzdem können sie an den ER binden, da von E2 (245 \AA^3) nur ca. die Hälfte des Volumens der LBD (450 \AA^3) beansprucht wird. [39]

Von RAL und OHT, jeweils mit der LBD von $\text{ER}\alpha$ kokristallisiert, konnte die Röntgenkristallstruktur und somit ihre Interaktionen mit dem ER aufgeklärt werden (siehe Abbildung 1.2.8).



Abbildung 1.2.8 Wechselwirkungen von SERM mit der LBD des ER α ; oben: von RAL nach Brozowski [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer 1ERR]; unten: von OHT nach Shiao [89] [Brookhaven PDB-ID-Nummer 3ERT]; Röntgenkristallstruktur eines Monomers, eingefärbt nach Sekundärstruktur, gelb: Helix 12; links: Aufsicht auf Helix 12; rechts: um 90° nach links gedreht, Aufsicht auf die Dimerisierungsregion

Die schematischen Wechselwirkungen sind in Abbildung 1.2.9 und dargestellt. Beide Moleküle werden wie E2 und DES durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Glu³⁵³, Arg³⁹⁴ und einem Wassermolekül in der LBD gebunden. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu His⁵²⁴ ist nur bei RAL möglich, da bei OHT im C-Ring keine Hydroxygruppe für eine solche Wechselwirkung zur Verfügung steht (vgl. Abbildung 1.2.7). Die basischen Seitenketten von RAL und OHT ragen zwischen Helix 3 und 11 in den β -Kanal, einen Bereich der LBD, der von E2 ungenutzt bleibt. Dort werden weitere Van-der-Waals-Kontakte ausgebildet.

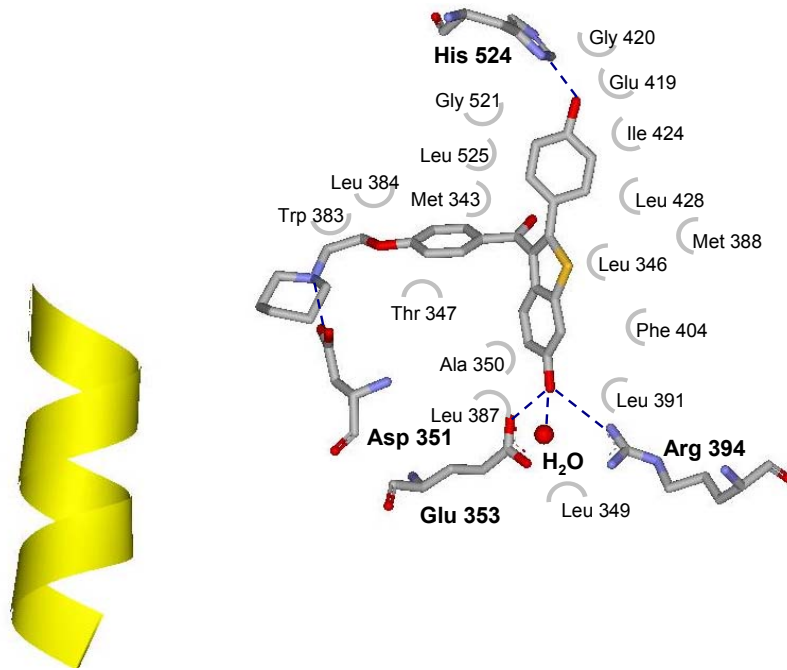


Abbildung 1.2.9 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von RAL in der LBD des ER α sowie Position von Helix 12 (gelb) nach Brozowski [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer 1ERR]

Für die antagonistische Wirkung der SERM ist die basische Seitenkette von großer Bedeutung. Durch ihr Volumen wird Helix 12 in eine andere Position als im dem E2/ER-Komplex gedrängt, und es kann keine funktionsfähige AF-2 ausgebildet werden. SERM gelten daher auch als AF-2-Antagonisten. Die Beeinflussung von AF-2 erfolgt auf zwei Weisen. Durch die nicht optimale Positionierung von Helix 12 kann AF-2 nicht vollständig ausgebildet werden. Zusätzlich besetzt Helix 12 mit den Resten Leu⁵⁴⁰ – Leu⁵⁴⁴, die einer NR-Box ähneln (LLEML statt LLXXLL), die Koaktivatorbindungsstelle, ohne selbst aktivierend zu wirken [89].

Ein wichtiger Kontaktpunkt für die SERM stellt die β -Carboxylatgruppe der Aminosäure Asp³⁵¹ in einer Seitentasche der LBD des ER α dar. Durch die Umorientierung von Helix 12 wird Asp³⁵¹ für die basischen Zentren der Seitenketten zugänglich. Es kommt zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum Piperidinstickstoff von RAL, während bei OHT eine Salzbrücke zur Dimethylaminogruppe ausgebildet wird [39, 89, 92]. Dieser Ankerpunkt für die basischen Seitenketten der SERM ist auch für die agonistische Wirkung von OHT verantwortlich. An ER-Mutanten, bei denen die anionische Aminosäure Asp³⁵¹ gegen

die neutrale Aminosäure Gly³⁵¹ ausgetauscht wurde, zeigt OHT nur noch antagonistische Eigenschaften. Durch diese Punktmutation verliert OHT seine agonistische Wirkkomponente. Die partialagonistische Wirkung der SERM hängt von ihrer Fähigkeit ab, mit ihrem basischen Zentrum die Ladung an Asp³⁵¹ abzuschirmen. Je stärker diese ausgeprägt ist, desto weniger agonistische Wirkkomponenten weist das SERM auf. Da AF-2 wegen unvollständiger Ausbildung im OHT/ ER-Komplex nicht für die agonistische Wirkung verantwortlich sein kann, wurde eine weitere Aktivierungsfunktion (AF-2b) vorgeschlagen, die den Agonismus von OHT vermittelt [92].

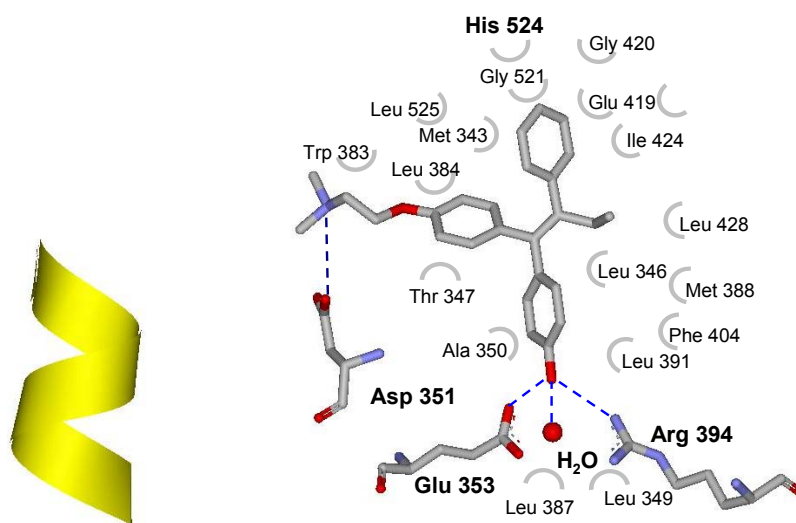


Abbildung 1.2.10 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von OHT in der LBD des ER α sowie Position von Helix 12 (gelb) Shiau [89]; [Brookhaven PDB ID-Nummer: 1ERR]

1.2.4 Antagonisten

Verbindungen mit reinem antagonistischen Wirkprofil sind E2-Derivate, die sich durch eine äußerst lange lipophile Seitenkette an 7 α - oder 11 β -Position auszeichnen. Dazu gehören Fulvestrant (FUL), ICI 164 384 und RU 58 668 (siehe Abbildung 1.2.11).

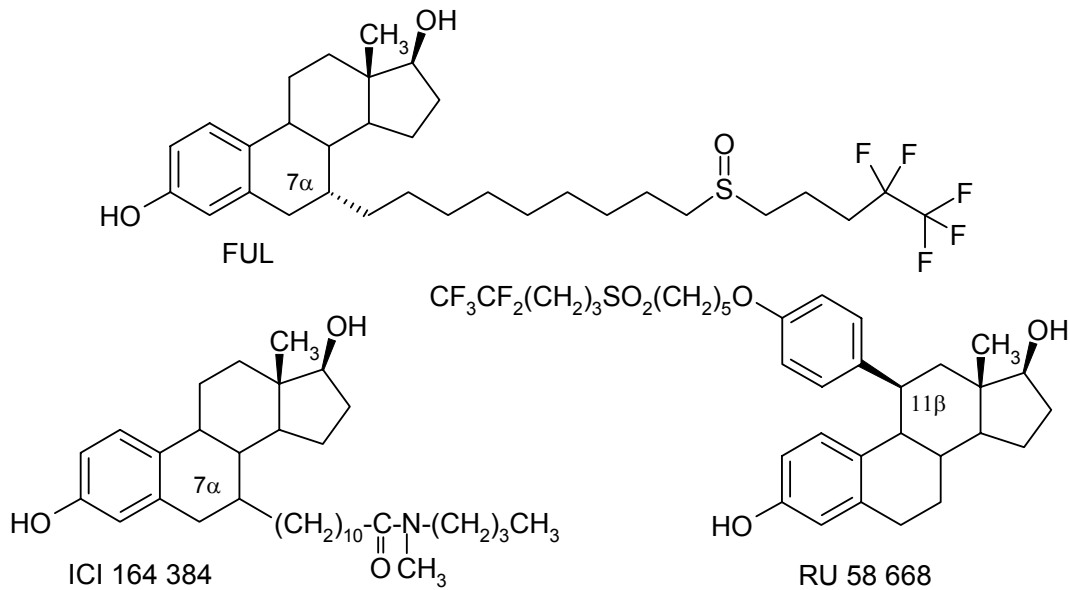


Abbildung 1.2.11 Strukturen verschiedener Antagonisten am ER

Proteolyse- und Peptidbindungsstudien deuten daraufhin, dass ICI 164 384 eine zu SERM unterschiedliche Rezeptorkonformation generiert. ICI 164 384 beeinflusst außerdem die Rezeptordimerisierung, das nucleozytoplasmatische *Shutteling* und den zellulären Umsatz des ER. [93-95]

2001 wurde ICI 164 384 mit der LBD des Ratten-ER β kokristallisiert und die Röntgenkristallstruktur aufgeklärt (siehe Abbildung 1.2.13). Demnach ist das Estradiolgerüst von ICI 164 384 analog zu E2 in der LBD gebunden. Der Antagonist liegt, verglichen mit E2, in einer um die Längsachse um 180° gedrehten Orientierung in der LBD (siehe Abbildung 1.2.12). [96]

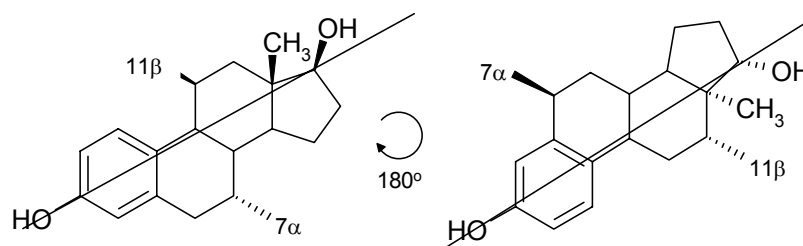


Abbildung 1.2.12 Mögliche Orientierung 7 α - und 11 β -substituierter E2-Derivate

Die charakteristischen Wasserstoffbrückenbindungen^b zwischen Glu²⁶⁰ (Glu³⁵³), Arg³⁰¹ (Arg³⁹⁴), einem Wassermolekül und der phenolischen Hydroxygruppe des Steroids sowie diejenige zwischen der 17 β -Hydroxygruppe und His⁴³⁰ (His⁵²⁴) bleiben durch die Drehung unbeeinflusst (siehe Abbildung 1.2.14).

Der Substituent in 7 α -Position ragt sehr weit aus der Bindungstasche heraus, und es kommt zur sterischen Hinderung der Positionierung von Helix 12 über der Bindungstasche. Ihre Position ist in der Kristallstruktur nicht zu erkennen. Helix 12 wird vollständig destabilisiert. Die Amidstruktur des Moleküls bindet selbst an einer Vertiefung in der Koaktivatorbindungsstelle von AF-2. Im Gegensatz zu den AF-2-Antagonisten werden die reinen Antagonisten als AF-1-Antagonisten bezeichnet. Die Konformation des ER nach Bindung von ICI 164 384 ist derart instabil, dass es zum beschleunigten Abbau des ER kommt [96].

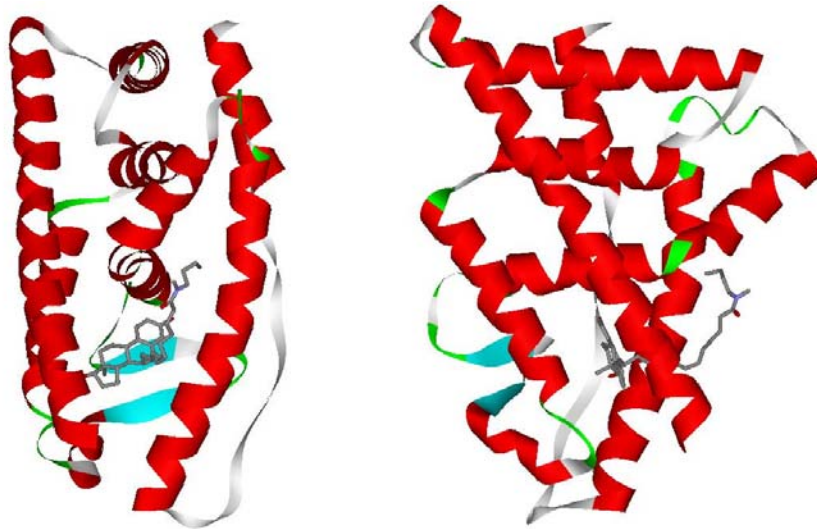


Abbildung 1.2.13 Wechselwirkungen von ICI 164 384 mit der LBD des Ratten-ER β nach Pike [96] [Brookhaven PDB ID-Nummer 1HJ1] Röntgenkristallstruktur eines Monomers, eingefärbt nach Sekundärstruktur; links: theoretische Aufsicht auf Helix 12; rechts: um 90 ° nach links gedreht, Aufsicht auf die Dimerisierungsregion

^b Die Angaben in Klammer beziehen sich auf die analogen Kontaktpunkte im humanen ER α .

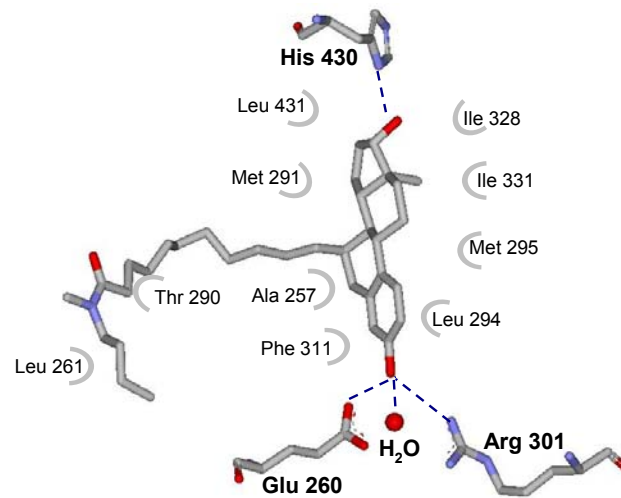


Abbildung 1.2.14 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von ICI 164 384 in der LBD des Ratten-ER β nach Pike [96] [Brookhaven PDB ID-Nummer 1HJ1]

1.2.5 Verbindungen mit selektiver Wirkung an ER α bzw. ER β

Die Homologie in der LDB zwischen den ER-Subtypen beträgt zwar ca. 53 %, doch haben wie der physiologische Ligand E2 viele synthetische und natürliche am ER wirksame Verbindungen ähnliche Bindungsaffinitäten zu ER α und ER β [8, 88, 97]. Dies ergibt sich aus der nahezu identischen Tertiärstruktur der Bindungstasche. Durch die hohe Homologie in der Bindungstasche ergeben sich für E2 und potentielle ER-Liganden in ER β ähnliche Kontaktpunkte wie in ER α . Die Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen über Glu³⁰⁵, Arg³⁴⁶ und einem Wassermolekül sowie über His⁴⁷⁵ [98].

Der Hauptunterschied der Bindungstaschen von ER α und ER β ergibt sich lediglich aus dem Austausch von je einer Aminosäuren auf der β -Seite in Helix 6, Leu³⁸⁴ in ER α ist durch Met³³⁶ in ER β ersetzt, und der α -Seite in Helix 8, Met⁴²¹ in ER α ist durch Ile³⁷³ in ER β ersetzt (siehe Abbildung 1.2.15). Er manifestiert sich in dem etwas kleineren Volumen der Bindungstasche des ER β [98]. Dies erklärt die Schwierigkeiten, subtypelektive ER-Liganden zu entwickeln.

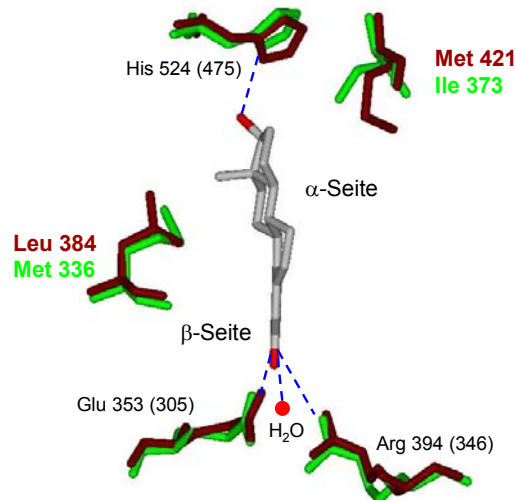


Abbildung 1.2.15 Superpositionierung der schematischen Darstellung der Wechselwirkungen von E2 in der LBD des ER α (braun) nach Brzozowski [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 1ERE] und des ER β (grün bzw. Angaben in Klammern) nach Pike [98] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 1QKM]

1999 stellte sich mit dem Pyrazolderivat **1** die Strukturklasse der Triarylpyrazole als ER-Liganden mit einer Präferenz für ER α heraus (siehe Abbildung 1.2.15). Pyrazolderivat **1** besitzt eine zehnmal höhere Bindungsaffinität und 120-fache Transkriptionsaktivität an ER α als an ER β [99]. Der erste ER α -selektiven Ligand PPT aus dieser Strukturklasse zeigt eine 410-fach höhere Bindungsaffinität zu ER α als zu ER β und führt ausschließlich über ER α zu einer Transaktivierung [100]. Eine ER α -Selektivität ist auch bei dem Triarylfuranderivat **2** zu beobachten (siehe Abbildung 1.2.16), dessen Bindungsaffinität an ER α 50-mal höher ist als an ER β . Eine Transkriptionsaktivierung zeigt es ausschließlich am ER α -Subtyp [101].

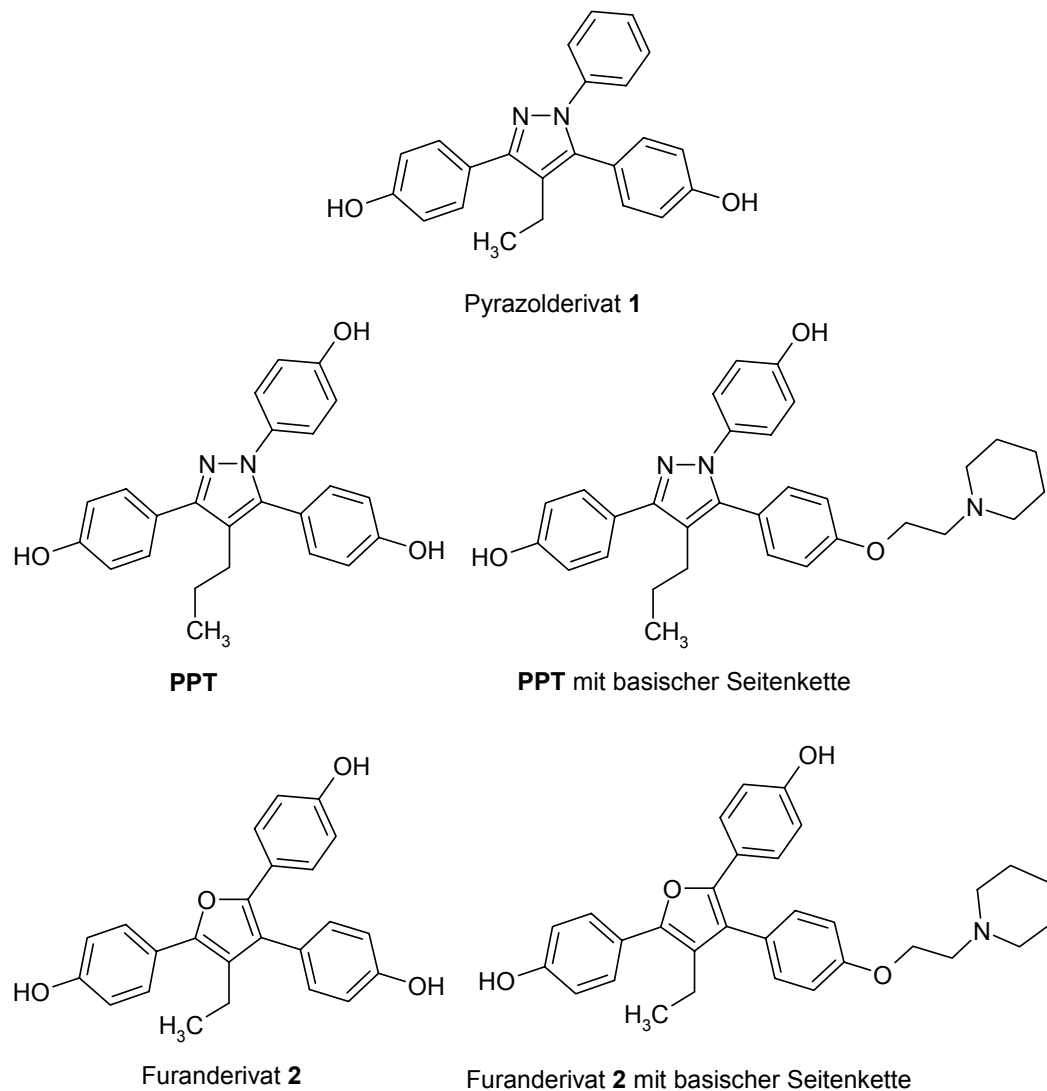


Abbildung 1.2.16 Strukturen verschiedener ER α -selektiver Verbindungen

Mit Einführung einer basischen Seitenkette - analog zu derjenigen in RAL (siehe Abbildung 1.2.16) - konnten die ER α -selektiven Agonisten unter Beibehaltung der Selektivität in Antagonisten ohne agonistische Wirkkomponente überführt werden. Beide Verbindungen zeigen an ER α eine ca. zehnmal stärkere antagonistische Wirksamkeit als an ER β [101-103].

Einige Naturstoffe zeigen eine bis zu 20-fach höhere Bindungsaffinität zu ER β im Vergleich zu ER α . In Transaktivierungsassays fand sich diese Präferenz nicht immer. Hierzu gehören z.B. die Phytoestrogene Genistein (GEN) und Coumestrol (siehe Abbildung 1.2.17) [104]. Die erste ER β -selektive Verbindung mit 4-fach höherer Bindungsaffinität zu ER β wurde 1999 mit einem (*R,R*)-Tetra-

hydrochrysenderivat (THC) (siehe Abbildung 1.2.17) beschrieben. Dabei ist interessant, dass THC an den ER-Subtypen ein unterschiedliches Wirkprofil zeigt. An ER α ist es ein reiner Agonist, an ER β wirkt es dagegen als Antagonist [99]. THC nimmt in ER β im Vergleich zu einem Agonisten eine um 5 Å verscho-bene Position ein, wodurch Helix 12 nicht die agonistgebundene Konformation über der Bindungstasche einnehmen kann. Durch das Fehlen einer voluminö-sen Seitenkette, kann der Antagonismus von THC nicht durch Umorientierung oder Destabilisierung von Helix 12, wie bei den SERM oder Antagonisten be-schrieben, hervorgerufen werden. Man spricht hier von einem „passiven“ Anta-gonismus, bei dem es zu einer Stabilisierung einer nicht produktiven Konfor-mation von Schlüsselaminosäuren in der LBD des ER β kommt [105].

Neben den natürlichen Verbindungen sind auch synthetische Verbindungen wie das 2001 beschriebene Diarylpropionitril (DPN, siehe Abbildung 1.2.17) mit einer 70-fachen Selektivität für ER β bekannt [106]. Mutationsexperimente, Untersuchungen mit ER-Chimären und *Molecular Modelling* Methoden haben gezeigt, dass die Subtypdiskriminierung von (S)-konfiguriertem DNP auf wenigen Unterschieden in einzelnen Aminosäuren beruht. Im dem Austausch von Leu³⁸⁴ in ER α zu Met³³⁶ in ER β in Helix 5 auf der β -Seite der LBD ist die Hauptursache für die ER β -Selektivität begründet. Zusätzlich wird die Selektivität durch Aminosäuren moduliert, die keinen direkten Kontakt mit dem Liganden in der Bindungstasche haben, sondern die Position von mit dem Liganden inter-agierenden Aminosäuren (konserviertes Thr²⁹⁹) beeinflussen. In ER β positionie-ren Met²⁹⁶, Ser²⁹⁷ und Lys³⁰⁰ Thr²⁹⁹ näher zur Nitrilgruppe des (S)-DPN als Gly³⁴⁴, Leu³⁴⁵ und Asn³⁴⁸ Thr³⁴⁷ in ER α . Es wird davon ausgegangen, dass das entsprechende (R)-DNP eine Selektivität zu ER α hat. Seine Bindungsaffinität zu ER α ist insgesamt aber schwächer ausgeprägt als die von (S)-DNP zu ER β , so dass sich für das Racemat eine ER β -Selektivität ergibt. Eine Enantiomerentrennung und separate Testung ist nicht erfolgt [107].

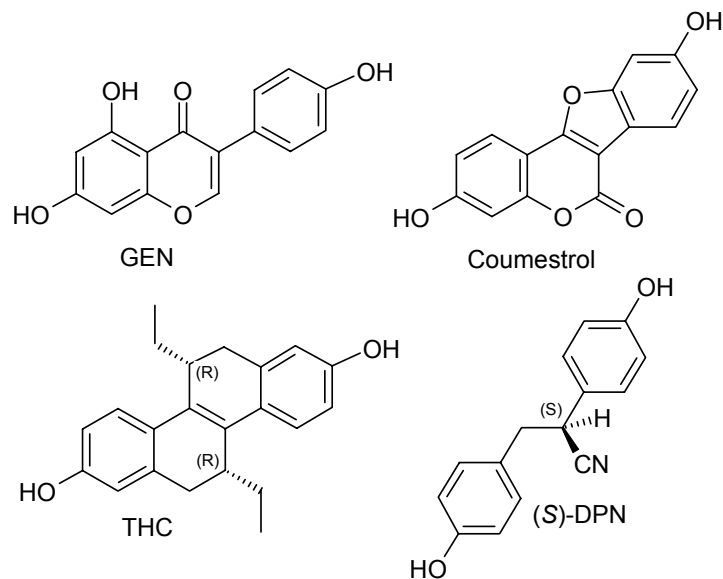


Abbildung 1.2.17 Strukturen verschiedener ERβ-selektiver Verbindungen

1.3 Vom Konzept des estrogenrezeptorvermittelten *drug-targeting* zu neuen Estrogenen

1.3.1 Estrogenrezeptorvermitteltes *drug-targeting*

Cisplatin (*cis*-Diammindichloroplatin(II)) (siehe Abbildung 1.3.1) ist ein in der Tumorthherapie etabliertes Chemotherapeutikum. Die geringe Ansprechrate von Prostata- und Mammakarzinom auf Cisplatin sowie dessen drastische Nebenwirkungen veranlassten die Arbeitsgruppen um Schönenberger und Gust in ihrem Konzept des ER-vermittelten *drug-targetings*, zytotoxische Platinkomponenten mit ER-affinen Strukturen zu kombinieren. So sollten Platinkomplexe mit auf ER-haltige Tumore erweitertem Wirkspektrum und geringerem Nebenwirkungspotential entwickelt werden [108]. In den neuen Platinkomplexen (**drug**) ist die zytotoxische PtCl₂-Einheit mit einem ER-affinen Neutralliganden vereint (siehe Abbildung 1.3.1). Die Zielstruktur (**target**) der Platinkomplexe ist die DNA, an der es zu *intrastranded crosslinking* kommt. Vermittelt durch die ER-Affinität des Neutralliganden sollte der ER für den Transport der neuen Platinkomplexe in den Nukleus zur DNA genutzt werden (**ER-vermittelt**).

Als Leitsubstanz für den Neutralliganden dient HEX, das analog zu DES und E2 an den ER binden kann [109]. Die Amminliganden des Cisplatins werden formal durch den Austausch gegen die Ethylgruppen des HEX an den 1,2-Diarylethan-

Pharmakophor gekoppelt. Als Neutralligand stehen somit 1,2-Diamino-1,2-diarylethane für die Koordination an Platin zur Verfügung (siehe Abbildung 1.3.1).

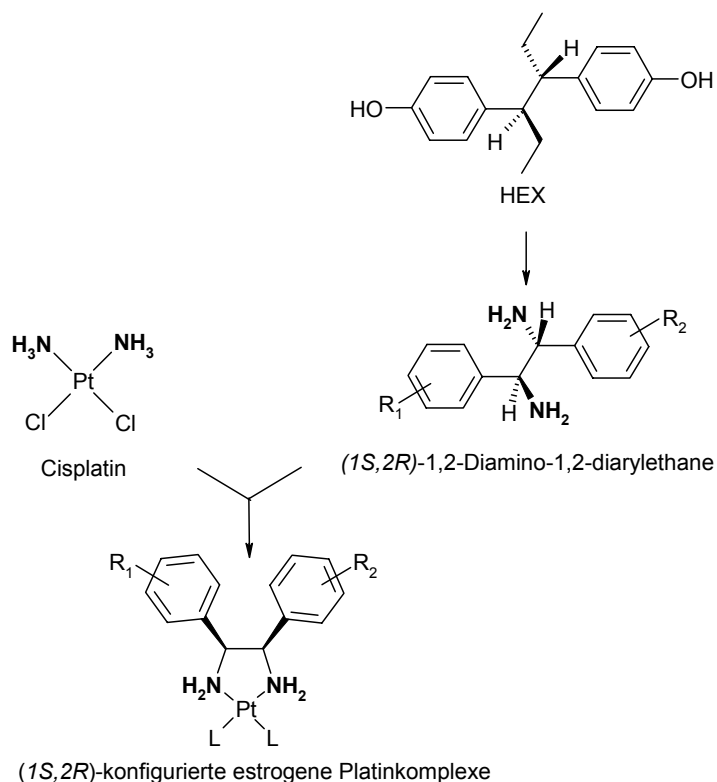


Abbildung 1.3.1 Estrogenrezeptorvermitteltes *drug-targeting* am Beispiel des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors mit (1S,2R)-Konfiguration; L = Cl oder I

Die Bindungstasche des ER hat einen ausgeprägt hydrophoben Charakter, so dass Van-der-Waals-Wechselwirkungen eine große Bedeutung bei der Ligandenbindung zukommen (vgl. Kapitel 1.1.2 Seite 15 ff.). Mit der Einführung der zwei Aminofunktionen in HEX ist eine Steigerung der hydrophilen Moleküleigenschaften und infolgedessen der Verlust der ER-Affinität von (1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethan verbunden [108, 110].

Zur Erhöhung der Lipophilie und Wiedererlangung der ER-Affinität können verschiedene Strategien zur Abschirmung der hydrophilen Eigenschaften der Aminogruppen verfolgt und kombiniert werden. Durch Einführung von Halogenatomen in die Arylringe kann die Affinität zum ER wieder erhöht werden, dabei haben sich die Positionen 2 und 6 als ideal herausgestellt. Lipophileres Chlor ist Fluor dabei überlegen. Eine dreifache Chlorierung über einen 2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl- und einen 2-Chlor-4-hydroxyphenyl-Substituenten erwies sich als optimal in Bezug auf die ER-Affinität. [111-114]

Eine weitere Erhöhung der Lipophilie und damit verbundenen Steigerung der ER-Affinität von 1,2-Diamino-1,2-diarylethanen wird durch Ethylierung einer oder beider Aminogruppen erzielt [115].

1.3.2 Konformation der 1,2-Diarylethaneinheit im freien Neutralliganden und Pt-Komplex

1,2-Diamino-1,2-diarylethane enthalten zwei asymmetrisch substituierte Kohlenstoffatome in der Ethanbrücke, so dass $(1R,2S)/(1S,2R)$ - und $(1R,2R)/(1S,2S)$ -konfigurierte Diastereomere möglich sind. Durch freie Rotationsmöglichkeit um die C-C-Bindung der Ethanbrücke, können sie, bezogen auf die Aromaten, in antiperiplanarer oder zwei synklinalen Konformationen vorliegen (siehe Abbildung 1.3.2 und Abbildung 1.3.3 Seite 44). In Lösung wird je nach Konfiguration eine der Konformationen bevorzugt (umrahmte Konformation in den Abbildungen). Die Ausbildung des Chelatrings kann nur aus einer synklinalen Anordnung der Aminogruppen erfolgen, so dass es bei $(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierten Neutralliganden zu einer Veränderung der Raumstruktur im Dihalogenplatin(II)-Komplex im Vergleich zum freien 1,2-Diamino-1,2-diarylethan kommt. Die Raumstruktur $(1R,2R)/(1S,2S)$ -konfigurierter Neutralliganden bleibt dagegen nach der Koordination an Platin erhalten (siehe Abbildung 1.3.2 und Abbildung 1.3.3 Seite 44).

In den resultierenden Platinkomplexen können zwei Konformationen angenommen werden, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Die Konfiguration und die Arylsubstituenten des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors beeinflussen dabei, welche Konformation bevorzugt wird (umrahmte Konformation in den Abbildungen).

Der Konformationswechsel ist in Abhängigkeit der Konfiguration des Neutralliganden unterschiedlich signifikant. Bei $(1R,2S)/(1S,2R)$ -Konfiguration wechselt sie von einer antiperiplanaren Anordnung der Arylreste im 1,2-Diamino-1,2-diarylethan zu einer synklinalen im Platinkomplex. Nach der Komplexbildung steht der 2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl-Substituent bevorzugt equatorial und der 2-Chlor-4-hydroxyphenyl-Ring bevorzugt axial. [116]

Bei $(1R,2R)/(1S,2S)$ -Konfiguration des Neutralliganden bleibt die synklinale Konformation der Arylreste nach der Koordination an Platin erhalten. Der resul-

tierende Platinkomplex liegt bevorzugt in der δ -Konformation mit bisequatorialer Orientierung der Aromaten vor. [112]

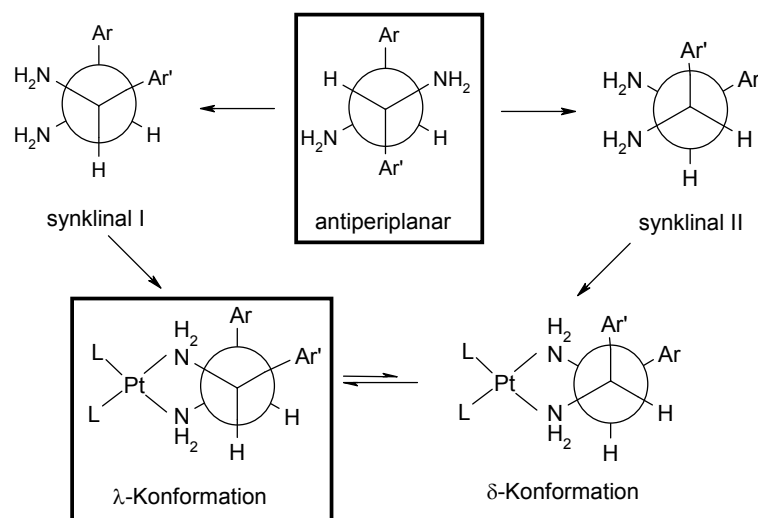


Abbildung 1.3.2 Konformationen des $(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierten Liganden und Platinkomplexes am Beispiel des $(1R,2S)$ -1-(2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethan-Strukturelements; eingerahmt: bevorzugte Konformation in Lösung; L = I; Ar: 2-Chlor-4-hydroxyphenyl; Ar': 2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl; die relativen Konformationsbezeichnungen beziehen sich auf die Arylreste

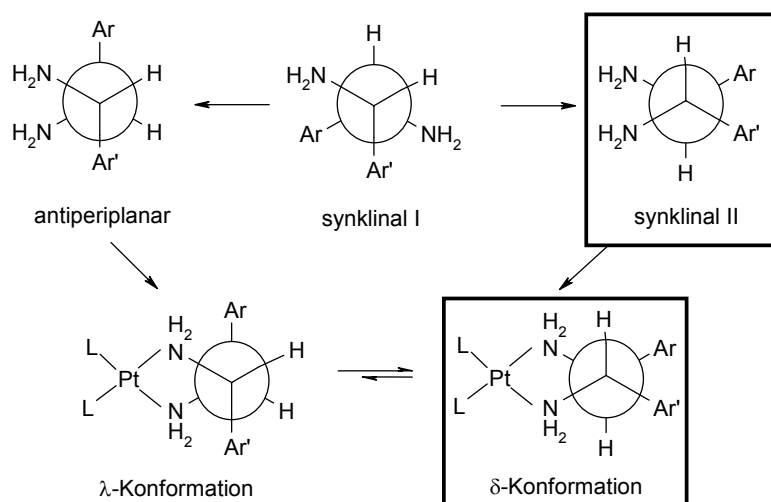


Abbildung 1.3.3 Konformationen des $(1S,2S)/(1R,2R)$ -konfigurierten Liganden und Platinkomplexes am Beispiel des $(1S,2S)$ -1-(2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethan-Strukturelements; eingerahmt: bevorzugte Konformation in Lösung; L = I; Ar: 2-Chlor-4-hydroxyphenyl; Ar': 2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl; die relativen Konformationsbezeichnungen beziehen sich auf die Arylreste

$(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierte 1,2-Diamino-1,2-diarylethane zeigen eine höhere Bindungsaffinität zum ER als die entsprechenden Diamine mit $(1R,2R)/(1S,2S)$ -Konfiguration [117]. Durch die antiperiplanare Konformation

der Aromaten in $(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierten 1,2-Diamino-1,2-diarylethanen sind die Hydroxygruppen optimal zu den Ankerpunkten in der LBD ausgerichtet, so dass eine Bindung analog zu DES und E2 möglich ist. Wie die Superpositionierung in Abbildung 1.3.4 zeigt, lassen sich die Aromaten des Diamins mit dem A- und D-Ring des E2 überlagern [118]. Auch $(1R,2R)/(1S,2S)$ -konfigurierte 1,2-Diamino-1,2-diarylethane können diese Konformation einnehmen und optimale Wechselwirkungen zu den Ankerpunkten in der LBD des ER eingehen. Beide hydrophilen Aminogruppen sind dabei aber auf einer Seite konzentriert (siehe Abbildung 1.3.3), und es kommt zu stärkeren störenden Einflüssen in hydrophoben Bereichen der LBD.

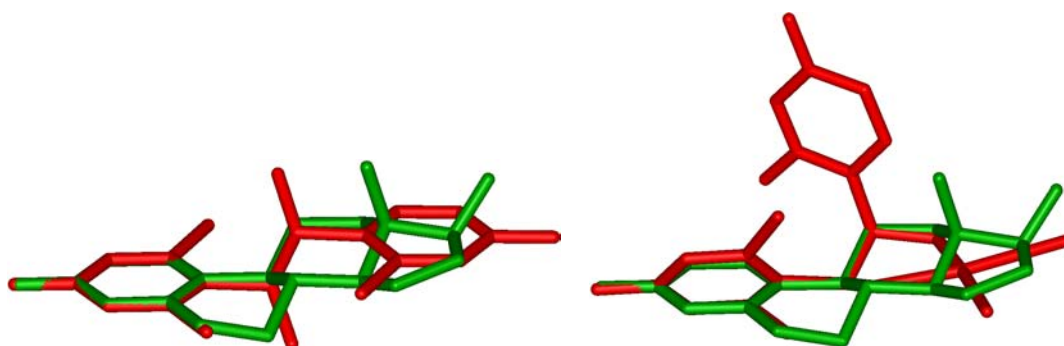


Abbildung 1.3.4 Superpositionierung von E2 (grün) mit einem $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethan in antiperiplanarer Konformation (rot; links) und eines $(1R,2S)/(1S,2R)$ -Diodo-Pt-Komplex (rot; rechts) beide im Energieminimum nach Keilitz [119, 120]

Im $(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierten Platinkomplex ragt der axialständige 2-Chlor-4-hydroxyphenyl-Substituent aus der Ebene des 5-gliedrigen Chelatrings heraus und steht nicht analog zum D-Ring in E2 zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu His^{524/475} in der LBD des ER α/β zur Verfügung, so dass eine Bindung in der LBD nicht analog zu E2 erfolgen kann (siehe Abbildung 1.3.4). Trotzdem werden bei ihm eine geringe relative Bindungsaffinität zum ER sowie estrogenische Effekte beobachtet. [1,2-Diamino-1,2-diarylethan]platin(II)-Komplexe wiesen eine im Vergleich zum freien Liganden geringere relative Bindungsaffinitäten zum ER auf, zeigen *in vivo* aber stärkere estrogenische Effekte [112, 119, 120]. Eine Bindung zum ER mit daraus resultierender produktiver Konformationsänderung muss demnach auch für $(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierte Platinkomplexe möglich sein. Sie muss aber über

andere Bindungsstellen als für Verbindungen mit Struktur analogie zu E2 erfolgen.

Aus diesen Ergebnissen wurde die Einteilung estrogen wirksamer Verbindungen in die zwei Strukturklassen der Typ-I- und Typ-II-Estrogene etabliert. [120]

Typ-I-Estrogene sind estrogen wirksame Verbindungen, die strukturell dem E2 ähnlich sind und in der LBD des ER vergleichbar binden. Es sind planare hydrophobe Moleküle.

Typ-II-Estrogene sind estrogen wirksame (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-konfigurierte Platin-komplexe und struktur analoge Verbindungen mit einer gewinkelten Molekülgeometrie. Ihr Bindungsmodus an den ER ist ein anderer als er für E2 gefunden wurde.

1.3.3 Estrogene mit 1,2-Diarylethan-Pharmakophor und Problemstellung

Zu den Typ-I-Estrogenen mit 1,2-Diarylethan-Pharmakophor zählen auch 1,2-Diazido-1,2-diarylethane (siehe Abbildung 1.3.5 Seite 49). Bei der Darstellung einiger Diamine dienen sie als Edukte.

Die Platinkomponente der neuen estrogenen Komplexe kann mit nukleophilen Zentren wie z. B. Purinbasen in der DNA reagieren. In der Überlagerung mit E2 liegt sie im Bereich des D-Rings und ragt in der LDB des ER in für die Ligan-denassoziation wichtige Bereiche (siehe Abbildung 1.3.4 Seite 45). Um zu untersuchen, ob der Platinbrücke durch ihre Reaktivität eine besondere Rolle bei der Wechselwirkung mit dem ER zukommt, wurden die Aminogruppen des 1,2-Diamino-1,2-diarylethans in verschiedene Heterozyklen (Imidazol, 2-Imidazolin, Imidazolidin, Piperazin) integriert (siehe Abbildung 1.3.5 Seite 49). Aus den (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-konfigurierten Platinkomplexen wurden so weitere Typ-II-Estrogene entwickelt.

Durch die unterschiedliche Winkelung der verschiedenen Grundkörper kann der Einfluss der Orientierung der Aromaten am zentralen Ringsystem sowie des Abstandes der *para*-Hydroxygruppen in den Aromaten auf die estrogen Aktivität untersucht werden.

Die Einführung von Alkylsubstituenten führte bei Platinkomplexen zu einer Steigerung der relativen Bindungsaffinität [121]. Analog dazu wurde zur Kompensation der durch die Stickstoffatome vermittelten hydrophilen Komponente in 2-

Imidazolinen und Piperazinen die Halogenierung in den Arylresten variiert bzw. Alkylgruppen an einen oder beide Stickstoffe sowie an C-2 der 2-Imidazoline eingeführt (siehe Abbildung 1.3.5 Seite 49).

Die 4,5-Diaryl-2-imidazoline erwiesen sich als ER-affiner als die analogen Piperazinderivate, so dass analog zu den in Kapitel 1.2.5 Abbildung 1.2.16 auf Seite 39 vorgestellten Pyrazol- und Furanderivaten untersucht werden sollte, ob durch Einführung verschiedener basischer Seitenketten an die 4-Position eines der Arylreste eine Umkehr des Wirkprofils von einem Estrogen in ein Antiestrogen möglich ist (siehe Abbildung 1.3.5 Seite 49) [117, 120, 122].

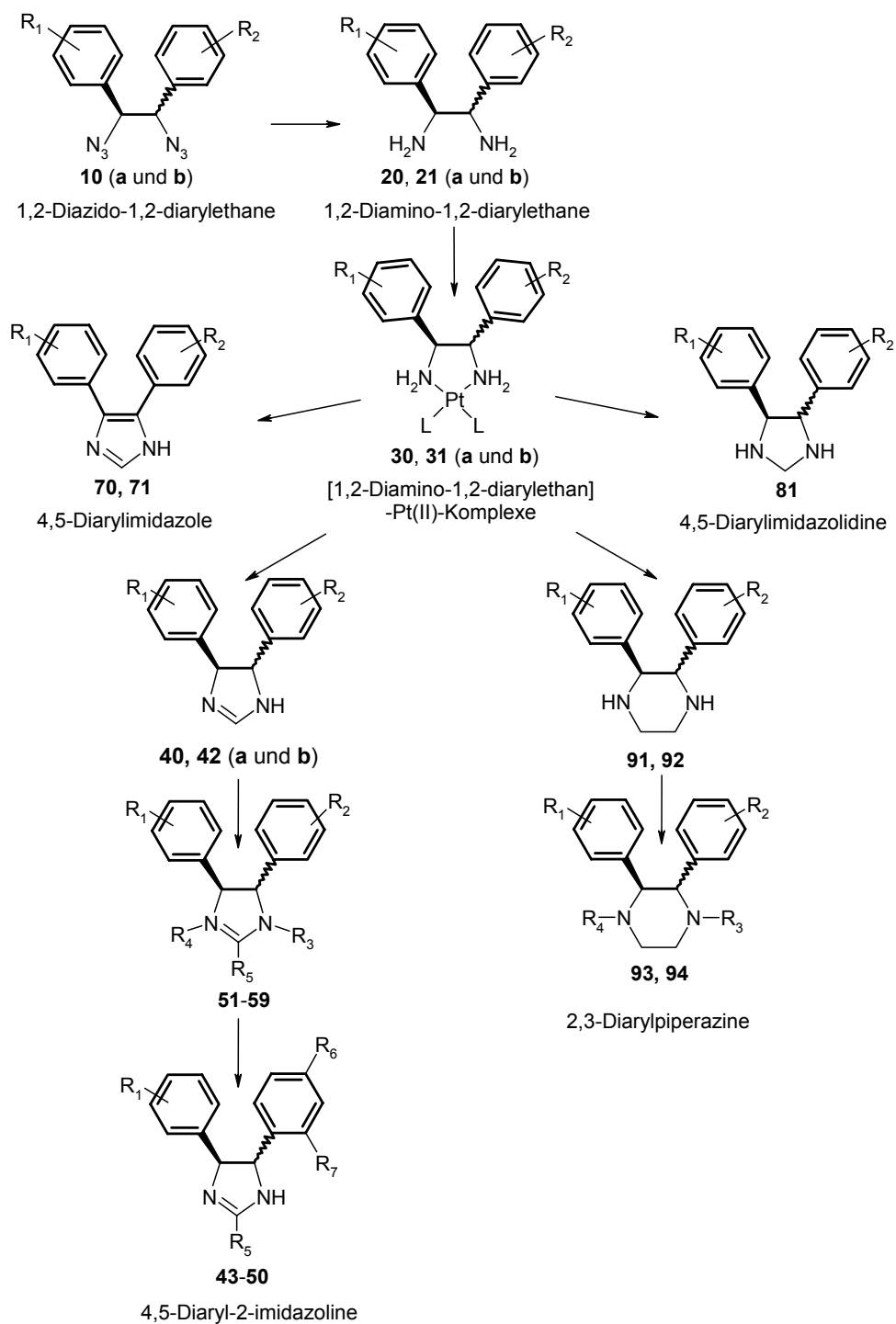
Durch die gewinkelte Molekülgeometrie der Typ-II-Estrogene wird für sie eine Assoziation in der LBD des ER in der von der basischen Seitenkette bekannter SERM besetzten Seitentasche im Bereich von Asp³⁵¹ (bezogen auf ER α) angenommen [120]. Von der Strukturanalogie heterozyklischer Typ-II-Estrogene zu SERM versprach man sich auch eine ER-Subtyppdiskriminierung oder ER-Selektivität, dessen Überprüfung ein Ziel dieser Arbeit war.

Bei ER-positiven Mammakarzinomen wird häufig eine Verschiebung der ER-Expression zu ER α beobachtet (vgl. Kapitel 1.1.7 Seite 23 ff). Dadurch muss das Konzept des ER-vermittelten *drug-targetings* erweitert, und für [1,2-Diamino-1,2-diarylethan]Pt(II)-Komplexe eine ER α -Selektivität angestrebt werden.

Die im Arbeitskreis Gust dargestellten neuartigen gewinkelten Typ-II-Estrogene aber auch Typ-I-Estrogene sollten auf eine mögliche ER-Selektivität hin untersucht werden. Dazu sollten neue *in vitro* Transaktivierungsassays aufgebaut werden, die den bereits bestehen Transaktivierungsassay mit stabil transfizierten ER α -positiven MCF-7-2a-Zellen ergänzen [123]. Alle drei Transaktivierungsassays geben Aufschluss über die pharmakologische Wirkung auf molekularer Ebene an dem jeweiligen ER-Subtyp. Damit sollten Aussagen über agonistische oder antagonistische Potenz von Verbindungen bezüglich der ER-Subtypen gemacht werden.

Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich der estrogenen Wirkpotenz, die mit dem MCF-7-2a-Testsystem in vorangegangenen Untersuchungen ermittelt wurden bzw. im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, sollten mit der an ER α und ER β verglichen werden sowie auf ER-Subtyppdiskriminierung geprüft werden.

Neben den neuartigen nicht steroidalen Estrogenen sollten bekannte Estrogene und Antiestrogene mit den neuen und bereits etablierten Transaktivierungsassays getestet werden.



rot:	1,2-Diarylethan-Strukturelement	L	Abgangsgruppe z.B. Cl oder I
R ₁ :	4-Methoxy oder 4-Hydroxy und 2,6-Dichlor, 2-Chlor oder H	R ₅ :	H, Methyl, Ethyl oder 4-Hydroxyphenyl
R ₂ :	4-Methoxy oder 4-Hydroxy und 2-Chlor oder H	R ₆ :	2-Dimethylethoxy, 2-Pyrrolidin-1-yl-ethoxy oder 2-Piperidin-1-yl-ethoxy
R ₃ , R ₄ :	H, Methyl, Ethyl oder Propyl	R ₇ :	H oder Chlor

Abbildung 1.3.5 Übersicht der auf Wirkung am ER getesteten Verbindungen mit 1,2-Diarylethan-Strukturelement

2 Aufbau ER-subtypselektiver Testsysteme

2 Aufbau ER-subtypselektiver Testsysteme

2.1 Allgemeines

Zur Erweiterung der im Arbeitskreis Prof. Gust bestehenden Testsysteme sollten *in vitro* Testsysteme aufgebaut werden, die Aufschluss über die pharmakologische Wirkung von Wirkstoffen auf molekularer Ebene an den einzelnen ER-Subtypen geben, um Aussagen über agonistische oder antagonistische Potenz von Verbindungen bezüglich der ER-Subtypen treffen zu können. Der bereits bestehende Transaktivierungsassay mit stabil transfizierten ER-positiven MCF-7-2a-Zellen sollte ergänzt werden, da in ihnen nur der ER-Subtyp α nachgewiesen werden konnte [123].

Grundlage der neuen Testsysteme bildet ein transientes Transfektionsexperiment mit U-2OS-Zellen, eine humane Zelllinie, die genuin keinen ER enthält, um endogene Einflüsse zu verhindern.

Die Zellen wurden mit zwei DNA-Segmenten sog. Plasmiden co-transfiziert, die für den jeweiligen ER-Subtyp (Estrogenrezeptorexpressionsplasmide, später als Rezeptorplasmide bezeichnet) und für ein Reportergen (Reporterplasmid) kodieren.

Analog zu dem bereits bestehenden Assay mit MCF-7-2a-Zellen wird auf zellulärer Ebene analysiert, ob eine Verbindung an den ER bindet und eine Konformationsänderung gefolgt von Dimerisierung und Bindung der Ligand/ER-Dimere an EREs und deren Aktivierung. Aus dieser Aktivierung resultiert die Bildung von Luciferase, die als Reporterenzym eingesetzt wird. Die Luciferaseaktivität wird schließlich in einem Assay mit entsprechendem Substrat quantifiziert. Die gebildete Enzymmenge kann mit der Wirkpotenz der Untersuchungssubstanz korreliert werden.

Für die immer wieder durchzuführenden transienten Transfektionsexperimente wurden verschiedene Parameter optimiert. Die Transfektionseffizienz gibt den Prozentsatz der transfizierten Zellen an der Gesamtzellzahl an. Sie ist von verschiedenen Faktoren wie der Zelllinie, des Verhältnisses von Transfektionsreagenz und DNA (Lipid/DNA-Ratio), der Zelldichte und der Transfektionsdauer, d.h. Einwirkzeit der Transfektionsmischung auf die Zellen, abhängig. Die Bestimmung der prozentualen Transfektionsrate erfolgte über die Durchführung

von β -Galactosidaseassays. Weiterhin wurden auch Parameter bezüglich der durchgeführten Assays für ER α und ER β optimiert.

Ziel der Transfektion ist es, ausreichend viele Zellen zu transfizieren, wobei zu beobachten war, dass in die Zelle eingeschleuste Fremd-DNA wieder eliminiert wird. In der Regel erfolgt dies in Endosomen über Degradierung mit Nukleasen und Hydrolasen. In den neuen Assays musste eine ausreichende Transfektionseffizienz, die relative langsame Aktivierung des Reportergens über den ER und eine ausreichende Empfindlichkeit bezüglich der Erfassung der ER-Aktivierung berücksichtigt werden. Weiterhin war auf Wirtschaftlichkeit, Verhältnismäßigkeit und Durchführbarkeit zu achten. Zur besseren Handhabung war das Ziel, die Assays im 96-Loch-Maßstab durchzuführen, so dass Substanzzugabe, Aufarbeitung und Vermessung in denselben Platten erfolgen.

2.2 Verwendete Reagenzien, Zelllinien, Assays und Plasmide

2.2.1 Transfektionsreagenz

Zum Einschleusen der Plasmid-DNA in die Säugerzellen wurde das Verfahren der Transfektion mit einem komplexen Transfektionsreagenz angewandt. Fugene 6[®] ist laut Herstellerangaben ein lipidbasiertes Transfektionsreagenz mit mehreren Komponenten. Es komplexiert DNA und schleust sie schonend in die Zellen. Durch seine geringe Toxizität für Zellen im Vergleich zu anderen Transfektionsreagenzien kann die Transfektion über Nacht sowie in Anwesenheit von FCS erfolgen. Wie bei anderen Transfektionsreagenzien muss auf die Anwesenheit von Antibiotika während der Transfektion verzichtet werden.

2.2.2 U-2OS-Zelllinie

U-2OS-Zellen - ursprünglich als 2T-Zellen bezeichnet - haben ihren Ursprung in humanem Knochengewebe. Sie wurden 1964 aus einem mäßig differenziertem Osteosarkom der Tibia einer 15 Jahre alten Patientin isoliert und als Zelllinie etabliert [124]. U-2OS-Zellen sind adhärente Zellen, die bevorzugt als Monolayer an Kulturflächen wachsen. Steroidrezeptoren wurden in ihr nicht gefunden, so dass sie sich gut für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Testungen am ER eignen.

Ihre Generationszeit lag bei 30.6 h \pm 7.3 h.

2.2.3 ER α - und ER β -Expressionsplasmid

Das Grundgerüst der Estrogerezeptorexpressionsplasmide pSG5-ER α (Heg0) für ER α und pSG5-ER β FL für ER β diente der eukaryotische Expressionsvektor pSG5 (Fa. Stratagene) mit hoher Kopierzahl und einer Größe von 4,1 kb (siehe Abbildung 2.2.1). Die DNA-Sequenz für ER α (Wildtyp-ER Heg0) wurde an die Klonierungsstelle *EcoR* I und die für ER β (ER β 0) an *BamH* I eingefügt.

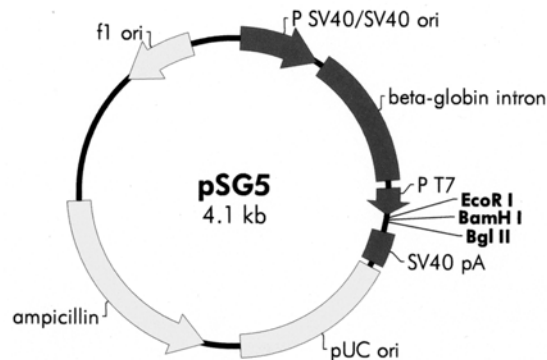


Abbildung 2.2.1 Plasmidkarte von pSG5 (Fa. Stratagene); *EcoR* I: Klonierungsstelle für ER α ; *BamH* I: Klonierungsstelle für ER β

2.2.4 Luciferaseassay und Reporterplasmid

Als Reportergene für Transaktivierungsassays werden hauptsächlich CAT- und Luciferasegene eingesetzt. Die Vorteile des Luciferaseassays gegenüber dem CAT-Assay liegen in der schnelleren Detektion, der höheren Empfindlichkeit, dem geringeren Aufwand und dem Verzicht auf eine radioaktive Messung. Bei den neu zu etablierenden Transaktivierungsassays wurde deshalb auf ein Reportersystem mit *firefly* Luciferase zurückgegriffen.

Die gebildete Luciferase katalysiert eine Chemolumineszenzreaktion (siehe Abbildung 2.2.2), deren Lichtemission in einem Luminometer quantifiziert wird. Die resultierende Lichtemission setzt unmittelbar nach Substratzugabe ein und klingt sehr schnell wieder ab. Schon nach einer Minute verbleiben nur noch ca. 10 % der Spitzenaktivität. Der Wellenlängenbereich des emittierten Lichts erstreckt sich von 490 bis 630 nm. Die Messung der relativen Lichtausbeute (RLU = *Relative Light Units*) erfolgt über einen Zeitraum von 10 s über den gesamten Empfindlichkeitsbereich des Luminometres.

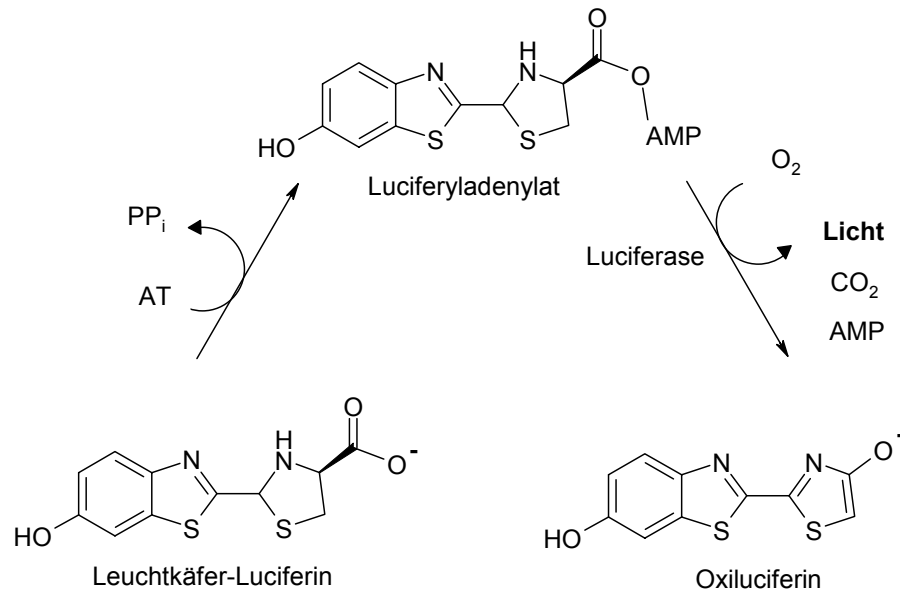


Abbildung 2.2.2 Chemolumineszenzreaktion des Luciferaseassays

Für die transiente Transfektion wurde ein Repoterplasmidkonstrukt verwendet, das das von cDNA cloniert und für *in vitro* Versuche optimierte Luciferasegen des nordamerikanischen Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) enthält (p(ERE)₂-luc⁺). Dieses Reporterogen steht unter transkriptioneller Kontrolle zweier ihm vorgeschalteter EREs. Durch Aktivierung der EREs wird die Bildung der *firefly* Luciferase induziert.

2.2.5 Gerätespezifische Messbereiche für Luciferasemessung

Für die Luciferasemessung kamen zwei Luminometer zur Anwendung - der Microlumat LB 96 P der Firma EG&G Berthold und der Multilable Reader Victor² der Firma Wallac/PerkinElmer. Mit beiden Geräten wurden Luciferase-RLU-Korrelationskurven erstellt. Über die Vermessung definierter Menge des Enzyms Luciferase wurde der Messbereich beider Luminometer ermittelt, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen den Logarithmen von RLU und Luciferasemenge besteht. Dies ist der optimale Messbereich, in dem die Messungen erfolgen sollten. Die Durchführung der Transaktivierungsassays erfolgte unter Verwendung weißer oder schwarzer Platten, die beide für die Zellkultur geeignet sind. Dementsprechend erfolgten die Bestimmung der Luciferase-RLU-Korrelation in beiden Plattenarten (siehe Abbildung 2.2.3).

Die RLU-Ausbeute aus 50 μL Luciferaselösung in Passive Lysis Buffer, dem 1 mg/mL BSA zugesetzt war, und 50 μL Luciferasereagenz wurde über zehn Sekunden gemessen. Die erhaltenen Messergebnisse wurden je nach Gerät unterschiedlich ausgegeben. Der Microlumat summiert die Lichtimpulse auf ($\text{RLU}_{10\text{s}}$), während der Victor² die über zehn Sekunden registrierten Lichtimpulse auf Impulse pro Sekunde mittelt ($\text{RLU}_{1\text{s}}$).

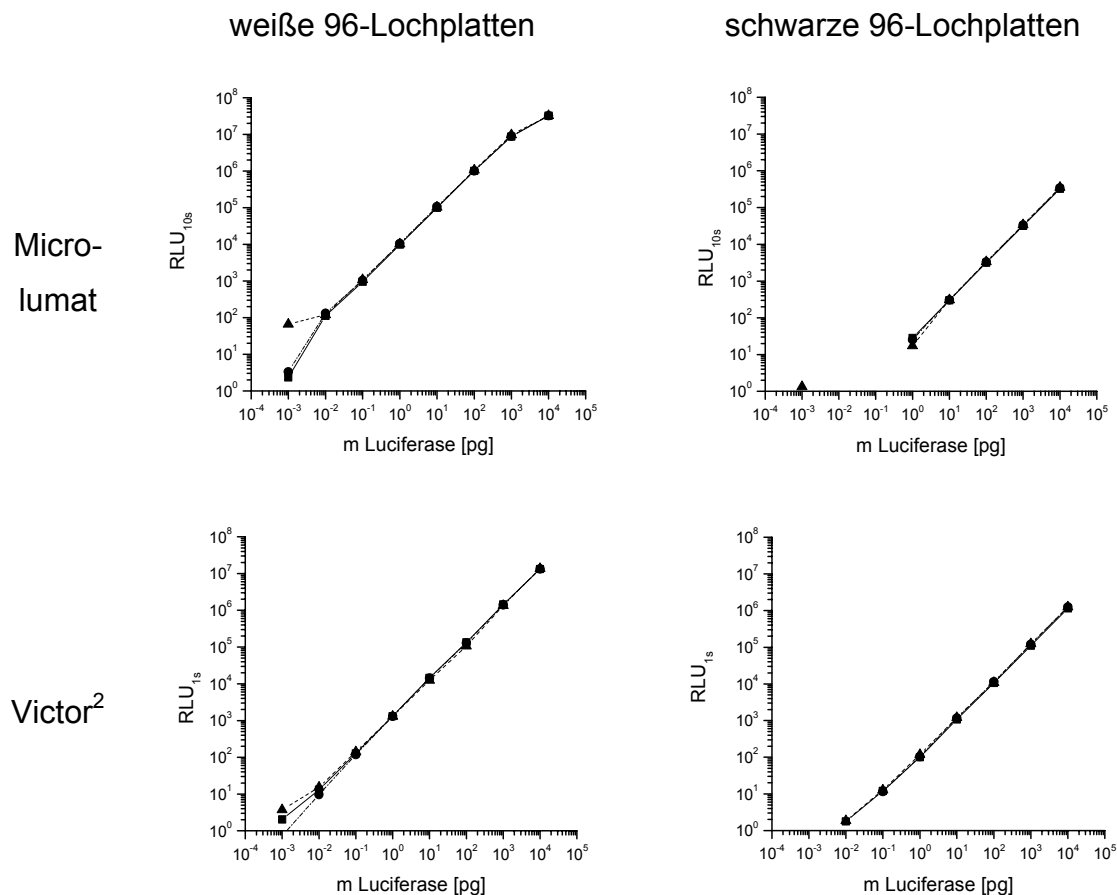


Abbildung 2.2.3 RLU-Ausbeute in Abhängigkeit der Luciferasemenge, dargestellt sind jeweils die Ergebnisse aus drei unabhängigen Einzelmessungen

Durch die Reflexion des emittierten Lichts an den Wänden der Löcher ist die Signalstärke in weißen Platten höher als in schwarzen Platten. In weißen Platten stellte sich bei beiden Luminometern der optimale Messbereich ab einer Luciferasemenge von 0.1 pg ein und reichte bei Verwendung des Microlumats bis zu einer Luciferasemenge von 1×10^3 pg bzw. bis 1×10^4 pg bei Nutzung des Victors². Der Messbereich beim Microlumat lag bei RLU-Werten über zehn Sekunden im Größenbereich von 10^3 bis 10^7 . Bei Luciferasemengen ab 1×10^4 pg

ging der Kurvenverlauf in ein Plateau über. Messwerte über die Größenordnung von 10^7 wurden nicht mehr erfasst. Unter Verwendung von Victor² reichte der Größenbereich im linearen Kurvenverlauf bei RLU-Werten pro Sekunden von 10^2 bis 10^7 ; Lichtimpulse aus höheren Luciferasemengen als 1×10^4 pg konnten durch das Gerät nicht mehr erfasst werden.

Unter der Verwendung von schwarzen Platten war die Empfindlichkeit der Messung bei beiden Geräten geringer. Der Microlumat erfasste Luciferase erst ab einer Menge von 10 pg innerhalb des linearen Bereichs mit einer RLU über zehn Sekunden im Größenbereich von 10^3 . Unter Verwendung von Victor² und schwarzen 96-Lochplatten stellte sich bei Luciferasemengen ab 1 pg ein linearer Kurvenverlauf bei doppeltlogarithmischer Skalierung ein. Bei beiden Geräten lag die maximal eingesetzte Luciferasemenge von 1×10^4 pg im linearen Bereich. Durch Verwendung von schwarzen Platten konnte die Empfindlichkeit der Messung herabgesetzt und höhere Luciferasemengen erfasst werden.

Bei Luciferasemessungen sollten die Messwerte immer im linearen Bereich der RLU-Luciferase-Korrelationskurve liegen. Beim Microlumat sollte die RLU Ausbeuten über zehn Sekunden mindestens 10^3 maximal aber 10^7 betragen. Messungen mit dem Victor² sollten RLU Werte über eine Sekunde im Größenbereich zwischen 10^2 bis 10^7 liegen.

Bei der Optimierung der Parameter für die Transaktivierungsassays auf ER α und ER β und Anwendung des Luciferaseassays wurden weiße 96-Lochplatten und der Microlumat als Messgerät verwendet.

2.2.6 β -Galactosidaseplasmid und -assays

Die Optimierung der Transfektionseffizienz erfolgte unter Verwendung des kommerziellen Vektors pSV- β -Gal (Fa Promega), der das bakterielle Gen *lacZ* enthält, das für das Enzym der β -Galactosidase codiert (siehe Abbildung 2.2.4).

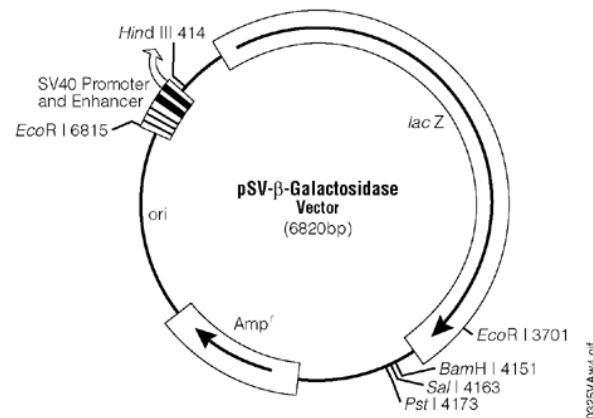


Abbildung 2.2.4 Plasmidkarte des pSV- β -Galactosidase Vectors; *lacZ*: Gen der bakteriellen β -Galaktosidase

Die Bestimmung der prozentualen Transfektionsrate erfolgte mit dem X-Gal-Assay durch Anfärbung der transfizierten Zellen und anschließendem Auszählen dieser in zufällig gewählten Ausschnitten im Lichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung. Zusätzlich wurde eine quantitative kolorimetrische Messung der β -Galactosidaseaktivität über den ONPG-Assay durchgeführt.

Beim X-Gal-Assay katalysiert die β -Galactosidase die Spaltung eines farblosen löslichen 3-Indolyl- β -D-galactopyranosid-Derivats (X-Gal). Das Indolderivat reagiert schließlich weiter zu einem blauen Indigoderivat, das sofort nach seiner Bildung in den Zellen präzipitiert. Die Zellen erscheinen im Lichtmikroskop blau. (Abbildung 2.2.5 und Abbildung 2.2.6)

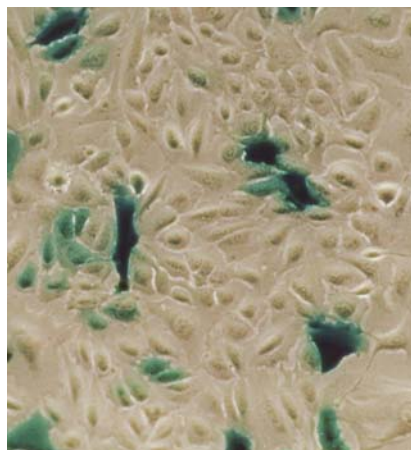


Abbildung 2.2.5 Mikroskopisches Bild der X-Gal-Färbung von U-2OS-Zellen (200-fache Vergrößerung); blau: mit pSV- β -Galactosidase Vector transfizierte und mit X-Gal abgefärbte Zellen

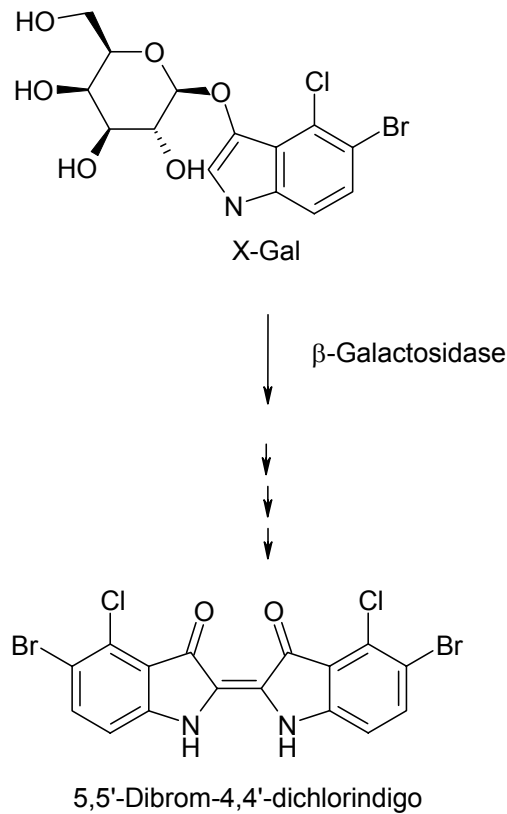


Abbildung 2.2.6 Reaktion des X-Gal-Assays

Der ONPG-Assay beruht auf die enzymatische Spaltung von *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG; siehe Abbildung 2.2.7). Unter der Katalyse von β -Galactosidase kommt es zur Bildung von β -D-Galactose und *o*-Nitrophenol. Letzteres ist gelb und kann im Zellextrakt spektralphotometrische bei 420 nm vermessen werden.

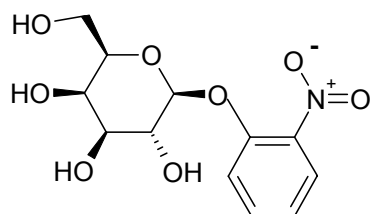


Abbildung 2.2.7 *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid

Das Reaktionsoptimum der bakteriellen β -Galactosidase, wie sie vom verwendete Vektor codiert wird, liegt im pH-Bereich von 7.0 bis 7.5. Endogene eukaryotische β -Galaktosidase dagegen hat ihr Reaktionsoptimum bei pH 3 bis 6.

Die Reaktion der beiden β -Galaktosidase-Assays wurden in gepufferten Lösungen (Phosphatpuffer, pH = 7.4) durchgeführt, so dass selektiv transfizierte Zellen erfasst wurden.

2.3 Optimierung der Transfektionseffizienz

Genauere Angaben zur Durchführung der Experimente zur Optimierung der Transfektionsexperimente sind in Kapitel 5 Experimenteller Teil Seite 154 ff. aufgeführt.

Beim X-Gal-Assay wurde die Transfektionseffizienz ermittelt. Dabei gilt:

$$\text{Transfektionseffizienz} = \frac{N_{\text{transfizierte Zellen}}}{N_{\text{gesamt}}} [\%]$$

Beim ONPG-Assay wurde die Absorption bei 420 nm im Zellysate bestimmt von der die Absorptionswerte aus den Negativkontrollen abgezogen wurden, so dass die hier im Folgenden aufgeführten Werte als Nettoabsorptionen verstanden werden können. Für die Negativkontrolle wurde statt der Transfektion lediglich ein Mediumwechsel mit Kulturmedium vorgenommen.

In den Diagrammen der folgenden Kapitel sind die Mittelwerte aus den Ergebnissen der Einzelerperimente bei den jeweiligen Untersuchungen dargestellt. Für die Fehlergrenzen wurden die Standardfehler berechnet (Konfidenzintervall 68 %).

2.3.1 Lipid/DNA-Ratio

Die Lipid/DNA-Ratio gibt das Verhältnis zwischen Transfektionsreagenz in μL und DNA-Menge in μg wieder. Die Bestimmung des optimalen Verhältnisses wurde in 6-Lochplatten mit einer Zelldichte von 2.5×10^5 Z/Loch durchgeführt.

Im ersten Schritt der Transfektion inkubieren Transfektionsreagenz und DNA miteinander, um einen Komplex zu bilden, der die Einschleusung der DNA in die Zelle ermöglicht. Im zweiten Schritt erfolgt die Verdünnung zur Transfektionslösung mit Kulturmedium, die auf die zu transfizierenden Zellen gegeben wird. Je nach Menge des zugegebenen Kulturmediums ergeben sich unterschiedliche Konzentrationen des Transfektionsreagenzes. Um den Einfluss der Konzentration des Transfektionsreagenzes sowohl bei der Komplexbildung mit

DNA als auch bei der Transfektion zu untersuchen, wurden bei dem Verhältnis 6:1 drei Varianten durchgeführt.

Bei den Verhältnissen 3:2, 3:1, 6:1b und 6:1c betrug bei der Komplexbildung die Konzentration von Fugene 6[®] 30 % (V/V). In Ansatz 6:1a betrug sie 60 % (V/V). Die Konzentration in der Transfektionslösung betrug 0.15 % (V/V) bei den Ansätzen 3:2, 3:1 und 6:1c. In der Ansätzen 6:1a und 6:1b betrug sie 0.3 % (V/V) (siehe Abbildung 2.3.1).

Lipid/DNA-Ratio	3:2	3:1	6:1a	6:1b	6:1c
% Fugene 6 [®] bei Komplexbildung	30	30	30	30	60
(V/V) Transfektionslösung	0.15	0.15	0.15	0.30	0.30

Abbildung 2.3.1 Konzentrationen von Fugene 6[®] in den Ansätzen zur Bestimmung der optimalen Lipid/DNA-Ratio

Die Ergebnisse des X-Gal-Assays sind Abbildung 2.3.2 dargestellt. Bei der Negativkontrolle konnten in der lichtmikroskopischen Auszählung keine blauen Präzipitate ausgemacht werden.

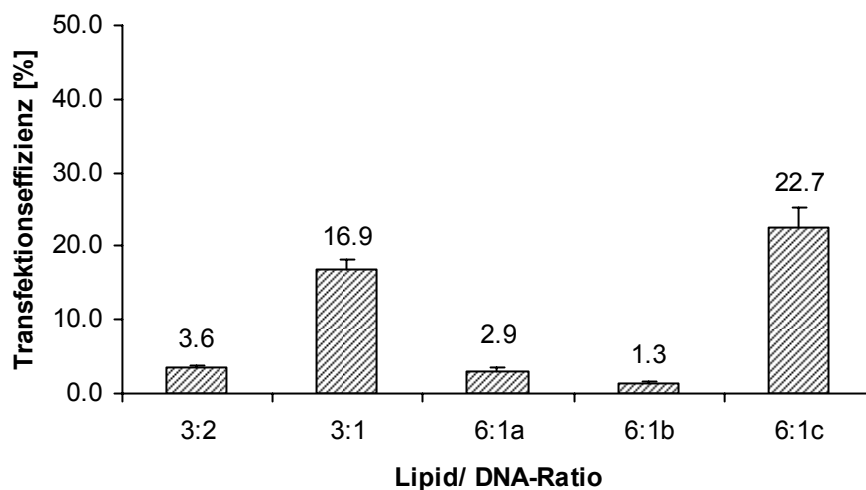


Abbildung 2.3.2 Ergebnisse der X-Gal-Assays bei verschiedenen Lipid/DNA-Ratios; Durchführung in 6-Lochplatten mit 2.5×10^5 Zellen/Loch (n=6)

In der Reihe mit einer Fugene 6[®]-Konzentration von 30 % (V/V) bei der Komplexbildung mit der DNA und 0.15 % (V/V) während der Transfektion zeigte sich mit sukzessiver Erhöhung des Lipidanteils ein Optimum der Transfektionseffizienz von 16.9 % bei einer Lipid/DNA-Ratio von 3:1. Wird bei dem Verhältnis

von 6:1 bei der Verdünnung mit Kulturmedium die doppelte Menge an Transfektionsreagenz im Vergleich zu dem Verhältnis 3:1 nicht kompensiert, sinkt die Transfektionseffizienz auf ca. 1.3 % (Ansatz 6:1b ca. 45 % von Ansatz 6:1a). Dies könnte auf toxische Einflüsse des Transfektionsreagenzes zurückzuführen sein. Interessanterweise kommt es trotz hoher Fugene 6[®]-Konzentration bei der Transfektion (0.3 % (V/V)) zu einer hohen Transfektionseffizienz von 22.7 %, wenn bei der Lipid/DNA-Ratio von 6:1 die Konzentration des Transfektionsreagenzes bei der Komplexbildung mit DNA doppelt so hoch ist (60 % (V/V)). Bei Betrachtung der durchschnittliche Gesamtzellzahl der ausgewählten Ausschnitte zeigte sich, dass 6:1c nur ca. 101 Zellen und bei 6:1a 179 Zellen gezählt wurden. In Ansatz 6:1c sind nur ca. 56 % der Zellmenge im Vergleich zu 6:1a vorhanden, die Transfektionseffizienz ist aber neun mal so hoch (Die absolute Anzahl abgefärbter Zellen ist bei 6:1c fünf mal so hoch). Die geringe Zellzahl weist wieder auf eine Toxizität des Transfektionsreagenzes hin. Die Transfektionswirkung ist so stark erhöht, dass die geringe Zellmenge überkompensiert wird.

Ansatz 6:1c ist trotz höchster Transfektionseffizienz nicht zu bevorzugen. Der Gewinn an Effektivität beträgt ca. 25 % im Vergleich zu Ansatz 3:1, bedeutet gleichzeitig aber eine Verdopplung der Menge an teurem Transfektionsreagenz und damit an Kosten.

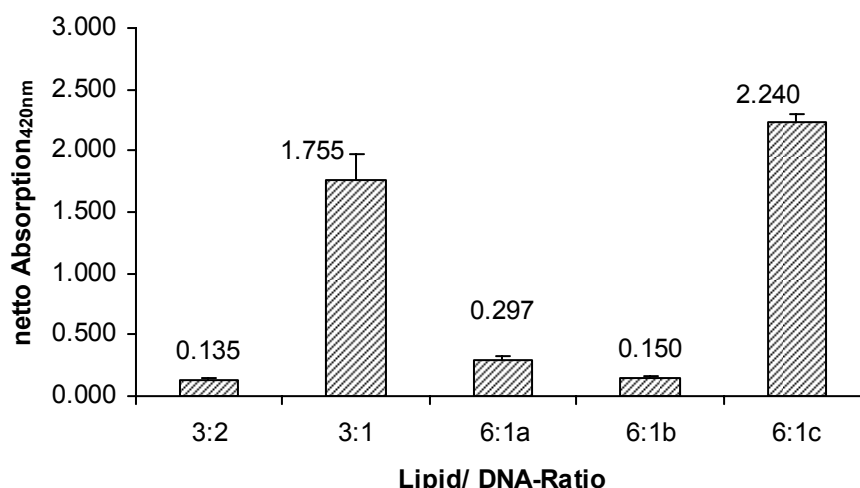


Abbildung 2.3.3 Ergebnisse der ONPG-Assays bei verschiedenen Lipid/DNA-Ratios; Durchführung in 6-Lochplatten mit 2.5×10^5 Zellen/Loch (n=6)

Die Aussagen des X-Gal-Assays bezüglich des Optimus ließen sich mit dem ONPG-Assay (siehe Abbildung 2.3.3) bestätigen. Die toxischen Effekte bei Ansatz 6:1b und 6:1c wurden nicht erfasst, da keine parallele Proteinbestimmungen der Proben durchgeführt wurden.

Die Lipid/DANN-Ratio von 3:1 wurde für alle folgenden Transfektionsansätze eingesetzt.

2.3.2 Zelldichte

Das maßgebende Signal in den Transaktivierungsassays geht nur von transfizierten Zellen aus, so dass bei der Untersuchung des Einflusses der Zelldichte auf die Transfektionseffizienz mit dem X-Gal-Assay die absolute Zellzahl an transfizierten Zellen - berechnet aus der Transfektionseffizienz und Ausgangszelldichte - herangezogen wurde. Die Absorptionenwerte aus dem ONPG-Assay mussten nicht umgerechnet werden, da sie Absolutwerte darstellten.

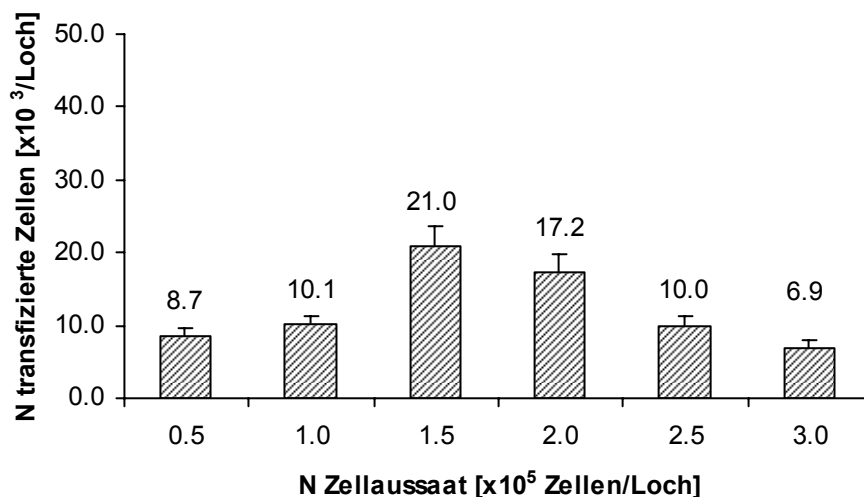


Abbildung 2.3.4 Ergebnisse der X-Gal-Assays bei verschiedenen Zellaussaaten; Durchführung in 6-Lochplatten (n=6)

Der X-Gal-Assay zeigte, dass bei Steigerung der Aussaatmenge bis zu einer Aussaat von 1.5×10^5 Zellen/Loch die Zahl der transfizierten Zellen pro Loch anstieg (siehe Abbildung 2.3.4). Weitere Erhöhung der Ausgangszellmenge führte zu einer geringeren Ausbeute von transfizierten Zellen pro Loch. Mit 21.0×10^3 transfizierter Zellen/Loch war die Aussaat von 1.5×10^5 Zellen/Loch am erfolgreichsten.

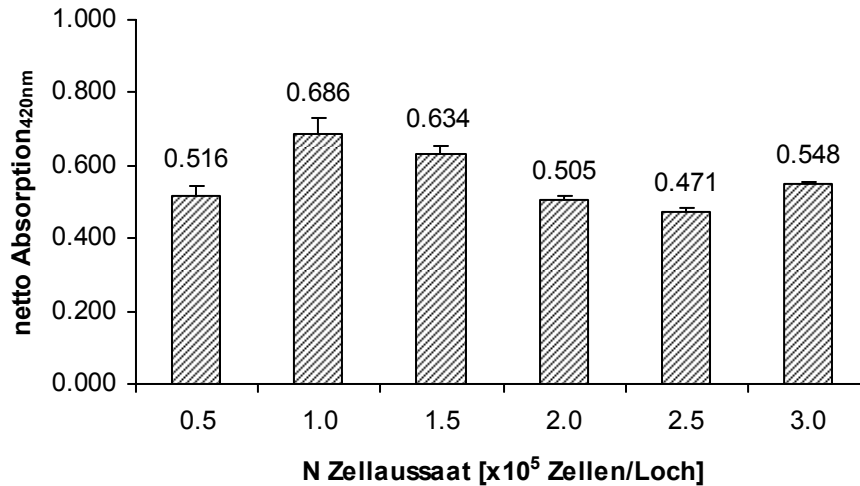


Abbildung 2.3.5 Ergebnisse der ONPG-Assays bei verschiedenen Zellaussaaten; Durchführung in 6-Lochplatten (n=3)

Im ONPG-Assay (siehe Abbildung 2.3.5) zeigte sich, dass sich die Ausbeute an transfizierten Zellen bei den Aussaaten von 1.0×10^5 bzw. 1.5×10^5 Zellen/Loch auf ähnlich hohem Niveau abspielt. Geringere als auch höhere Aussaatmengen ergaben ein geringeres Signal von transfizierte Zellen. Bei einer Zelleaussaat von 1.5×10^5 Zellen/Loch in 6-Lochplatten wird die Kulturfläche besser ausgenutzt.

Die mit 17.2×10^3 Z/Loch noch hohe Ausbeute an transfizierten Zellen im X-Gal-Assay bei einer Einsaat von 2.0×10^5 Z/Loch ließ sich im ONPG-Assay nicht bestätigen.

2.3.3 Transfektionsdauer

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Transfektionsdauer, d.h. Einwirkzeit der Transfektionslösung auf die Zellen, wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 2.5×10^5 Zellen/Platte in 4 cm Platten ausgesät und transfiziert. Die Transfektion wurde nach 3, 6, 18, 24 und 30 Stunden durch einen Mediumwechsel mit Kulturmedium abgebrochen. Die Durchführung der β -Galactosidaseassays erfolgte dann für alle Ansätze gleichzeitig ca. 48 Stunden nach der Transfektion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3.6 für den X-Gal-Assay und in Abbildung 2.3.7 für den ONPG-Assay dargestellt.

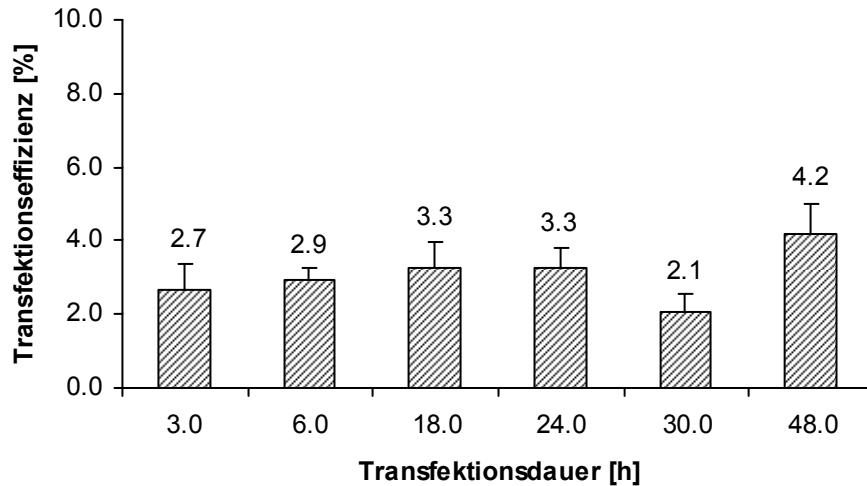


Abbildung 2.3.6 Ergebnisse der X-Gal-Assays nach unterschiedlicher Transfektionsdauer; Durchführung in 4 cm Platten mit 2.5×10^5 Zellen/Platte (n=6)

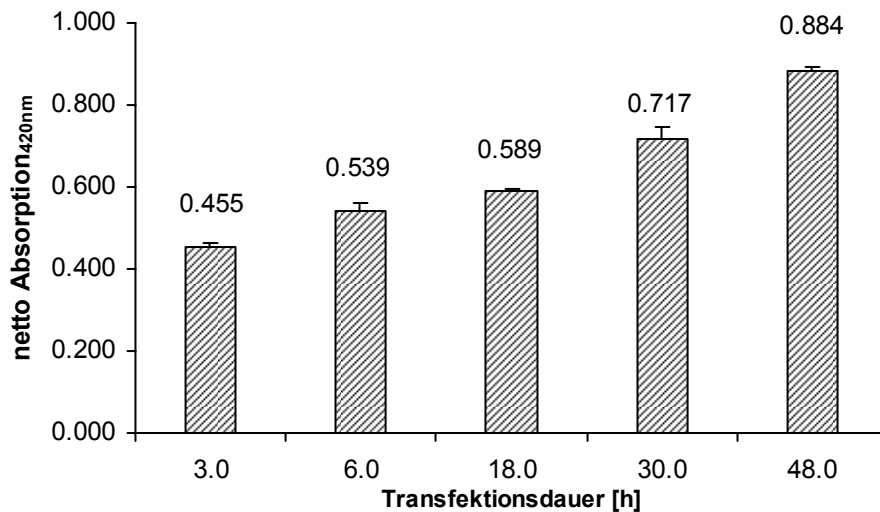


Abbildung 2.3.7 Ergebnis der ONPG-Assays nach unterschiedlicher Transfektionsdauer; Durchführung in 4 cm Platten mit 2.5×10^5 Zellen/Platte (n=3)

Die Transfektionseffizienz variiert im Bereich von drei bis 24 Stunden nur sehr wenig. Bei längerer Inkubation der Zellen bis zu 30 bzw. 48 Stunden mit Transfektionslösung konnte die Transfektionseffizienz zwar erhöht werden, doch ist eine so lange Zeitspanne in Anbetracht der noch zu folgenden Schritten in der Testdurchführung nicht praktikabel. Eine Transfektionszeit von 18 bis 24 Stunden für die Testdurchführung lässt sich besser in eine mehrstufige Testdurchführung integrieren.

2.3.4 Einfluss der Trypsinierung

Eine Transfektion ist ein störanfälliger Vorgang, der nicht sehr gut reproduzierbar ist. Die Schwankungen zwischen den Experimenten sind hoch. Auch wenn bei der Transfektion in Multiwellschalen eine Transfektionslösung verwendet und die auf die verschiedenen Löcher aufgeteilt wird, sind die Schwankungen in der Transfektionseffizienz hoch. Da der Maßstab der künftigen Transaktivierungsassays im 96-Lochmaßstab erfolgen sollte, läuft man Gefahr, dass die Messwerte ob der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen in den einzelnen Löchern stark schwanken werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob U-2OS-Zellen eine Trypsinierung und erneute Aussaat ohne starke Einbußen in der Transfektionseffizienz tolerieren. Durch den hohen Bedarf an transfizierten Zellen bei den künftig durchzuführenden Transaktivierungsassays, böte es sich an, mehrere Transfektionsansätze durchzuführen, diese nach der Transfektionsinkubation zu poolen und schließlich in 96-Lochplatten auszusäen. So sollte eine gleichmäßigere Verteilung der transfizierten Zellen und folglich eine geringere Schwankung in den Messwerten erreicht werden.

Es wurde deshalb der Einfluss der Trypsinierung und erneuten Aussaat auf die Transfektionseffizienz untersucht. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1.5×10^5 Zellen/Loch in 6-Lochplatten eingesät und nach sechs Stunden über eine Zeitspanne von 18 Stunden transfiziert. Während die Zellen für die Ansätze mit Trypsinierung mit einer Zelldichte von 1.0×10^4 Zellen/Loch in 96-Lochplatten eingesät wurden, wurde bei den Ansätzen ohne Trypsinierung nur das Medium gewechselt. 24 Stunden später wurde der X-Gal-Assay durchgeführt.

Es zeigte sich, dass 83 % der transfizierten Zellen eine erneute Aussaat mit Trypsinierung ohne Plasmidverlust und dessen Funktionalität tolerierten. Ein Poolen von mehreren Transfektionsansätzen vor einer erneuten Aussaat ist möglich.

2.3.5 Up-Scale und Trypsinierung

Da die Optimierung der Zelldichte für einen geringeren Arbeitsaufwand und höheren Durchsatz im 6-Loch-Maßstab durchgeführt wurden, wurden die ermittelten Ergebnisse auf den Maßstab in einer 10 cm Schale übertragen. Im 6-Loch-Maßstab zeigte eine Aussaat von 1.5×10^5 Zellen/Loch eine gute Transfektions-

effizienz in beiden β -Galactosidaseassays. Für die Umrechnung der Maßstäbe wurden die Herstellerangaben für die Wachstumsflächen von $9.03 \text{ cm}^2/\text{Loch}$ bei 6-Lochplatten und 60.1 cm^2 bei 10 cm Schalen zu Grunde gelegt. Bei der Umrechnung wurde zum Schluss sinnvoll für die praktische Durchführung gerundet. So entsprach die Aussaat von 1.5×10^5 Zellen/Loch in 6-Lochplatten einer Aussaat von 1.0×10^6 Zellen in 10 cm Schalen.

Mit dem größeren Ansatz wurde analog zu Abschnitt 2.3.4 eine erneute Aussaat nach der Transfektion in eine 96-Lochplatte (1.0×10^4 Zellen/Loch) durchgeführt und die Transfektionseffizienz mit dem X-Gal-Assay ermittelt. Mit Trypsinierung und erneuter Aussaat wurden 70 % der transfizierten Zellen im Vergleich zu dem Ansatz ohne Trypsinierung gefunden.

2.4 Optimierung des ER α - und ER β -Assays

Die bei der Optimierung der Transfektionseffizienz ermittelten Parameter wurden auf die Verwendung der Rezeptor- und Reporterplasmide übertragen und weitere Optimierungen bezüglich des letztendlich verwendeten Systems vorgenommen.

U-2OS-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1.0×10^6 Zellen/Schale in 10 cm Schalen eingesät. Nach sechs Stunden erfolgte die Transfektion über 18 Stunden mit einer Lipid/DNA-Ratio von 3:1. Drei Stunden nach der Aussaat in 96-Lochplatten mit einer Zellzahl von 1.0×10^4 Zellen/Loch erfolgte die Stimulation des ER/Reportersystems.

Schließlich wurde der Luciferaseassay durchgeführt (vgl. Kapitel 5.5 Seite 166 ff.). Die Stimulation erfolgte durch den natürliche Ligand des ER, E2, in einer Konzentration von $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ mit einem Lösungsmittelanteil von 0.1 % (V/V). Die im Folgenden aufgeführten RLU_{10s}-Werte verstehen sich als Nettowerte.

In den Diagrammen der folgenden Kapitel sind die Mittelwerte aus den Ergebnissen der Einzelerperimente bei den jeweiligen Untersuchungen dargestellt. Für die Fehlergrenzen wurden die Standardfehler berechnet (Konfidenzintervall 68 %).

2.4.1 Verhältnis zwischen Rezeptor- und Reporterplasmid

Es wurde geprüft, welches Verhältnis zwischen Rezeptorplasmid und Reporterplasmid optimale Messwerte liefert (siehe Tabelle 2.4.1).

Rezeptorplasmid	0.01 µg	0.02 µg	0.04 µg	0.10 µg	0.20 µg	0.50 µg
Reporterplasmid	1 µg					
Verhältnis						
Rezeptor- zu Reporterplasmid	1:100	1:50	1:25	1:10	1:5	1:2

Tabelle 2.4.1 Rezeptor-/Reporterplasmidverhältnisse

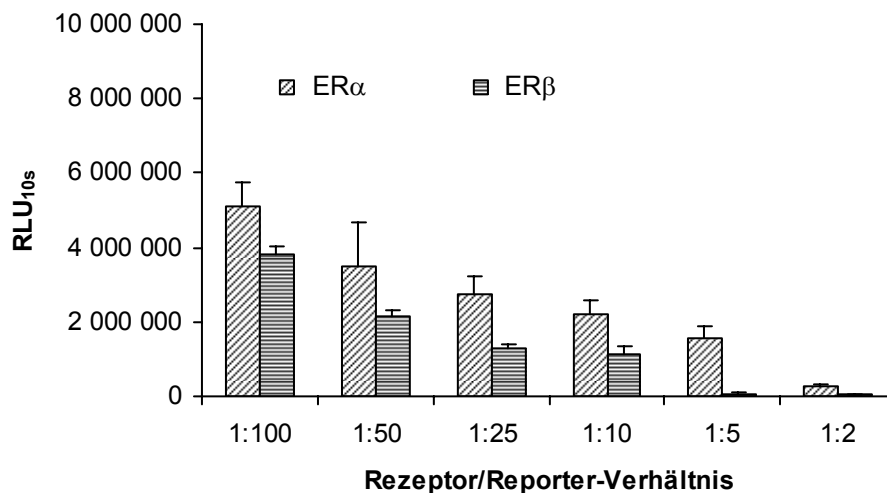


Abbildung 2.4.1 Ergebnisse der Luciferaseassays bei verschiedenen Rezeptor/Reporter-Verhältnissen; Stimulation mit E2 (1.0×10^{-7} M) über 21 h (n=6)

Durch Erhöhung des Anteils an Reporterplasmid gegenüber dem Rezeptorplasmid wurden bei ER α und ER β die RLU-Ausbeuten stetig gesteigert (siehe Abbildung 2.4.1). Bei doppeltem bzw. 5-fachem Überschuss von Reporterplasmid sind die RLU-Werte vor allem bei ER β nicht sehr hoch. Mit RLU_{10s}-Werten von 5.11×10^6 ($\pm 1.13 \times 10^6$) für ER α und 3.82×10^6 ($\pm 0.38 \times 10^6$) für ER β bei dem Verhältniss von 1:100 bzw. 3.49×10^6 ($\pm 2.03 \times 10^6$) für ER α und 2.14×10^6 ($\pm 0.28 \times 10^6$) für ER β bei dem Verhältniss von 1:50 lagen die höchsten Werte. Somit wurden die Verhältnisse von 1:100 und 1:50 bei den weiteren Untersuchungen verwendet.

2.4.2 Expressionskinetik der Luciferaseaktivität

Die Induktion der nukleären Genaktivierung über den ER gehört zu den langsamen Signalwegen. Die Signalkaskade läuft innerhalb von Stunden bis Tagen im Gegensatz zu schnellen Rezeptorantworten wie z.B. von membranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die innerhalb von Sekunden bis Minuten eintreten, ab. Für jeden ER-Subtyp wurde unter Verwendung der Plasmidverhältnisse von 1:100 und 1:50 die Expressionskinetik der Luciferaseaktivierung untersucht, um eine optimale Inkubationszeit für die Testsubstanzen in den neuen Transaktivierungsassays festzulegen. Dazu wurden die Testsysteme mit E2 in einer Konzentration von 1.0×10^{-7} M stimuliert.

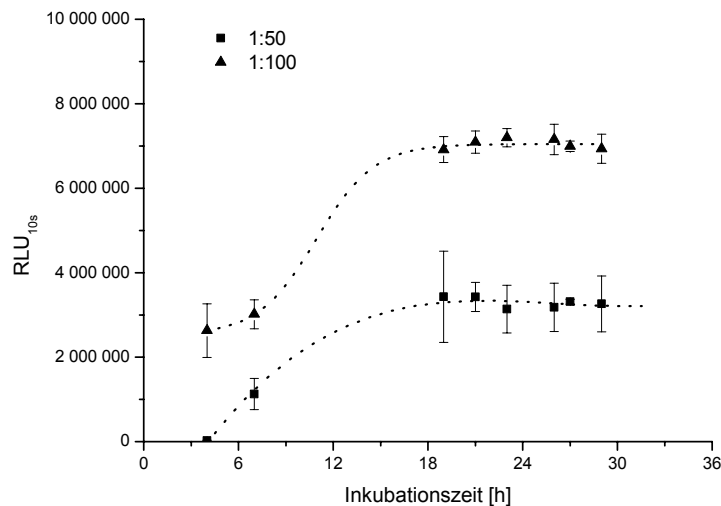


Abbildung 2.4.2 Ergebnisse der Luciferaseassays mit ER α nach verschiedenen Inkubationszeiten mit E2 (1.0×10^{-7} M) unter Verwendung unterschiedlicher Rezeptor/Reporter-Verhältnisse (n=3)

Im Transaktivierungsassay mit ER α bewegte sich die RLU-Ausbeute in der Zeitspanne zwischen ca. 18 und 30 Stunden nach der Stimulation in einem hohem konstanten Bereich (siehe Abbildung 2.4.2). Dies galt sowohl für einen Reporterüberschuss von 50 als auch 100 gegenüber dem Rezeptor.

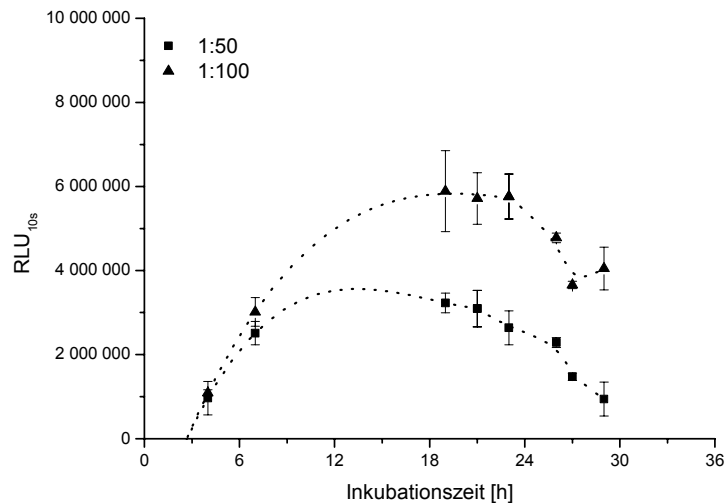


Abbildung 2.4.3 Ergebnis der Luciferaseassays mit ER β nach verschiedenen Inkubationszeiten mit E2 ($1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$) unter Verwendung unterschiedlicher Rezeptor/Reporter-Verhältnisse ($n=3$)

Auch beim Transaktivierungsassay mit ER β wurde bei den beiden Rezeptor/Reporter-Verhältnissen von 1:50 und 1:100 in einem Zeitraum zwischen ca. 18 und 23 Stunden nach der Stimulation maximale RLU-Ausbeuten in einem hohen konstanten Bereich erreicht (siehe Abbildung 2.4.3). Danach fielen die RLU-Werte wieder ab.

Unter Berücksichtigung der Expressionskinetik der Luciferase in beiden Transaktivierungsassays sollte die Inkubationsdauer mit Testsubstanzen mindestens 18 Stunden betragen, und in Anbetracht der RLU-Abnahme bei ER β sollte sie nicht länger als 24 Stunden erfolgen.

2.4.3 Basalaktivität

Zur Untersuchung, ob endogene Strukturen in U-2OS-Zellen eine estrogenabhängige Induktion des Reportersystems bewirken, wurden die Zellen nur mit Reporterplasmid (1 μg) ohne Rezeptorplasmid transfiziert.

Nach der Stimulation mit E2 ($1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der RLU-Ausbeute im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0.1 % (V/V) LM; siehe Abbildung 2.4.4). Auch ohne Transfektion zeigten U-2OS-Zellen keinen nennenswerten Einfluss auf die RLU-Ausbeute, sie liegt

gerade im Erfassungsbereich des Luminometers, und eignen sich somit gut für die Transaktivierungsassays mit ER α und ER β .

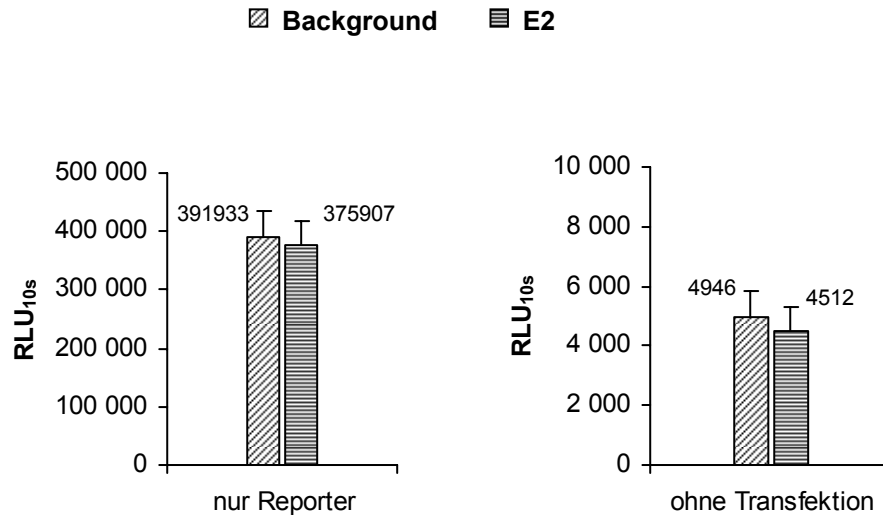


Abbildung 2.4.4 Ergebnis Luciferaseassay nach Stimulation mit E2 ($c=1.0 \times 10^{-7}$ M; über 21 Stunden); links: Transfektion nur mit Reporterplasmid (n=30); rechts: ohne Transfektion (n=6)

2.5 Bezug der RLU auf die Zellmasse

Bei der Durchführung der Transaktivierungsassays kann es zu einem Abfall der RLU-Ausbeute kommen. Dies kann neben Handhabungsfehlern während der Testdurchführung an zytotoxischen Eigenschaften der Testsubstanzen liegen. Aus diesem Grund wurde ein Parallelansatz in klaren 96-Loch-Platten durchgeführt. Hier wurde der Einfluss der getesteten Verbindungen auf die Zellmenge innerhalb der 21-stündigen Inkubation mittels Kristallviolettassay (Durchführung vgl. Kapitel 5.4 Seite 165 ff.) erfasst. Dazu wurden U-2OS-Zellen mit ct-DMEM behandelt, das 0.12 % (V/V) absoluten Ethanol zugesetzt ist. Dies entspricht der Ethanolkonzentration, die während der Transfektion auf die Zellen einwirkt, da das Transfektionsreagenz in ethanolischer Lösung vorliegt. Ein Parallelansatz mit kompletter Transfektion wäre zwar besser, um Einflüsse sowohl des Transfektionsreagenzens als auch einer ER-vermittelten Zytotoxizität zu erfassen, doch bedeutete dies einen zu hohen Kostenaufwand. Durch Quotientenbildung von RLU-Ausbeute und Absorptionswerte bei 590 nm können kleinere

Schwankungen ausgeglichen werden. Toxische Eigenschaften von Substanzen können dadurch nicht ausgeglichen werden. Die Messwerte können dann nicht in den Konzentrations-Aktivierungskurven berücksichtigt werden.

2.6 ER-subtypselektive Transaktivierungsassays

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass sich U-2OS-Zellen als Zellsystem für die Transaktivierungsassays für ER α und ER β eignen. Unter Verwendung von Fugene 6[®] als lipidbasiertes Transfektionsreagenz hat sich eine Zelleinsaat von 1.0×10^6 Zellen pro 10 cm Schale als optimal für die Transfektion herausgestellt.

Eine Lipid/DNA-Ratio von 3:1 erwies sich als günstig bezüglich des Kosten-Nutzen-Faktors. Mit dem Reporter-/Rezeptorverhältnis von 1:100 wurden bei beiden Assays (ER α und ER β) die höchsten RLU-Ausbeuten, die sich innerhalb des Messbereichs des Luminometres befanden, erhalten. Die Transfektion erfolgte schließlich über 18 Stunden. Es hat sich gezeigt, dass U-2OS-Zellen nach der Transfektion eine erneute Aussaat ohne großen Aktivitätsverlust tolerieren, so dass die Transfektionsansätze für einen ER-Subtyp vereint und mit einer Zelldichte von 1.0×10^4 Zellen/Loch in 96-Loch-Platten eingesät wurden. Nach drei Stunden waren die Zellen ausreichend an der Kulturoberfläche angewachsen, und die Substanzzugabe erfolgte.

21 Stunden Inkubation lagen im Rahmen der ermittelten Inkubationszeitspanne (18 bis 23 Stunden), in der ein Maximum der ER-induzierten Luciferaseexpression erreicht wurde.

Auf die Verwendung von internen Transfektionskontrollen durch Cotransfektion mit Reporterplasmiden mit konstitutiver Expression wurde verzichtet. Durch das Poolen von Transfektionsansätzen wurde die Fluktuation der Messwerte gemindert. Als Kontrolle über die Güte des Experiments diente die Konzentrations-Aktivierungskurve von E2, deren Mittelwert des Plateaus auch als Bezugswert für die einzelnen Aktivierungswerte herangezogen wurde (siehe Kapitel 3.1.1.3 Seite 80 ff.). Ein Ablaufschema der neuen Transaktivierungsassays ist in Abbildung 2.6.1 dargestellt.

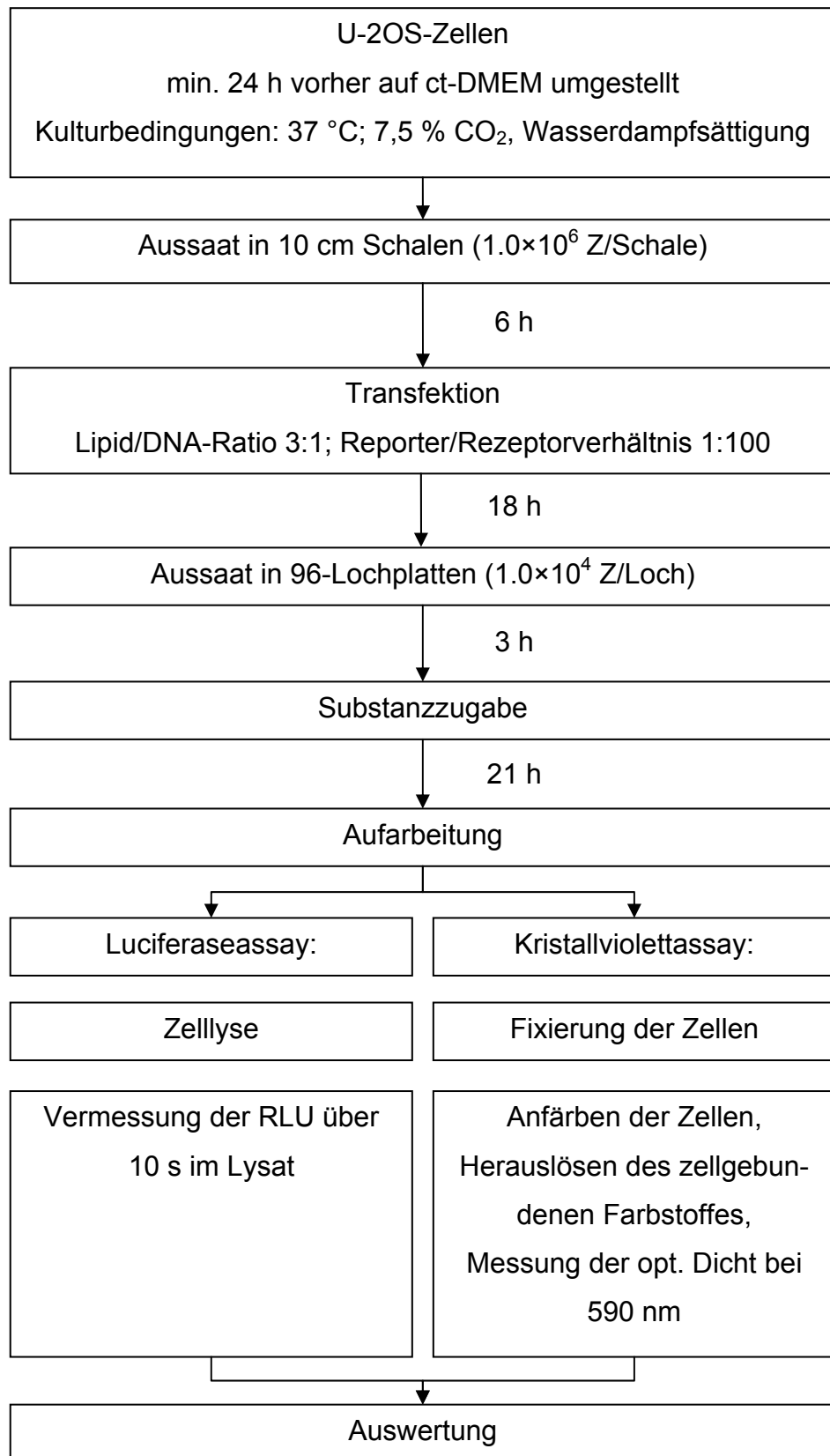


Abbildung 2.6.1 Flussdiagramm für den Ablauf der neuen Transaktivierungsassays an ER α und ER β

3 Pharmakologische Untersuchungen am Estrogenrezeptor

3 Pharmakologische Untersuchungen am Estrogenrezeptor

In der modernen pharmakologischen Forschung, vor allem beim Screenen eines großen Pools von Verbindungen, werden *in vitro* Testsystemen der Vorzug gegenüber *in vivo* Versuchen gegeben. Verschiedene, u.a. im Arbeitskreis Prof. Gust dargestellte, estrogene Verbindungen wurden auf ihre pharmakologische Wirkung auf den ER und auf ihre zytotoxischen Eigenschaften hin untersucht. Dabei kamen verschiedene sowohl bestehende als auch neu etablierte *in vitro* Testsysteme zur Anwendung.

3.1 Testsysteme

Endokrine Eigenschaften werden in einem Bindungsexperiment am isolierten Rezeptor nicht erfasst. Für Aussagen über agonistische und antagonistische Wirkungen von Verbindungen auf molekularer Ebene werden *in vitro* Transaktivierungsassays auf zellulärer Basis durchgeführt. Sie kommen *in vivo* Bedingungen näher als das Competitionsexperiment am isolierten Rezeptor. Durch sie wurden die früher zur Untersuchung von Estrogenen durchgeführten Uterusgewichtstests an juvenilen NMRI-Mäusen ersetzt und damit die Anzahl der Tierversuche reduziert.

Untersuchungen am ER mit Transaktivierungsassays basieren auf ER-induzierte Genaktivierung an DNA und daraus resultierender Proteinexpression. Die zytotoxische Potenz von Verbindungen wird ebenfalls über zelluläre Tests an verschiedenen Zelllinien unterschiedlicher Tumorgenese bestimmt.

Die hohe genetische Variabilität in der Zellkultur birgt das Problem eines hohen Selektionsdrucks, bei dem es durch häufiges Passagieren zu einer Veränderung der Zelllinie kommen kann. Bei stabil transfizierten Zellen kommt es zum sukzessiven Verlust der für die Untersuchung wichtigen Plasmiden, so dass sie für die Untersuchungen unbrauchbar werden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muss man auf identisches Zellmaterial zugreifen können. Deshalb wurde eine Zellbank nach dem *seed stock* Prinzip nach Hay angelegt [125]. Von einer frühen Passage wurden Zellen eingefroren, auf die bei Veränderungen der Zellen zurückgegriffen werden konnte [126].

3.1.1 Testung der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung auf molekularer Ebene in Transaktivierungsassays

Wie schon in Kapitel 2.2 und 2.2.4 Seite 53 ff. erläutert erfolgt die Testungen auf agonistische oder antagonistische Wirkung mit Hilfe von zellulären Transaktivierungsassays. Auf die Ligandenbindung an den ER folgt die Aktivierungskaskade. Liganden/ER-Komplexe binden dann an die EREs im Reportergenkonstrukt, infolgedessen die Transkription des Reportergens induziert und Luciferase exprimiert wird. Nach der testspezifischen Inkubationszeit werden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Lysat bestimmt, die mit der estrogenen Wirkung korreliert [125, 127].

Die Luciferaseaktivität wird durch Zugabe des Luciferase-Assay-Reagenzes mittels Lichtemission detektiert. Nähere Ausführungen zu der luciferasekatalysierten Chemolumineszenzreaktion, die sowohl für die stabilen Transfektanten als auch die transiente Transfektion gelten, sind in Kapitel 2.2.4 (Seite 54 ff.) aufgeführt. Die Luciferasequantifizierung wird zusätzlich auf die Zellmenge bezogen, die in einem Parallelansatz mittels Kristallviolettassay bestimmt wird (vgl. Kapitel 5.4 Seite 165 ff.).

Die in den Transaktivierungsassays erzielten Wirkungen werden innerhalb dieser Arbeit als estrogen bzw. antiestrogen bezeichnet, sind aber nicht mit den entsprechenden Wirkungen im einem intakten Organismus, d.h. *in vivo*, gleich zu setzen. Es handelt sich hier um ein künstliches Konstrukt von ERE und Reportergen und ist im engeren Sinne ein Bindungsassay am ERE mit der Erweiterung, dass bei produktiver Konformation des gebildeten Liganden/ER-Komplexes eine Genaktivierung über EREs erfasst werden kann. Estrogene Wirkungen im engeren Sinne wäre z.B. die Induktion des Progesteronrezeptors oder die *down*-Regulation des ER, die *in vitro* bestimmt werden könnte, oder *in vivo* bestimmbare uterotrophe Effekte.

3.1.1.1 Testung an der stabil transfizierten MCF-7-2a-Zelllinie

Der für die Transaktivierung benötigte ER ist genuiner Bestandteil der MCF-7-2a-Zelllinie. Sie leitet sich von der ER-positiven humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 ab. Sie enthält ER α während ER β in ihr nicht nachgewiesen werden

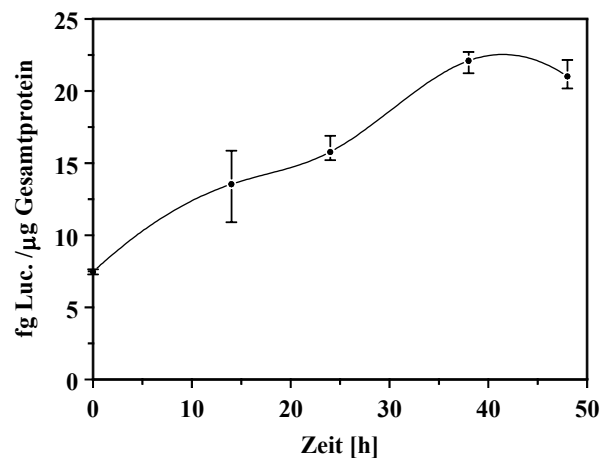


Abbildung 3.1.2 Kinetik der Luciferaseexpression in MCF-7-2a-Zellen nach Hafner [130]

3.1.1.2 Testung mit transient transfizierten U-2OS-Zellen an ER α /ER β

Zur selektiven Untersuchung der Substanzen auf ER α und ER β wurden neue Transaktivierungsassays etabliert. Dafür wurden U-2OS-Zellen verwendet, die keinen ER enthalten, so dass keine ER-vermittelten Einflüsse auf das Testsystem zu erwarten sind (vgl. Kapitel 2.4.3 Seite 70 ff.). Bei jedem Testdurchlauf wurde eine transiente Transfektion durchgeführt, bei der der jeweilige ER-Subtyp mit dem Reporterplasmid in die Zellen in einem Verhältnis von 1:100 über einen Zeitraum von 18 Stunden cotransfiziert wurde. Die humanen ER-Subtypen wurden in den Vector pSG5 cloniert. Als Reporterplasmid wurde p(ERE)₂luc⁺ verwendet. Anders als bei ERE_{wtc}luc sind hier zwei EREs als *Enhancer* in der Promoterregion des Luciferasegens enthalten. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte dann über eine Dauer von 21 Stunden. Detailliertere Angaben sind in Kapitel 2 (Seite 52 ff.) aufgeführt.

Charakteristischer Unterschied zwischen der stabilen Transfektion und dem transienten Transfektionsexperiment ist, dass die Lumineszenzausbeute bei transienter Transfektion wesentlich höher ist. Sie bewegt sich nahezu am Erfassungsmaximum der Messgeräte, während im Vergleich dazu bei den stabil transfizierten Zellen die Lumineszenzausbeute in frühen Passagen um zwei Zehnerpotenzen niedriger liegt.

3.1.1.3 Ermittlung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Zur Untersuchung der estrogenen und antiestrogenen Eigenschaften einer Verbindung werden mit den Transaktivierungsassays Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt (siehe Abbildung 3.1.3 Seite 83).

Bei der Testung auf agonistische Eigenschaften werden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Verbindung inkubiert und die substanzbedingte Luciferaseexpression bestimmt.

Zur Untersuchung der antiestrogenen Eigenschaften einer Verbindung werden die Transaktivierungsassays in Form von Konkurrenzexperimenten durchgeführt. Hierfür werden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Verbindung zusammen mit einer konstanten Konzentration von E2 inkubiert und die substanzbedingte reduzierte Luciferaseexpression ermittelt. Die erhaltenen Messwerte entsprechen der verbleibenden durch E2 induzierten Aktivierung nach Zugabe der Testverbindung. Da es sich um ein Konkurrenzexperiment handelt, darf die E2-Konzentration nicht zu hoch sein, damit die Konkurrenz nicht übermäßig aber ausreichend für die E2 bedingte maximale Luciferaseinduktion ist. Aus der Konzentrations-Wirkungskurve von E2 wurde als Konzentration mit maximaler E2-Wirkung gewählt: ER α : 0.030 nM; ER β : 0.30 nM; MCF-7-2a-Zellen: 1.0 nM.

Zur Kontrolle werden Zellen mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel inkubiert (Negativkontrolle: 0.01 % (V/V) LM) und die ermittelten Werte von den Messwerten subtrahiert (siehe Gleichung 3.1.1).

Die Messbereiche der einzelnen Transaktivierungsassays sind nicht konstant. Sie schwanken je nach Güte der eingesetzten Plasmide, der Transfektion und nehmen bei den stabilen Transfektanten mit der Anzahl der Passagen ab. Um verschiedene Experimente eines Transaktivierungsassays miteinander vergleichen zu können und die Güte des Tests beurteilen zu können, wird bei jedem Test eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve des E2 aufgenommen (MCF-7-2a-Zellen: 1.0×10^{-7} M bis 1.0×10^{-12} M; ER α und ER β : 1.0×10^{-8} M bis 1.0×10^{-13} M). Das ermittelte Plateau in der Messwertkurve wird gemittelt (E2-Max entspricht 100 % E2-Wirkung) und dient als Bezug zur Ermittlung der prozentualen Aktivierung bei der Testung auf agonistische Eigenschaften der einzelnen Kurvenpunkte der getesteten Verbindungen. Bei Testung auf antagonistische Wirkung

am ER wird die Luciferaseinduktion der den Testsubstanzen zugesetzten E2-Konzentration (Positivkontrolle) als Bezugswert für die Berechnung der prozentualen relativen Aktivierung herangezogen.

Die ermittelte relative prozentuale Aktivierung (rel. Akt.) entspricht dem prozentualen Anteil des von E2 erreichten Maximalwerts (siehe Gleichung 3.1.1).

$$\text{rel. Akt.} = \frac{\text{Messwert} - \text{Neg.kontr.}}{\text{E2} - \text{Max} - \text{Neg.kontr.}} \times 100 [\%]$$

rel. Akt.	relative Aktivierung [%]
E2-Max	Mittelwert der maximalen Messwerte von E2 (Messwerte im Plateau) bzw. Messwerte der Positivkontrolle [RLU]
Neg.kontr.	Negativkontrolle Mittelwert der Messwerte mit LM Behandlung (0.01 % (V/V) [RLU])
Messwert	Einzelmesswert [RLU]
EC50, IC50	50% relative Aktivierung

Gleichung 3.1.1 Berechnung der prozentualen relativen Aktivierung der ER/Reporter-gensysteme

3.1.1.4 Bestimmung der agonistischen und antagonistischen

Wirkung

Die in unabhängigen Versuchen bestimmten prozentualen relativen Aktivierungen wurden gemittelt und gegen die Konzentrationen in einem Diagramm aufgetragen. Für die Fehlergrenzen wurden die Standardfehler berechnet (Konfidenzintervall 68 %).

Aus diesen Diagrammen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden die EC₅₀-Werte bei der Testung auf agonistische Wirkung bzw. die IC₅₀-Wert bei der Testung auf antagonistische Wirkung graphisch bestimmt. Für diese Arbeit wurde als EC₅₀- bzw. IC₅₀-Wert diejenige Konzentration angegeben, bei der 50 % der maximalen E2-Wirkung erzielt bzw. auf diese reduziert wurde.

Die agonistische bzw. antagonistische Potenz einer Verbindung in Form des EC₅₀- bzw. IC₅₀-Werts in den verschiedenen Transaktivierungsassays wurden miteinander verglichen, um Aussagen über eine mögliche Selektivität oder Präferenz bezüglich der ER-Subtypen treffen zu können (siehe Abbildung 3.1.3

Seite 78). Dazu wurden jeweils die graphisch ermittelten EC_{50} - bzw. IC_{50} -Werte der Transaktivierungsassays an $ER\beta$ bzw. an der MCF-7-2a-Zelllinie zu dem an $ER\alpha$ ins Verhältnis gesetzt (siehe Gleichung 3.1.2). Der gebildete Quotient gibt das n-fache der Wirkung einer Verbindung an $ER\alpha$ im Vergleich zu $ER\beta$ bzw. der MCF-7-2a-Zelllinie wieder. Ist der EC_{50} - bzw. IC_{50} -Wert an $ER\beta$ geringer, d.h. ist die Verbindung an $ER\beta$ wirksamer als an $ER\alpha$, wird der EC_{50} -Werte an $ER\alpha$ zu dem an $ER\beta$ in Verhältnis gesetzt. Der Quotient gibt in diesem Fall die n-fache Wirkung an $ER\beta$ an. Beträgt der Quotient eins, liegt keine Diskriminierung zwischen zwei Testsystemen vor.

$$n - \text{fache Wirkung von } ER\alpha = \frac{EC_{50} (IC_{50})_{MCF-7-2a-Zellen \text{ bzw. } ER\beta}}{EC_{50} (IC_{50})_{ER\alpha}}$$

$$n - \text{fache Wirkung von } ER\beta = \frac{EC_{50} (IC_{50})_{ER\alpha}}{EC_{50} (IC_{50})_{ER\beta}}$$

Gleichung 3.1.2 Quotientenbildung zum Vergleich der Potenz am ER in verschiedenen Transaktivierungsassays

Mit Hilfe des EC_{50} -Werts des E2 in dem jeweiligen Transaktivierungsassay ($ER\alpha = 0.0015$ nM; $ER\beta = 0.010$ nM; MCF-7-2a-Zelllinie = 0.045 nM) kann die relative Transkriptionspotenz (RTP) berechnet werden (siehe Gleichung 3.1.3) [131].

$$RTP = \frac{EC_{50} E2}{EC_{50} \text{ Testverbindung}} \times 100 [\%]$$

Gleichung 3.1.3 Berechnung des RTP-Wertes

Der RTP-Wert stellt ein Maß für die agonistische Potenz einer Verbindung bezogen auf E2 dar. Definitionsgemäß beträgt der RTP-Wert für E2 100.

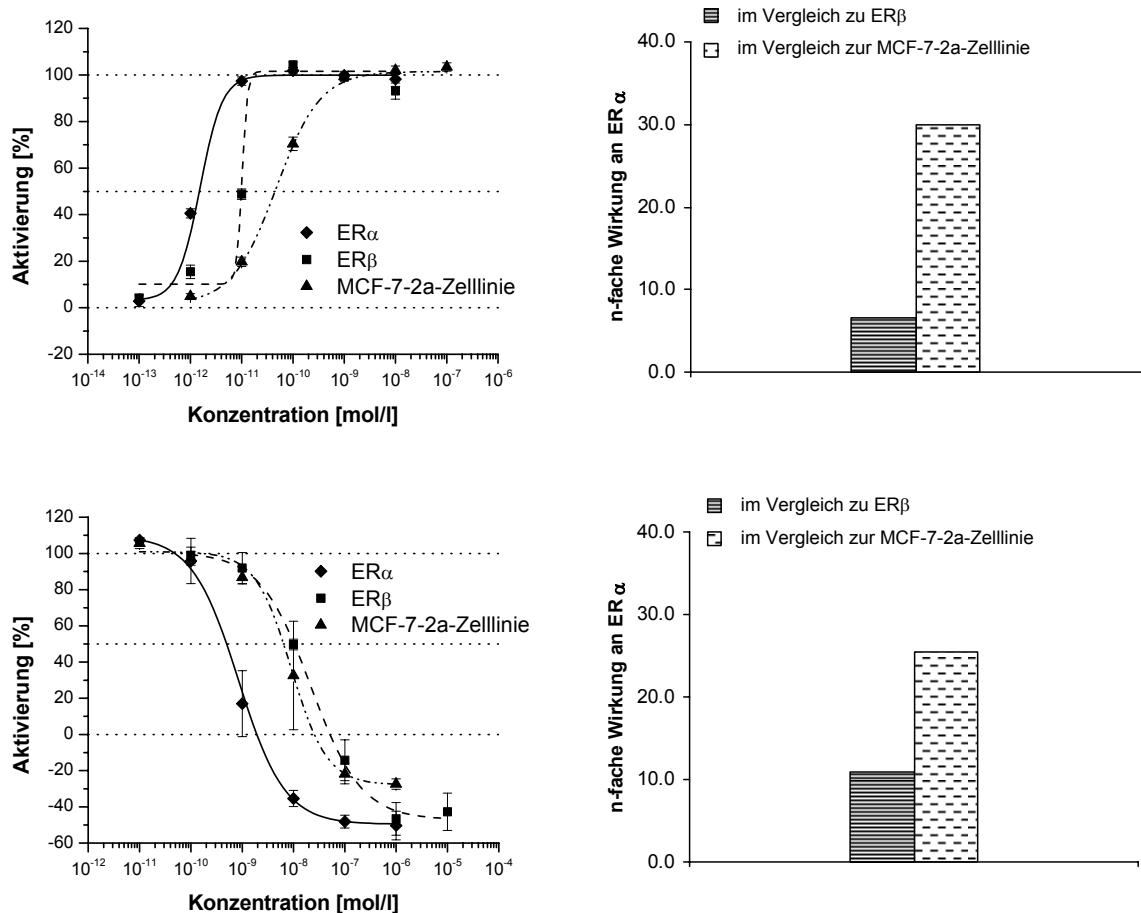


Abbildung 3.1.3 Oben: links: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von E2 an ER α , ER β und der MCF-7-2a-Zelllinie; rechts: Verhältnis der EC₅₀-Werte von E2 in den verschiedenen Transaktivierungsassays
unten: links: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Raloxifen bei gleichzeitige Inkubation mit E2 (ER α : 0.030 nM; ER β : 0.30 nM; MCF-7-2a-Zelllinie: 1.0 nM); rechts: Verhältnis der IC₅₀-Werte von Raloxifen in den verschiedenen Transaktivierungsassays

3.1.2 *In vitro* Zytotoxizitätstest

Parallel zum Transaktivierungsassay wurde mittels Kristallviolett färbung die Zellmasse bestimmt, um hierauf die Messwerte zu beziehen. Ergaben sich hierbei Hinweise auf Zytotoxizität, wurden die entsprechenden Verbindungen auf ihre antiproliferativen Eigenschaften hin an verschiedenen Zelllinien untersucht. Der Zytotoxizitätstest ist ein kinetischer Test, bei dem die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen über verschiedene Zeitspannen mit den Zellen inkubiert werden. Zur Ermittlung der Wirkkinetik wird nach fünf aufeinander folgenden Zeitpunkten die Inkubation beendet. Als Kontrolle für Wachstum ohne Substanzen dient das verwendete Lösungsmittel in entsprechender Konzentration. Die antiproliferative Eigenschaft einer Substanz wird über die veränderte

Zellmasse, die zur Zellmenge proportional ist, in Monolayerkulturen bestimmt. Dabei wird die Zellmasse nach der Inkubation (T^*) zu der zu Beginn der Inkubation (C_0) vorliegenden Ausgangszellmenge, jeweils korrigiert um den Lösungsmiteleinfluss (C^*), ins Verhältnis gesetzt (siehe Gleichung 3.1.4). Die Zellmasse wird über ein kolorimetrisches Verfahren durch Anfärbung der Zellen, vor allem von DNA-assoziierten Nukleoproteinen, mit Kristallviolett bestimmt [132]. Nach dem Anfärben wird der Farbstoff wieder extrahiert und der Extrakt photometrisch vermessen (590 nm). Nach Spruß korreliert die Extinktion mit der Zellmasse [133]. Aus den erhaltenen Daten kann die zytotoxische Wirkung (relative prozentuale Wachstumshemmung T/C_{corr}) der untersuchten Verbindungen nach Gleichung 3.1.4 (links) berechnet werden.

Bei zytoziden Verbindungen ist der Mittelwert der Extinktion der behandelten Kulturen (T^*) geringer als die des Ausgangswertes (C_0). Nach Skehan [134] wird die Zellmenge der Kontrollkultur (C^*) in die Berechnung zur Quantifizierung der Wirkung nicht miteinbezogen. Anstelle von T/C_{corr} wird deshalb der τ -Wert nach Gleichung 3.1.4 (rechts) berechnet.

$$T/C_{\text{corr}} = \frac{T^* - C_0}{C^* - C_0} \times 100 [\%] \qquad \tau = \frac{T^* - C_0}{C_0} \times 100 [\%]$$

- T^* : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der behandelten Kulturen
- C^* : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der Kontrollkulturen (ausschließlich mit Lösungsmittel behandelte Kulturen)
- C_0 : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der Kulturen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe (Ausgangszellmenge)

Gleichung 3.1.4 Berechnung der zytotoxischen (links) bzw. zytoziden (rechts) Wirkung

Innerhalb eines Tests wurden pro Zeitpunkt und Testverbindung 16 Messwerte bestimmt, aus denen wie beschrieben die relative prozentuale Wachstumshemmung ermittelt wird. Als Fehlergrenzen wurde die Standardabweichung aus einem Testdurchlauf angegeben.

Die ermittelten Werte, über die die antiproliferativen Eigenschaften der Testsubstanzen bewertet werden, werden nach folgender Einteilung interpretiert:

$T/C_{\text{corr}} > 80\%$	keine antiproliferative Wirkung
$T/C_{\text{corr}} < 80\%$	antiproliferative Wirkung
$0\% < T/C_{\text{corr}} < 20\%$	zytostatische Wirkung
$T/C_{\text{corr}} < 0\%$ ($\rightarrow T/C_{\text{corr}} = \tau$)	zytotoxische Wirkung

Unter zytotoxischer Wirkung wird jede negative Beeinflussung des Zellwachstums verstanden.

3.1.2.1 MCF-7-Zelllinie

Die MCF-7-Zelllinie (Michigan Cancer Foundation) ist eine humane Mammatumorzelllinie, die 1970 aus dem malignen Pleuraerguss einer Patientin gewonnen wurde, deren metastasierendes, duktales Mammaadenokarzinom zuvor drei Jahre lang mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war [135].

Die weit verbreitete und gut charakterisierte Zelllinie besitzt unter anderem Rezeptoren für Estrogene, Androgene und Progesteron und gilt deshalb als hormonsensitive Zelllinie [136]. Sie hat einen hohen ER-Gehalt von 70 bis 90 fmol/mg Protein [137, 138]. Sie ist aber auch für andere Substanzen ohne hormonelle Wirkung, wie z.B. Platinkomplexe, sensitiv. Die epithelialen Zellen wachsen in rosettenförmiger Anordnung im Monolayer und besitzen einen hohen Differenzierungsgrad. Die Generationszeit für die MCF-7-Zelllinie beträgt $34.4 \text{ h} \pm 2.5 \text{ h}$ [117].

3.1.2.2 MDA-MB-231-Zelllinie

Die MDA-MB-231-Zelllinie ist ebenfalls eine aus einem malignen Pleuraerguss gewonnene Mammakarzinomzelllinie. Sie wurde 1974 von einer Patientin mit metastasierenden, duktalem Mammakarzinom etabliert, die drei Wochen zuvor mit Chemotherapeutika behandelt worden war [139]. Estrogen- und Progesteronrezeptoren konnten in ihr nicht nachgewiesen werden, und so gilt sie als hormoninsensitive Zelllinie [140]. Die epithelialen Zellen wachsen als Monolayer und besitzen einen geringeren Differenzierungsgrad. Die Generationszeit für die MDA-MB-231-Zelllinie beträgt $19.3 \text{ h} \pm 5.0 \text{ h}$ [117].

3.2 Testergebnisse am Estrogenrezeptor

Die hier untersuchten Verbindungen mit 1,2-Diarylethan-Phamakophor wurden von verschiedenen Wissenschaftlern dargestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Eine Aufstellung ihrer Quellen sind im Anhang (Kapitel 6.1 Seite 186 ff) aufgeführt. Die Quellen der kommerziell erhältlichen Estrogene und Antiestrogene sind bei den Materialien in Kapitel 5.1.4 (Seite 158 ff.) verzeichnet.

3.2.1 Untersuchung estrogen wirksamer Verbindungen

Sowohl mit den neu etablierten als auch dem bereits bestehenden Transaktivierungsassay wurden Verbindungen mit bekannter estrogen Wirkung untersucht. Neben Estradiol (E2), dem natürlichen ER-Agonisten wurden die beiden synthetischen Estrogene DES und HEX sowie das Phytoestrogen GEN auf ihre estrogen Wirkung untersucht (siehe Tabelle 3.2.1 und Abbildung 3.2.1).

Verbindung	ER α		ER β		MCF-7-2a-Zelllinie	
	EC ₅₀ [nM]	RTP [%]	EC ₅₀ [nM]	RTP [%]	EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
E2	0.0015	100	0.010	100	0.045	100
DES	0.010	15	0.012	83	0.41	11
HEX	0.010	15	0.018	56	0.15	30
GEN	5.5	0.027	0.19	5.3	30	0.15

Tabelle 3.2.1 Agonistische Wirkung verschiedener Estrogene an ER α , ER β und der MCF-7-2a-Zelllinie

Alle hier getesteten Estrogene wirkten in den Testsystemen als volle Agonisten am ER, wobei ihre Potenz unter der von E2 in dem jeweiligen Transaktivierungsassay lag (RTP < 100 %).

In den neuen Transaktivierungsassays mit den ER-Subtypen war E2 jeweils ein voller Agonist. Seine Potenz an ER α war dabei aber im Größenbereich einer log-Einheit höher als an ER β . Seine EC₅₀-Werte betragen an ER α 0.0015 nM und an ER β 0.010 nM. An der MCF-7-2a-Zelllinie lag der EC₅₀-Wert bei 0.045 nM.

DES und HEX zeigte keinen Unterschied in der Potenz zwischen ER α und ER β . An den ER-Subtypen wurde auch kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den synthetischen Estrogenen beobachtet. DES zeigte an ER α einen EC₅₀-Wert von 0.010 nM und an ER β von 0.012 nM. Bei HEX beträgt der EC₅₀-Wert an ER α 0.010 nM und an ER β 0.018 nM. An der MCF-7-2a-Zelllinie lagen die EC₅₀-Werte dieser beiden Estrogene mit 0.41 nM für DES und 0.15 nM für sein Ethanderivat sehr nahe beieinander. DES ist das dem HEX analoge Stilben. Die Ergebnisse bestätigten die Vorstellung, dass HEX durch freie Drehbarkeit um die Ethanbindung eine antiperiplanare Konformation einnehmen kann, die eine dem DES analoge Assoziation in der LBD des ER ermöglicht. Genau wie DES kann HEX zu den Typ-I-Estrogenen eingeordnet werden.

Das Phytoestrogen GEN konnte in alle drei Testsystemen eine Stimulation über die maximale von E2 erreichbare Aktivierung (100 %) hinaus bewirken. Den niedrigsten EC₅₀-Wert mit 0.19 nM wurden von GEN im Transaktivierungsassay an ER β erzielt. Damit ist GEN an ER β ca. 30-mal wirksamer als an ER α . Im Vergleich zu DES und HEX ist es allerdings an ER β um den Faktor 10 schlechter wirksam.

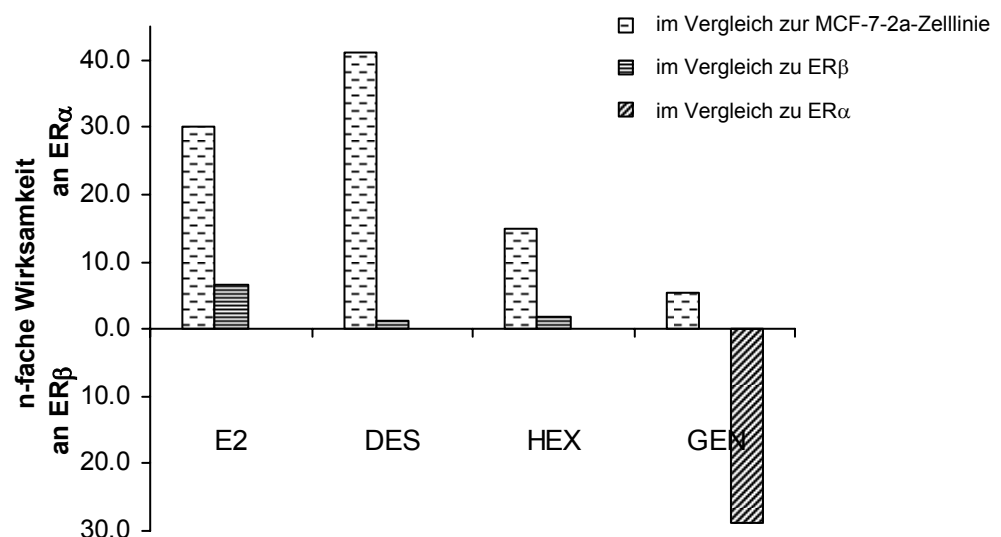


Abbildung 3.2.1 Vergleich der agonistischen Wirkung von Estrogenen in den verschiedenen Transaktivierungsassays

Beim Vergleich der erzielten Ergebnisse im Assay mit ER α und der MCF-7-2a-Zelllinie zeigte sich, dass alle Verbindungen an ER α einen niedrigeren EC₅₀-

Wert erzielen. Bis auf GEN lag zwischen den Ergebnissen in den beiden Testsystemen mindestens eine *log*-Einheit (siehe Abbildung 3.2.1).

Aus den Untersuchungen ergab sich folgende Reihenfolge der agonistischen Potenz am ER bezüglich der Assays als auch im Verhältnis der Verbindungen untereinander:

$$\text{ER}\alpha \geq \text{ER}\beta > \text{MCF-7-2a-Zelllinie}$$

$$\text{E2} > \text{DES} \approx \text{HEX} > \text{GEN}$$

3.2.2 Untersuchung antiestrogen wirksamer Verbindungen

Antiestrogen wirksame Verbindungen wurden ebenfalls mit den Transaktivierungsassays untersucht (siehe Tabelle 3.2.2 und Abbildung 3.2.2). Die Triarylalkene TAM und OHT gehören wie das Benzothiophenderivat RAL zu den SERM mit gewebeabhängigem antiestrogenem Wirkprofil. FUL ist ein antiestrogenes E2-Derivat (vgl. Kapitel 1.2 Seite 26 ff.).

Verbindung	ER α IC ₅₀ [nM]	ER β IC ₅₀ [nM]	MCF-7-2a-Zelllinie IC ₅₀ [nM]
TAM	70	70	660
OHT	1.8	11	8.1
RAL	0.55	6.0	14
FUL	0.28	0.31	4.0

Tabelle 3.2.2 Antagonistische Wirkung verschiedener Antiestrogene an ER α , ER β und der MCF-7-2a-Zelllinie (C_{E2} in den Konkurrenzexperimenten: ER α : 0.030 nM; ER β : 0.30 nM; MCF-7-2a-Zelllinie: 1.0 nM)

Von den vier Verbindungen zeigte sich TAM in allen Assays als schwächste antiestrogen wirksame Verbindung. Seine IC₅₀-Werte lagen mit 70 nM an ER α und ER β und 660 nM bei der MCF-7-2a-Zelllinie in hohen Konzentrationsbereichen.

Sein physiologische Hauptmetabolit OHT wies eine um mindestens den Faktor 10 höherer antiestrogenen Potenz auf. Dies entspricht der Einordnung von TAM als Prodrug, das durch Hydroxylierung in *para*-Position des 1-Phenylrings zum 4-Hydroxytamoxifen (OHT) aktiviert wird. Wie aus der Röntgenkristallstruktur bekannt, ist die Ausbildung der zweiten Wasserstoffbrückenbindung

zu His⁵²⁴ (475)^c dadurch möglich [89]. Durch die Wirksteigerung zu OHT wurde die Bedeutung dieses zweiten Ankerpunktes in der LBD unterstrichen und bestätigt. An ER α erwies sich OHT mit einem IC₅₀-Wert von 1.8 nM als 6-mal potenter als an ER β mit einem IC₅₀-Wert von 11 nM.

Mit Ausnahme des Tests an ER α zeigte RAL eine antiestrogene Wirkung wie OHT. Mit einem IC₅₀-Wert von 0.55 nM an ER α war seine Wirkung hier um ca. $\frac{1}{2}$ log-Einheit besser als bei OHT. RAL wies eine ca. 10-mal höhere Antiestrogenität an ER α als an ER β auf und zeigt damit eine ER α -Selektivität.

FUL erwies sich in allen drei Assays als wirksamstes Antiestrogen, wobei es an ER α und ER β mit einem IC₅₀-Wert von 0.28 nM bzw. 0.31 nM gleich stark wirksam war.

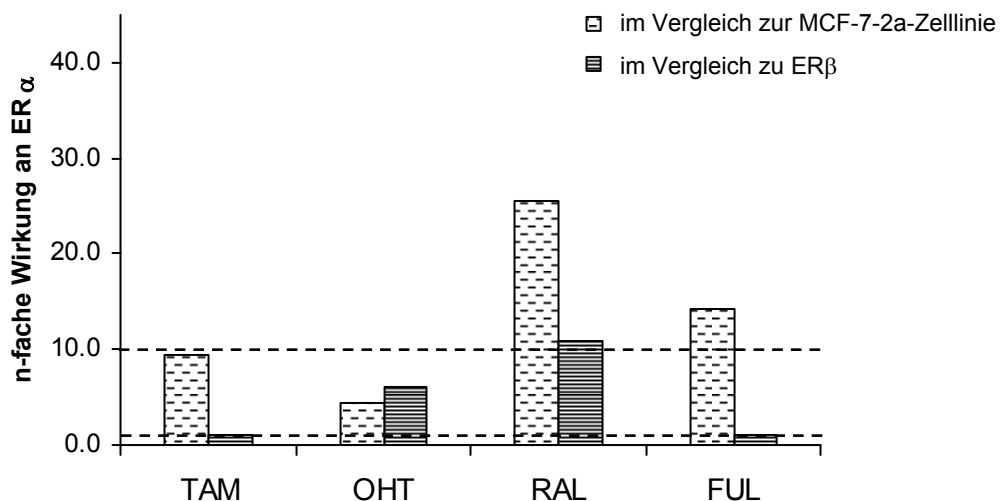


Abbildung 3.2.2 Vergleich der antagonistischen Wirkung von Antiestrogenen in den verschiedenen Transaktivierungsassays

Wie bei den Estrogenen zeigten sich die Antiestrogene im Vergleich der Tests an ER α und an der MCF-7-2a-Zelllinie an ER α um den Faktor 10 bis 25 besser wirksam.

Keine der vier Verbindungen zeigten in den drei Transaktivierungsassays eine agonistische Wirkung.

^c Die Angabe in Klammern bezieht sich auf die korrespondierende Position der Aminosäure in ER β .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich für die getesteten Antiestrogene in allen drei Assays folgende Reihenfolgen der antiestrogenen Potenz am ER sowohl bezüglich der Assays als auch der verschiedenen Verbindungen ergab:

$$\text{ER}\alpha \geq \text{ER}\beta \geq \text{MCF-7-2a-Zelllinie}$$
$$\text{FUL} > \text{RAL} \geq \text{OHT} > \text{TAM}$$

3.2.3 Untersuchung antiestrogen wirksamen Verbindungen auf Zytotoxizität

Bei den Transaktivierungsassays mit den Antiestrogenen fiel auf, dass die Messwerte im hohen Konzentrationsbereich unterhalb der LM-Kontrolle lagen. Die Ansätze für den Kristallviolettassay wiesen auf reduzierte Zellzahl hin, so dass mit den Antiestrogenen Zytotoxizitätstest durchgeführt wurden.

Bei FUL zeigten sich in Abhängigkeit der Zelllinie unterschiedliche Einflüsse auf die Zellproliferation. In Tabelle 3.2.1 sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests an der MCF-7-, U-2OS- und MDA-MB-231-Zelllinie zusammengefasst. Auffällig ist, dass die Hemmung der Zellproliferation an hormonabhängigen MCF-7-Zellen schon bei geringen Konzentrationen (0.5 nM) einsetzt. An hormonunabhängigen MDA-MB-231-Zellen werden zwar minimale T/C-Werte unter 80 % bei 10.0 und 5.0 μM erreicht, könnten aber auf Artefakte zurückzuführen sein. Im zeitlichen Verlauf zeigt FUL an dieser Zelllinie aber keine antiproliferative Wirkung mit durchschnittlichen Werten über 85 %. Nur an der U-2OS-Zelllinie zeigte FUL ab einer Konzentration von 5.0 μM eine antiproliferative Wirkung.

Der Maximaleffekt variierte ebenfalls stark zwischen hormonabhängigen und hormonunabhängigen Zellen. In Konzentrationen von 5.0 nM bis 1.0 μM zeigte FUL an MCF-7-Zellen eine reproduzierbare Kinetik der maximalen Proliferationshemmung. Maximal wurden bei 5.0 nM minimale T/C_{corr} -Werte nach 119.4 h von 11.2 % (± 0.43 %) erreicht. An U-2OS-Zellen lagen die minimalen T/C_{corr} -Werte bei 52.7 % (± 9.81 %).

FUL		Minimale T/C _{corr} -Werte [%]					
<i>MCF-7-Zelllinie</i>							
5.0 nM	t _{min} [h]	1.0 nM	t _{min} [h]	0.5 nM	t _{min} [h]	0.1 nM	t _{min} [h]
11.4	168.1	39.2	120.9	57.5	120.9	98.3	120.9
<i>U-2OS-Zelllinie</i>							
10.0 µM	t _{min} [h]	5.0 µM	t _{min} [h]	1.0 µM	t _{min} [h]		
52.7	140.9	60.9	140.9	74.1	70.4		
<i>MDA-MB-231-Zelllinie</i>							
10.0 µM	t _{min} [h]	5.0 µM	t _{min} [h]	1.0 µM	t _{min} [h]		
79.1	50.2	72.2	50.2	90.3	118.1		

Tabelle 3.2.3 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests von FUL an verschiedenen Zelllinien

FUL zeigte eine ausgeprägte hormonrezeptorabhängige Zytotoxizität als Folge seiner antiestrogene Wirkung.

Die Kontrollplatten für den Kristallviolettassay wurden mit nicht transfizierten U-2OS Zellen angesetzt, so dass die aus ihnen erhaltenen toxischen Einflüsse nicht genau denen im transienten Transfektionsexperiment entsprachen. Die bei der Behandlung mit FUL beobachtete Zellreduktion in den Kontrollplatten ist im Vergleich zur RLU-Reduktion in hohen Konzentrationen weniger stark ausgeprägt. Der starke Abfall der RLU-Messwerte lässt darauf schließen, dass toxischen Einflüsse bei den transfizierten Zellen höher ist als bei den Kontrollplatten.

Die drei hier getesteten SERM zeigten in ihrer zytotoxischen Wirkung nur wenig Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. In der niedrigsten Konzentration (1.0 µM) wirkten TAM, OHT und RAL nur an der MCF-7-Zelllinie antiproliferativ. In der höchsten Konzentration von 10.0 µM zeigten alle drei Verbindungen eine zytotoxische Wirkung an den drei Zelllinien; die Daten sind in Tabelle 3.2.4 zusammengefasst.

Verbindung	Minimale T/C _{corr} -Werte bei 10.0 µM					
	MCF-7-Zelllinie		U-2OS-Zelllinie		MDA-MB-231-Zelllinie	
	T/C _{corr} [%]	t _{min} [h]	T/C _{corr} [%]	t _{min} [h]	T/C _{corr} [%]	t _{min} [h]
TAM	21.6	141.0	37.5	143.8	26.7	97.4
OHT	7.1	68.8	-19.1	26.7	4.2	168.7
RAL	9.5	141.0	16.7	143.8	13.2	121.4

Tabelle 3.2.4 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der SERM TAM, OHT und RAL an verschiedenen Zelllinien

TAM zeigte nur antiproliferative Wirkungen an den Zellen während sein aktiver Metabolit OHT zytostatisch an den beiden Brustkrebszelllinien wirkte, an U-2OS-Zellen sogar in der höchst getesteten Konzentration zytozide Eigenschaften aufwies. Wie schon bei den antiestrogenen Wirkungen zeigten OHT und RAL auch ähnlich starke zytostatische Effekte (MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen).

Auf Grund der selektiven zytotoxischen Wirkung von FUL ist es nur sinnvoll die antiproliferativen Eigenschaften der getesteten Antiestrogene an MCF-7-Zellen zu vergleichen. Unter der Annahme, dass die Kinetik der Wachstumshemmung von FUL über 1.0 µM den beobachteten Verlauf beibehielte, würden sich die minimal erreichten T/C_{corr}-Werte der einzelnen Verbindung bei 10.0 µM im zytostatischen Bereich von 15.0 bis 10.0 % bewegen. Eine Differenzierung im erzielten Effekt zeigte sich bei den Antiestrogenen nicht. Unter Einbezug der geringen Konzentration von FUL, bei der diese Effekte eintraten (5 nM), war es an der hormonabhängigen Zelllinie MCF-7 um den Faktor 2000 wirksamer als die SERM. Dementsprechend ergab sich für die zytotoxischen Eigenschaften der Antiestrogene folgende Reihenfolge:

$$\text{FUL} \gg \text{RAL} = \text{OHT} > \text{TAM}$$

Die hormonvermittelte Zytotoxizität von FUL ist genotropen Ursprungs. FUL weist keine agonistische oder antagonistische Wirkung in einem Schweinekoronararterienmodell auf. Dies ist ein Testmodell für membranär vermittelte estrogenische Effekte, bei dem E2 und RAL eine calciuminduzierte Kontraktion der

Schweinkoronararterie hemmen.^d In der Aktivität von RAL am mER kann auch eine Erklärung für die 28-mal höhere Aktivität in dem neuen ER α -Assay als in dem ebenfalls auf ER α basierenden Test mit MCF-7-2a-Zellen liegen.

3.2.4 Untersuchung verschiedener Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement

Leitstruktur der hier getesteten Verbindungen ist das nicht steroidale Estrogen HEX mit 1,2-Diarylethan-Pharmakophor (vgl. Kapitel 1.3 Seite 41 ff.). Der 1,2-Diarylethan-Pharmakophor wurde in verschieden stickstoffhaltige Grundkörper integriert. Zur Kompensation der durch den Stickstoff vermittelten Hydrophilie wurden insgesamt drei Chloratome in Positionen 4 bzw. 2 und 4 der Aromaten - ein Substitutionsmuster, das sich in Bindungsstudien als optimal herausgestellt hat - eingeführt [114]. Mit dem 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement wurden der Einfluss des Grunkörpers, die Substitution in Position 4 der Arylreste sowie die Konfiguration des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors auf die estrogenen Aktivität offenkettiger Typ-I- und zyklischer Typ-II-Estrogene untersucht.

^d persönliche Mitteilung Moritz

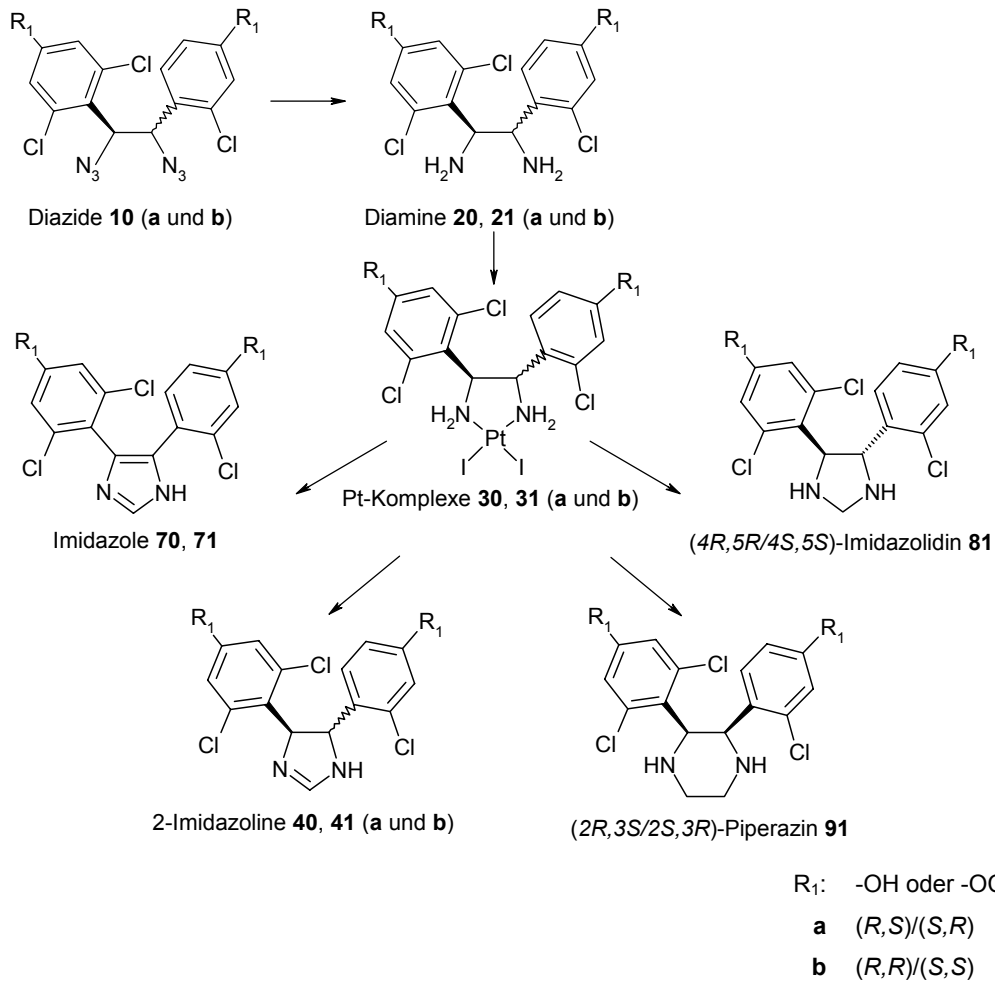


Abbildung 3.2.3 Verbindungen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement

3.2.4.1 Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie

Verbin- dung	R ₁	Konfiguration	relative		EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
			Aktivierung [%] bei 1 µM	Aktivierung [%] bei 10 µM		
10 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)	58.6	- ^I	400	0.011
10 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)	25.4	- ^I	-	-
20 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)		6.2	-	-
20 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)		-4.2	-	-
21 a	4-OH	(1R,2S)/(1S,2R)	80.5	- ^I	71	0.063
21 b	4-OH	(1R,2R)/(1S,2S)	59.0	- ^I	790	0.006
30 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)	3.5	- ^I	-	-
30 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)	0.4	- ^I	-	-
31 a	4-OH	(1R,2S)/(1S,2R)		104.6	120	0.036
31 b	4-OH	(1R,2R)/(1S,2S)		80.6	1900	0.002
40 a	4-OCH ₃	(4R,5S)/(4S,5R)	1.4	- ^I	-	-
40 b	4-OCH ₃	(4R,5R)/(4S,5S)	-4.1	- ^I	-	-
41 a	4-OH	(4R,5S)/(4S,5R)		91.3	180	0.025
41 b	4-OH	(4R,5R)/(4S,5S)		47.5	-	-
70	4-OCH ₃		1.2	- ^I	-	-
71	4-OH			46.7	-	-
81	4-OH	(4R,5R)/(4S,5S)		60.1	580	0.008
91	4-OH	(2R,3S)/(2S,3R)		43.2	-	-

Tabelle 3.2.5 Agonistische Wirkung der Verbindungen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement an der MCF-7-2a-Zelllinie;^I: Werteabfall im Vergleich zur niedrigeren Konzentration

Mit Ausnahme der Diazide **10 a** und **b** zeigten die in Position 4 der Arylringe methoxysubstituierten Verbindungen keine bzw. geringe (**20 a**: 6.2 % rel. Akt. bei 10 µM) estrogenere Aktivität.

Mit 4-Hydroxy-Substitution in den Phenylresten wies das an der Ethanbrücke (R,S)/(S,R)-konfigurierte Racemat jeweils eine höhere Wirksamkeit auf. Im Ver-

gleich zu E2 erreichten nicht alle (R,R)/(S,S)-konfigurierten Verbindungen 50 % relative Aktivierung. Sofern eine Aktivität gezeigt wurde, war diese gering und spiegelte sich in sehr geringen RTP-Werten zwischen 0.008 % (Imidazolidin **81**) und 0.002 % (Pt-Komplex **31 b**) wieder.

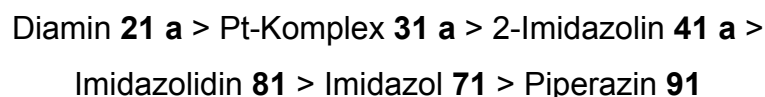
Die Wirkung des (R,S)/(S,R)-konfigurierten Diamins **21 a** war mit einem EC₅₀-Wert von 71 nM ca. 10-mal wirksamer als das (R,R)/(S,S)-konfigurierte Diastereomer mit einem EC₅₀-Wert von 790 nM. **21 a** wies mit 0.063 % auch den höchsten RTP-Wert auf.

Der Platinkomplex **31 a** mit (R,S)/(S,R)-Konfiguration (EC₅₀=120 nM) ist ca. 15-mal wirksamer als sein diastereomerer Komplex **31 b**, dessen EC₅₀-Wert bei 1900 nM lag. Mit 0.036 % lag der RTP-Wert von **31 a** innerhalb der zyklischen Verbindungen am höchsten.

Bei den 2-Imidazolinen erreichte das (R,R)/(S,S)-Racemat (**41 b**) nicht die maximale durch E2 erreichbare Wirkung. Bei einer Konzentration von 10 µM erzielte es mit 47.5 % Aktivierung nur ca. die Hälfte der estrogene Aktivität des (R,S)/(S,R)-konfigurierten 2-Imidazolins (**41 a**) (91.3 % Aktivität bei 10 µM).

Der RTP-Wert von **41 a** war mit 0.025 % im Bereich desjenigen von **31 a** (Pt-Komplex) und spiegelt eine gute Wirkung wieder.

Der Vergleich der verschiedenen Grundkörper mit (R,S)/(S,R)-Konfiguration des 1,2-Diarylethan-Strukturelements (Ausnahme **81**) und Hydroxygruppe in Position 4 der beiden Phenylreste zeigte sich folgende Reihenfolge der estrogenen Potenz:



Trotz Methoxysubstituenten in *para*-Position der Phenylringe wies das (R,S)/(S,R)-konfigurierte Diazid **10 a** eine estrogene Aktivität von 58.6 % bei einer Konzentration von 1 µM aus. Bei beide Diastereomere konnte einen Abfall der Messwerte bei Konzentrationen über 1 µM beobachtet werden, der für das (R,S)/(S,R)-konfigurierte Diazid stärker war, und eine Toxizität vermuten ließ. Diazid **10 a** zeigte dennoch mit 0.011 % einen guten RTP-Wert.

Die Pt-Komplexe **30 a** und **b** führten bei einer Konzentration von 10 µM zu einem so starken Abfall der Messwerte aufgrund von Zelldezimierung, dass keine Auswertung möglich war.

3.2.4.2 Agonistische Wirkung an ER α

Verbin- dung	R ₁	Konfiguration	relative		EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
			Aktivierung [%] bei 1 μ M	bei 10 μ M		
10 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)		44.5	-	-
10 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)		44.1	-	-
20 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)		26.3	-	-
20 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)		-11.4	-	-
21 a	4-OH	(1R,2S)/(1S,2R)		110.0	2.8	0.054
21 b	4-OH	(1R,2R)/(1S,2S)		105.3	16	0.009
30 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)	75.9	- ^I	310	0.001
30 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)	113.1	- ^I	100	0.002
31 a	4-OH	(1R,2S)/(1S,2R)		101.2	2.5	0.060
31 b	4-OH	(1R,2R)/(1S,2S)		110.7	41	0.004
40 a	4-OCH ₃	(4R,5S)/(4S,5R)		2.7	-	-
40 b	4-OCH ₃	(4R,5R)/(4S,5S)	-66.8	- ^I	-	-
41 a	4-OH	(4R,5S)/(4S,5R)		77.4	1.8	0.083
41 b	4-OH	(4R,5R)/(4S,5S)		119.5	500	<0.001
70	4-OCH ₃		-34.6	- ^I	-	-
71	4-OH			96.2	190	0.001
81	4-OH	(4R,5R)/(4S,5S)		98.7	7.8	0.019
91	4-OH	(2R,3S)/(2S,3R)		100.4	110	0.001

Tabelle 3.2.6 Agonistische Wirkung der Verbindungen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement an ER α ; ^I: Werteabfall im Vergleich zur niedrigeren Konzentration

In Position 4 beider Phenylringe methoxysubstituierte Verbindungen zeigten mit Ausnahme der Pt-Komplexe (**31 a** und **b**) keine bzw. geringe (**20 a**: 26.3 % rel. Akt. bei 10 μ M) estrogenen Aktivität an ER α .

Im Gegensatz zur MCF-7-2a-Zelllinie wiesen die Pt-Komplexe **30** an ER α eine estrogenen Wirksamkeit auf, die bei **30 b** mit einem EC₅₀-Wert von 100 nM höher lag als bei seinem Diastereomer **30 a** mit einem EC₅₀-Wert von 310 nM. Bei

Konzentrationen über 1 μM konnten wegen toxischer Effekte die Messdaten nicht ausgewertet werden. Die RTP-Werte der Pt-Komplexe **30** sind mit 0.001 % (**30 a**) und 0.002 % (**30 b**) gering und lagen unterhalb der entsprechenden 4-hydroxysubstituierten Analoga **31 a** und **b**.

Mit Ausnahme der Pt-Komplexe **30** waren Verbindungen mit (*R,S*)/(*S,R*)-Konfiguration im 1,2-Diarylethan-Pharmakophor an $\text{ER}\alpha$ wirksamer als das entsprechende Diastereomer.

Bei Diamin **21 a** lag der EC_{50} -Wert bei 3 nM und war damit ca. 5-mal potenter als das (*R,R*)/(*S,S*)-konfigurierten Diamin **21 b** (EC_{50} -Wert: 16 nM).

31 a erzielte an $\text{ER}\alpha$ einen EC_{50} -Wert von 2.5 nM und damit eine 16-fache Wirksamkeit als **31 b** mit einem EC_{50} -Wert von 41 nM.

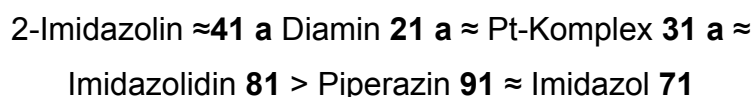
Zwischen den beiden 2-Imidazolinen **41** zeigte sich an $\text{ER}\alpha$ ein Unterschied von 2 *log*-Einheiten in der estrogenen Potenz zwischen den beiden diastereomeren Konfigurationen; **41 a** war dabei 277-mal wirksamer.

Beim Vergleich der estrogenen Wirkung an $\text{ER}\alpha$ der unterschiedlichen Grundstrukturen mit (*R,S*)/(*S,R*)-Konfiguration der Ethanbrücke des Pharmakophors und Hydroxysubstitution in Position 4 beider Phenylreste erreichten **21 a** (Diamin), **31 a** (Pt-Komplex) und **41 a** (2-Imidazolin) an $\text{ER}\alpha$ EC_{50} -Werte (1.8 nM bis 2.8 nM) in der selben Größenordnung. Die Verbindungen wiesen auch hohe RTP-Werte (0.054 % bis 0.083 %) auf.

Interessanterweise zeigte das (*R,R*)/(*S,S*)-konfigurierte Imidazolidin **81** ebenfalls eine gute estrogenen Potenz an $\text{ER}\alpha$ (EC_{50} -Wert: 7.8 nM).

Das Imidazol **71** (EC_{50} = 190 nM) und Piperazin **91** (EC_{50} = 110 nM) waren im Vergleich dazu 2 *log*-Einheiten schlechter wirksam. Die schlechte Wirksamkeit spiegelte sich auch in dem geringen RTP-Wert von 0.001 % wieder.

Für die estrogenen Wirksamkeit ergab sich an $\text{ER}\alpha$ nachstehende Reihenfolge:



Die Diazide **10** bewirkten ebenfalls trotz Methoxysubstitution in *para*-Position der beiden Arylringe eine estrogenen Aktivität an $\text{ER}\alpha$, die aber maximal bei ca. 44 % lag.

3.2.4.3 Agonistische Wirkung an ER β

Verbin- dung	R ₁	Konfiguration	relative		EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
			Aktivierung [%] bei 1 μ M	Aktivierung [%] bei 10 μ M		
10 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)		58.5	39	0.026
10 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)		57.5	1000	0.001
20 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)		21.5	-	-
20 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)		14.5	-	-
21 a	4-OH	(1R,2S)/(1S,2R)		98.1	31	0.032
21 b	4-OH	(1R,2R)/(1S,2S)		98.6	39	0.026
30 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)	60.0	- ^I	690	0.001
30 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)	99.7	- ^I	220	0.005
31 a	4-OH	(1R,2S)/(1S,2R)		91.4	2.5	0.400
31 b	4-OH	(1R,2R)/(1S,2S)		76.3	100	0.010
40 a	4-OCH ₃	(4R,5S)/(4S,5R)		-1.1	-	-
40 b	4-OCH ₃	(4R,5R)/(4S,5S)		-0.2	-	-
41 a	4-OH	(4R,5S)/(4S,5R)		102.2	5.0	0.200
41 b	4-OH	(4R,5R)/(4S,5S)		127.5	280	0.004
70	4-OCH ₃			5.7	-	-
71	4-OH			100.0	73	0.014
81	4-OH	(4R,5R)/(4S,5S)		84.6	3.5	0.286
91	4-OH	(2R,3S)/(2S,3R)		93.5	200	0.005

Tabelle 3.2.7 Agonistische Wirkung der Verbindungen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement an ER β ; -^I: Werteabfall im Vergleich zur niedrigeren Konzentration

Mit Ausnahme der Pt-Komplexe **30** und Diazide **10** zeigten die in Position 4 der Arylringe methoxysubstituierten Verbindungen keine estrogene Wirkung an ER β .

Die Pt-Komplexe **30** waren an ER β aktiv. Die estrogene Aktivität an ER β von **30 b** war dabei mit einem EC₅₀-Wert von 220 nM ca. 3-mal potenter an ER β als **30 a**.

(*R,S*)/(*S,R*)-konfigurierten Verbindungen waren mit Ausnahme bei den Diaminen **21** und den Pt-Komplexen **30** eine bis zwei 10er-Potenzen wirksamer an ER β als die jeweiligen Diastereomere. **31 a** zeigte eine um den Faktor 40 höhere estrogenische Wirksamkeit als **31 b**; **41 a** war 60-mal wirksamer als **41 b**.

Imidazolidin **81** zeigte eine estrogenische Potenz, die der von **31 a** und **41 a** entsprach und damit zu den wirksamsten Verbindungen an ER β gehörte. Ihre estrogenische Aktivität näherte sich gut an diejenige von E2 an ER β an (RTP-Wert: **31 a** = 0.400 %; **81** = 0.286 %; **41 a** = 0.200 %)

Beim Vergleich der estrogenischen Wirksamkeit der verschiedenen Grundstrukturen ergab sich folgende Reihenfolge:

Pt-Komplex **31 a** \approx Imidazolidin **81** \approx 2-Imidazolin **41 a** >

Diamin **21 a** \approx Diazid **10 a** > Imidazol **71** > Piperazin **91**

Die Diazide **10** waren estrogen aktiv, wobei ihre Wirkung 58 % nicht überschritt. **10 a** erreichte dieses Maximum bei einem Zehntel der Konzentration als sein Diastereomer **10 b**. Die RTP von **10 a** betrug dabei 0.026 % .

3.2.4.4 Zusammenfassung

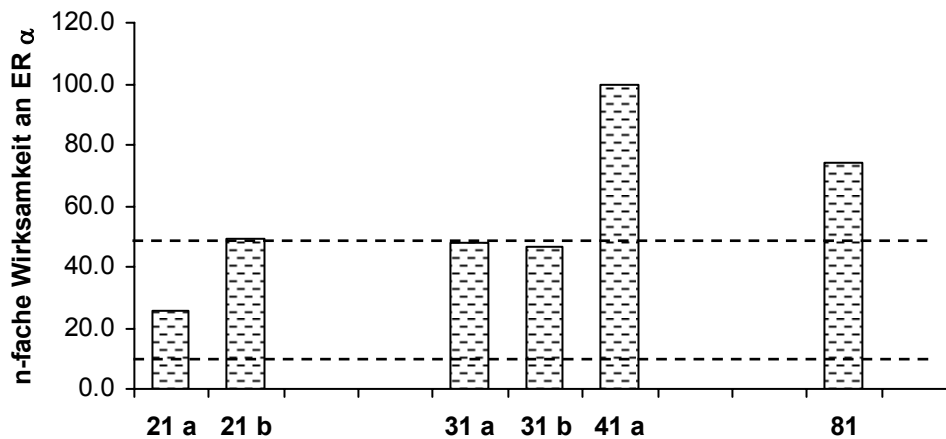
Mit wenigen Ausnahmen (**10**, **30**) erwiesen sich die Verbindungen ohne Hydroxygruppe in *para*-Position der Arylringe unwirksam am ER. Die OH-Gruppe an dieser Position konnte als essentielles Strukturelement bestätigt werden.

Nur 4-methoxysubstituierte Pt-Komplexe und Diazide zeigten eine estrogenische Aktivierung. Die Diazide **10** vermochten alle Testsysteme zu stimulieren. An ER α und ER β erreichten sie ein Plateau in der Konzentrations-Aktivierungskurve, ihre maximale Aktivierung der Systeme lag dabei aber nur bei ca. 50 %. Die Pt-Komplexe **30** konnten in den subtypspezifischen Transaktivierungsassays eine Aktivierung bewirken.

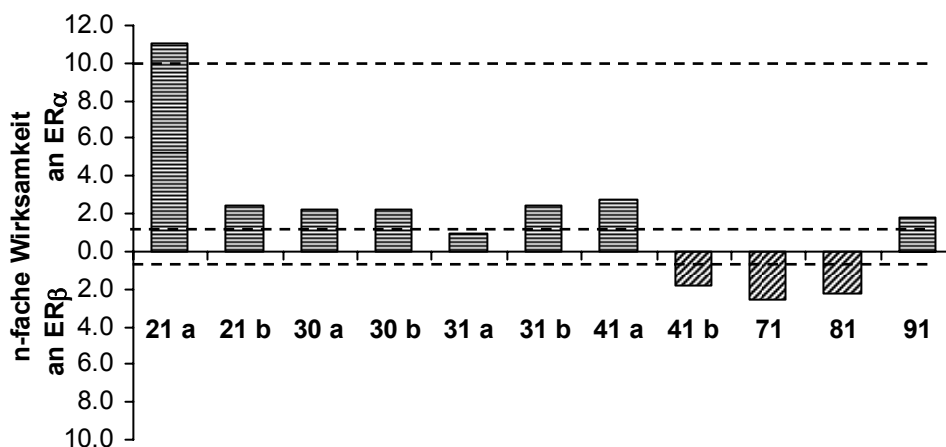
Eine (*R,S*)/(*S,R*)-Konfiguration des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors erwies sich mit Ausnahme bei den Verbindungen **30** an ER α als optimal. An ER α lag zwischen der Wirkung von **30 b** und **30 a** der Faktor 3 zugunsten der (*R,R*)/(*S,S*)-Konfiguration.

Imidazolidin **81** erwies sich interessanterweise in allen drei Transaktivierungsassays als potentes Estrogen, obwohl es (*R,R*)/(*S,S*)-konfiguriert ist. Seine

Wirksamkeit lag im Bereich der potentesten estrogen aktiven Verbindungen dieser Reihe (Pt-Komplexes **31 a** und 2-Imidazolin **41 a**). Dabei muss beachtet werden, dass unter Hydrolyse von **81** das Diamin **21 b** entstehen könnte und bei der ER-Induktion beteiligt ist.



Vergleich ER α zur MCF-7-2a-Zelllinie



Vergleich zwischen ER α und ER β

Abbildung 3.2.4 Verhältnis der EC₅₀-Werte in den verschiedenen Transaktivierungsassays

Der Vergleich der Transaktivierungsassays (siehe Abbildung 3.2.4) zeigte, dass die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der estrogen wirksamen Verbindungen an der MCF-7-2a-Zelllinie um ein bis zwei 10er-Potenzen nach rechts verschoben war. Die Wirksamkeit der Verbindungen in den neuen Assays an ER α und ER β waren besser als in dem MCF-7-2a-System.

Diamin **21 a** zeigte unter den getesteten Verbindungen eine auffällig höhere estrogene Potenz an ER α als an ER β . In Relation zu E2 ist der Unterschied der

RTP-Werte, bedingt durch die unterschiedliche Potenz von E2 an den ER-Subtypen, geringer ($ER\alpha = 0.054 \%$; $ER\beta = 0.032 \%$). Trotz geringer Wirksamkeit an der MCF-7-2a-Zelllinie (EC50-Wert = 71 nM) ist sie derjenigen von E2 am nächsten angenähert (RTP-Wert = 0.063 %)

Neben den Pt-Komplexen (**30**, **31**) wiesen das 2-Imidazolin **41 a** und das Piperazin **91** eine etwas bessere Wirksamkeit an $ER\alpha$ als an $ER\beta$ auf.

3.2.5 Untersuchung von 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin

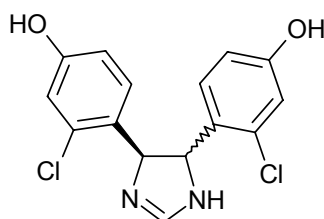


Abbildung 3.2.5 Struktur von 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin **42**

Verbin- dung	Konfiguration	relative		
		Aktivierung [%] bei 10 μ M	EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
an der MCF-7-2a-Zelllinie¹				
42 a	<i>(4R,5S)/(4S,5R)</i>	80.9	750	0.006
			an ERα	
		96.9	28	0.005
			an ERβ	
		111	22	0.046
an der MCF-7-2a-Zelllinie¹				
42 b	<i>(4R,5R)/(4S,5S)</i>	37.0	-	-
			an ERα	
		101.7	600	<0.001
			an ERβ	
		110.3	1800	<0.001

Tabelle 3.2.8 Agonistische Wirkung der Diastereomere von 4,5-Bis-(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin an der MCF-7-2a-Zelllinie, ER α und ER β (¹ bestimmt von von Rauch)

Die symmetrisch substituierten 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline **42** zeigten ebenfalls wie die dreifach chlorierten 2-Imidazoline **41** eine von der Konfiguration abhängige estrogenische Wirkung, wobei **41 a** potenter als **42 a** war. Die *(4R,5S)/(4S,5R)*-Konfiguration stellte sich je nach Testsystem als das um 21- (ER α) bis 82-fach (ER β) wirksamere Diastereomer heraus. Im Vergleich zu **41 a** lagen die EC₅₀-Werte der *meso*-Verbindung **42 a** um eine halbe bis ganze 10er-Potenz höher.

Eine Diskriminierung zwischen ER α und ER β konnten bei **42 a** nicht beobachtet werden (EC₅₀-Wert: ER α = 28 nM; ER β = 22 nM). Die EC₅₀-Werte von **42 a** war an der MCF-7-2a-Zelllinie verglichen mit der an ER α um den Faktor 25 höher und somit die Wirksamkeit geringer.

Die Wirkung der Racemate **41 b** und **42 b** differierte nur wenig. An ER β war **41 b** 6-mal potenter als **42 b** (EC₅₀-Wert: **41 b** = 280 nM; **42 b** = 1800 nM).

Beide Diastereomere zeigten in allen drei Transaktivierungsassays keine antagonistische Wirkung im Konkurrenzexperiment.

42 a war somit eine estrogen aktive Verbindung mit rein agonistischem Wirkprofil, deren RTP an den ER-Subtypen bei ca. 0.005 % lag. Im Testsystem mit MCF-7-2a-Zellen lag er ca. um den Faktor 10 höher (0.046 %).

3.2.6 Untersuchung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2*R*,3*S*)/(2*S*,3*R*)-2,3-Diarylpiperazin-Derivaten mit verschiedenen Substituenten am Heterozyklus

Die Änderung des Chlorierungsgrades der Arylreste des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors wirkt sich auf die Lipophilie des Moleküls aus. Im Vergleich der estrogenen Aktivität der 2-Imidazoline **41 a** und **42 a** zeigte, dass diese mit steigender Lipophilie zu nahm (vgl. Kapitel 3.2.5102 ff).

Durch eine Alkylierung am Heterozyklus werden ebenfalls hydrophile Moleküleigenschaften kompensiert. Ausgehend von dem 2-Imidazolin **42 a** bzw. dem analogen Piperazin wurden verschiedene Modifikationen am Heterozyklus vorgenommen, um deren Auswirkung auf die estrogene Aktivität der Verbindungen zu untersuchen. Es wurden Mono- bzw. Dialkylierungen am Stickstoff vorgenommen sowie Alkyl- oder Phenylreste in Position 2 des 2-Imidazolinrings eingeführt (siehe Abbildung 3.2.6).

Durch die Überlegenheit des 4-hydroxysubstituierten und (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-konfigurierten 1,2-Diarylethan-Pharmakophors bezüglich der Aktivität am ER wurde das (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-Strukturelement in den Verbindungen konstant gehalten (siehe Abbildung 3.2.6).

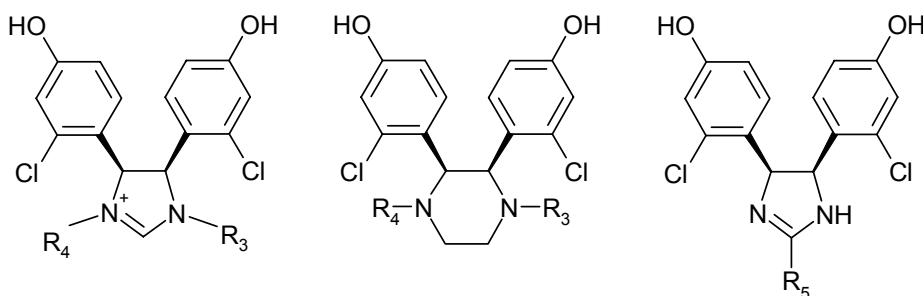


Abbildung 3.2.6 Substitutionsschema der getesteten (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline und (2*R*,3*S*)/(2*S*,3*R*)-2,3-Diarylpiperazine; Br als Gegenion bei Substitution von 2-Imidazolinen mit R₄

3.2.6.1 Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie

Verbindung	R ₃	R ₄	R ₅	relative Aktivierung [%]		EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
				bei 1 µM	bei 10 µM		
<i>(4R,5S)/(4S,5R)</i> -4,5-Diaryl-2-imidazoline							
42 a	H	-	H	80.9		750	0.006
51	Methyl	-	H	104.4		340	0.013
52	Methyl	Methyl	H	109.4		500	0.009
53	Ethyl	-	H	103.4		11	0.409
54	Ethyl	Ethyl	H	86.7		590	0.008
55	Propyl	-	H	86.2	¹	120	0.038
56	Propyl	Propyl	H		9.8	-	-
57	H	-	Methyl		11.3	-	-
58	H	-	Ethyl		28.9	-	-
59	H	-	4-OH-Phenyl		19.6	-	-
<hr/>							
	R ₃	R ₄					
<i>(2R,3S)/(2S,3R)</i> -2,3-Diarylpiperazine							
92	H	H	-	28.2		-	-
93	Ethyl	H	-	75.2		800	0.006
94	Ethyl	Ethyl	-	16.0		-	-

Tabelle 3.2.9 Agonistische Wirkung von *(4R,5S)/(4S,5R)*-4,5-Diaryl-2-imidazolinen und *(2R,3S)/(2S,3R)*-2,3-Diarylpiperazinen an der MCF-7-2a-Zelllinie; [141-143];¹: Werteabfall im Vergleich zur niedrigeren Konzentration

Während eine Derivatisierung an C-2 den Verlust der estrogenen Aktivität von 4,5-Diaryl-2-imidazolinen zur Folge hatte (**57-59**: rel. Akt. < 30 % bei 10 µM), führte eine Alkylierung an den Heteroatomen zu einer verbesserten Estrogenität an der MCF-7-2a-Zelllinie. Es ergab sich folgende Reihenfolge der estrogenen Wirksamkeit:

$$53 > 55 > 51 > 52 \approx 54 > 56$$

Als optimal erwies sich dabei eine N-Monoethylierung (**53**). Der EC₅₀-Wert von **53** lag um den Faktor 64 niedriger als bei **42 a** und erzielte in dieser Reihe mit 0.400 % den höchsten RTP-Wert.

Aus der N,N'-Dipropylierung (**56**) resultierte eine inaktive Verbindung.

Bei 2,3-Diarylpiperazinen stellte sich an der MCF-7-2a-Zelllinie nur bei N-Monoethylierung (**93**) eine estrogene Wirkung ein.

3.2.6.2 Agonistische Wirkung an ER α

Verbindung	R ₃	R ₄	R ₅	relative Aktivierung [%]		EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
				bei 1 μ M	bei 10 μ M		
<i>(4R,5S)/(4S,5R)</i> -4,5-Diaryl-2-imidazoline							
42 a	H	-	H	96.9		28	0.005
51	Methyl	-	H	94.0		1.8	0.083
52	Methyl	Methyl	H	96.0		1.9	0.079
53	Ethyl	-	H	98.3		0.42	0.357
54	Ethyl	Ethyl	H	101.2		9.8	0.015
55	Propyl	-	H	83.7	- ^I	1.9	0.079
56	Propyl	Propyl	H	76.7		3500	<0.001
57	H	-	Methyl	103.2		1200	<0.001
58	H	-	Ethyl	87.3		160	0.009
59	H	-	4-OH-Phenyl	103.2		1800	<0.001
	R ₃	R ₄					
<i>(2R,3S)/(2S,3R)</i> -2,3-Diarylpiperazine							
92	H	H	-	79.6		3900	<0.001
93	Ethyl	H	-	118.8	47.2	38	0.004
94	Ethyl	Ethyl	-	107.6	14.54	120	0.001

Tabelle 3.2.10 Agonistische Wirkung von *(4R,5S)/(5R,4S)*-4,5-Diaryl-2-imidazolinen und *(2R,3S)/(2S,3R)*-2,3-Diarylpiperazinen an ER α ; ^I: Werteabfall im Vergleich zur niedrigeren Konzentration

Modifikationen an C-2 und an den Heteroatomen des 2-Imidazolingrundgerüsts von **42 a** führten zu unterschiedlich stark estrogen aktiven Verbindungen an ER α .

Eine Derivatisierung an C-2 führte im Vergleich zu **42 a** zu Verbindungen mit 6- bis 60-fach geringerer Wirksamkeit an ER α .

Alkylierungen an den Heteroatomen von **42 a** erhöhten die estrogene Potenz um das 10- bis 100-fache. Dabei ergab sich folgende Reihenfolge:



Als optimal erwies sich dabei eine N-Monoethylierung (**53**), bei der der EC₅₀-Wert um den Faktor 67 niedriger lag als bei **42 a**. Mit 0.57 % lag der RTP-Wert von **53** am höchsten in dieser Reihe.

4,5-Diaryl-2-imidazoline mit N,N'-Dimethylierung (**52**), N-Monomethylierung (**51**) und -propylierung (**55**) waren schwächere Estrogene, zeigten aber keine Unterschiede in ihrer estrogenen Potenz an ER α (EC₅₀-Werte jeweils ca. 1.8 nM). Durch N,N'-Diethylierung (**54**) trat eine Abschwächung der estrogenen Potenz an ER α um eine 10er-Potenz ein. Aus der N,N'-Dipropylierung (**56**) resultierte eine nur noch schwach aktive Verbindung (EC₅₀ = 3500 nM).

Bei den 2,3-Diaryl-Piperazinen trat mit Ethylierung der Heteroatome eine Wirkungssteigerung an ER α um den Faktor 33 bis 100 ein, wobei das N-monoethylierte Derivat (**93**) mit einem EC₅₀-Wert von 38 nM am wirksamsten war. Der RTP-Wert von **93** lag mit 0.004 % aber ca. um den Faktor 10 niedriger als derjenige des korrespondierenden 2-Imidazolins **53**.



3.2.6.3 Agonistische Wirkung an ER β

Verbindung	R ₃	R ₄	R ₅	relative Aktivierung [%]		EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
				bei 1 μ M	bei 10 μ M		
<i>(4R,5S)/(4S,5R)</i> -4,5-Diaryl-2-imidazoline							
42 a	H	-	H	111		22	0.046
51	Methyl	-	H	90.7		6.5	0.154
52	Methyl	Methyl	H	112.4		3.9	0.256
53	Ethyl	-	H	123.5		3.1	0.322
54	Ethyl	Ethyl	H	74.7		48	0.021
55	Propyl	-	H	95.8	- ¹	4.0	0.250
56	Propyl	Propyl	H	103.5		400	0.003
57	H	-	Methyl	55.1		7000	<0.001
58	H	-	Ethyl	105.8		400	0.003
59	H	-	4-OH-Phenyl	61.9		5500	<0.001
	R₃	R₄					
<i>(2R,3S)/(2S,3R)</i> -2,3-Diarylpiperazine							
92	H	H	-	53.4		7500	<0.001
93	Ethyl	H	-	75.0		28	0.036
94	Ethyl	Ethyl	-	27.6	- ¹	-	-

Tabelle 3.2.11 Agonistische Wirkung von *(4R,5S)/(5R,4S)*-4,5-Diaryl-2-imidazolinen und *(2R,3S)/(2S,3R)*-2,3-Diarylpiperazinen an ER β , ¹: Werteabfall im Vergleich zur niedrigeren Konzentration

C-2-Derivate der 2-Imidazoline (**57-59**) waren an ER β verglichen mit **42 a** um den Faktor 18 bis 318 schwächer estrogen aktiv.

An den Heteroatomen alkylierte Derivate wiesen mit Ausnahme von **54** und **56** eine estrogenische Potenz an ER β auf, die mindestens 3-fach (**51**) höher lag als bei **42 a**. **53** mit N-Ethylgruppe war 7-mal besser wirksam als die nicht alkylierte Ausgangsverbindung **42 a**, und innerhalb dieser Reihe die wirksamste Verbindung. Seine RTP ist mit 0.322 % hoch.

Durch N,N'-Dipropylierung (**56**) wurde die estrogen Potenz um den Faktor 18 im Vergleich zu **42 a** erniedrigt ($EC_{50} = 400$ nM), und die RTP sank auf 0.003 %. Innerhalb der N-alkylierten 2-Imidazoline ergab sich nachstehende Reihenfolge

$$\mathbf{53} \approx \mathbf{55} \approx \mathbf{52} \approx \mathbf{51} > \mathbf{54} > \mathbf{56}.$$

Das N-monoethylierte 2,3-Diarylpiperazin **93** zeigte sich an ER β mit einem EC_{50} -Wert von 28 nM, der im Bereich von **42 a** lag, als wirksamstes Piperazin. Es war über 260-mal potenter als die nicht alkylierte Verbindung **92**. Sein RTP-Wert lag bei 0.036 %.

94 mit N,N'-Diethylierung war kaum noch estrogen aktiv an ER β :

$$\mathbf{93} > \mathbf{92} > \mathbf{94}.$$

3.2.6.4 Zusammenfassung

Eine Modifikation von **42 a** an den Heteroatomen durch Alkylierung führte zu einer verbesserten estrogenen Wirksamkeit von 4,5-Diaryl-2-imidazolinen. Ausnahme hierbei war in allen Transaktivierungsassays **56** mit N, N'-Dipropylierung, bei dem es zu einem Abfall der estrogenen Potenz kam.

Als optimal hat sich in allen Transaktivierungsassays die N-Monoethylierung bei **53** erwiesen.

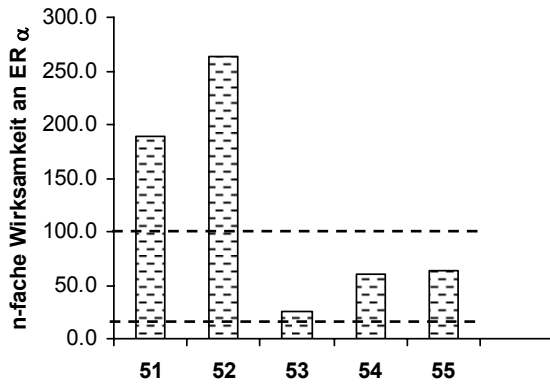
Im Vergleich zu der MCF-7-2a-Zelllinie waren die Verbindungen **51** bis **55** an ER α viel stärker wirksam. (siehe Abbildung 3.2.7)

Bei der insgesamt wirksamsten Verbindung **53** war dieser Unterschied mit dem Faktor von ca. 7 am schwächsten ausgeprägt. Verbindung **55** war über 60-mal aktiver an ER α als an der MCF-7-2a-Zelllinie. Bei **51**, **52** und **54** waren die Konzentrations-Wirkungskurven um mindestens zwei 10er-Potenzen zugunsten von ER α nach links verschoben waren. Die Verbindungen waren ca. 200- bis 300-mal wirksamer an ER α . (siehe Abbildung 3.2.7)

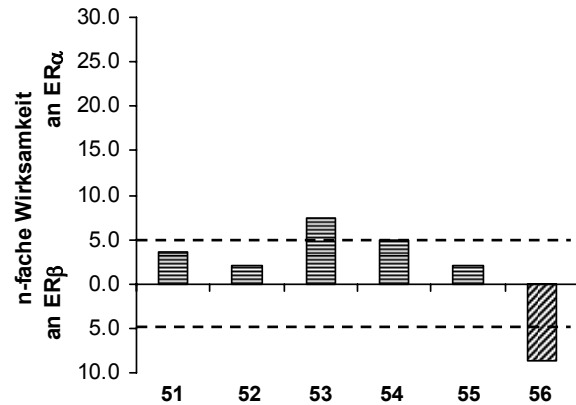
Eine Subtypdiskriminierung zeigten nur die N-ethylierten 2-Imidazoline **53** und **54**, die an ER α um den Faktor 7 bzw. 5 besser wirksam waren. (siehe Abbildung 3.2.7)

Das N,N'-dipropylierte 2-Imidazolin **56** war an ER β über 8-mal wirksamer als an ER α . (siehe Abbildung 3.2.7)

Die anderen N-alkylierten 2-Imidazoline waren an beiden ER-Subtypen ähnlich gut wirksam.



im Vergleich zur MCF-7-2a-Zelllinie



Vergleich der beiden ER-Subtypen

Abbildung 3.2.7 Vergleich der EC₅₀-Werte von (4*R*,5*S*)/(5*R*,4*S*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit N-Monoalkylierung und N,N'-Dialkylierung aus den verschiedenen Transaktivierungsassays

Die Einführung von Substituenten an C-2 des Heterozyklus der 2-Imidazoline bewirkte eine starke Reduktion der Wirkung, wobei an der MCF-7-2a-Zelllinie keine nennenswerte Aktivierung des ER beobachtet wurde. **57** und **59** waren sowohl an ER α als auch an ER β jeweils schwache Agonisten. Die Wirksamkeit an ER α war im Vergleich zu ER β lediglich um den Faktor 2.5 bis 5.8 höher. (siehe Abbildung 3.2.8)

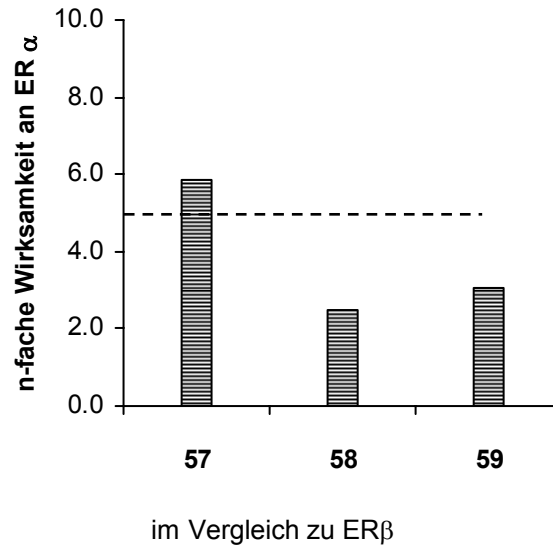


Abbildung 3.2.8 Vergleich der EC_{50} -Werte von (4*R*,5*S*)/(5*R*,4*S*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit unterschiedlicher Substitution an C-2 des 2-Imidazolinrings aus den verschiedenen Transaktivierungsassays

Wie bei den 2-Imidazolinen erwies sich die N-Monoethylierung bei Piperazinen (**93**) ebenfalls als optimal und erzielte an ER α und ER β eine estrogene Potenz vergleichbar mit der von **42 a**. Eine Diskriminierung zwischen den ER-Subtypen wurde kaum beobachtet. (siehe Abbildung 3.2.9).

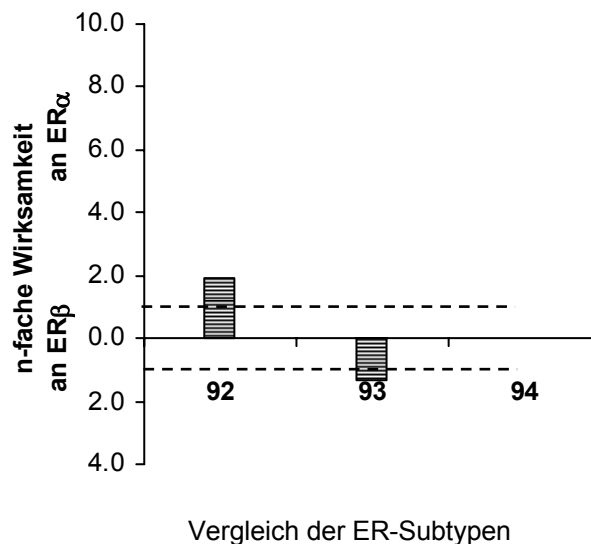


Abbildung 3.2.9 Vergleich der EC_{50} -Werte von (2*R*,3*S*)/(2*S*,3*R*)-2,3-Diarylpiperazinen mit N-Monoalkylierung und N,N'-Dialkylierung aus den verschiedenen Transaktivierungsassays

3.2.7 Untersuchung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette

Die basische Seitenkette in bekannten SERM ist das maßgebende Strukturelement für die Vermittlung der antagonistischen Eigenschaften z.B. von OHT (vgl. Kapitel 1.2.3 Seite 30 ff.).

Verbindungen aus der Strukturklasse der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline erwies sich als gut wirksame heterozyklische Estrogene. Sie erwiesen sich den entsprechenden 2,3-Diarylpiperazinen stets als überlegen.

Ausgehend von OHT (2-Dimethylaminoethoxy-Seitenkette) und RAL (2-Piperidin-1-ylethoxy-Seitenkette) wurde eine basische Seitenkette in *para*-Position des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors eingeführt (siehe Abbildung 3.2.10). Es wurde untersucht, ob das Wirkprofil von einem Agonisten in einen Antagonisten möglich ist.

Zusammen mit dem Einfluss des Chlorierungsgrades des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors sowie eine Ethylierung in Position 2 des 2-Imidazolringgrundgerüsts wurden verschiedenen Derivate der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline auf ihre Wirkung am ER untersucht.

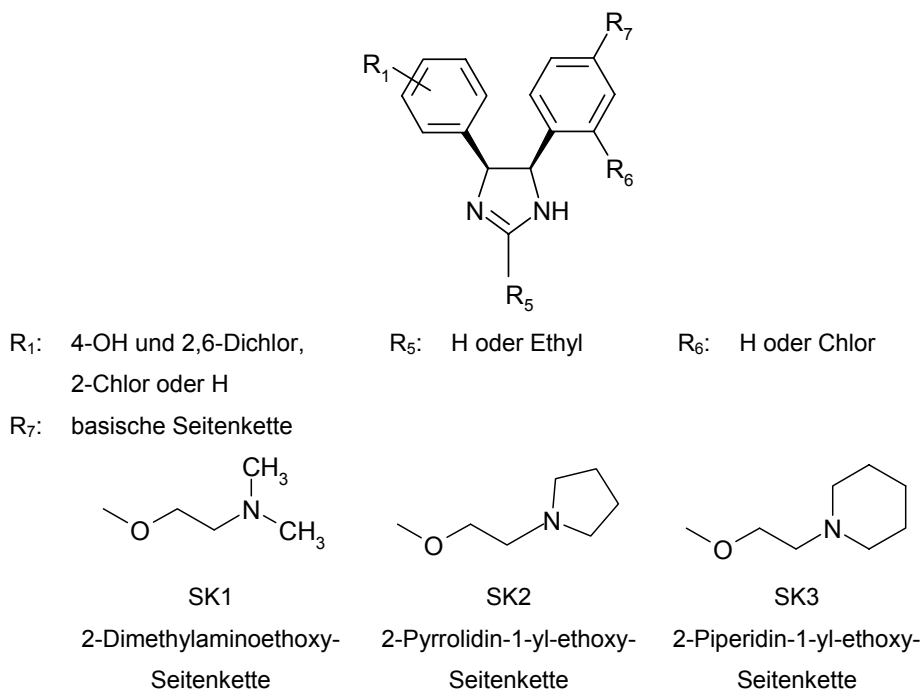


Abbildung 3.2.10 Substitutionsmuster (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline und Strukturen der an Position 4 eingeführten basischen Seitenketten

3.2.7.1 Agonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie

Verbin- dung	R ₁	R _{6/7}	R ₅	relative	EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
				Aktivierung [%] bei 10 µM		
41 a	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-OH	H	91.3	180	0.025
42 a	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-OH	H	80.9	700	0.007
43	4-OH	4-SK1	H	-0.1	-	-
44	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK1	H	11.1	-	-
45	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK2	H	-11.4	-	-
46	4-OH	4-SK3	H	2.8	-	-
47	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	-3.2	-	-
48	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	5.8	-	-
49	4-OH	4-SK3	Ethyl	-1.4	-	-
50	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	Ethyl	-8.9	-	-

Tabelle 3.2.12 Agonistische Wirkung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette an der MCF-7-2a-Zelllinie [122, 141]

Die Daten aus Tabelle 3.2.12 wurden im Rahmen der Dissertation von von Rauch bestimmt [141].

Mit Einführung einer basischen Seitenkette in das Molekül **42 a** (**44**, **45**, **47**, **50**) und **41 a** (**48**) ging die estrogene Wirkung verloren. Weitere Modifikationen an der Struktur führten ebenfalls zu keiner agonistische Aktivität an der MCF-7-2a-Zelllinie.

3.2.7.2 Agonistische Wirkung an ER α

Verbin- dung	R ₁	R _{6/7}	R ₅	relative	EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
				Aktivierung [%] bei 10 μ M		
41 a	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-OH	H	77.4	1.8	0.083
42 a	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-OH	H	96.9	28	0.005
43	4-OH	4-SK1	H	74.0	3000	<0.001
44	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK1	H	122.8	1800	<0.001
45	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK2	H	97.3	2500	<0.001
46	4-OH	4-SK3	H	16.2	-	-
47	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	87.4	510	<0.001
48	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	101.3	120	0.001
49	4-OH	4-SK3	Ethyl	-16.8	-	-
50	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	Ethyl	41.8	-	-

Tabelle 3.2.13 Agonistische Wirkung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette an ER α

An ER α konnten Derivate von **42 a** mit basischer Seitenkette immer noch eine hohe relative Aktivierung um 100 % induzieren. Die Aktivierung setzte aber erst bei 10- bis 100-facher Konzentration im Vergleich zu **42 a** ein.

Durch Einführung der SK3 in **42 a** (**47**) wurde die Wirkung an ER α um ca. zwei *log*-Einheiten abgeschwächt. Eine Ethylierung von **47** an C-2 (**50**) führte zu einer starken Reduktion der estrogenen Eigenschaften. **50** vermochte das ER α -System in einer Konzentration von 10 μ M nur zu 41.8 % zu stimulieren.

Das 2-Imidazolin **43** ohne Chlorsubstituenten in den Arylringen und mit SK1 zeigte die schwächste agonistische Wirkung an ER α (EC₅₀ = 3000 nM). Der Austausch von SK1 durch SK3 zu **46** bewirkte eine fast vollständige Aufhebung der estrogenen Aktivität, die durch Ethylierung an C-2 (**50**) wieder etwas gesteigert werden konnte.

Eine Steigerung der estrogenen Aktivität von **43** (EC₅₀-Wert = 3000 nM) wurde auch über die Einführung von zwei Chlorsubstituenten in den 1,2-Diarylethan-Pharmakophor zu **44** (EC₅₀-Wert = 1800 nM) erreicht.

In der Reihe der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette stellte **48** mit drei Chlorsubstituenten die wirksamste Verbindung an ER α (EC₅₀ = 120 nM) dar. Dieses Derivat war aber mehr als 60-mal schwächer wirksam als seine Ausgangsverbindung **41 a**.

3.2.7.3 Agonistische Wirkung an ER β

Verbindung	R ₁	R _{6/7}	R ₅	relative		
				Aktivierung [%] bei 10 μ M	EC ₅₀ [nM]	RTP [%]
41 a	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-OH	H	102.2	5.0	0.200
42 a	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-OH	H	111	22	0.046
43	4-OH	4-SK1	H	35.6	-	-
44	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK1	H	74.8	3100	<0.001
45	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK2	H	105.1	450	0.002
46	4-OH	4-SK3	H	25.5	-	-
47	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	42.0	-	-
48	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	102.7	390	0.003
49	4-OH	4-SK3	Ethyl	95.4	510	0.002
50	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	Ethyl	92.2	2000	<0.001

Tabelle 3.2.14 Agonistische Wirkung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette an ER β

Die Derivatisierung von **42 a** mit SK1 (**44**) und SK2 (**45**) führte zu Verbindungen, die an ER β eine maximale Aktivierung um 100 % induzierten. Ihre Wirksamkeit war allerdings um den Faktor 140 bzw. 20 geringer als bei **42 a**. **47** mit SK3 vermochte das ER β -System bei 10 μ M nur noch bis 42.0 % zu stimulieren. Eine weitere Derivatisierung von **47** zu **50** durch Einführung einer Ethylgruppe an C-2 konnte die Wirkung wieder erhöht werden (relative Aktivierung bei 10 μ M: 92.2 %).

Die Einführung von SK3 in **41 a** führte zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von **48**. **48** war dabei 80-mal schwächer wirksam (EC₅₀ = 390 nM).

Die 2-Imidazoline **43** und **46** mit SK1 bzw. SK3 ohne Chlorsubstituenten in den Arylringen führte zu wenig estrogen aktiven Verbindungen an ER β . Die agonistische Wirkung an ER β konnte aber durch Ethylierung an C-2 zu Verbindung **49** bzw. **50** wieder gesteigert werden. An ER β am wirksamsten waren **48**, **45** und **49** (EC₅₀ 390 -510 nM).

3.2.7.4 Antagonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie

Verbindung	R ₁	R _{6/7}	R ₅	relative Aktivierung [%] bei 1 μ M	IC ₅₀ [nM]
43	4-OH	4-SK1	H	96.3	-
44	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK1	H	96.2	-
45	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK2	H	96.7	-
46	4-OH	4-SK3	H	95.0	-
47	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	96.4	-
48	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	87.2	-
49	4-OH	4-SK3	Ethyl	107.1	-
50	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	Ethyl	103.4	-

Tabelle 3.2.15 Antagonistische Wirkung von (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette an der MCF-7-2a-Zelllinie [122, 141]

Die Daten aus Tabelle 3.2.15 wurden im Rahmen der Dissertation von von Rauch bestimmt [141].

Keine der 2-Imidazoline mit basischer Seitenkette zeigte eine antagonistische Wirkung an der MCF-7-2a-Zelllinie. Eine Umkehr des Wirkprofils von **41 a** und **42 a** von einem ER-Agonisten zu einem ER-Antagonisten an der MCF-7-2a-Zelllinie wurde nicht erreicht.

3.2.7.5 Antagonistische Wirkung an ER α

Verbindung	R ₁	R _{6/7}	R ₅	relative Aktivierung [%] bei 10 μ M	IC ₅₀ [nM]
43	4-OH	4-SK1	H	42.1	8000
44	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK1	H	102.6	-
45	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK2	H	122.7	-
46	4-OH	4-SK3	H	99.6	-
47	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	104.9	-
48	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	88.2	-
49	4-OH	4-SK3	Ethyl	34.4	62
50	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	Ethyl	65.7	-

Tabelle 3.2.16 Antagonistische Wirkung von (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette an ER α [122]

Eine antagonistische Wirkung an ER α zeigte die an C-2 ethylierte Verbindung **49** ohne Chlorsubstituenten (IC₅₀ = 62 nM), während die ebenfalls an C-2 ethylierte Modifikation **50** mit zwei Chlorsubstituenten in den Arylringen, die E2-induzierte Aktivierung nicht unter 50 % zu reduzieren vermochte. Die verbleibende Restaktivität bei 10 μ M betrug 65.7 %. Eine leichte antagonistische Wirkung an ER α zeigte die Verbindungen **43** in der höchsten getesteten Konzentration von 10 μ M.

3.2.7.6 Antagonistische Wirkung an ER β

Verbindung	R ₁	R _{6/7}	R ₅	relative Aktivierung [%] bei 10 μ M	IC ₅₀ [nM]
43	4-OH	4-SK1	H	102.4	-
44	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK1	H	95.5	-
45	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK2	H	72.4	-
46	4-OH	4-SK3	H	98.6	-
47	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	115.7	-
48	2,6-Cl ₂ , 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	97.3	-
49	4-OH	4-SK3	Ethyl	43.0	8000
50	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	Ethyl	40.2	7000

Tabelle 3.2.17 Antagonistische Wirkung von (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette an ER β [122]

Eine leichte antagonistische Wirkung an ER β zeigte Verbindungen **45** - mit SK2 derivatisiertes **42 a**. Die Reduktion der E2-Aktivierung betrug 27.6 %.

Beide Verbindungen mit einer Ethylgruppe an C-2 (**49** und **50**) erzielten in der höchsten getesteten Konzentration von 10 μ M eine Reduktion der E2-induzierten Aktivierung auf ca. 40 %. Die antiestrogene Wirksamkeit von **49** und **50** lagen mit IC₅₀-Werten von 8000 nM (**49**) und 7000 nM (**50**) sehr nahe beieinander.

3.2.7.7 Zusammenfassung

An der MCF-7-2a-Zelllinie zeigten Derivate von (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit einer basischen Seitenkette weder eine agonistische noch eine antagonistische Wirkung am ER. Im Gegensatz dazu wurden an subtypselektiven ER-Testsystemen Wirkungen gefunden. Dabei wurden hauptsächlich agonistische Eigenschaften der Verbindungen ermittelt.

Antagonistische Wirkungen zeigten nur einzelnen Verbindungen. Die Einführung einer basischen Seitenkette in (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-2-imidazoline führte nicht generell zu einem Wechsel des Wirkprofils.

Die Struktur der basischen Seitenketten hatte nur wenig Einfluss auf die agonistische Wirkung.

Die agonistische Wirksamkeit der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline stieg mit der Anzahl der Chlorsubstituenten in den Arylringen. Das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4-(2-Chlor-4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl)-5-(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**47**) zeigte ausschließlich an ER α eine agonistische Wirkung.

Die Einführung einer Ethylgruppe an C-2 in die Moleküle hatte an ER α und ER β unterschiedliche Folgen.

An ER α kam es zu einer Reduktion der agonistischen Wirkung. Im Gegensatz dazu stieg die Wirksamkeit an ER β nach Ethylierung an Position 2 des Imidazolirings. Die an ER α unwirksame C-2-ethylierte Verbindung **49** zeigte an ER β eine agonistische Wirkung. Die Aktivität von **50** bei 10 μ M war an ER β doppelt so hoch wie an ER α . Abbildung 3.2.11 veranschaulicht, dass der Unterschied der Wirksamkeit der an beiden ER-Subtypen aktiven Verbindungen **44**, **45** und **48** nicht groß war. **45** wies eine leichte Präferenz gegenüber ER β auf.

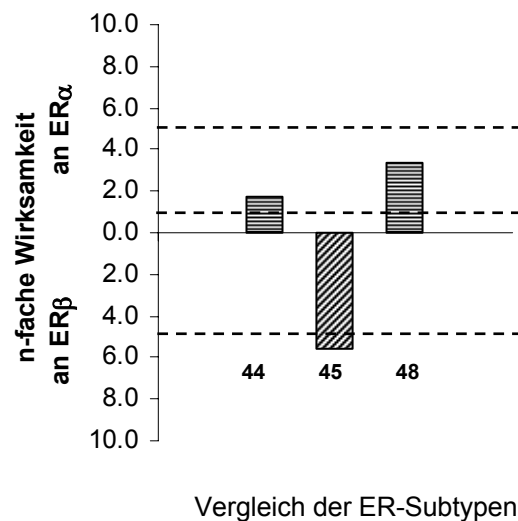


Abbildung 3.2.11 Verhältnis der EC₅₀-Werte der subtypeselektiven Transaktivierungsassays

Eine antagonistische Wirkung an beiden ER-Subtypen erreichte die C-2-ethylierte Verbindung **49** (IC₅₀: ER α = 62 nM; ER β = 8000 nM). **49** ist an ER α aufgrund fehlender estrogener Aktivität ein reines Antiestrogen. Die mit dem 13-fachen IC₅₀-Wert an ER β verbundene geringere antiestrogenen Wirkung von **49** ist durch die agonistische Aktivität (ER₅₀ = 500 nM) bedingt. **50** erreichte an ER β eine höhere antagonistische Wirkung als an ER α . Eine leichte Antiestrogenität

ausschließlich an ER α zeigte **43**, während **45** nur an ER β eine leichte Abschwächung der E2-Aktivierung bewirkte.

3.3 Diskussion der Testergebnisse

3.3.1 Unterschied in den auf ER α basierenden Transaktivierungsassays

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tests wiesen die im transienten Transfektionsexperiment an ER α erzielten Ergebnisse auf eine höhere Wirksamkeit als an der MCF-7-2a-Zelllinie hin. Die Konzentrations-Wirkungskurven an der MCF-7-2a-Zelllinie waren stets nach rechts verschoben, obwohl beide Testsysteme eine Genaktivierung über ER α induzieren.

Diese Beobachtung zog sich durch alle Klassen der getesteten Substanzen – sei es bei den bekannten natürlichen oder synthetischen Estrogenen bzw. Antiestrogenen, den Typ-I-Estrogenen oder den Typ-II-Estrogenen unabhängig von Grundkörper und Derivatisierung. Selbst bei dem natürlichen Liganden E2 liegt zwischen den EC₅₀-Werten an ER α und der MCF-7-2a-Zelllinie der Faktor 30 (EC₅₀: ER α = 0.0015 nM; MCF-7-2a-Zelllinie = 0.045 nM). Bei manchen in beiden Transaktivierungsassays aktiven Verbindungen war die Wirksamkeit an ER α sogar bis zu 260-mal höher (**52**). Andere an der MCF-7-2a-Zelllinie unwirksame Verbindungen zeigten an den ER-Subtypen estrogene Effekte.

Damit erwiesen sich die neu etablierten Transaktivierungsassays mit ER α und ER β als empfindlichere Testsysteme für Estrogene als das bereits bestehende System mit MCF-7-2a-Zellen.

Schon vor der Klonierung des nukleären ER α 1986 wurde 1977 von Rezeptoren mit hoher Affinität zu E2 an der Membran von Endometrium- und Leberzellen berichtet [144]. Seit dem verdichten sich sehr stark die Hinweise auf die Existenz eines membranständigen Estrogenrezeptors (mER), dessen Signaltransduktion schnell - innerhalb von Sekunden bis Minuten - über eine nicht-geotrope Signalkaskade erfolgt. Die Existenz eines mER ist heute unumstritten, doch konnte noch kein Rezeptormolekül kloniert werden [145, 146].

Untersuchungen an MCF-7-Zellen zeigten, dass sich an der Membran ein 67 kDa Protein befindet, zu dem E2 eine hohe Affinität hat. 22 % der Gesamt-

hormonbindung von MCF-7-Zellen erfolgt an dieser Membranstruktur. Die Dissoziationskonstante von E2 beträgt hier 3.6×10^{-10} M, und im Sättigungsgleichgewicht sind 6.7 pmol E2 pro mg Membranprotein gebunden. Durch fluoreszenzmarkiertes E2-BSA wurde gezeigt, dass ca. 77 % der MCF-7-Zellen diese E2-bindende Struktur an ihrer Oberfläche aufweisen. Größe und immunochemische Analysen mit Antikörpern gegen die LBD von ER α weisen darauf hin, dass es sich um ER α mit Lokalisation an der Zellmembran handelt. [147, 148]

Diesem mER wird die E2-induzierte Proliferation und Zellüberleben von MCF-7-Zellen über die Stimulation der MAPK innerhalb weniger Minuten zugeschrieben [147, 149, 150].

MCF-7-2a-Zellen leiten sich von der MCF-7-Zelllinie ab und tragen deshalb an ihrer Membran ebenfalls den mER, an dem Estrogene binden könnten [130]. Somit stünden die am mER abgefangenen Estrogene nicht mehr zur Aktivierung des ER/ERE-Reportersystems zur Verfügung. Eine Stimulation des mER ist dabei wahrscheinlich, doch kann eine schnelle Rezeptorantwort über *second messenger* nicht mit dem verwendeten ERE/Reportersystem detektiert werden. Das für diese Arbeit eingesetzte Reportersystem spricht nur auf genotrope Transaktivierung durch den ER an.

In einer Bindung der estrogenen Substanzen an andere Strukturelemente der MCF-7-2a-Zelllinie wie den mER könnte die Ursache für die schwächere Wirksamkeit der Verbindungen in diesem Testsystem liegen. Der Grund für diese beobachtete höhere Empfindlichkeit der ER-subtypeselektiven Rezeptor/Reportersysteme unter Verwendung von U-2OS-Zellen könnte in der Abwesenheit zusätzlicher ER-affiner Zellstrukturen liegen. Ein Unterschied der Empfindlichkeit zwischen den verschiedenen Rezeptor/Reportersystemen kann auf Grund dieser Untersuchungen aber auch nicht ausgeschlossen werden.

3.3.2 Bindungsmodell für Typ-I-Estrogene

Offenkettige stickstoffhaltige Verbindungen mit 1,2-Diarylethan-Pharmakophor wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirkung am ER untersucht. Bei 1,2-Diamino- und 1,2-Diazido-1,2-diarylethane ist eine freie Rotation um die Ethan-einheit möglich. Sie gehören zu den Typ-I-Estrogenen. Als Arylsubstituenten wurden die 2,6-Dichlor-4-hydroxy- bzw. -methoxyphenyl und 4-Chlor-4-hydroxy- bzw. 4-methoxyphenylgruppe gewählt. Die drei Chloratome kompen-

sieren die Hydrophilie der stickstoffhaltigen Molekülkomponenten genügend, um essentielle hydrophobe Kontakte mit der LBD zu ermöglichen [114, 116].

Das (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-konfigurierte Diamin **21 a** zeigte die höchste Wirksamkeit in allen drei Transaktivierungsassays (EC_{50} : $ER\alpha = 2.8$ nM; $ER\beta = 31$ nM; MCF-7-2a-Zelllinie = 71 nM). In Konkurrenzexperimenten mit radioaktiv markiertem E2 zeigte es eine Verdrängung des natürlichen Liganden aus der Bindungstasche des ER [151]. Daraus resultiert eine hohe relative Bindungsaffinität (RBA = 1.500) und weist auf eine starke Bindung in der Bindungstasche hin [113]. Voraussetzung hierfür sind ähnliche Interaktionen in der LBD wie sie von E2 eingegangen werden können. Als essentielle Strukturvoraussetzung gelten eine planare Raumstruktur und zwei Hydroxygruppen im Abstand von 10.9 Å [39].

Unabhängig von der Konfiguration zeigen die 1,2-Diamino-1,2-diarylethane **21** strukturelle Ähnlichkeiten mit E2. Durch ungehinderte Rotation um die Ethanbindung ist eine antiperiplanare Ausrichtung der Aromaten möglich. In dieser Konformation liegt eine Raumstruktur vergleichbar zu E2 vor und eine Bindung in der LBD des ER ist möglich (siehe Abbildung 3.3.1).

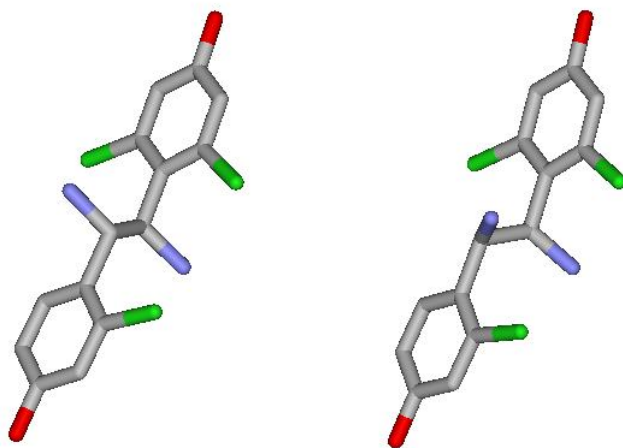


Abbildung 3.3.1 Konformation der Diamine **21 a** (links) und **b** (rechts) mit antiperiplanarer Anordnung der Aromaten

Bei dem (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-konfigurierten Diamin **21 a** lässt sich der 2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl-Substituent mit dem A-Ring des E2 superpositionieren während der 2-Chlor-4-hydroxyphenyl-Substituent mit dem D-Ring zur Deckung kommt (vgl. Kapitel 1.3.2 Abbildung 1.3.4 Seite 45) [120]. Der O-O-Abstand der beiden Hydroxygruppen beträgt 11.9 Å und liegt zwischen dem in E2 (10.9 Å)

und DES (12.1 Å), dessen analoge Bindung in der LBD des ER durch Röntgenkristallstrukturanalyse bewiesen wurde (vgl. Kapitel 1.2.2 Seite 14 ff.) [89]. Eine zu E2 bzw. DES analoge Verankerung in der LBD z.B. des ER α über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu³⁵³, Arg³⁹⁴, einem Wassermolekül und His⁵²⁴ sind für **21 a** daher möglich (siehe Abbildung 3.3.2). In *Molecular Modelling* Untersuchungen konnten dieses Bindungsmodell bestätigt werden [152].

Die Homologie in der LBD zwischen den ER-Subtypen ist mit 53 % zwar relativ gering, die Tertiärstruktur Bindungstasche und Aminosäuresequenz in Ligandennähe hingegen sind nahe zu identisch (vgl. Kapitel 1.2.5 Seite 37 ff.), so dass das Bindungsmodell und Interaktionsmöglichkeiten von ER α auf ER β übertragen werden kann. Die hydrophilen Wechselwirkungen in der LBD des ER β erfolgen dann zu His⁴⁷⁵, Glu³⁰⁵ und Arg³⁴⁶.

Im Gegensatz zu **21 a** und **b** zeigten methoxysubstituierte Diamine (**20 a** und **b**) keine Wirkung, da ihnen die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Ankerpunkten fehlt.

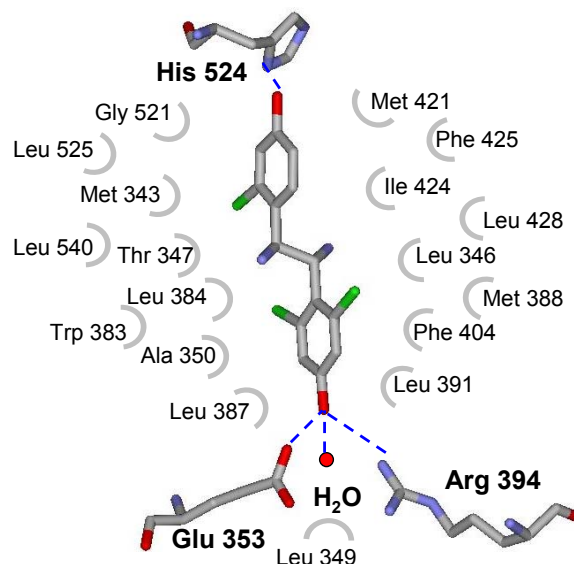


Abbildung 3.3.2 Bindungsmodell für Typ-I-Estrogene mit (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-konfiguriertem 1,2-Diarylethan-Pharmakophor am Beispiel von Diamin **21 a** in der LBD des ER α , orientiert an der Röntgenkristallstruktur von E2 in der LBD des ER α [Brookhaven PDB ID-Nummer 1ERE]

Die Aromaten des (1*R*,2*R*)/(1*S*,2*S*)-konfigurierten Diamin **21 b** können auch in antiperiplanarer Konformation angeordnet sein. Die polaren Molekülanteile sind hier auf einer Molekülseite konzentriert, während sie beim Diastereomer **21 a** auf gegenüberliegenden Seiten verteilt sind (siehe Abbildung 3.3.1 Seite 122). Die beiden hydrophilen Aminogruppen in **21 b** ragen bei der Bindung an den ER in Bereiche der LDB, in der hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein bestimmend sind, wie sie in der Röntgenkristallstruktur des DES/ER α - oder THC/ER α -Komplexes im Bereich der Ethylgruppen gefunden wurden [89, 105]. Durch die Konzentrierung hydrophiler Molekülkomponenten in hydrophobe Bereiche der LBD werden wichtige zur Stabilisierung der Ligandenbindung benötigte Wechselwirkungen gestört, so dass **21 b** an ER α weniger wirksam ist als sein Diastereomer **21 a** (siehe Abbildung 3.3.3). **21 b** besitzt ferner aus diesen Gründen eine niedrigere relative Bindungsaffinität (**21 a** = 1.500; **21 b** = 0.500) als **21 a** [113, 117].

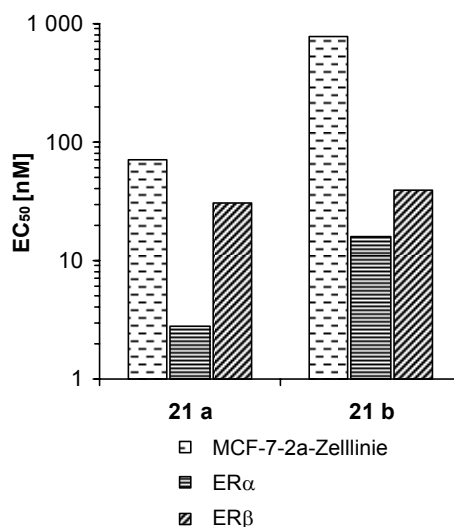


Abbildung 3.3.3 EC₅₀-Werte (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)- (**21 a**) und (1*R*,2*R*)/(1*S*,2*S*)-konfigurierter (**21 b**) 1,2-Diamin-1,2-diarylethane

Während der Unterschied der Wirksamkeit des (1*R*,2*R*)/(1*S*,2*S*)-konfigurierten Diamins **21 b** zwischen den ER-Subtypen mit einem Faktor von 2.4 gering ist, wies das diastereomere **21 a** eine ca. 10-fach höhere Wirksamkeit an ER α auf. Trotz der großen Übereinstimmung in der Bindungstasche der beiden ER-Subtypen gibt es wenige Unterschiede in den Aminosäuren, die direkten Kontakt mit dem Liganden haben. Im Vergleich von ER α zu ER β befindet sich auf der α -

Seite von gebundenem E2 an der Position von Met⁴²¹ (ER α) Ile³⁷³ (ER β) und an der β -Seite an der Position von Leu³⁸⁴ (ER α) Met³³⁶ (ER β). Die Methioninseiten-
gruppe hat im Vergleich zu Isoleucin bzw. Leucin ein größeres Van-der-Waals-
Volumen (siehe Abbildung 3.3.4).

Struktur-Wirkungs-Untersuchungen – teilweise in Kombination mit *Molecular
Modelling* Analysen führten zur Hypothese, dass in diesem Aminosäureaus-
tausch subtypselektives Verhalten von ER-Liganden begründet liegt [106, 153-
155].

Bei der Entwicklung ER-subtypselektiver Liganden werden derzeit zwei Strate-
gien verfolgt.

Die Bindungstasche des ER β ist generell zwar kleiner als die des ER α , auf der
 α -Seite ist sie aber durch den Austausch von Met⁴²¹ zu Ile³⁷³ in ER β in diesem
Bereich etwas größer (siehe Abbildung 3.3.4) [98]. ER β -Selektivität könnte ge-
zielt durch Liganden erreicht werden, die dieses größere Raumangebot durch
Substituenten im Bereich von Ile³⁷³ ausnutzen. [154]

Eine weitere Strategie bezieht sich auf die β -Seite des Liganden. Hier ist die
schwefelhaltige Seitenkette des Met³³⁶ in ER β durch ihre größere räumliche
Ausdehnung im Vergleich zu derjenigen des Leu³⁸⁴ in ER α näher zum Liganden
positioniert (siehe Abbildung 3.3.4). Diese Nähe könnte für gezielte Interakti-
onen von Substituenten im Liganden mit Met³³⁶ genutzt werden, um eine ER β -
Selektivität zu erzielen. Für (S)-DPN werden hauptsächlich Wechselwirkungen
zwischen Cyanogruppe und Met³³⁶ verantwortlich gemacht (vgl. Kapitel 1.2.5
Seite 37 ff.). [107, 154]

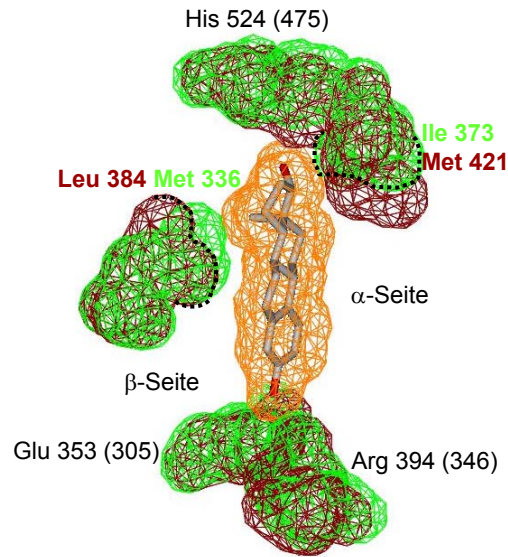


Abbildung 3.3.4 Superpositionierung der Wechselwirkungen von E2 (orange) in der LBD des ER α (braun) nach Brzowski [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 1ERE] und des ER β (grün bzw. Angaben in Klammern) nach Pike [98] [Brookhaven PDB ID-Nummer : 1QKM]; jeweils dargestellt die Van-der-Waals-Oberflächen

Im Vergleich der schematischen Wechselwirkungen von **21 a** mit den beiden ER-Subtypen zeigt sich, dass der Abstand einer hydrophilen Aminogruppe zum Schwefel der Methioninseitengruppe unterschiedlich ist. Im Fall von ER α beträgt der Abstand 5.29 Å während er bei ER β nur 2.20 Å groß ist (siehe Abbildung 3.3.5 Seite 127). Die Bindung von **21 a** könnte durch die Annäherung von Met³³⁶ und einer Aminogruppe sterisch beeinträchtigt sein, so dass sie schwächer und daraus resultierend die Wirksamkeit an ER β geringer ist.

N,N'-Dialkylierte Diamine sollten dementsprechend eine größere ER α -Selektivität zeigen. In der LBD des ER β müssten sich die Seitengruppe von Met³³⁶ und eine N-Alkylgruppe des Liganden mit zunehmender Kettenlänge der Alkylgruppe stärker sterisch behindern und die Bindung und damit die ER-Aktivität schwächer werden. Zur Verifizierung dieser Interpretation müsste dies in den Transaktivierungsassays oder in subtypeselektiven Bindungsstudien geprüft werden.

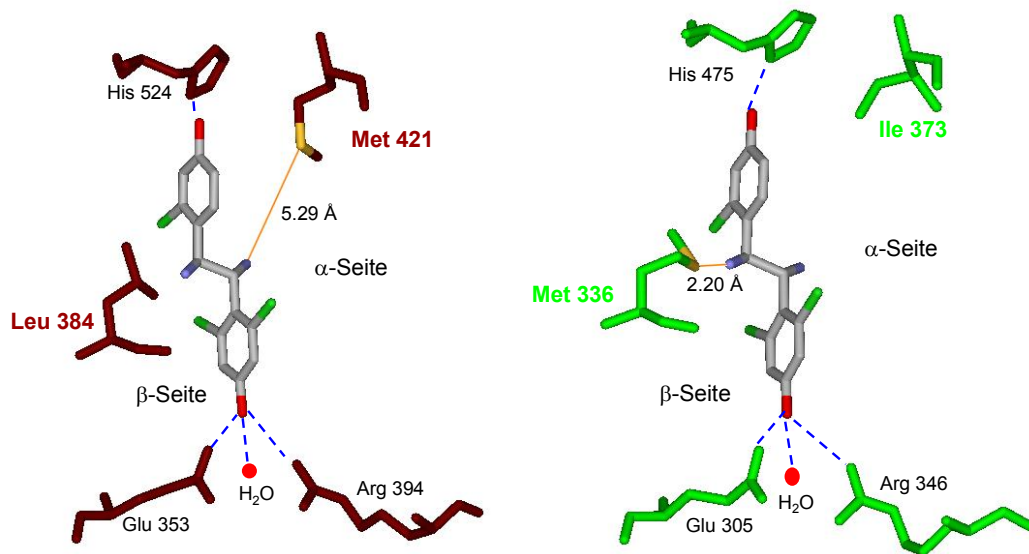


Abbildung 3.3.5 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von **21 a** in der LBD des ER α (links) und ER β (rechts), orientiert an der Röntgenkristallstruktur von E2 in der LBD des ER α [Brookhaven PDB ID-Nummer 1ERE] bzw. GEN in der LBD des ER β [Brookhaven PDB-ID-Nummer 1QKM]

Die 1,2-Diazido-1,2-diarylethane **10** zeigten trotz Methoxysubstitution in 4 Position der Arylreste eine Aktivierung des empfindlicheren ER α /ER β -(ERE)₂luc-Systems. Die RBA ist daneben höher als bei den hydroxysubstituierten Diaminen **21** (RBA: **10 a** = 86; **10 b** = 37; **21 a** = 1.500; **21 b** = 0.500) [117]. Wasserstoffbrückenbindungen zu den bekannten Ankerpunkten Glu³⁵³, Arg³⁹⁴, Wasser und His⁵²⁴ des ER α wie bei E2 und DES sind von den methoxysubstituierten Verbindungen nicht in gleicher Weise möglich.

Bedingt durch die Methoxygruppen und die sehr lipophilen Azidgruppen haben die Verbindungen **10 a** und **b** einen ausgeprägten hydrophoben Charakter, der sich u. a. in ihrer schlechten Wasserlöslichkeit bemerkbar macht [156]. Bei der Verdünnung aus organischen Lösungsmitteln (LM) in Kulturmedium fallen beide Diazide bei 10 % und 1 % LM (V/V) sichtbar aus. Lösungseffekte können auch ein Grund für das Erreichen eines Plateaus in der Konzentrations-Wirkungskurve der beiden Verbindungen sein.

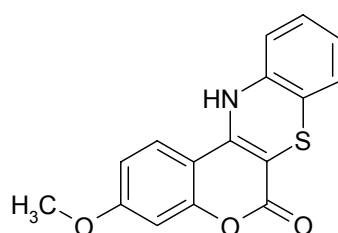
Hohe RBA und estrogenische Wirkung von **10 a** sind durch starke hydrophobe Wechselwirkungen in der Bindungstasche möglich. Diese Interaktionen reichen für eine Stabilisierung in der LBD aus, ermöglichen die Verdrängung von E2 aus der Bindungstasche und induzieren eine aktive Rezeptorkonformation. Die

beide linearen Azidgruppen ragen bei antiperiplanarer Anordnung der Aromaten von **10 a** analog zu den Ethylgruppen von DES in die von E2 unbesetzte hydrophobe Taschen der LBD des ER [89]. Sie können starke hydrophobe Wechselwirkungen eingehen, die die fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen kompensieren.

Analog zu den Aminogruppen des Diamins **21 b** sind bei antiperiplanarer Konformation der Aromaten von **10 b** die Azidgruppen *cis*-ständig zueinander und nicht optimal zu beiden hydrophoben Seitentaschen ausgerichtet. Die Einlagerung in die LBD ist nicht so gut möglich wie für **10 a**. Aus diesem Grund ist **10 b** schwächer wirksam.

Trotz der Methoxygruppen sind hydrophile Wechselwirkungen der Diazide **10** zu bekannten Ankerpunkten der LBD nicht auszuschließen. Ein methoxysubstituiertes Cumarinderivat (siehe Abbildung 3.3.6) zeigte im Wettbewerbsexperiment keine Bindungsaffinität zu den ER-Subtypen, wies aber estrogenen Eigenschaften im zellulären Kontext auf. Für diese Verbindung wird eine hydrophile Wechselwirkung zu His⁵²⁴ in ER α angenommen. Eine Wasserstoffbrückenbindung wird demnach zwischen dem δ N als *H*-Donor im His⁵²⁴ und dem Sauerstoff der Methoxygruppe als *H*-Akzeptor ausgebildet. [157, 158]

Solche Bindungen in der LBD sind auch für die Diazide **10 a** und **b** möglich. Die Bindungen an den ER von **10 a** und **b** können aber nicht ausschließlich darin begründet sein. Hydrophobe Interaktionen haben hierbei den Hauptanteil und vermitteln die für sie im Gegensatz zum Cumarinderivat gefundene hohe RBA.



6,12-Dihydro-3-methoxy-1-benzopyrano[3,4-*b*]
[1,4]benzothiazin-6-on

Abbildung 3.3.6 Struktur eines methoxysubstituierten Cumarinderivats mit estrogenen Eigenschaften

3.3.3 Bindungsmodell für Typ-II-Estrogene

Die Komplexierung der 1,2-Diamino-1,2-diarylethane an Platin zu den entsprechenden Diiodoplatinkomplexen führte zu dem Prototyp der gewinkelten

Typ-II-Estrogene. Durch die Winkelung ist die zweite Hydroxygruppe nicht mehr zu einem hydrophilen Ankerpunkt ausgerichtet. Aus der Überlagerung mit E2 geht hervor, dass der entsprechende Aromat aus der Molekülebene herausragt. (vgl. Abbildung 1.3.4 Seite 45). Trotzdem zeigten **31 a** und **b** in allen drei Transaktivierungsassays estrogene Eigenschaften. Dies stimmt mit früheren Untersuchungsergebnissen überein, nach denen analoge Aquasulfatoplatinkomplexe *in vivo* estrogene Aktivität zeigten. Mit den *in vitro* Tests konnte auch bestätigt werden, dass eine (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-Konfiguration des Neutralliganden zu einer besseren Wirkung des Platinkomplexes führte (**31 a** im Vergleich zu **31 b**: ca. 16-fache Wirksamkeit an ER α und der MCF-7-2a-Zelllinie bzw. 40-fache Wirksamkeit an ER β). [113]

In der Überlagerung mit E2 ist auch ersichtlich, dass die Diiodoplatineinheit mit dem C/D-Ring des Steroidgerüsts zur Deckung zu bringen ist. Die Diiodoplatineinheit liegt in der Ebene des quadratisch planaren Platinkomplexes und birgt eine große Hydrophobizität.

Neben den hydrophilen Wechselwirkungen zu His⁵²⁴, Glu³⁵³ und Arg³⁹⁴ ist die Assoziation und Stabilisierung von E2 in der LBD des ER α hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen über das Steroidgerüst zur LBD geprägt [39].

Die Diiodoplatineinheit kann ebenfalls hydrophobe Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der LBD eingehen und so die Assoziation des Typ-II-Estrogens begünstigen. **31 a** gehörte zu den wirksamsten Typ-II-Estrogenen in allen drei Transaktivierungsassays (siehe Abbildung 3.3.7 Seite 130).

30 a und **b** zeigten als einzige Typ-II-Estrogene trotz Methoxysubstitution in den Aromaten estrogene Eigenschaften. Im Vergleich von **30 a** zu **31 a** ist das methoxysubstituierte Derivat um ca. den Faktor 120 an ER α bzw. 270 an ER β geringer wirksam. Die eingeschränkte Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen wird analog zu Diaziden **10 a** durch verstärkte Möglichkeiten zu hydrophobe Interaktionen - hier über die Diiodoplatineinheit - in der LBD kompensiert. Im Falle der Platinkomplexe simulieren sie Bereiche der C/D-Ringe des Steroidgerüsts von E2, während bei den Diaziden zusätzliche Wechselwirkungen in hydrophoben Seitentaschen erfolgen, in die auch die Ethylseitenketten des DES hineinragen.

Neben den hydrophoben Wechselwirkungen kann die Diiodoplatineinheit auf Grund ihrer Reaktivität mit nukleophilen Proteinstrukturen der LBD reagieren. Durch die Zyklisierung der (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethaneinheit zu verschiedene Heterozyklen bleibt eine gewinkelte Raumstruktur erhalten, so dass eine Einteilung als Typ-II-Estrogen bestehen bleibt, die Reaktivität aber unterbunden wird (vgl. Kapitel 1.3.2 Seite 45).

In Abhängigkeit des Testsystems und des Grundkörpers zeigten alle Heterozyklen mit (*R,S*)/(*S,R*)-Konfiguration und *para*-Hydroxygruppe in beiden Aromaten der 1,2-Diarylethaneinheit estrogene Eigenschaften. Somit ist eine Reaktivität, wie sie in der Diiodoplatineinheit enthalten ist für die Bindung und Interaktion in der LBD des ER nicht entscheidend. Die Zyklisierung führte zur Abnahme bzw. zum Verlust der RBA ohne Einbuße agonistischer Eigenschaften am ER wie schon in anderen Untersuchungen gezeigt wurde [117, 119, 141].

Den heterozyklischen Typ-II-Estrogenen fehlt die hydrophobe Molekülkomponente des Platinkomplexes zur Kompensierung fehlender hydrophiler Wechselwirkungen zu den bekannten Ankerpunkten in der LBD, so dass alle im 1,2-Diarylethan-Pharmakophor methoxysubstituierten Verbindungen keine Aktivität in den Transaktivierungsassays aufwiesen.

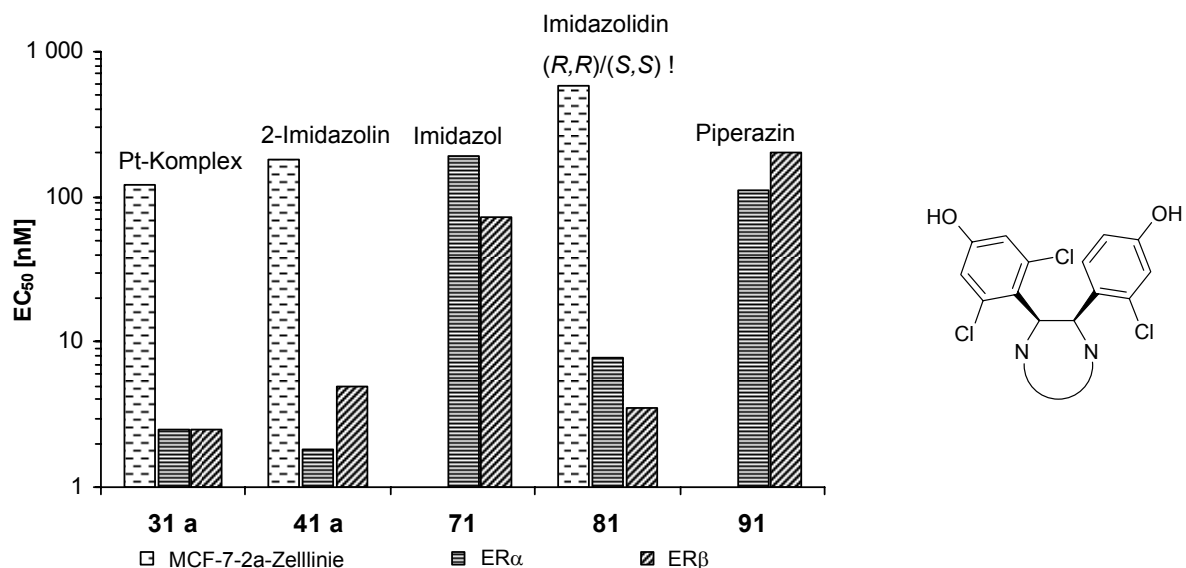


Abbildung 3.3.7 EC₅₀-Werte (*R,S*)/(*S,R*)-konfigurierter Typ-II-Estrogene; (Ausnahme: 81 ist (*R,R*)/(*S,S*)-konfiguriert!)

Unter den (*R,S*)/(*S,R*)-konfigurierten Typ-II-Estrogen - bei konstantem Substitutionsmuster mit insgesamt drei Chloratomen und *para*-Hydroxysubstitution in beiden Aromaten - zeigten Pt-Komplexe und 2-Imidazoline die höchste estrogene Potenz (siehe Abbildung 3.3.7). Interessanterweise lag die Wirksamkeit an ER α bzw. ER β der beiden Typ-II-Estrogene **31 a** (Pt-Komplex) und **41 a** (2-Imidazolin) im Bereich des Typ-I-Estrogens **21 a** (Diamin), während sie an der MCF-7-2a Zelllinie schwächer estrogen wirksam waren als **21 a**.

Die Einbindung des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors in ein Piperazin- oder Imidazolgrundgerüst unter Beibehaltung des Substitutionsmusters in den Arylresten führte zu einer drastischen Wirkabnahme. Die maximal erzielten Wirkungen bei 10 μ M von **91** und **71** lagen an der MCF-7-2a-Zelllinie bei 43 % bzw. 46 %. In den subtypeselektiven Transaktivierungsassays war ihre Wirksamkeit um mindestens den Faktor 15 schwächer wirksam als bei **31 a** oder **41 a** (siehe Abbildung 3.3.7 Seite 130).

Die Ergebnisse der Transaktivierungsassays ergaben, dass (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline an beiden ER-Subtypen gut wirksame Typ-I-Estrogene sind. Von Rauch zeigte, dass unter Testbedingungen (37 °C, 50 h, pH = 7.4) 2-Imidazoline hinreichend stabil sind und ihre estrogen Wirkung nicht von Hydrolyseprodukten induziert wird [141, 142].

Die selektive Hormonerkennung durch den ER erfolgt stets mittels einer Kombination von spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkung. Essentiell, und in allen derzeit aufgeklärten Röntgenkristallstrukturen von Ligand/ER-Komplexen nachgewiesen, ist die Assoziation des Liganden über Wasserstoffbrückenbindungen mit Glu³⁵³, Arg³⁹⁴ und einem Wassermolekül in der LDB des ER α bzw. Glu³⁰⁵, Arg³⁴⁶ des ER β . Dies sollte auch über den *para*-hydroxylierten Aromaten der Typ-II-Estrogenen möglich sein, der den A-Ring des E2 simuliert (siehe Kapitel 1.3.2 Abbildung 1.3.4 Seite 45). Die Wichtigkeit dieser hydrophilen Wechselwirkung wird dadurch unterstrichen, dass die methoxysubstituierten Analoga unwirksam waren.

Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu His⁵²⁴ in ER α bzw. His⁴⁷⁵ in ER β ist durch die gewinkelte Strukturgeometrie nicht möglich.

Bei den Typ-II-Estrogenen zeigte sich unter Beibehaltung des Substitutionsmusters in den Arylresten eine Abhängigkeit der ER-Aktivierung vom Grundkörper und Assay (siehe Abbildung 3.3.7). Ihre gewinkelte Molekülstruktur bedingt eine Verringerung des Abstandes der beiden Sauerstoffatome im Vergleich zu E2. Durch die unterschiedliche Geometrie der Ringsysteme kommt es zu verschiedenen räumlichen Ausrichtungen der Arylringe, was sich auf den O-O-Abstand auswirkt (siehe Tabelle 3.3.1) [119, 120, 141].

	Pt-Komplex 31 a	2-Imidazolin 41 a	Imidazol 71	Piperazin 91
O-O-Abstand [Å]	7.8	5.1	8.9	7.1

Tabelle 3.3.1 O-O-Abstände verschiedener Typ-II-Estrogene nach Keilitz [120]

Das Imidazol **91** besitzt eine planare Struktur, in der die Phenylgruppen in einer Ebene liegen und mit 8.9 Å den höchsten O-O-Abstand aufweist. Es ist das schwächste Typ-II-Estrogen. Im am stärksten wirksamen heterozyklischen Typ-II-Estrogen, 2-Imidazolin **41 a**, beträgt der Abstand nur noch 5.1 Å.

Dies zeigt, dass die relative Orientierung des zweiten Aromaten von Typ-II-Estrogenen wichtig ist, obwohl eine Ausrichtung zu His⁵²⁴ bzw. His⁴⁷⁵ in keinem Fall möglich ist.

Typ-II-Estrogene zeigen eine Strukturanalogie zu SERM. Die Orientierung des zweiten Aromaten von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-konfigurierten 2-Imidazolinen erfolgt in Richtung der basischen Seitenkette tragenden Phenylrestes von RAL, wie in der Überlagerung zu sehen ist (siehe Abbildung 3.3.8).

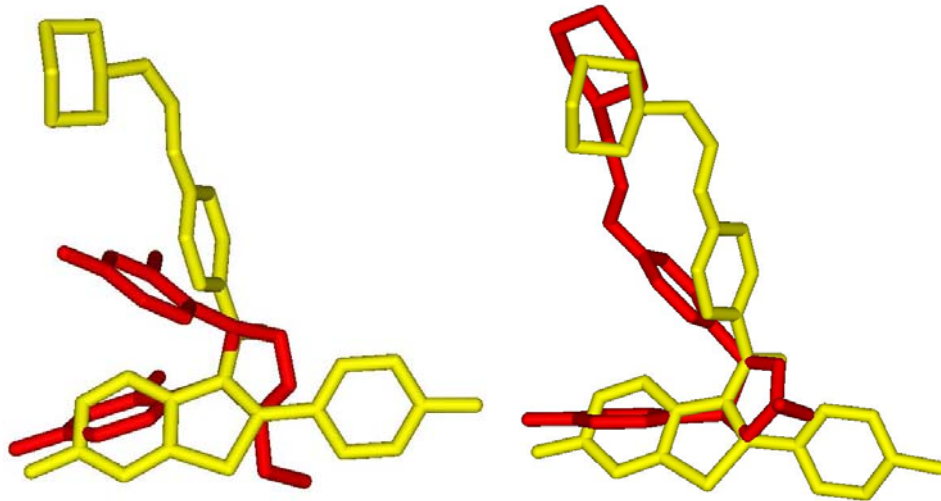


Abbildung 3.3.8 Superpositionierung $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierter 4,5-Diaryl-2-imidazoline (rot; links: 53; rechts: 49) mit RAL (gelb)

Das Bindungsmodell von Typ-II-Estrogenen orientiert sich an der Bindung von SERM an den ER.

Die basische Seitenkette der SERM ragt in einen engen β -Kanal der LBD, der ebenfalls die voluminösen Seitenketten steroidalster ER-Antagonisten aufnimmt [39, 89, 98]. Der zweite Aromat der Typ-II-Estrogene könnte in diesen β -Kanal reichen. Eine Bindung der Typ-II-Estrogene über Wasserstoffbrücken zu Asp³⁵¹, wie sie in den Röntgenkristallstrukturen der ER α -Komplexe mit RAL und OHT gefunden wurden (vgl. Kapitel 1.2.3 Seite 30 ff.), wie ursprünglich angenommen, ist unwahrscheinlich [120]. Bei SERM geht das weiter vom Grundkörper entfernte basische Zentrum diese Interaktion ein. Die 4-Hydroxygruppe von $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten 2-Imidazolinen wäre von Asp³⁵¹ zu weit zur Ausbildung von hydrophile Interaktionen entfernt. Zudem ist Asp³⁵¹ nur in einem Antagonisten/ER-Komplex, in dem Helix 12 verschoben ist, zugänglich. In einer dem E2/ER-Komplex analoger Rezeptorkonformation ist die Seitenkette von Asp³⁵¹ von der Bindungstasche weg orientiert (siehe Abbildung 3.3.9) [39, 89, 152].

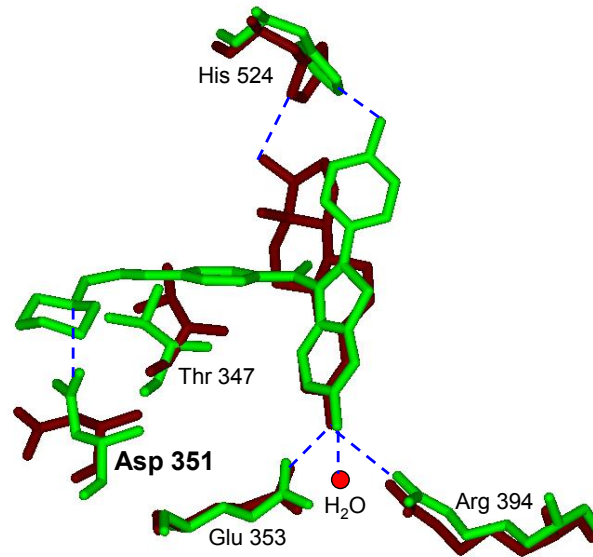


Abbildung 3.3.9 Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen nach Brzozowski von E2 (braun) [Brookhaven PDB ID-Nummer 1ERE] und RAL (grün) [Brookhaven PDB ID-Nummer 1ERR] in der LDB des ER α [39]

Molecular Modelling Studien mit Typ-II-Estrogenen verschiedener Verbindungsklassen zeigten, dass eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der zweiten Hydroxygruppe und Thr³⁴⁷ ausgebildet werden könnte. Thr³⁴⁷ ist ebenfalls wie Asp³⁵¹ im β -Kanal lokalisiert [152].

Das Bindungsstellenmodell für Typ-II-Estrogene am Beispiel von ER α geht von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einer phenolischen Hydroxygruppe und Glu³⁵³, Arg³⁹⁴ und einem Molekül Wasser sowie zwischen der zweiten Hydroxygruppe und Thr³⁴⁷ aus (siehe Abbildung 3.3.10). Die Abhängigkeit der estrogenen Potenz der Typ-II-Estrogene vom O-O-Abstand der beiden Hydroxygruppen basiert auf der idealen Orientierung der zweiten Phenylsubstituenten in den β -Kanal während über den anderen Aromaten die Assoziation am proximalen Ende der Bindungstasche erfolgt.

Neben den beschriebenen hydrophilen Wechselwirkungen können Typ-II-Estrogene über ihr Grundgerüst und die aromatischen Reste hydrophobe Wechselwirkungen mit der LDB des ER eingehen. Dies trägt zu einer Stabilisierung der Liganden in der Bindungstasche bei. Insgesamt sind die Wechselwirkungen aber schwächer als bei E2, Typ-I-Estrogenen oder Platinkomplexen. Dies zeigt sich in ihrem Unvermögen, E2 aus der Bindungstasche zu verdrängen.

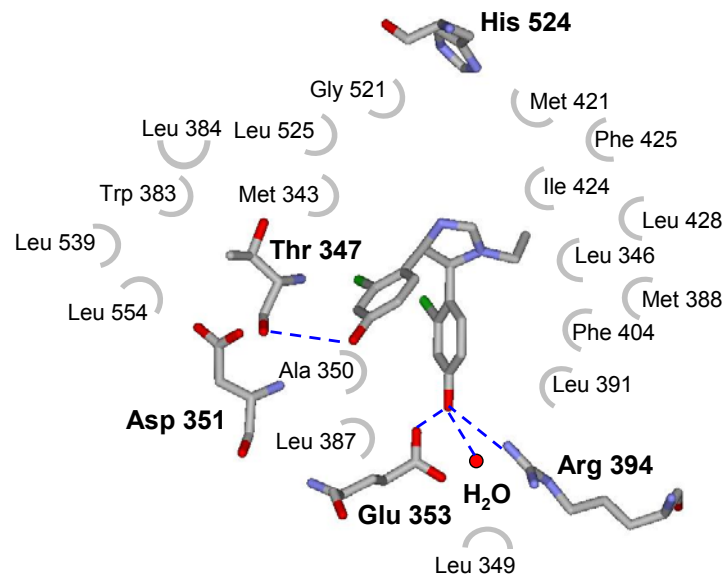


Abbildung 3.3.10 Bindungsstellenmodell für Typ-II-Estrogene am Beispiel von 53 orientiert an der Röntgenkristallstruktur des RAL/ER α -Komplexes [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer: 1ERR]

Eine Einflussnahme auf die Wirksamkeit über die Lipophilie in Folge stärkerer hydrophober Assoziationsmöglichkeiten in der LBD und Kompensation hydrophiler Molekülkomponenten ist über die Variation der Chlorsubstitution möglich. Derivate von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit drei Chlorsubstituenten waren in allen Testsystemen besser wirksam als die mit jeweils nur einem Chloratom in den Phenylresten (siehe Abbildung 3.3.11). Mit den Chlorsubstituenten wird die Lipophilie des Moleküls erhöht, und die Liganden können mehr Wechselwirkungen mit der LBD des ER eingehen. Die Wirksamkeit der Typ-II-Estrogene steigt.

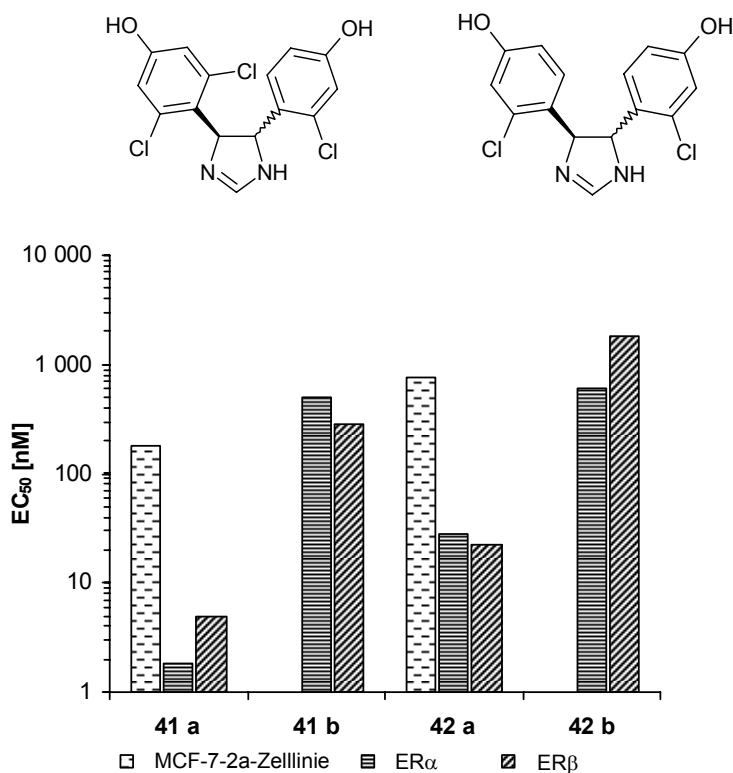


Abbildung 3.3.11 EC₅₀-Werte (*R,S*)/(*S,R*)- (a) und (*R,R*)/(*S,S*)-konfigurierter (b) 4,5-Diaryl-2-imidazoline (41 und 42)

Eine weitere Option zur Erhöhung der Lipophile und Kompensierung der hydrophilen Eigenschaften der Heteroatome in (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen und (*2R,3S*)/(*2S,3R*)-2,3-Diarylpiperazinen stellt die N-Alkylierung dar.

(*4R,5S*)/(*4S,5R*)-4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline mit N-Monoalkylierung sind wirksamer als die entsprechende unalkylierte Ausgangsverbindung **42 a** (siehe Abbildung 3.3.12). Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der Wirkstärke von der Kettenlänge der eingeführten Alkylgruppen. Das Wirkoptimum lag bei einer N-Monoethylierung.

Verbindung **53** ((*4R,5S*)/(*4S,5R*)-N-Ethyl-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin) stellte sich als wirksamste Verbindung der im Rahmen dieser Arbeit getesteten neuen Estrogene dar (EC₅₀: ER α = 0.42 nM; ER β = 3.1 nM; MCF-7-2a-Zelllinie = 11 nM).

Eine Verlängerung der Alkylkette auf drei Kohlenstoffatomen führte mit Ausnahme an ER β zu keiner weiteren Wirksteigerung. Eine Ursache hierfür könnten sterische Behinderungen der Wechselwirkungen zwischen Ligand und LBD durch die Propylkette sein.

Auch Untersuchungen von Derivaten von DES und HEX bezüglich ihrer Bindungsaffinität zum ER und estrogenen Wirkung zeigten eine Abhängigkeit der Wirkung zur Kettenlänge der Alkylgruppen. Die Ethylgruppe, wie sie in DES und HEX vorliegt, erwies sich dort ebenfalls als optimal [159-161]. Es ist daher anzunehmen, dass die N-Alkyl-4,5-diaryl-2-imidazoline ähnliche hydrophobe Wechselwirkungen in der LBD eingehen, wie sie bei einer der Ethylseitenketten von DES gefunden wurden (vgl. Kapitel 1.2.2 Seite 28 ff.) [89, 142]. In diesen zusätzlichen hydrophoben Kontakten liegt auch die Begründung für die Wirksteigerung durch N-Alkylierung. Eine Alkylierung beider Stickstoffatome von 4,5-Diaryl-2-imidazolinen führt zu kationischen Verbindungen, die trotz Ladung in die Zelle gelangen und eine Wirkung durch Bindung in der hydrophoben Bindungstasche des ER induzieren (siehe Abbildung 3.3.12).

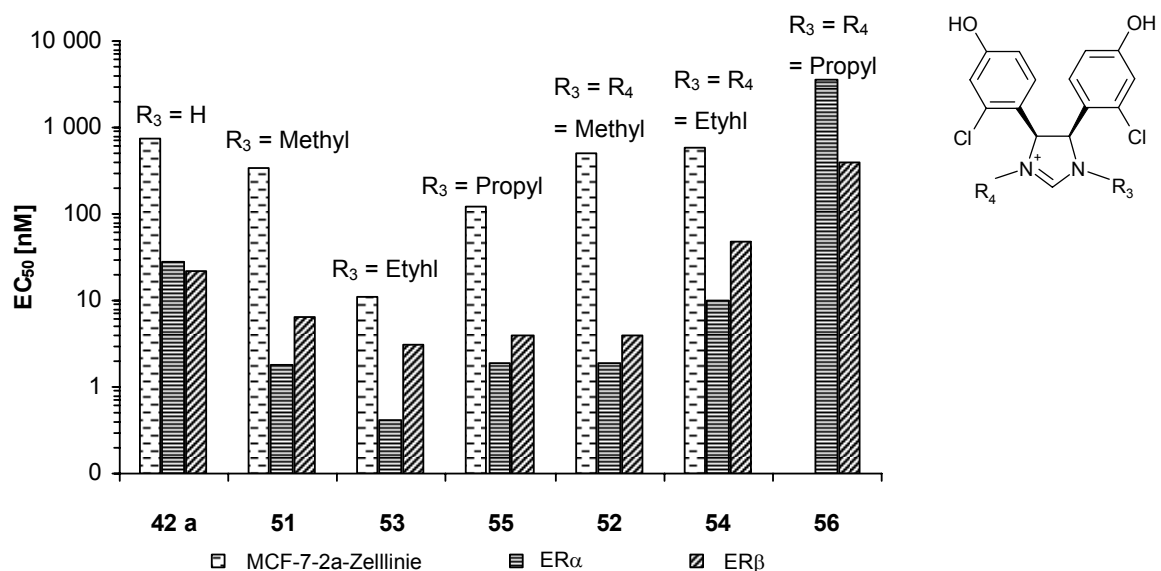


Abbildung 3.3.12 EC₅₀-Werte N- und N,N'-alkylierter (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-konfigurierter 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline

(2*R*,3*S*)/(2*S*,3*R*)-2,3-Diaryl-piperazinen erwiesen sich als schwächere Typ-II-Estrogene als die analogen (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline. Zwar hatten die Variation der Lipophilie durch Erhöhung der Zahl der Chlorsubstituenten in den Phenylresten oder die N-Mono- bzw. N,N'-Diaklylierung eine vergleichbare Änderung in der Wirksamkeit wie bei den entsprechenden 2-Imidazolinen zur Folge, doch waren sie diesen in der Wirksamkeit immer unterlegen.

Durch Alkylierung von C-2 der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline sollte ebenfalls eine erhöhte Wirksamkeit erzielt werden. Stattdessen kam es zu einer Abnahme der Wirksamkeit im Vergleich zur Ausgangsverbindung **42 a** (bis zu 43-fach bei ER α und 320-fach bei ER β) bis hin zur Unwirksamkeit an der MCF-7-2a-Zelllinie. Sowohl eine in der Ringebene stehende C-2-Methylgruppe als auch eine oberhalb der Ringebene orientierte C-2-Ethylgruppe sollten in den von Typ-II-Estrogenen nicht besetzten Bereich Richtung His⁵²⁴ bzw. His⁴⁷⁵ ragen und zu keiner sterischen Behinderungen der Bindung führen [141, 142].

Bisherige Bemühungen auf dem Weg zur Entwicklung ER-selektiver Liganden - vor allem in Richtung ER β -Selektivität - gehen von starren und planaren Grundkörpern wie Biphenylen, Arylbenzothiophenen, Arylnaphtalinen und Triazinen aus (siehe Abbildung 3.3.13) oder den bereits vorgestellten (*S*)-DPN, THC bzw. PPT (vgl. Kapitel 1.2.5 Seite 37 ff.) [99, 100, 106, 154, 155, 162, 163]. Durch geeignete Substituenten sollen dann subtypspezifische Unterschiede in der LBD ausgenutzt werden (vgl. Kapitel 3.3.2 Seite 121 ff).

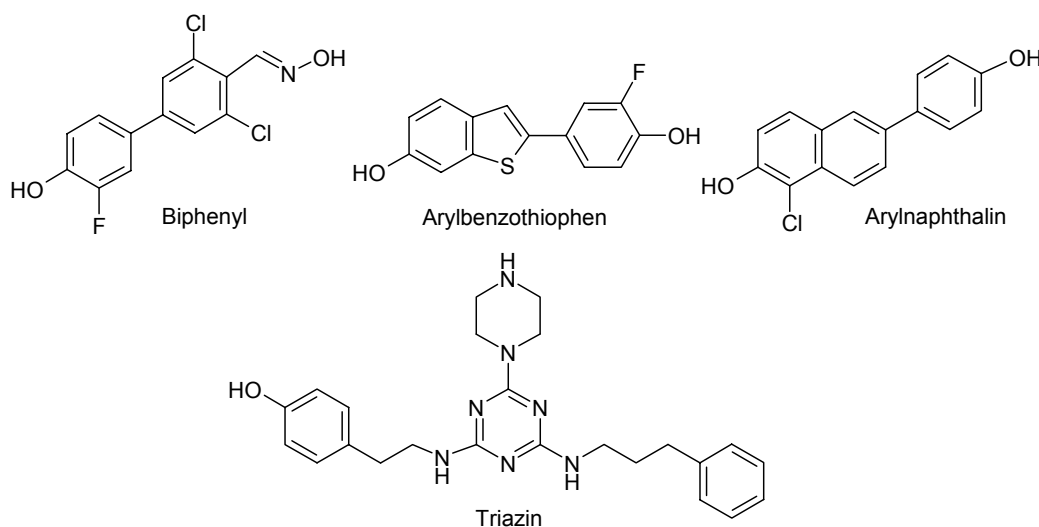


Abbildung 3.3.13 Strukturen neuerer ER β -selektiver Liganden

(*R,S*)/(*S,R*)-konfigurierte Typ-II-Estrogene sind dagegen gewinkelte Moleküle, die je nach Grundkörper und Substitutionsmuster eine Moleküldynamik aufweisen.

Mit Ausnahme des N,N'-dipropylierten 2-Imidazolins **56** zeigten alle an den Heteroatomen sowie an Position 2 des 2-Imidazolinrings derivatisierten Verbindun-

gen eine höhere Wirksamkeit an ER α als an ER β (siehe Abbildung 3.3.12 Seite 137 und Abbildung 3.2.8 Seite 111).

Dies könnte an dem größeren Raumbedarf der eingeführten Gruppen liegen, die in der größeren LBD des ER α mehr Platz finden.

Im Vergleich der verschiedenen Grundkörper zeigte das planare Imidazol **71** - die Arylreste liegen in der Ringebene - die höchste ER β -Selektivität (2.6-fache Wirkung an ER β im Vergleich zu ER α).

Das N,N'-dipropylierte 2-Imidazolin **56** war 8.8-mal wirksamer an ER β als an ER α .

Beide Verbindungen zeigten allerdings nur schwache estrogene Aktivität, die auf sterische Behinderung einer optimalen Assoziation in die LBD des ER beruhen könnte. Ihre Position könnte dabei in Richtung der α -Seite in den Bereich von Met^{421 (ER α)}/Ile^{373 (ER β)} verschoben sein. In ER β steht in diesem Bereich ein größeres Raumangebot zur Aufnahme eines Liganden zur Verfügung (vgl. Abbildung 3.3.4 Seite 126).

Die Strukturanalogie der Typ-II-Estrogene zu SERM führte zu weiteren Derivatisierung der Klasse der gut wirksamen (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline. Die basische Seitenkette in bekannten SERM trägt maßgeblich zur deren antagonistischen Wirkung bei. Durch Einführung einer basischen Seitenkette wurde versucht, das Wirkprofil von agonistisch wirkenden (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen zu ändern. Dies in Kombination mit Lipophilieänderungen wurde in den Transaktivierungsassays untersucht. Dazu wurde der Grad der Chlorierung des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors variiert und der Einfluss einer C-2-Ethylierung untersucht.

Mit der Einführung einer basischen Seitenkette an den zweiten Aromaten der 2-Imidazoline ragt der voluminöse Rest des 4-Substituenten tiefer in den β -Kanal der LBD des ER α in Richtung Asp³⁵¹ hinein (siehe Abbildung 3.3.14). Damit sollte es möglich sein, Helix 12 von ihrer Position zu verschieben, Wechselwirkungen mit Asp³⁵¹ über das basische Zentrum einzugehen und eine antagonistische Wirkung hervorzurufen.

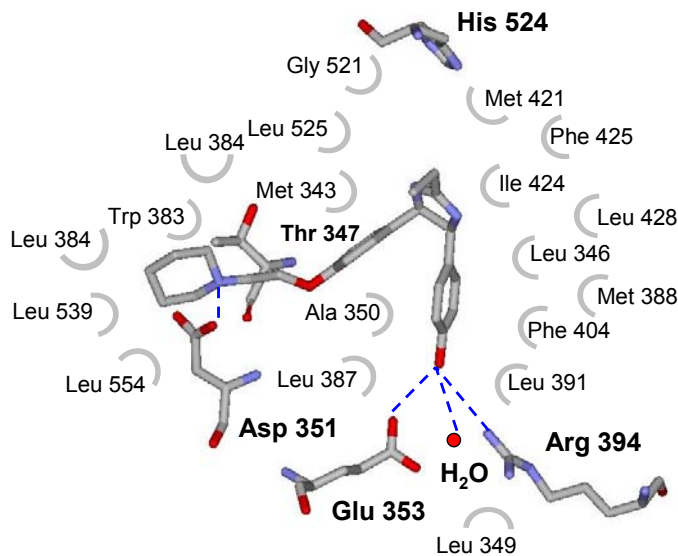


Abbildung 3.3.14 Bindungsstellenmodell für *(4R,5S)*/*(4S,5R)*-konfigurierte 4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette am Beispiel von **49**; orientiert an der Röntgenkristallstruktur des RAL/ER α -Komplexes [39] [Brookhaven PDB ID-Nummer 1ERR]

Die Einführung einer basischen Seitenkette in den 1,2-Diarylethan-Pharmakophor bei 2-Imidazolinen bewirkte an beiden ER-Subtypen eine Abschwächung der agonistischen Wirkung. Mit Ausnahme von SK2 (2-Pyrrolidin-1-yl-ethoxy-Gruppe) war die Verringerung der Wirksamkeit an ER β stärker ausgeprägt.

2-Imidazoline mit basischer Seitenkette sind größere Liganden, die wahrscheinlich von der größeren LBD des ER α besser aufgenommen werden. Dies spiegelt sich zum einen in der besseren Wirksamkeit an ER α sowie der stärkeren Reduktion im Vergleich zur Ausgangsverbindung an ER β wieder.

Wie in Abbildung 3.3.15 (Seite 142) zu sehen, führte die Derivatisierung von **41 a** (EC_{50} : ER α = 1.8 nM; ER β = 120 nM) mit einer 2-Piperidin-1-yl-ethoxy-Seitenkette zu Verbindung **48** mit an ER α 67-fach und an ER β 78-fach schlechteren Wirksamkeit.

Einer alleinigen Einführung einer Ethylgruppe in Position 2 des 2-Imidazolinrings folgte ebenfalls die Abnahme der estrogen Eigenschaften an beiden ER-Subtypen. Diese war an ER β stärker ausgeprägt. Die entsprechenden Derivate zeigten, wie erwähnt, eine höhere Wirksamkeit an ER α . Die an beiden ER Subtypen ähnlich gut wirksame Verbindung **42 a** (EC_{50} : ER α = 28 nM; ER β = 22 nM) war

an ER α ca. 6-mal bzw. an ER β 18-mal wirksamer als ihr Derivat **58** mit C-2-Ethylgruppe (siehe Abbildung 3.3.15 Seite 142).

Die Kombination einer C-2-Ethylierung mit einer basischen Seitenkette führte dagegen zu Liganden mit antagonistischen Eigenschaften am ER. Diese waren an den ER-Subtypen unterschiedlich stark ausgeprägt.

An ER α führte diese Kombination zu Liganden mit reduzierter oder fehlender agonistischen Wirkung, die stattdessen antagonistische Eigenschaften zeigten. Besonders ausgeprägt war dies bei Verbindung **49**.

An ER β dagegen zeigten Derivate mit zusätzlicher Ethylgruppe in Position 2 höhere agonistische Eigenschaften im Vergleich zu analogen Verbindungen ohne diesen Substituenten, verdeutlicht an dem Beispiel der Verbindungen **46** und **49** in Abbildung 3.3.15 (Seite 142).

Auch an ER β zeigten die Verbindungen antagonistische Eigenschaften. Im Gegensatz zu ER α waren diese Derivate nur schwach antagonistisch wirksam. (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-2-Ethyl-4-(4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**49**) zeigte an ER α eine fast 130-fach höhere antagonistische Wirksamkeit als an ER β (IC₅₀: ER α = 62 nM; ER β = 8000 nM) (siehe Abbildung 3.3.15 Seite 142).

Durch die zusätzliche Ethylgruppe könnte es zu einer veränderten Einlagerung in die LBD kommen, die in Bezug auf eine produktive Konformationsänderung von ER β eher toleriert wird, und gleichzeitig einer Verschiebung von Helix 12 in eine „antagonistische“ Positionierung entgegenwirkt.

In der Überlagerung mit RAL ist zu erkennen, dass die basischen Seitenketten unterschiedlich ausgerichtete Bögen beschreiben (siehe Abbildung 3.3.8 Seite 133), und somit an verschiedenen Seiten des β -Kanals der LBD entlang führen. Eine Verdrängung von Helix 12 durch 2-Imidazoline mit basischer Seitenkette ist demnach wahrscheinlich. Sie erfolgt aber nicht in gleicher Weise wie bei RAL. Somit werden die agonistischen Eigenschaften der 2-Imidazoline stark gemindert, antagonistische Effekte dagegen nur schwach ausgebildet.

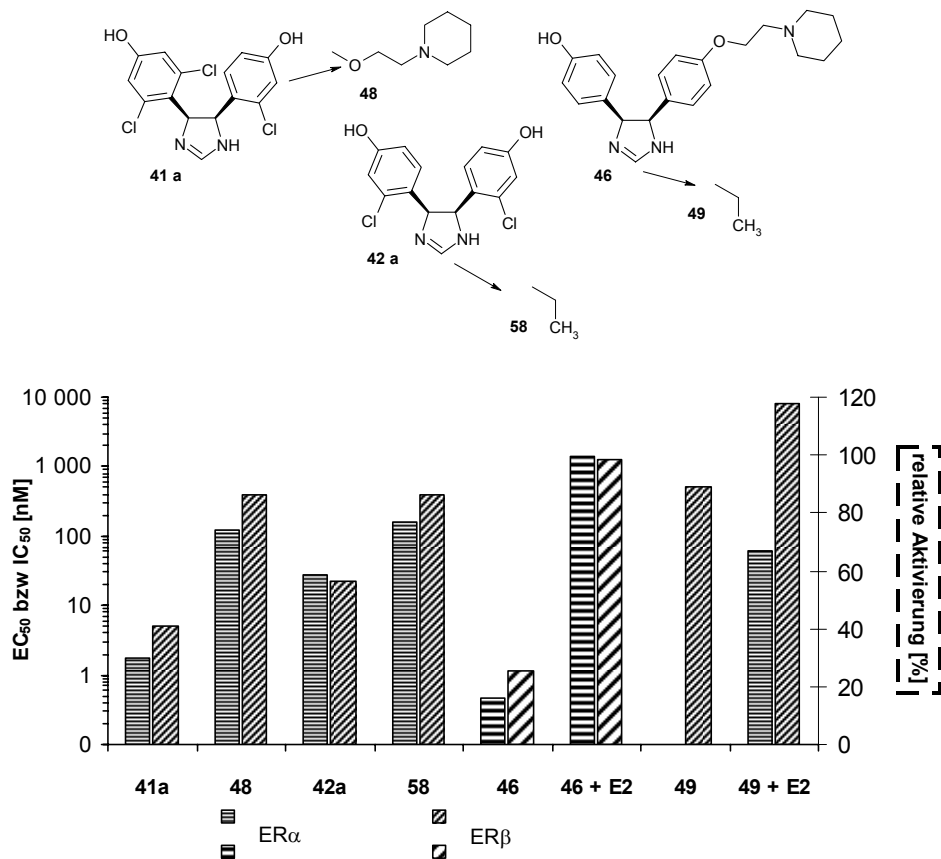


Abbildung 3.3.15 EC₅₀- und IC₅₀-Werte (feine Schraffierung und Skalierung links) bzw. relative Aktivierung bei 10 μ M; (grobe Schraffierung und Skalierung rechts) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-konfigurierter 4,5-Diaryl-2-imidazolin-Derivate; + E2: Test auf antagonistische Wirkung mit C_{E2} ER α = 0.030 nM bzw. ER β = 0.30 nM

Ebenso wie bei den Typ-I-Estrogenen war die agonistische Wirkung der Typ-II-Estrogene in allen Transaktivierungsassays abhängig von der Konfiguration des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors (siehe Abbildung 3.3.11 Seite 136). (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-konfigurierte 2-Imidazoline haben eine andere Raumstruktur als ihre (*R*,*S*)/(*S*,*R*)-konfigurierte Diastereomere. Die Aromaten stehen jeweils equatorial auf verschiedenen Seiten der Ringebene (siehe Abbildung 3.3.16). Bei Assoziation einer der Phenylreste an Glu³⁵³, Arg³⁹⁴ und ein Wassermolekül weist der zweite Aromat in entgegengesetzte Richtung zum ersten Ring und ist nicht mehr in den β -Kanal der LBD orientiert. Eine Bindung analog des Bindungsmodells für Typ-II-Estrogene ist nicht möglich.

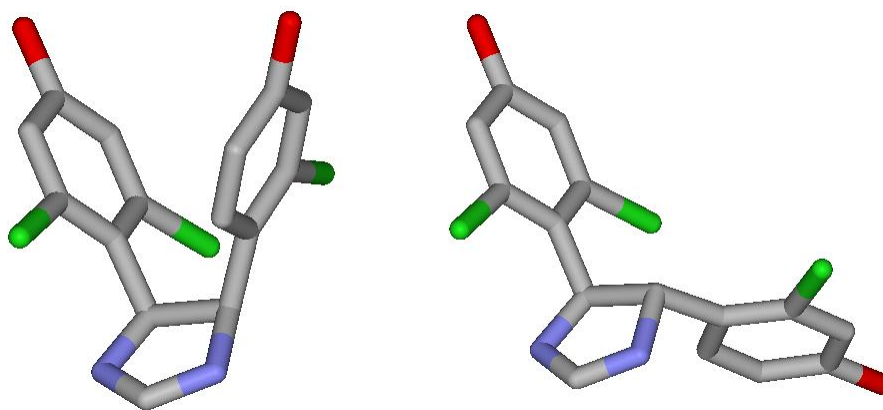


Abbildung 3.3.16 Konformation von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)- (links) und (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-konfigurierten (rechts) 2-Imidazoline **41 a** und **b**

Anhand der Kopplungskonstanten der beiden nicht äquivalenten benzylichen Protonen (in Position 4 und 5) im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 2-Imidazolins **41 b** ($J_3 = 9.7 \text{ Hz}$) und der Beziehung von Karplus^e liegt der Torsionswinkel im Bereich zwischen 140° und 180° [141, 164]. Hohe Torsionswinkel würden zu starken Ringspannungen führen, so dass angenommen werden kann, dass er im Bereich von 140° liegt. Daraus ergibt sich ein O-O-Abstand von ca. 10 \AA , der damit im Bereich desjenigen von E2 (10.9 \AA) liegt [141]. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu His⁵²⁴ bzw. His⁴⁷⁵ scheint möglich zu sein. Doch durch die gewinkelte Struktur liegt der Imidazolinring nicht in einer Ebene mit den Aromaten. Lipophile Wechselwirkungen zur LDB wie sie von dem Steroidgerüst des E2 eingegangen werden, können nicht in gleicher Weise erfolgen. Dem entsprechend sind (*R,R*)/(*S,S*)-konfigurierte zyklische Typ-II-Estrogene zwischen 10- (MCF-2a-Zellen) und 100-mal (ER-subtypselektive Assays) schwächer wirksame als ihre entsprechenden Diastereomere.

Überraschend war deshalb die Wirkung des (*R,R*)/(*S,S*)-konfigurierten Imidazolidins **81** (EC_{50} : MCF-7-2a-Zelllinie = 580 nM ; $\text{ER}\alpha = 7.8 \text{ nM}$; $\text{ER}\beta = 3.5 \text{ nM}$), die maximal um den Faktor 4 geringer war als die des 2-Imidazolins **41 a** (siehe Abbildung 3.3.7 Seite 130), obwohl die Aromaten durch die (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-Konfiguration auf verschiedenen Seiten des Imidazolidinrings liegen. Das entsprechende Diastereomer mit *cis*-Anordnung der Phenylsubstituenten stand konnte bisher nicht getestet werden.

^e Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstante vom Diederwinkel

Imidazolidine beinhalten eine Aminalstruktur (R-NH-CH₂-NH-R), die durch Säuren leicht hydrolysiert werden kann (siehe Abbildung 3.3.17).

Untersuchungen verschiedener Imidazolidine in wässrigem Milieu bei 30 °C zeigten, dass die Hydrolysegeschwindigkeit pH-abhängig ist. Beginnend mit der Protonierung eines Stickstoffatoms erfolgt die reversible Ringöffnung zu einer kationischen Schiffischen Base. In saurer Lösung ist die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Ringöffnung je nach Substitutionsmuster des Imidazolidins 3 bis 5 *log*-Einheiten höher als in alkalischem Milieu. Die weitere Hydrolyse der Schiffischen Base zu Diamin und Aldehyd ist weitgehend pH-unabhängig. [165-168]

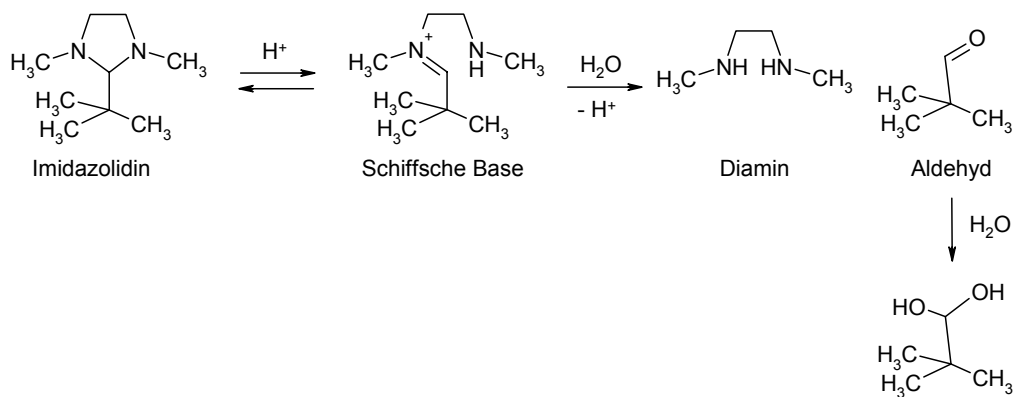


Abbildung 3.3.17 Hydrolyse von 2-(*tert*-Butyl)-N,N'-dimethyl-1,3-imidazolidin nach Fife et al. [166]

Unter den Testbedingungen der Transaktivierungsassays (pH 7.4, 37 °C, 18 bis 50 Stunden) ist es möglich, dass Imidazolidin **81** einer Hydrolyse unterliegt. Nach Ringöffnung läge ein Typ-I-Estrogen vor, dem die freie Rotation um die Ethaneinheit möglich ist. Nach vollständiger Hydrolyse läge sogar neben Formalddehyd bzw. dessen Hydrat Diamin **21 b** vorl. Eine Stabilitätsuntersuchung des Imidazolidins unter den durchgeführten Testbedingungen erfolgte nicht im Rahmen dieser Arbeit.

An der MCF-7-2a-Zelllinie zeigten **81** und **21 b** nur wenig Unterschied in ihrer Wirksamkeit. Bei den ER-subtypeselektiven Tests zeigten sich mehr Unterschiede, wobei an ER β das Imidazolidin ca. 10-mal wirksamer war als das Diamin (siehe Abbildung 3.3.18). Die Inkubationszeit der Substanzen bei der Testung mit MCF-7-2a-Zellen ist mit 50 Stunden viel länger als im transienten Transfektionsexperiment (Inkubationszeit 18 Stunden), so dass die Hydrolyse von **81** zu

21 b weiter fortgeschritten sein könnte als bei der Testung an den ER α und ER β .

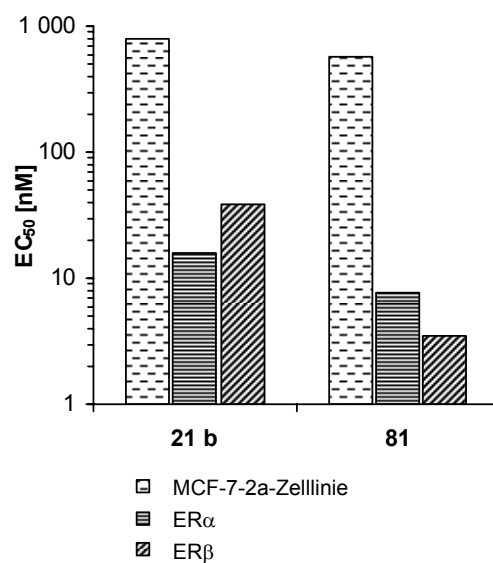


Abbildung 3.3.18 EC₅₀-Werte des Diamins **21 b** und Imidazolidins **81**, beide mit der (1*R*,2*R*)/(1*S*,2*S*)-konfiguriertem 1,2-Diarylethan-Pharmakophor

4 Zusammenfassung

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Reporterassays aufgebaut, mit denen eine *in vitro* Testung estrogen wirksamer Verbindungen an den ER-Subtypen α und β möglich ist. Die neuen Transaktivierungsassays basieren auf der transienten Transfektion von ER-negativen U-2OS-Zellen mit Plasmiden unter Verwendung von Fugene 6[®] (Lipid/DNA-Ratio 3:1, Transfektionsdauer 18 Stunden). Auf diese Weise wurden das Rezeptorplasmid für den jeweiligen ER-Subtyp (pSG5-ER α (Heg0) bzw. pSG5-ER β FL) zusammen mit einem Reporterplasmid ((p(ERE)₂luc⁺) in die Zellen eingeschleust (Verhältnis Rezeptor-/Reporterplasmid: 1:100). Die Aktivierung des Reporterassays wurden nach 21 Stunden Inkubation mit den Testsubstanzen über eine Lumineszenzmessung bestimmt.

Diese Testsysteme ergänzen den bestehenden Transaktivierungsassay mit ER α -enthaltenden MCF-7-2a-Zellen.

Mit den drei Testmodellen wurden verschiedene Verbindungen auf ihre Wirkung auf den ER untersucht. Dabei stellten sich die neuen ER/Reporterassays als empfindlicher als der Assay mit MCF-7-2a-Zellen heraus. Ein Wirkunterschied in den Testsystemen könnte über ein Abfangen von estrogen wirksamen Verbindungen durch den mER, der an der Membran der ER-positiven MCF-7-2a-Zellen vermutet wird, hervorgerufen werden.

Untersuchungen von Estrogenen und Antiestrogenen am ER ergaben, dass Genistein ein Agonist mit bevorzugter Wirkung an ER β (EC₅₀: ER α = 5.5 nM; ER β = 0.19 nM) und Raloxifen ein Antagonist mit Präferenz für ER α ist (IC₅₀: ER α = 0.55 nM; ER β = 6.0 nM).

Fulvestrant erwies sich als starkes Antiestrogen ohne ER-Subtypselektivität (IC₅₀: ER α = 0.28 nM; ER β = 0.3 nM). Aus Zytotoxizitätstests ergab sich eine ER-abhängige Zytotoxizität für Fulvestrant.

Es wurde ebenfalls verschiedene offenkettige und zyklische Verbindungen mit von Hexestrol abgeleitetem 1,2-Diarylethan-Pharmakophor auf ihre Wirkung am ER untersucht.

Die Verbindungen können entsprechend ihrer Bindung an den ER in zwei Klassen eingeteilt werden:

Typ-I-Estrogene sind planare hydrophobe Verbindungen mit struktureller Ähnlichkeit zu E2 wie z.B. Diethylstilbestrol und Hexestrol. Sie binden in der LBD des ER ähnlich wie E2.

Hierzu zählen ringoffene 1,2-Diazido- und 1,2-Diamino-1,2-diarylethane (Diazide bzw. Diamine). Eine freie Rotation um die C-C-Bindung des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors ist hier möglich.

Typ-II-Estrogene sind zyklische Verbindungen mit einer gewinkelten Raumstruktur, die einen anderen Bindungsmodus als E2 in der LBD erfordern. Eine Rotation um die Ethaneinheit ist nicht mehr möglich. Die Konformation des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors ist dadurch fixiert.

Der Prototyp dieser Klasse sind [1,2-Diamio-1,2-diarylethan]Pt(II)-Komplexe (Platinkomplexe). Daneben wurde der 1,2-Diarylethan-Pharmakophor mit dem Heterozyklus von Imidazolen, 2-Imidazolinen, Imidazolidinen und Pierazinen kombiniert.

Eine *para*-Hydroxysubstitution beider Arylringe erwies sich sowohl bei Typ-I- als auch bei Typ-II-Estrogenen als Strukturvoraussetzung für eine agonistische Wirkung am ER.

Eine Ausnahme bildeten das Diazid **10 a** und der Platinkomplex **30 a** – beide methoxysubstituiert in den 4 Positionen der Arylringe - deren starke hydrophobe Moleküleigenschaften die fehlenden hydrophilen Kontakte durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen in der LDB ausgleichen. Während die planare Diiodoplatineinheit in **30 a** hydrophobe Interaktionen des C/D-Rings der E2-Steroidgerüsts simuliert, ragen die linearen Azidgruppen von **10 a** analog den Ethylgruppen des DES in hydrophobe Seitentaschen der LBD.

Die estrogenische Wirkung des entsprechenden hydroxysubstituierten Platinkomplexes **31 a** ist an ER α dennoch über 120-mal wirksamer als **30 a** (EC₅₀ an ER α : **30 a** = 310 nM; **31 a** = 2.5 nM). Dies unterstreicht die Bedeutung der *para*-Hydroxysubstitution.

In dem Bindungsmodell für Typ-I-Estrogenen assoziiert der Ligand in einer anti-periplanaren Konformation der Arylreste in der LBD. Zwischen einer freien Hydroxygruppe Glu³⁵³ (305), Arg³⁹⁴ (346) und einem Wassermolekül sowie der

zweiten Hydroxygruppe und His^{524 (475)} werden Wasserstoffbrücken ausgebildet^f.

Diamin **21 a** mit (1*R*,2*S*/1*S*,2*R*)-konfiguriertem 1,2-Diarylethan-Pharmakophor zeigte eine ca. 10-fach höher Wirksamkeit an ER α (EC₅₀: ER α = 2.8 nM; ER β = 31 nM). Eine Aminogruppe reicht in der LBD in einen Bereich auf der β -Seite (bezogen auf in der LBD gebundenen E2) in der Met³³⁶ in ER β gegen Leu³⁸⁴ in ER α ausgetauscht ist. Die niedrigere Potenz von **21 a** an ER β könnte in sterischen Behinderungen zwischen der Aminogruppe und der großen Seitenkette von Met³³⁶ begründet sein.

Die polaren Aminogruppen des (1*R*,2*R*/1*S*,2*S*)-konfigurierten Diamins **21 b** stehen bei antiperiplanarer Konformation der Arylreste auf der gleichen Molekülseite. In der LBD des ER könnten dadurch wichtige hydrophobe Kontakte gestört werden, so dass sich daraus an ER α eine geringere Wirksamkeit im Vergleich zu seinem Diastereomer **21 a** ergibt (EC₅₀ an ER α : **21 a** = 2.8 nM; **21 b** = 16 nM).

Bei Typ-II-Estrogenen ergab sich eine Anhängigkeit der estrogenen Wirkung von der Grundstruktur bzw. des O-O-Abstandes. Zyklische Verbindungen wie der Platinkomplex **31 a** und das 4,5-Diaryl-2-imidazolin **41 a** zeigten eine vergleichbare Wirksamkeit zu **21 a**. 2,3-Diarylpiperazine und 4,5-Diarylimidazole erwiesen sich als schwach wirksam am ER.

Durch die vergleichbare Wirksamkeit des (4*R*,5*S*/4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolins **41 a** mit dem analogen Platinkomplex **31 a** konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität der Diiodoplatineinheit nicht essentiell für die Vermittlung estrogenen Eigenschaften der Typ-II-Estrogene ist.

Typ-II-Estrogene können ebenfalls über einen *para*-hydroxylierten Aromaten mit Glu^{353 (305)}, Arg^{394 (346)} und einem Wassermolekül hydrophile Interaktionen eingehen^f. Durch ihre gewinkelte Molekülgeometrie ist die zweite Hydroxygruppe aber nicht in Richtung His^{524 (475)} in der LBD orientiert. Aus der Strukturanalogie zu SERM geht das Bindungsmodell der Typ-II-Estrogene deshalb von einer zweiten Verankerung im β -Kanal der LBD des ER aus. Hierhin ragt z.B. ebenfalls die basische Seitenkette von Raloxifen. Der zweite Aromat ragt aber

^f Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die analogen Kontaktpunkte im humanen ER β .

nicht bis zu Asp³⁵¹, dem charakteristischen Ankerpunkt der SERM, in den β -Kanal der LBD hinein. Asp³⁵¹ ist zudem in einem ER/Agonisten-Komplex nicht zugänglich. Aus diesen Gründen werden hydrophile Kontakte mit Thr³⁴⁷ von Typ-II-Estrogenen zur Ergänzung der Bindung in der LBD angenommen⁹.

An 2-Imidazoline und Piperazine konnte gezeigt werden, dass durch Erhöhung der Lipophilie eine Wirksteigerung erreicht wird. Auf diese Weise ergeben sich zusätzliche hydrophobe Assoziationsmöglichkeiten für die Liganden in der LBD. Eine Erhöhung der Wirksamkeit zeigte sich z.B. durch einen höheren Chlorierungsgrad in den Arylresten des 1,2-Diarylethan-Pharmakophors.

Weiterhin stellte sich heraus, dass eine N-Alkylierung des 2-Imidazolrings eine deutliche Verstärkung der estrogene Wirkung in Abhängigkeit der Kettenlänge zur Folge hatte.

Während 2-Imidazoline gut wirksame Typ-II-Estrogene waren, erwiesen sich Piperazine als den 2-Imidazolinen unterlegene Estrogene.

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-N-Ethyl-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**53**)

stellte sich als wirksamste Verbindung der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen heraus (EC₅₀: ER α = 0.42 nM; ER β = 3.1 nM; MCF-7-2a-Zelllinie = 11 nM).

Sie zeigte auch eine um den Faktor 7 höhere Wirksamkeit an ER α . Dies könnte in dem größeren Raumbedarf durch die eingeführte Ethylgruppe begründet liegen. Die LBD des ER α ist größer und könnte den Liganden besser aufnehmen. Eine Alkylierung beider Stickstoffe des 2-Imidazolrings führte zu ionischen Derivaten mit teilweise besserer Wirksamkeit als die unalkylierte Ausgangsverbindung. Eine Substitution an C-2 der 2-Imidazoline hingegen bewirkte eine Abnahme der Wirksamkeit.

In Erweiterung der Strukturanalogie zu SERM wurde versucht, durch Einführung basischer Seitenketten in Position 4 eines Arylrests das Wirkprofil der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline von Agonisten in Antagonisten zu ändern.

Durch Vergleich der Struktur der 2-Imidazoline mit basischer Seitenkette mit Raloxifen und den Erkenntnissen aus der Röntgenkristallanalyse des RAL/ER α -

⁹ Die Angaben der Aminosäuren (Asp³⁵¹ und Thr³⁴⁷) beziehen sich auf ER α .

Komplexes ist die Ausbildung eine Wasserstoffbrückenbindung des basischen Zentrums in der Seitenkette zu Asp³⁵¹ in der LBD des ER α denkbar.

Eine basische Seitenkette führte aber erst in Kombination mit einer Ethylierung an C-2 des 2-Imidazolinrings zu einer antagonistischen Wirkung. Dies war an ER α stärker ausgeprägt.

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-Ethyl-4-(4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**49**) zeigte an ER α eine fast 130-fach höhere antagonistische Wirksamkeit (IC₅₀: ER α = 62 nM; ER β = 8000 nM).

Während **49** an ER α keine agonistische Aktivität mehr zeigte, betrug ihr EC₅₀-Wert an ER β 510 nM.

(*R,R*)/(*S,S*)-konfigurierte Typ-II-Estrogene haben eine Molekülgeometrie, die weder mit E2 noch mit (*R,S*)/(*S,R*)-konfigurierten Platinkomplexen in Einklang zu bringen ist. Sie sind gewinkelt anstatt planar und ihre Aromaten sind *trans*-ständig zueinander angerichtet, so dass eine optimale Orientierung eines Arylrests in den β -Kanal nicht möglich ist. Dementsprechend sind sie zwischen 10- (MCF-7-2a-Zellen) und 100-mal (ER-subtypselektive Assays) schwächer wirksam als ihre entsprechenden Diastereomere.

Bei der guten estrogene Wirksamkeit des (4*R*,5*R*)/(4*S*,4*S*)-4,5-Diarylimidazolidins **81** (EC₅₀: MCF-7-2a-Zellen = 580 nM; ER α = 7.8 nM; ER β = 3.5 nM) muss beachtet werden, dass es unter Testbedingungen (pH 7.4, 37 °C, 18 - 50 h) einer Hydrolyse zu einem Typ-I-Estrogen unterliegen kann.

5 Experimenteller Teil

5 Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Materialien

5.1.1 Geräte

Absaughilfe VACUBOY®	Integra
8-Kanal-Edelstahladapter	Integra
8-Kanal-Kunststoffadapter mit Abwurfvorrichtung für Einwegtips	Integra
Analysenwaage BP211D	Satorius
Autoklav 2540 ELV Dampfsterilisator	Tuttnauer
CO ₂ -Begasungsbrutschränke:	Heraeus/Kendro
Cytoperm 8080	
B5560 EK/CO ₂	
Einkanal- und Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Kühltruhe (-80 °C) Taurus PLTA 0986	National Lab
Luminometer:	
Microlumat LB 96 P	EG&G Berthold
Multilable Counter mit Injektor 1420 victor ²	Wallac/Perkin Elmer
Magnetrührer Combimag RCT	IKA
Microplattenautoreader Flash Scan	Analytik Jena
Mikroskope:	Zeiss
Invertmikroskop Axiovert 40 CFL mit Digitalkamera	Inteq
Invertmikroskop Axiovert 135	
Multipette Plus	Eppendorf
Neubauerzählkammer (0.100 mm, 0.0025 mm ²) improved	Marienfeld
pH-Elektrode Inlab 419 mit Thermofühler	Mettler Toledo
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Pipettierhilfe PIPETBOY®	Integra
Schüttler TiMix mit Inkubationshaube TH15	Edmund Bühler
Sicherheitsbunsenbrenner FIREBOY®	Integra

Spektralphotometer UVIKON 930	Kontron
Sterilfilterhalter	Satorius
Sterilwerkbänke:	Heraeus/Kendro
Sterilwerkbank Lamin Air HB 2448	
Sterilwerkbank Hera safe	
Stickstofftank GT 11	Air Liquide
Thermoblock TB1	Biometra
Ultraschallbad	Kontron
UV/VIS-Mikroplattenautoreader	
FLASHScan S12	Analytik Jena
Vakuumpumpe	KNF
Vortexer	Heidolph
Wasserbad SW-21C	Julabo Labortechnik
Zentrifugen:	
Zentrifuge Megafuge [®] 1.0R	Heraeus
Eppendorf 5415 C	Eppendorf

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-Loch Platten	Nunc, TPP
96-Lochplatten (Mikrotiterplatten)	Nunc, Packard/Perkin
klare 96- Lochplatten	Elmer
weiße 96-Lochplatten	
schwarze 96-Lochplatten	
Einmalkanülen	Braun
Einmalspritzen	Braun
Membranfilter 0.2 µm, Ø 50 mm; 0.45 µm, Ø 50 mm	Satorius
Pasteurpipetten	Brand
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf
Polystyrol-Einmalküvetten mit Verengung	Sarstedt
Reaktionsgefäße: 0.5 mL, 2.0 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße: 1.5 mL	Sarstedt
Rundbodenröhrchen 12 mL	Falcon
Serumpipetten (steril): 2 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt
Spritzen für Multipette plus	Eppendorf

UV-Einmalküvetten	Brand
Zellkulturflaschen:	
75 cm ² Wachstumsfläche	Sarstedt
175 cm ² Wachstumsfläche	Nunc, TPP
Zellkulturplatten: 4 cm, 6 cm, 10 cm Durchmesser	TPP
Zentrifugenröhrchen konisch 15 mL, 50 mL	Sarstedt, Falcon

5.1.3 Chemikalien

17 β -Estradiol	Sigma, Fluka
4-Hydroxytamoxifen	Sigma
bovines Serum Albumin (als Proteinstandard)	Serva
Dimethylsulfoxid	VWR
Ethanol 96 %	VWR
Fulvestrant	Tocris
Genistein	Fr. Prof. B. Dräger
Glutardialdehyd 25 %	VWR
Glycerin 85 %	VWR
HCl p.a.	VWR
<i>meso</i> -Hexestrol	Sigma
N,N'-Dimethylformamid p.a.	VWR
NaOH p.a.	VWR
Raloxifen	freundliche Gabe von Prof. Pertz
Tamoxifen-citrat	Acros
<i>E</i> -Diethylstilbestrol	Serva

5.1.4 Puffer, Lösungen

Ampicillin-Na-Stammlösung	100 mg/ml in Aqua bidest.	Sigma
Eindeckmedium	70 % (V/V) Glycerol in PBS	VWR
Fugene 6 [®]	Transfektionsreagenz	Roche
G418-Lösungen als Kulturzusatz	Lagerung: -20°C 80 mg/mL G418 in PBS	PAN, Sigma

Kohlesuspension für ct-FCS	10.0 g Norit A, 100.0 mg Dextran 60 in 200 mL Tris- Puffer pH = 7.5	Serva, Sigma
Kristallviolettlösung	0.02 % (m/V) Kristallviolett in Aqua dest.	VWR
Lachs-DNA	Lösung: 1 µg/µL	Sigma
L-Glutaminstammlösung	200 mM L-Glutamin in PBS	Sigma
Luciferase-Assay Reagenz	20 mM Tricine, 33.3 µM Coenzym A, 1.07 mM DTT, 2.67 nM MgSO ₄ , 530 µM ATP, 470 µM Luciferin	Promega (Fertigprodukt)
Na-Phosphatpuffer pH 7.5	82 mL 0.2 M Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O, 18 mL 0.2 M NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O, Aqua bidet. ad 100 mL	VWR
<i>ONPG-Assay [169]</i>		
ONPG Stammlösung (Lagerung: -20°C)	6.65 mg/mL ONPG in Na- Phosphatpuffer	Sigma
Mg-Lösung (100×) (Lagerung: -20°C)	100 mM MgCl ₂ , 4.5 M β- Mercaptol	VWR
Reaktionspuffer vor Gebrauch frisch hergestellt	2.2 mL ONPG-Stammlö- sung, 100 µL Mg-Lösung (100×), Na-Phosphatpuffer ad 10.0 ml (3 mM ONPG, 1 mM MgCl ₂ , 45 mM β-Mercap- tol)	
Na ₂ CO ₃ -Lösung	1 M Na ₂ CO ₃ in Aqua bi- dest	VWR
Passive Lysis Buffer (5×)	vor Gebrauch 1:5 mit Wasser verdünnt	Promega

PBS	137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O, 1.4 mM KH ₂ PO ₄	VWR
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	10000 IE Penicillin, 10 mg Streptomycin	PAN, Biochron (fertige Mischung)
QIAFilter [®] Maxi Kit	Plasmidaufreinigungsset	Quiagen
TE-Puffer pH 8.0	10 mM Trisbase, 1 mM EDTA	VWR
Tris-Acetat-Puffer pH 7.5	0.5 M Tris, Essigsäure (bis pH = 7.5) in Aqua bidest.	VWR
Tris-Puffer pH 7.5	10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA	VWR
Trypsin/ EDTA-Lösung	0,17 % (m/V) Trysin, 0,07 % (m/V) EDTA	PAN, VWR
<i>X-Gal-Assay:</i>		
Reaktionspuffer	5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆], 5 mM, K ₄ [Fe(CN) ₆] × 3H ₂ O, 2 mM MgSO ₄ in PBS	Acros
X-Gal-Stammlösung	2 % (m/V) X-Gal in DMF	Sigma
Reaktionslösung	0.2 % (m/V) X-Gal in Reaktionspuffer (entspricht 1:10 Verdünnung der X-Gal-Stammlösung)	

Alle weiteren Reagenzien wurden von Aldrich, VWR, Fluka oder Serva bezogen. Im pharmakologischen Teil wurde stets mit bidestilliertem Wasser gearbeitet.

5.1.5 Biologische Materialien

kompetente E. coli

freundliches Geschenk von AK Prof. Schäfer-Korting und AK Dr. Kleuser

MCF-7-Zellen	hormonabhängige, humane Mammakarzinomzelllinie	ATTC
MDA-MB-231-Zellen	hormonunabhängige, humane Mammakarzinomzelllinie	ATTC
p(ERE) ₂ -luc ⁺	Reporterplasmid	
pSG5-ER α (Heg0)	Rezeptorexpressionsplasmid für ER α	freundliche Geschenke von Dr. Fritzemeier,
pSG5-ER β FL	Rezeptorexpressionsplasmid für ER β	Schering AG, Berlin
pSV- β -Galactosidase Control Vektor	Kontrollvektor	Promega
U-2OS-Zellen	humane Osteosarkomzelllinie	freundliches Geschenk von Dr. Fritzemeier, Schering AG, Berlin
MCF-7-2a-Zellen	mit dem Vektor EREwtcluc [170] Vektor stabil transfi-zierte MCF-7-Zellen	Hafner [130]

5.1.6 Kulturmedien

Zur Herstellung der Medien für eukaryotische Zellen wird das entsprechende Pulvermedium in etwa $\frac{3}{4}$ des benötigten Volumens an Aqua bidest. gelöst. Nach Zugabe der jeweiligen Medienzusätze wird die Lösung vollständig aufgefüllt und der pH-Wert mit 0.1 N NaOH oder 0.1 N HCl auf pH 7.4–7.5 eingestellt. Anschließend wird das Medium über einen 0.2 μ m Membranfilter sterilfiltriert und bei 2–8°C aufbewahrt. Der Zusatz von FCS erfolgt erst bei Anbruch einer neuen Flasche.

LB-Medium und -Agar für E. coli werden eingewogen (25 g/L bzw. 40 g/L) und in Aqua bidest. gelöst bzw. suspendiert und anschließend autoklaviert. Ab einer Temperatur von 50 °C kann die Ampicillinlösung zur LB-Agarlösung gegeben werden, und schließlich Agarplatten gegossen (30–50 mL pro 10 cm Platte) werden.

E. coli:

LB-Medium	Sigma
LB Agar	Sigma
je 100 µg/mL Ampicillin zur Selektion	Sigma

MCF-7-2a-Zellen:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ohne Phenolrot)	Sigma, PAN Sigma, PAN
1 % (V/V) L-Glutaminammlösung	
5 % (V/V) Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	
0.5 % (V/V) G418-Kulturzusatz	PAN, Biochrom
5 % (V/V) (ct-)FCS	PAN, Biochrom

MCF-7-Zellen:

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	Sigma, PAN
Na-Pyruvat 110 mg/L	PAN, Serva
NaHCO ₃ 2.2 g/L	VWR
Gentamycinsulfat 50 mg/L	PAN
10 % (V/V) FCS	PAN, Biochrom

MDA-MB-231-Zellen:

McCoy's 5A Medium	Sigma
Na-Pyruvat 110 mg/L	PAN, Serva
NaHCO ₃ 2.2 g/L	VWR
Gentamycinsulfat 50 mg/L	PAN
5 % (V/V) FCS	PAN, Biochrom

U-2OS-Zellen:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma, PAN
2 % (V/V) L-Glutaminammlösung	
5 % (V/V) (ct-)FCS	PAN, Biochrom

5.2 Molekularbiologische Methoden zur Plasmidgewinnung

5.2.1 Anzucht und Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von kompetenten *E. coli* erfolgt grundsätzlich unter aseptischen Bedingungen bei 37 °C unter einer Inkubationshaube. Zur Gewinnung von einzelnen Kolonien werden Agarplatten aus LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/mL)

verwendet. Größere Volumina werden als Suspension in 500 mL Erlenmeyerkolben mit ampicillinhaltigem LB-Medium unter Schütteln (300 min^{-1}) kultiviert.

5.2.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation werden die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 50 μL der Zellsuspension von *E. coli* werden mit 1 μg zu transformierendem Plasmid in einem 2 mL Reaktionsgefäß gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgt für 30 Sekunden ein Hitzeschock bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Anschließend kommen die Zellen für zwei Minuten auf Eis. Schließlich werden 500 μL vorgewärmtes LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Heizblock inkubiert.

Zur Ampicillinselektion und Koloniegewinnung werden verschiedene Verdünnungen der Zellsuspension (1:10, 1:100) angesetzt, von denen je 100 μL auf einer vorgewärmten Agarplatte ausplattiert werden. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Agarplatten, auf denen abgegrenzte einzelne Kolonien erkennbar und isolierbar sind, werden für die weitere Plasmidgewinnung herangezogen.

Eine Kolonie transformierter *E. coli* wird zuerst für acht Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in LB-Medium mit Ampicillin in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen unter Schütteln (300 min^{-1}) inkubiert. 200 μL dieser Vorkultur werden dann in 100 mL ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht (12 bis 18 Stunden) in einem 500 mL Erlenmeyerkolben amplifiziert. Durch Zentrifugation (600 Umin^{-1} , 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) der Hauptkultur werden die transformierten Bakterien geerntet.

Transformierte Bakterien lassen sich gut bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Zugabe von Glycerol zum LB-Medium (500 μL 80 % (V/V) Glycerol + 500 μL Bakteriensuspension aus der Hauptkultur) kryokonservieren.

5.2.3 Plasmidaufreinigung

Die Plasmidaufreinigung erfolgt unter Verwendung des Plasmidaufreinigungskits QIAfilter[®] Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen gemäß den Herstellerangaben.

Die Resuspendierung des Bakterienpellets erfolgt in 10 mL RNase-haltigem Puffer, dem anschließend 10 mL Lysepuffer zugesetzt werden. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wird die alkalische Lyse durch Zugabe von 10 mL Kalium-

acetatpuffer beendet. Dabei kommt es zur Präzipitation von genomischer DNA, Proteinen und Zelltrümmern. Über Filterspritzen wird das Präzipitat abgetrennt. Das plasmidhaltige Lysat wird auf zuvor equilibrierte Qiagen-500-Säulen gegeben. Während die negativ geladene Plasmid-DNA auf dem Anionenaustauscherharz der Säulen festgehalten wird, werden Verunreinigungen mit 60 mL Waschpuffer entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt mit 15 mL eines stark salzhaltigen Puffers. Aus dem Eluat wird die Plasmid-DNA unter zu Hilfe nahme eines Präzipitators mit Isopropanol präzipitiert, mit Ethanol gewaschen und in TE-Puffer gelöst.

5.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der gewonnenen Plasmidlösung erfolgt photometrisch bei 280 nm und 260 nm gegen TE-Puffer in einer Dreifachbestimmung.

Zur Konzentrationsbestimmung wird eine Verdünnungsreihe von Lachs-DNA in TE-Puffer angesetzt (0.075 µg/µL, 0.05 µg/µL, 0.04 µg/µL, 0.03 µg/µL, 0.02 µg/µL, 0.01 µg/µL, 0.005 µg/µL) und bei 260 nm vermessen.

Die Plasmidlösung wird 1:5 verdünnt und vermessen. Über die erhaltene Kalibriergerade und unter Berücksichtigung der Verdünnung, kann dann auf die DNA-Konzentration der gewonnenen Plasmidlösung geschlossen werden.

Zur Bestimmung der Verunreinigung mit Proteinen wird der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm gebildet. Er sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Mit zunehmender Verunreinigung wird dieser kleiner. [171]

5.3 Allgemeine Zellbiologische Arbeitsmethoden

5.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die verwendeten Zelllinien werden unter aseptischen Bedingungen kultiviert. Dies erfolgt für die Dauerkultur in Gewebekulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche und Möglichkeit zum Gasaustausch in einem Brutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und unter Begasung mit CO₂. Für die U-2OS-Zelllinie wird ein CO₂-Gehalt von 7.5 % und für MCF-7-2a-, MCF-7- sowie MDA-MB-231-Zellen ein CO₂-Gehalt von 5 % eingestellt.

5.3.2 Passage der Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgt bei 80- bis 90%iger Konfluenz. Dazu wird das verbrauchte Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gespült und mit ausreichend Trypsin/ EDTA-Lösung von der Kulturoberfläche angelöst. Die Trypsin/ EDTA-Lösung wird abgesaugt und die Kulturflasche bis zum vollständigen Ablösen der Zelle (ca. 2 min) im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 10 mL frischem Kulturmedium werden die Zellen suspendiert und unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Das Vereinzeln verhindert, dass die Zellen in größeren Agglomeraten und Plaques wachsen, sondern ermöglicht, dass sie sich gleichmäßig verteilen und in einem Monolayer wachsen. Abhängig von der Zelllinie und der Kulturdauer werden unterschiedliche Zellmengen zur Subkultivierung in eine neue Kulturflasche eingesät (siehe Abbildung 5.3.1). Die Zellen werden ein- bis zweimal in der Woche passagiert.

Zelllinie	U-2OS	MCF-7-2a	MCF-7	MDA-MD-231
Einsaat [Zellen $\times 10^4$]	40/45	20	50	15
Kulturdauer [d]	3/4	4-5	7	7

Abbildung 5.3.1 Einsaatmengen und Kulturdauer der verschiedenen Zelllinien in Kulturflaschen mit 75 cm² Kulturfläche

5.3.3 Kryokonservierung der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen werden kurz vor der Konfluenz stehende Kulturen genommen und von der Kulturoberfläche angelöst (vgl. 5.3.2). Die Zellsuspension wird zentrifugiert (5 min, 2000 min⁻¹, RT). Der Überstand wird verworfen und jedes Zellpellet, das den Zellrasen einer 75 cm² Kulturflasche enthält, in 1 mL Einfriermedium (90 % (V/V) Kulturmedium, 10 % (V/V) DMSO) resuspendiert. Diese Zellsuspension wird in sterile Kryoröhrchen überführt, welche in Zellstoff und Aluminiumfolie gewickelt bei -80 °C für ein bis drei Tage vorgefroren und anschließend bei -196 °C in flüssigen Stickstoff aufbewahrt werden.

5.3.4 Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgt schnell. Die Kryoröhrchen werden dem Stickstofftank entnommen, in 70%igem Isopropanol (V/V) gelegt und bei 37 °C aufgetaut. Der Inhalt eines Kryoröhrchens wird in ein konisches Zentrifu-

genröhrchen überführt und mit 10 mL Kulturmedium gewaschen. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (5 min, 2000 min^{-1} , RT) und anschließend das Zellpellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wird in eine 75 cm^2 Kulturflasche gegeben und unter den in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Kulturbedingungen inkubiert. Gegebenenfalls erfolgt 24 bis 48 Stunden nach dem Auftauen ein Mediumwechsel.

5.3.5 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer. Diese hat Vertiefungen definierter Höhe (0.1 mm) und mehrere Quadrate definierter Fläche (1 mm^2) als Zählraster, woraus sich ein definiertes Volumen von $0.1 \mu\text{L}$ ergibt. Beschickt man sie mit einer homogenen Zellsuspension, kann man unter dem Mikroskop die Zellen in den Zählrastern auszählen und erhält durch das definierte Volumen eines Zählrasters die Zellkonzentration in Zellen $(Z) \times 10^4/\text{mL}$ der ausgezählten Zellsuspension.

5.3.6 Dextran/Kohlebehandlung von FCS

In FCS, das den Kulturmedien zugesetzt wird, sind neben Wachstumsfaktoren auch endogene Steroide enthalten. Da diese die Testung verfälschen würden, müssen sie weitgehend entfernt werden. Dies geschieht durch Adsorption an dextranbeschichteter Aktivkohle. In einem Mörser werden 10 g Aktivkohle mit etwas Tris-Puffer intensiv verrieben, in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit Tris-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 200 mL aufgefüllt. Die Suspension wird vier Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und über Nacht bei 0 bis $4 \text{ }^\circ\text{C}$ stehengelassen. Nicht benetzte Kohle schwimmt oben auf und wird vorsichtig von der Oberfläche abgesaugt. Die Kohlesuspension wird nach Zugabe von 100 mg Dextran gerührt (20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und anschließend zentrifugiert (10 min, 4000 min^{-1} , $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Die Hälfte des erhaltenen Kohlepellets wird anschließend zu 500 mL FCS gegeben, das zuvor bei $56 \text{ }^\circ\text{C}$ für 45 min im Wasserbad inaktiviert wurde, gerührt (3 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und zentrifugiert (20 min, 5000 min^{-1} , $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Der Überstand wird zu der zweiten Hälfte des Kohlepellets gegeben und abermals wie beschrieben gerührt und zentrifugiert. Das so behandelte FCS wird über $0.45 \mu\text{m}$ und $0.2 \mu\text{m}$ Membranfilter vorfiltriert und anschließend unter asepti-

schen Bedingungen über einem 0.2 µm Membranfilter sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.3.7 Allgemeine Transfektion mit Fugene 6®

Nachfolgend wird nur der Ablauf der Transfektion mit Fugene 6® beschrieben. Die verschiedenen Volumina der eingesetzten Lösungen werden in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

Für einen Transfektionsansatz wird die DNA in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Zur Mischung verschiedener DNA-Lösungen verwenden diese nur ineinander pipettiert - durch vortexen oder auf- und abpipettieren kann die DNA geschädigt werden. In ein 12 mL Rundbodenröhrchen wird DMEM ohne Zusätze vorgelegt. Hierhin wird das Transfektionsreagenz Fugene 6® gegeben. Die beiden Mischungen werden 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit dem Transfektionsreagenz langsam zu der DNA-Mischung in das 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Diese Transfektionslösung wird für 15 Minuten bei RT inkubiert wobei jegliche Erschütterungen vermieden werden. Dann wird Testmedium zu der Mischung gegeben und vorsichtig geschwenkt. Dieses Transfektionsmedium wird gegen das Medium auf den zu transfizierenden Zellen ausgetauscht und unter Kulturbedingungen weiter inkubiert.

5.4 Bestimmung der Zellmasse mittels Kristallviolett-Färbung

Die Färbung mit Kristallviolett beruht auf einer von Gillies beschriebenen leicht modifizierten Methode [132].

DNA-assoziierte Nukleoproteine der Zellen werden mit wässriger Kristallviolett-Lösung angefärbt. Der Farbstoff wird aus den Zellen wieder extrahiert und photometrisch vermessen. Die optische Dichte des Extraktes ist proportional zur Zellmasse.

Anwendung findet diese Methode bei Kontrollplatten von Transaktivierungsassays, der Generationszeitbestimmung und dem Test auf Zytotoxizität.

5.4.1 Aussaat und Abstoppen

Die Aussaat der Zellen erfolgt nach Behandlung der Zellen wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben. Die Zellen werden in sterile klare Mikrotiterplatten mit flachem Boden ausgesät. Die Zelldichte und das Suspensionsvolumen variieren je nach

Zweck und Zelllinie. Während der Aussaat ist auf gute Resuspendierung zu achten.

Nach festgelegter Inkubation unter Kulturbedingungen (vgl. Kapitel 5.3.1) wird das Zellwachstum abgestoppt. Hierzu wird das Medium möglichst quantitativ abgesaugt und die am Boden anhaftenden Zellen durch Zugabe von 100 μL pro Loch frisch zubereitete Lösung von 1 % (V/V) Glutardialdehyd in PBS fixiert. Nach einer Inkubation von 20 bis 30 Minuten bei RT wird die Fixierlösung abgeschüttelt und die Zellen bis zur Anfärbung mit 180 μL PBS pro Loch überschichtet, um das Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Bis zur Anfärbung können die Platten bei 4 °C aufbewahrt werden.

5.4.2 Anfärben der Zellen

Alle Platten eines Tests werden in einem Schritt angefärbt. Das PBS wird von den Platten abgeschüttelt und durch 100 μL /Loch Kristallviolettlösung (0.02 % (m/V)) ersetzt. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wird die Farbstofflösung entfernt. Überschüssige Farbstofflösung wird durch zweimaliges Waschen der Platten mit Wasser und anschließendem 15-minütigem Stehen lassen unter Wasser beseitigt. Das Wasser wird gründlich abgeschüttelt und die Platten auf Zellstoff ausgeklopft, um restliches Wasser zu entfernen. Der in den Zellen verbleibende Farbstoff wird durch Zusatz von 180 μL 70%igem (V/V) Ethanol pro Loch unter vierstündigem moderatem Schütteln (100 min^{-1}) extrahiert. Die optische Dichte der Farbstofflösung in den einzelnen Löchern wird mittels eines Plattenreaders bei 590 nm photometrisch vermessen.

5.5 Luciferaseassay

Der Luciferaseassay dient zur Bestimmung der Enzymaktivität von Luciferase. In den hier verwendeten Transaktivierungsexperimenten befindet sich das Luciferasegen unter Kontrolle von EREs auf einem Reporterplasmid. Die exprimierte Luciferasemenge ist somit proportional zur Stimulation des ER. Die Luciferaseaktivität wird über Lumineszenzmessung bestimmt und dient so als Maß für die estrogene Aktivität von Testverbindungen.

Die Zellen werden nach erfolgter Inkubation mit den Testverbindungen unter starkem Schütteln (600 min^{-1}) bei RT mit *Passive Lysis Buffer* (PLB) für 30 bis 60 Minuten lysiert.

Die Messung der Lumineszenz erfolgt in weißen oder schwarzen Mikrotiterplatten. Zu 50 μL Zelllysat werden in dem Luminometer automatisch 50 μL Luciferasesubstrat (Luciferase-Assay-Reagent) gegeben. Anschließend wird für 2 s geschüttelt und die Lichtentwicklung über den Zeitraum von 10 s gemessen. Die Angabe der Messergebnisse erfolgt in RLU.

5.6 X-Gal-Assay

Der X-Gal Assay dient zur Nachweis von β -Galaktosidase im Rahmen der Optimierung der transienten Transfektion. X-Gal ist ein Substrat der β -Galactosidase und wird von ihr gespalten, wobei ein blaues Indolderivat frei wird, das als blauer Niederschlag im mikroskopischen Bild in den Zellen zu erkennen ist. Zellen, die β -Galaktosidase gebildet haben, werden im Zellrasen angefärbt und unter dem Mikroskop in einem Zählraster ausgezählt.

Zur Vorbereitung wird der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, und die Zellen mit einer 0.25%igen Glutardialdehydlösung (V/V in PBS) fixiert. Die frisch hergestellte X-Gal-Stammlösung (2 % (m/V) in DMF) wird zur Herstellung der Färbelösung 1:10 in Reaktionspuffer verdünnt. Diese Färbelösung wird anschließend auf die Zellen gegeben. Die so präparierten Platten werden für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion werden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen unter PBS im Mikroskop ausgezählt. Für eine längere Aufbewahrung der Zellen bei +8 °C wird PBS durch Eindeckmedium ersetzt.

In der nachfolgenden Tabelle 5.6.1 sind die Volumina des X-Gal-Assays bei der Durchführung in verschiedenen Maßstäben aufgeführt.

	96-Loch- platte	6-Loch- platte	4 cm Platte	10 cm Platte
PBS	-	1.0 mL	1.0 mL	5.0 mL
Fixierlösung	0.1 mL	1.0 mL	1.0 mL	3.0 mL
Färbelösung	0.1 mL	1.0 mL	1.0 mL	5.0 mL
	Angaben pro Loch			

Tabelle 5.6.1 Volumina der zur Durchführung des X-Gal-Assays verwendeten Lösungen bei der Durchführung in verschiedenen Maßstäben

5.7 ONPG-Assay

Der ONPG-Assay dient zum Nachweis von β -Galactosidase im Rahmen der Optimierung der transienten Transfektion. ONPG ist ein Substrat der β -Galactosidase und wird von ihr gespalten, wobei ein gelbes Spaltprodukt frei wird, das photometrisch im Zelllysats vermessen wird.

Zur Vorbereitung wird das Medium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, und die Zellen mit PLB bei RT für 15 bis 30 Minuten unter starkem Schütteln (600 min^{-1}) lysiert. Die zerstörten Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers zusammengewischt und möglichst quantitativ in 1.5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Suspensionen werden kurz gevortext und schließlich die groben Zellbestandteile durch Zentrifugation (10 min, 2000 min^{-1} , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) vom Überstand abgetrennt. Die weitere Bearbeitung des Lysats erfolgt in den Löchern einer klaren Mikrotiterplatte. 50 μL des Lysats werden jeweils in ein Loch pipettiert. Dazu kommen 50 μL Reaktionspuffer. Die Proben werden durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für eine Stunde inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion werden zu jeder Probe 150 μL einer 1.0 M Na_2CO_3 -Lösung gegeben. Der Ansatz wird unter Vermeidung von Luftblasen gut durchmischt und bei 420 nm photometrisch in einem Plattenreader vermessen. In Tabelle 5.7.1 sind die Volumina bei Durchführung des ONPG-Assays in verschiedenen Maßstäben aufgeführt.

	96-Loch- platte	6-Loch- platte	4 cm Platte	10 cm Platte
PBS (Waschen)	0.1 mL	2.0 mL	2.0 mL	10.0 mL
PLB (Lyse)	50 μL	200 μL	200 μL	2000.0 μL
	Angaben pro Loch			
ONPG-Assay	Lysat	Reaktions- puffer	1.0 M Na_2CO_3-Lösung	
	50 μL	50 μL	150 μL	

Tabelle 5.7.1 Volumina der zur Durchführung des ONPG-Assays verwendeten Komponenten bei der Durchführung in verschiedenen Maßstäben

5.8 Transiente Transfektion im Rahmen der Optimierung der Transfektionseffizienz

5.8.1 Transiente Transfektion mit Kontrollvektor

Zur Optimierung bezüglich der DNA/Lipid-Ratio, Zelldicht, Transfektionsdauer, Trypsinierung, Up-scale und Trypsinierung wie in den folgenden Kapitel 5.8.1.1 bis 5.8.1.5 beschrieben wird der X-Gal (vgl. Kapitel 5.6) und/oder ONPG-Assay (vgl. Kapitel 5.7) durchgeführt. Die Mengenangaben für die unterschiedlichen Versuchsmaßstäbe bei einer Lipid/DNA-Ratio von 3:1 sind in Tabelle 5.8.1 aufgeführt.

U-2OS-Zellen werden ausgesät und nach 6 Stunden unter Verwendung von Fugene 6[®] mit einem Kontrollvektor transfiziert, der für das Enzym β -Galactosidase kodiert (pSV- β -Galactosidase Control Vector). Da die DNA-Mengen die nötige Menge an β -Galactosidasevektor überschreiten, wird die Differenz mit Lachs-DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in TE-Puffer) aufgefüllt. Die Durchführung erfolgt wie in Kapitel 5.3.7 beschrieben. Das Transfektionsmedium wird hier mit Kulturmedium angesetzt. Die Transfektionslösung inkubiert unter Kulturbedingungen auf den Zellen. Die Inkubationsdauer richtete sich nach dem Ziel der Untersuchung. Zur Beendigung der Transfektion werden die Zellen mit PBS gewaschen und bis zur Durchführung der β -Galactosidaseassays für 24 Stunden mit Kulturmedium unter Kulturbedingungen weiter inkubiert.

Lipid/DNA-Ratio 3:1	6-Lochplatte	4 cm Platte	10 cm Platte
Vorlage DMEM ohne Zusätze	97.0 μL	97.0 μL	485.0 μL
Fugene 6 [®]	3.0 μL	3.0 μL	15.0 μL
β -Galactosidase- vektor	0.50 μg	0.50 μg	2.50 μg
Lachs-DNA	0.50 μg	0.50 μg	2.50 μg
DMEM ad	2.0 mL	2.0 mL	10.0 mL
	Angaben pro Loch		

Tabelle 5.8.1 Mengenangaben der für die Optimierung der transiente Transfektion verwendeten Komponenten bei der Durchführung in verschiedenen Maßstäben

5.8.1.1 Lipid/DNA-Ratio

Zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von DNA-Menge und Transfektionsreagenz (Lipid/DNA-Ration) wird der X-Gal-Assay (vgl. Kapitel 5.6) mit verschiedenen Lipid/DNA-Rations in 6-Lochplatten durchgeführt.

Die Zellen werden mit einer Zelldichte von 2.5×10^5 Zellen/Loch in 2 mL Kulturmedium in die Löcher einer 6-Lochplatte ausgesät. Sechs Stunden später erfolgt die Transfektion mit verschiedenen Lipid/DNA-Rations (3:2, 3:1, 6:1). Nach 18 Stunden wird die Transfektion beendet und 24 Stunden später wird der X-Gal-Assay durchgeführt. Die Mengenangaben der Komponenten für die verschiedenen Ansätze sind in Tabelle 5.8.2 aufgeführt.

Lipid/DNA-Ratio	3:2	3:1	6:1a	6:1b	6:1c
Vorlage DMEM ohne Zusätze	97.0 μ L	97.0 μ L	194.0 μ L	194.0 μ L	94.0 μ L
Fugene 6 [®]	3.0 μ L	3.0 μ L	6.0 μ L	6.0 μ L	6.0 μ L
β -Galactosidasevektor	0.5 μ g	0.5 μ g	0.5 μ g	0.5 μ g	0.5 μ g
Lachs-DNA	1.5 μ g	0.5 μ g	0.5 μ g	0.5 μ g	0.5 μ g
DMEM ad	2.0 mL	2.0 mL	4.0 mL	2.0 mL	2.0 mL

Tabelle 5.8.2 Mengenangaben der für die Optimierung der Lipid/DNA-Ratio verwendeten Komponenten bei der Durchführung in 6-Lochplatten; Angaben pro Loch

5.8.1.2 Zelldichte

Die Zellen werden mit unterschiedlicher Zelldichte in Löcher von 6-Lochplatten ausgesät (2.0×10^5 Zellen/Loch; 2.5×10^5 Zellen/Loch; 3.0×10^5 Zellen/Loch). Unter Verwendung einer Transfektionslösung mit einer Lipid/DNA-Ration von 3:1 werden die Zellen 6 Stunden später transfiziert. Nach 18 Stunden wird die Transfektion beendet und 24 Stunden später wird der X-Gal- und ONPG-Assay durchgeführt.

5.8.1.3 Transfektionsdauer

Die Zellen werden mit einer Dichte von 2.5×10^5 Zellen/Platte in 4 cm Platten in 2 mL Kulturmedium ausgesät. Unter Verwendung einer Transfektionslösung mit einer Lipid/DNA-Ration von 3:1 werden die Zellen transfiziert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (3 h, 6 h, 18 h, 24 h und 30 h) erfolgt der Abbruch der Transfektion durch einen Mediumwechsel mit Kulturmedium. Bis zur Durchführung des X-Gal- und ONPG-Assays werden die Zellen unter Kulturbedingungen kultiviert. Die β -Galactosidaseassays werden bei allen Ansätzen gleichzeitig durchgeführt.

5.8.1.4 Einfluss der Trypsinierung

Die Zellen werden mit einer Zelldichte von 1.5×10^5 Zellen/Loch in Löcher von 6-Loch-platten mit 2 mL Kulturmedium ausgesät. Unter Verwendung einer Transfektionslösung mit einer Lipid/DNA-Ration von 3:1 werden die Zellen transfiziert. Nach 18 Stunden wird die Transfektionslösung abgesaugt, und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden durch Trypsinierung von der Kulturfläche abgelöst und mit einer Zelldichte von 1.0×10^4 Zellen/Loch mit 100 μ L Kulturmedium in klare 96-Lochplatten eingesät. Bei den Kontrollkulturen ohne Trypsinierung erfolgt nur ein Mediumwechsel in den 6-Lochplatten. Nach 24 Stunden wird der X-Gal- und ONPG-Assay durchgeführt.

5.8.1.5 Up-Scale mit und ohne Trypsinierung

Für den Up-Scale werden die Zellen in 10 cm Platten ausgesät, so dass das Verhältnis von Zelldichte und Wachstumsfläche gleich ist wie bei den vorangegangenen Optimierungen. Es werden zwei Zelldichten gewählt.

Die Zellen werden mit einer Zelldichte von 1.0×10^6 Zellen/10 cm Platte und 1.5×10^6 Zellen/10 cm Platte mit 10 mL Kulturmedium eingesät. Unter Verwendung einer Transfektionslösung mit einer DNA/Lipid-Ratio von 3:1 werden die Zellen transfiziert. Nach 18 Stunden wird die Transfektionslösung abgesaugt, und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden durch Trypsinierung von der Kulturfläche abgelöst und mit einer Zelldichte von 1.0×10^4 Zellen/Loch mit 100 μ L Kulturmedium in klare 96-Lochplatten eingesät. Bei den Kontrollkulturen ohne Trypsinierung erfolgt nur ein Mediumwechsel in den 10 cm Platten. Nach 24 Stunden wird jeweils der X-Gal- und ONPG-Assay durchgeführt.

5.8.2 Transiente Transfektion mit Rezeptor- und Reporterplasmid

Die optimalen Bedingungen für die allgemeine Durchführung der transienten Transfektion werden auf die transiente Transfektion mit ER-Plasmiden und Reporterplasmid übertragen und weitere Optimierungen Reportergensystems vorgenommen.

U-2OS-Zellen werden mindestens 24 Stunden vor Beginn des Tests auf Medium mit ct-FCS (ct-Medium) umgestellt. U-2OS-Zellen werden ausgesät (1.5×10^5 Zellen/Loch in 6-Lochplatten in 2 mL ct-Medium; 1.0×10^6 Zellen/10 cm Platte in 10 mL ct-Medium). Nach sechs Stunden Inkubation unter Kulturbedingungen erfolgt die Transfektion unter Verwendung einer Transfektionslösung mit einer DNA/Lipid-Ratio von 3:1.

Die Durchführung der Transfektion erfolgt gemäß Kapitel 5.3.7. Grundlage für das Transfektionsmedium ist ct-Medium. Die Transfektionslösung inkubiert 18 Stunden unter Kulturbedingungen auf den Zellen und wird dann entfernt. Der Zellrasen wird mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/ EDTA-Lösung von der Wachstumsfläche abgelöst. Die Zellen werden nun in weiße Mikrotiterplatten mit einer Zelldichte von 1.0×10^4 Zellen/Loch in 100 μ L ct-Medium ausgesät. Drei Stunden später erfolgt ein Mediumwechsel mit ct-Medium, das E2 in einer Konzentration von 10n M und einen Lösungsmittelanteil von 0.1 % (V/V) enthält. Als Negativkontrolle dient Kulturmedium mit 0.1 % (V/V) Lösungsmittel. Positiv- und Negativkontrolle inkubieren für 18 Stunden auf den Zellen. Der Überstand wird dann von den Zellen gründlich und vorsichtig abgesaugt. Pro Loch werden die Zellen mit 50 μ L PLB lysiert und weiter wie in Kapitel 5.5 beschrieben behandelt.

5.8.2.1 Verhältnis zwischen ER α - bzw. ER β - und Reporterplasmid

Um das optimale Verhältnis von Rezeptorplasmid und Reporterplasmid zu ermitteln, werden U-2OS-Zellen in 6-Lochplatten ausgesät (1.5×10^5 Zellen/Loch in 2 mL ct-Medium). Die Transfektion wird mit verschiedenen Verhältnissen von Rezeptor- und Reporterplasmid (1:100, 1:50, 1:25, 1:10, 1:5, 1:2) durchgeführt. Die Lipid/DNA-Ration von 3:1 wird stets eingehalten. Die weitere Durchführung erfolgt wie in Kapitel 5.8.2 beschrieben.

5.8.2.2 Inkubationszeit für Testsubstanzen

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit der Testsubstanzen werden U-2OS-Zellen in 10 cm Platten (1.0×10^6 Zellen/Platte in 2 mL ct-Medium) ausgesät. Die Transfektion mit einer Lipid/DNA-Ration von 3:1 und einem Rezeptor-/Reporterplasmidverhältnis von 1:100 bzw. 1:50 erfolgt 6 Stunden später. Die weitere Durchführung erfolgt wie in Kapitel 5.8.2 beschrieben.

5.8.2.3 Bestimmung der Basalaktivität

Zur Bestimmung der Basalaktivität werden Zellen in 6-Lochplatten (1.5×10^5 Zellen/Loch in 2 mL ct-Medium) eingesät. Die Transfektion erfolgt 6 Stunden später mit einer Lipid/DNA-Ration von 3:1, wobei nur das Reporterplasmid in die Zellen eingeschleust wird. Die weitere Durchführung erfolgt wie in Kapitel 5.8.2 beschrieben.

5.9 Transiente Transfektion zur Vorbereitung des Transaktivierungsassays

5.9.1 Anzucht der Zellen vor einem Test

Für einen Test werden U-2OS-Zellen eine Passage - mindestens aber 24 Stunden - vor der Aussaat auf Kulturmedium umgestellt, bei dem die 5 % (V/V) FCS gegen 5 % (V/V) ct-FCS ersetzt werden (ct-Medium). Dies soll störende Einflüsse durch im FCS enthaltenen Steroide minimieren. Da das im Abschnitt 5.3.6 beschriebene Verfahren dem FCS neben den Steroiden auch Wachstumsfaktoren entzieht, werden die Zellen vor jedem Test erneut von unbehandeltem FCS auf ct-FCS umgestellt.

Die Zellen werden wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben behandelt nur, dass nach ca. 2-minütiger Inkubation im Brutschrank die abgelösten Zellen in 10 mL ct-Medium suspendiert werden. Da die für einen Testdurchlauf benötigte Menge an U-2OS-Zellen hoch ist, werden die ct-Kulturen in Zellkulturflaschen mit 175 cm^2 Wachstumsfläche angelegt. Dafür werden 78×10^4 Zellen/ 175 cm^2 in 30 mL ct-Medium ausgesät und für 3 bis 4 Tage wie unter Abschnitt 5.3.1 beschrieben bis zu maximal 70 % Konfluenz kultiviert. Die Zellen sollten nicht zu dicht gewachsen sein, da sie sonst Stress unterliegen, der die Transfektionseffizienz negativ beeinflusst.

5.9.2 Aussaat der Zellen

Die Zellen der ct-Kulturen werden wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben behandelt. Die Zellen einer 175 cm² Kulturflasche werden in 10 mL ct-Medium suspendiert; alle Zellsuspensionen werden vereint. Die Zellkonzentration wird wie unter 5.3.5 beschrieben bestimmt, und die Zellen werden in Zellkulturplatten mit 10 cm Durchmesser in einer Dichte von 1.0×10^6 Zellen/10 cm Platten in insgesamt 10 mL ct-Medium ausgesät. Bis zur Transfektion werden die Kulturschalen 6 Stunden unter den in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Bedingungen inkubiert.

5.9.3 Transfektion

Für jeden Rezeptor wird ein Gesamtansatz der Transfektionslösung hergestellt, der dann auf die Anzahl der zu transfizierenden 10 cm Platten aufgeteilt wird. Pro 10 cm Platte wird eine Transfektionslösung mit 5 µg Reporterplasmid, 0.05 µg Rezeptorplasmid, 485 µL DMEM ohne Zusätze und 15 µL Fugene 6[®] angesetzt. Durch Zugabe von 9.5 mL ct-Medium pro 10 cm Platte erhält man das Transfektionsmedium. Das Medium in den 10 cm Platte wird gegen 10 mL des Transfektionsmediums ausgetauscht. Die Mengen der verschiedenen Komponenten für unterschiedliche Maßstäbe sind tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 5.9.1).

	6-Loch- platte	4 cm Platte	6cm Platte	10cm Platte
Zellaussaat	1.5×10^5 Z	1.5×10^5 Z	3.7×10^5 Z	1.0×10^6 Z
ct-DMEM	2.0 mL	2.0 mL	4.0 mL	10.0 mL
Vorlage DMEM	97.0 µL	97.0 µL	194.0 µL	485.0 µL
Fugene 6 [®]	3.0 µL	3.0 µL	6.0 µL	15.0 µL
Reporterplasmid	1.00 µg	1.00 µg	2.00 µg	5.00 µg
Rezeptorplasmid	0.01 µg	0.01 µg	0.02 µg	0.05 µg
ct-DMEM ad	2.0 mL	2.0 mL	4.0 mL	10.0 mL
Transfektionssimulation: 0.12 % (V/V) EtOH _{abs.} in ct-DMEM	2.0 mL	2.0 mL	4.0 mL	10.0 mL
	Angaben pro Loch			

Tabelle 5.9.1 Mengenangaben der für die transiente Transfektion verwendeten Komponenten für die Durchführung in verschiedenen Maßstäben

5.10 Transaktivierungsassay im 96-Loch Maßstab

5.10.1 Anzucht der Zellen vor einem Test

Bei einem Transaktivierungsassay mit ER α oder ER β mit vorangehender transienter Transfektion von U-2OS-Zellen mit Rezeptor- und Reporterplasmid erfolgt die Transfektion wie in Kapitel 5.9 beschrieben.

MCF-7-2a-Zellen werden eine Passage vor Testbeginn auf ct-Medium umgestellt. Da bei diesen Zellen die Transfektion entfällt und die Aussaat direkt in die Testplatten erfolgen kann, werden hier weniger Zellen benötigt, so dass 2 bis 3 75 cm² Kulturflaschen mit 70-80 % Konfluenz für einen Test ausreichen.

5.10.2 Aussaat in Testplatten

Bei dem transienten Transfektionsexperiment wird die Transfektionslösung nach 18 Stunden abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben abgelöst. Pro 10 cm Platte werden die Zellen in 5 mL ct-Medium suspendiert. Um starke Schwankungen in der Transfektionseffizienz zu minimieren, werden alle Zellen, die mit demselben ER-Subtyp transfiziert wurden, vereint. Die Zellen der ct-Kulturen von MCF-7-2a-Zellen werden ebenfalls wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben behandelt, und alle Zellsuspensionen vereint, und die Zellkonzentration wie unter 5.3.5 beschrieben bestimmt.

In die 60 innen liegenden Löcher einer weißen zur Lumineszenzmessung geeigneten Mikrotiterplatte, werden die Zellen ausgesät (1.0×10^4 Z/Loch bei vorheriger transienter Transfektion; 5×10^3 Z/Loch bei MCF-7-2a-Zellen). Hierzu wird von den Zellen eine Verdünnung mit 1×10^5 Zellen/mL (transient transfizierte U2-OS-Zellen) bzw. 5×10^4 Zellen/mL (MCF-7-2a-Zellen) hergestellt, von der 100 μ L/Loch eingesät wird. Um Verdunstungseffekte zu vermeiden werden in die äußeren Löcher jeweils 200 μ L einer isoosmotischen Lösung (z.B. PBS, Medium, etc.) gegeben.

5.10.3 Verdünnungsreihe

Die Verdünnung der Testsubstanzen erfolgt im klaren Mikrotiterplatten mit DMEM ohne Zusätze bzw. DMEM ohne Zusätze, das 1 % (V/V) Lösungsmittel enthält. Ziel ist es, dass im Test eine einheitliche Lösungsmittelkonzentration vorliegt, die 0.1 % (V/V) nicht überschreitet. Pro Testplatte werden drei Verbin-

dungen in jeweils sechs Konzentrationen mit einer Dreifachbestimmung pro Konzentration getestet. Eine Übersicht über das Pipettierschema ist in Abbildung 5.10.1 darstellt.

Die Verdünnung in der Verdünnungsplatte erfolgt in Zehnerpotenzen. Beim Übertragen aus der Verdünnungsplatte auf die Testplatte erfolgt der letzte Verdünnungsschritt (1:10). Zuerst wird das Medium zum Verdünnen vorgelegt. In die ersten beiden Reihen (A, B) wird DMEM ohne Zusätze gegeben – 90 µL/Loch in Reihe A, 180 µL/Loch in Reihe B. In die folgenden sechs Reihen (C - G) werden 180 µL DMEM pro Loch mit 1 % (V/V) Lösungsmittel gegeben. In der ersten Reihe (A) erfolgt durch Zugabe von 10 µL der Ausgangslösung der Testsubstanz eine Vorverdünnung. Dies geschieht für jedes Loch separat. Die folgenden Schritte erfolgten für alle Löcher einer Reihe simultan mit einer 12-Kanalpipette. Die Lösung wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt. 20 µL der Lösung werden in das Loch in der nächsten Reihe mit Medium gegeben. Danach werden die Pipettenspitzen gewechselt, und erst mit neuen Pipettenspitzen wird die neue Verdünnung durchmischt und wiederum 20 µL in die nächste Reihe zum Verdünnen gegeben. Die letzten sechs Konzentrationen enthalten 1 % (V/V) Lösungsmittel. Sie werden zur Übertragung auf die Zellen verwendet. Konzentrationen ab 0.1 % (V/V) durch die kontinuierliche Verdünnung der Ausgangslösung werden vernachlässigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	E-2			Testsubstanz 1			Testsubstanz 2			bleiben leer		
A	1×10^{-6} M			1×10^{-3} M						90 µl DMEM ohne Zusätze + 10 µl Stammlösung		
B	1×10^{-7} M			1×10^{-4} M						180 µl DMEM ohne Zusätze + 20 µl aus Reihe A		
C	1×10^{-8} M			1×10^{-5} M						180 µl 1% LM in DMEM + 20 µl aus Reihe B		
D	1×10^{-9} M			1×10^{-6} M						180 µl 1% LM in DMEM +20 µl aus Reihe C		
E	1×10^{-10} M			1×10^{-7} M						180 µl 1% LM in DMEM +20 µl aus Reihe D		
F	1×10^{-11} M			1×10^{-8} M						180 µl 1% LM in DMEM +20 µl aus Reihe E		
G	1×10^{-12} M			1×10^{-9} M						180 µl 1% LM in DMEM +20 µl aus Reihe F		
H												

Abbildung 5.10.1 Pipettierschema für eine Verdünnungsreihe in einer 96-Lochplatte am Beispiel von E2 (Testkonzentrationen: 1×10^{-8} M - 1×10^{-13} M; Stammlösung: 1×10^{-5} M) und einer Testsubstanz (Testkonzentrationen: 1×10^{-5} M - 1×10^{-10} M ; Stammlösung: 1×10^{-2} M)

5.10.4 Substanzzugabe

Bei vorangegangener transienter Transfektion erfolgt die Substanzzugabe drei Stunden nach der Aussaat in die Messplatten. Bei stabil transfizierten Zellen erfolgt sie 24 Stunden nach der Aussaat.

Das Medium auf den Zellen wird durch 180 μL ct-DMEM ersetzt. 20 μL der Substanzverdünnungen werden dazu pipettiert, hierbei erfolgt ein letzter Verdünnungsschritt (1:10). Als Negativkontrolle in drei- oder sechsfacher Bestimmung werden 20 μL Medium mit 1 % (V/V) Lösungsmittel zu 180 μL ct-Medium auf die Zellen gegeben. Ein Pipettierschema ist in Abbildung 5.10.2 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	E-2				Testsubstanz 1			Testsubstanz 2				
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	$1 \times 10^{-8} \text{ M}$			1×10^{-5}						Negativkontrolle	-
C	-	$1 \times 10^{-9} \text{ M}$			1×10^{-6}							-
D	-	$1 \times 10^{-10} \text{ M}$			1×10^{-7}							-
E	-	$1 \times 10^{-11} \text{ M}$			1×10^{-8}							-
F	-	$1 \times 10^{-12} \text{ M}$			1×10^{-9}							-
G	-	$1 \times 10^{-13} \text{ M}$			1×10^{-10}							-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbildung 5.10.2 Pipettierschema für einen Transaktivierungsassay am Beispiel von E2 (Testkonzentrationen: $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-13} \text{ M}$) und einer Testsubstanz (Testkonzentrationen: $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-10} \text{ M}$); Zugabe von 20 μL aus den Reihen G – B der Verdünnungsplatte zu 180 μL ct-DMEM; Negativkontrolle: 20 μL 1% LM in DMEM zu 180 μL ct-DMEM; -: 200 μL isotonische Lösung

5.10.5 Zellernte und Zellyse

Nach einer festgelegten Inkubationsdauer (21 Stunden bei transient transfizierten U-2OS-Zellen; 48 bis 50 Stunden bei MCF-7-2a Zellen) wird der Überstand von den Zellen gründlich und vorsichtig abgesaugt. Pro Loch werden die Zellen mit 50 μL PLB für 30 bis 60 Minuten bei RT und kräftigem Schütteln (600 min^{-1}) lysiert. Weiter wird der Luciferaseassay wie in Kapitel 5.5 beschrieben durchgeführt.

5.10.6 Anlegen von Kontrollplatten

Parallel zu den weißen Mikrotiterplatten werden Zellen in klare Mikrotiterplatte angesetzt. Einsaat und Substanzzugabe erfolgen genau wie in den Kapiteln 5.10.2 und 5.10.4 beschrieben. Die weitere Behandlung erfolgt nach der Durchführung des Kristallvioletassay wie er in Kapitel 5.4 dargestellt wird.

Bei einem transienten Transfektionsexperiment werden in einem parallelem Ansatz Zellen analog zu 5.9.2 in 10 cm Platten eingesät dann aber statt mit Transfektionsmedium mit 10 mL ct-Medium pro 10 cm Schale behandelt, das 0.12 % (V/V) absoluten Ethanol enthält. Dieser Ethanolgehalt entspricht dem des Transfektionsmediums. Ethanol beeinflusst das Wachstum der Zellen negativ. Das Transfektionsreagenz selbst wird auch einen Einfluss auf das Zellwachstum haben, auch ist dies denkbar für die Plasmide, die in die Zellen eingeschleust werden. Kontrollplatten für jeden Rezeptorsubtyp mit Transfektion anzusetzen, würde aber einen zu hohen Kostenaufwand bedeuten, so dass als Hilfsmittel nur eine Kontrollplatte pro Substanz und Konzentrationreihe angesetzt wird.

5.10.7 Auswertung

Die Differenz der nach Kristallviolett färbung bestimmten Absorptionswerte bei 590 nm der behandelten 60 innen liegenden Löcher und dem Untergrundrauschen (gemittelte Absorption bei 590 nm aus den Rändern) ist proportional zur Zellmasse.

Die gemessenen $RLU_{10\text{ s}}$ -Werte werden auf die Zellmasse bezogen, in dem der Quotient aus $RLU_{10\text{ s}}$ und $Absorption_{590\text{ nm}}$ gebildet wird. Von ihnen wird der Mittelwert des Quotienten des als Negativkontrolle mit getesteten Lösungsmittels abgezogen.

Um Ergebnisse aus verschiedene Testläufen miteinander vergleichen zu können, werden die ermittelten Quotienten ($RLU_{10\text{ s}}/Absorption_{590\text{ nm}}$) auf die maximale Ausbeute von E2 (gemittelter Wert aus dem E2-Plateau wird 100 % gesetzt) bezogen, das als komplette Konzentrations-Aktivierungs-Kurve (von $1.0 \times 10^{-8}\text{ M}$ bis $1.0 \times 10^{-13}\text{ M}$) in jedem Test als Referenz mitgeführt wird. Die Stimulation wird als Aktivierung in %, die als relative Aktivierung zu verstehen ist, angegeben.

5.10.8 Testung auf antagonistische Wirkung

Die Testung auf antagonistische Wirkung einer Testsubstanz erfolgt in einem Konkurrenzexperiment, in dem die Minderung einer estradiolinduzierten Luciferaseexpression beobachtet wird. Die Testdurchführung erfolgt wie voran beschrieben, nur dass die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz mit

einer festen Estradiolkonzentration zusammen auf die Zellen einwirken. E2 wird zusammen in 180 μL ct-Medium (aa-Medium) auf die Zellen gegeben. Für $\text{ER}\alpha$ beträgt die Estradiolkonzentration im Test 0.030 nM (transiente Transfektion mit $\text{ER}\alpha$ -Plasmid), für $\text{ER}\beta$ werden 0.30 nM (transiente Transfektion mit $\text{ER}\beta$ -Plasmid), und bei Verwendung von MCF-7-2a-Zellen werden 1.0 nM E2 zugesetzt. Zusätzlich wird eine Positivkontrolle von 20 μL Medium mit 1 % (V/V) Lösungsmitteln mit 180 μL ct-Medium bestimmt.

5.11 Zytotoxizitätstests

Der Test auf Zytotoxizität wird unter Zuhilfenahme der in Kapitel 5.4 beschriebenen Bestimmung der Zellmasse mittels Kristallviolett durchgeführt. Ein schematischer Ablauf des Tests ist in Abbildung 5.11.1 dargestellt.

5.11.1 Aussaat der Zellen

Es wird eine Zellsuspension mit definierter Zellkonzentration angesetzt, von der 100 μL /Loch in klare Mikrotiterplatten pipettiert werden, so dass sich eine definierte Zelldichte ergibt. Bis zur Substanzzugabe werden die Mikrotiterplatten unter den in Kapitel 5.3.1 angegebenen Bedingungen inkubiert. Zelldichte und Inkubationszeit bis zur Substanzzugabe sind abhängig von der Zelllinie und sind in Tabelle 5.11.1 zusammengefasst.

5.11.2 Substanzzugabe und Messpunktnahme

Für die Substanzzugabe werden von den Testverbindungen die geforderten Verdünnungen in Kulturmedium angesetzt. Hierzu wird von der Testverbindung eine Stammlösung in adäquatem Lösungsmittel hergestellt, die dann weiter bis zum 1000-fachen der geforderten Endkonzentration mit dem Lösungsmittel verdünnt wird. Für die Testung werden die jeweiligen Verdünnung 1:1000 mit Kulturmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt (20 μL Verdünnung + 20 mL Kulturmedium). Das Kulturmedium wird abgesaugt und 200 μL /Loch der zutestenden Verdünnung auf die Zellen gegeben. Jede Wirkstoffkonzentration wird in jeweils 16 Löcher getestet. Jeweils 16 Löcher pro Platte dienen als Kontrollwerte, in denen nur das Lösungsmittel (0.1 % V/V in Kulturmedium) auf die Zellen einwirkt. Jede Platte wird in fünffacher Ausführung pipettiert, so dass fünf Messwerte aufgenommen werden können. Nach vollständiger Beschickung

werden die Platten im Brutschrank inkubiert (vgl. 5.3.1). Eine Platte wird zur Ermittlung der initialen Zelldichte (C_0 -Wert zum Zeitpunkt T_0) sofort abgestoppt (vgl. Kapitel 5.4.1). Bei den anderen Platten wird zu verschiedenen Zeitpunkten das Zellwachstum unterbrochen. Schließlich wird die Zellmasse in den Löchern mittels Kristallviolett färbung wie in Kapitel 5.4 beschrieben bestimmt.

Zelllinie:	U-2-OS	MCF-7	MDA-MB-231	
Aussaat: Zellzahl [N/Loch]	350	800	360	
Zeitpunkt der Substanzzugabe [Tage nach Aussaat]	3	4	2	
t1	2	3	2	
t2	3	5	3	
Messpunktnahmen [Tage nach Substanzzugabe]	t3	4	6	4
t4	6	7	5	
t5	7	10	7	

Tabelle 5.11.1 Übersicht über Zellmengen und Zeitablauf bei der Durchführung von Zytotoxizitätstests

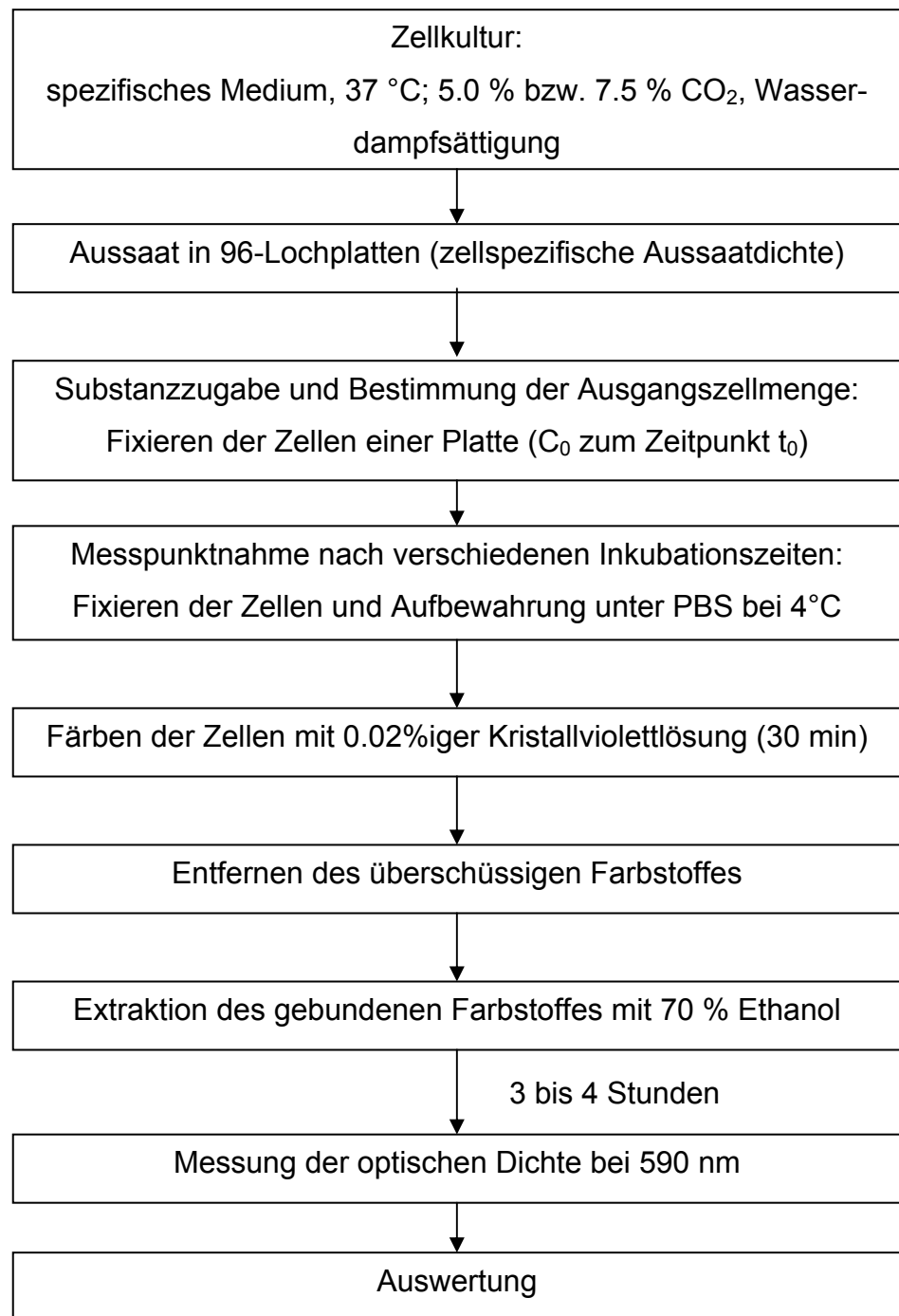


Abbildung 5.11.1 Flussdiagramm für den Testablauf des Zytotoxizitätstests mittels Kristallviolett färbung

5.12 Generationszeitbestimmung

Zur Charakterisierung von U-2OS-Zellen wird eine Generationszeitbestimmung über Bestimmung der Zellmasse mittels Kristallviolett-Färbung wie in 5.4 beschrieben durchgeführt.

5.12.1 Durchführung

Aus der Zellernte von zwei bis drei 75 cm² Kulturflaschen wird eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 5×10^3 Z/mL angesetzt. Pro Loch einer sterilen klaren Mikrotiterplatte werden 200 µL dieser Zellsuspension pipettiert, so dass eine Zelldichte von 1000 Z/Loch erreicht wird. Die Platten werden dann unter Kulturbedingungen (vgl. Kapitel 5.3.1) inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wird jeweils das Zellwachstum in einer Mikrotiterplatte abgestoppt. Nachdem für alle nötigen Zeitpunkte die Messpunkte genommen wurden, wird für alle gleichzeitig die Zellmenge mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Zusätzlich wird eine leere Mikrotiterplatte angefärbt. Die hieraus bestimmten Absorptionswerte repräsentieren das Untergrundrauschen.

5.12.2 Auswertung

Eine typische Wachstumskurve von Zellen hat einen 3- bis 4-phasischen Verlauf. Zu Beginn in der *lag*-Phase vermehren sich die Zellen kaum. Daran schließt die *log*-Phase an, in der exponentielles Zellwachstum beobachtet wird. Diese Phase wird zur Generationszeitbestimmung herangezogen. Die *log*-Phase geht dann in ein Plateau über, in dem kaum noch Zellwachstum zu beobachten ist. Wachstumsrate und Sterberate stehen hier miteinander im Gleichgewicht. Manchmal kann danach auch ein Absinken der Zellzahl beobachtet werden (Sterbephase).

Der erste Messzeitpunkt dient als Bezugswert, für die folgenden Messzeitpunkte bezogen werden. Pro Messzeitpunkt werden 96 Einzelwerte erhalten, von denen das Untergrundrauschen abgezogen wird. Aus den Nettowerten wird der dekadische Logarithmus gebildet. Für die Wachstumskurve wird der Mittelwert der Nettowerte logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. In dem Teil des so erhaltenen Graphen, der linear verläuft, befinden sich die Zellen in exponentiellem

Wachstum (log-Phase). Durch die Punkte des Graphen wird eine Regressionsgerade gelegt, aus deren resultierender Geradengleichung ($y = mx + b$).

Aus der Gleichung einer Reaktionskinetik 1. Ordnung und der Geradengleichung der Regressionsgerade lässt sich die Generationszeit berechnet (siehe Gleichung 5.12.1). Über die lineare Regressionsanalyse ergibt sich der Standardfehler der Steigung der Regressionsgerade.

$$\frac{dN}{dt} = k \times N$$

$$N = N_0 \times e^{kt} \Rightarrow \ln N = \ln N_0 + kt \Rightarrow \log N = \log N_0 + \frac{k}{2.303} \times t$$

$$y = mx + b; y = \log N; x = t; b = \log N_0 \text{ (theoretisch)}; m = \frac{k}{2.303}$$

$$t_{\text{Verdopplung}} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{\ln 2}{m \times 2.303} = \frac{0.3}{m}$$

N Zellzahl zu Zeitpunkt t

N_0 Zellzahl zum Zeitpunkt t_0
(theoretisch)

k Reaktionskonstante

$t_{\text{Verdopplung}}$ Generationszeit

Gleichung 5.12.1 Ermittlung der Generationszeit

6 Anhang

6.1 Quellen der Testverbindungen

6.1.1 Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement

Verbindung	R ₁	Konfiguration	zur Verfügung gestellt von
10 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)	Prof. Gust
10 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)	Prof. Gust
20 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)	von Rauch
20 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)	von Rauch
21 a	4-OH	(1R,2S)/(1S,2R)	Prof. Gust
21 b	4-OH	(1R,2R)/(1S,2S)	Prof. Gust
30 a	4-OCH ₃	(1R,2S)/(1S,2R)	Prof. Gust
30 b	4-OCH ₃	(1R,2R)/(1S,2S)	Prof. Gust
31 a	4-OH	(1R,2S)/(1S,2R)	Prof. Gust
31 b	4-OH	(1R,2R)/(1S,2S)	Prof. Gust
40 a	4-OCH ₃	(4R,5S)/(4S,5R)	Keilitz
40 b	4-OCH ₃	(4R,5R)/(4S,5S)	Keilitz
41 a	4-OH	(4R,5S)/(4S,5R)	von Rauch
41 b	4-OH	(4R,5R)/(4S,5S)	von Rauch
70	4-OCH ₃		Prof. Gust
71	4-OH		Prof. Gust
81	4-OH	(4R,5R)/(4S,5S)	Prof. Gust
91	4-OH	(2R,3S)/(2S,3R)	Keilitz

6.1.2 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline

Verbindung	Konfiguration	zur Verfügung gestellt von
42 a	(4R,5S)/(4S,5R)	von Rauch

Verbindung	Konfiguration	zur Verfügung gestellt von
42 b	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	von Rauch

6.1.3 (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2*R*,3*S*)/(2*S*,3*R*)-2,3-Diarylpiperazin-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Heterozyklus

Verbindung	zur Verfügung gestellt von
51	von Rauch
52	Schlenk
53	Keilitz
54	von Rauch
55	von Rauch
56	Schlenk
57	von Rauch
58	von Rauch
59	Wiglenda
92	Keilitz
93	Keilitz
94	Keilitz

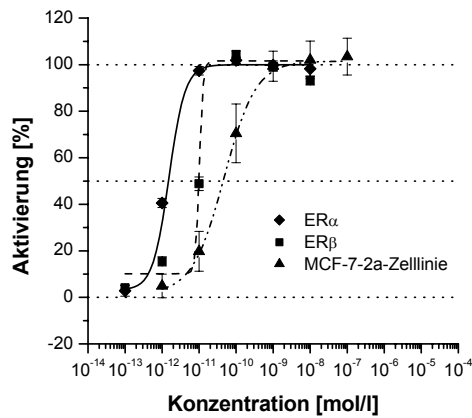
6.1.4 (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette

Verbindung	Konfiguration	zur Verfügung gestellt von
43 - 50	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	von Rauch

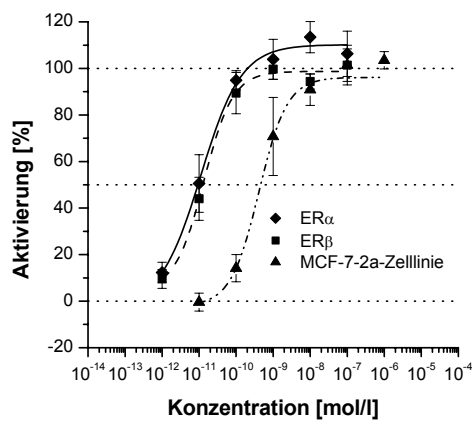
6.2 Konzentrations-Wirkungskurven der Transaktivierungsassays

6.2.1 Untersuchung estrogen wirksamer Verbindungen

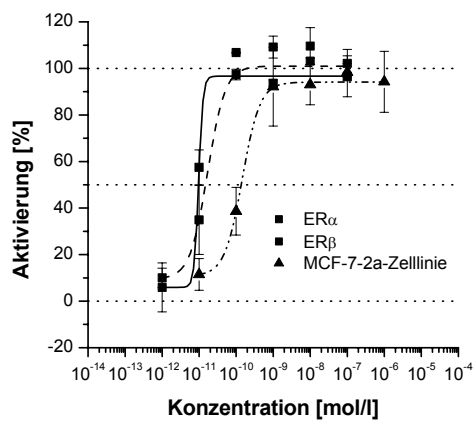
E2

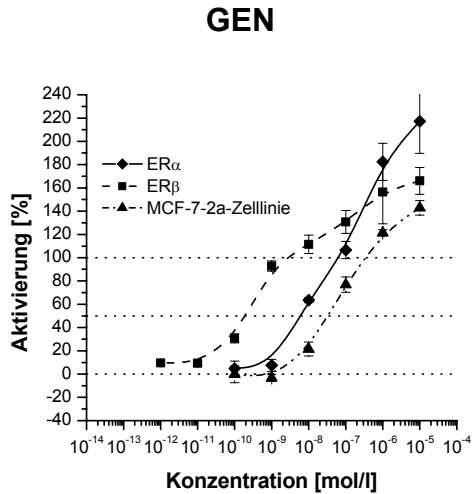


DES



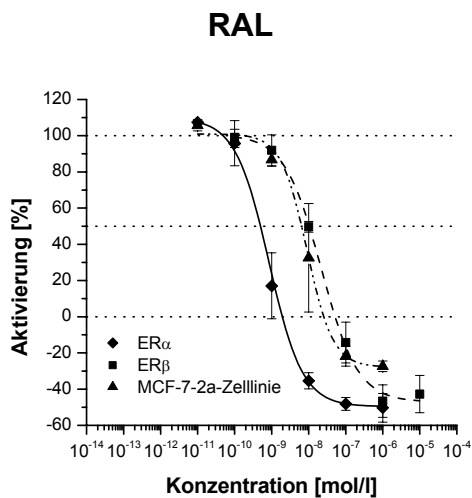
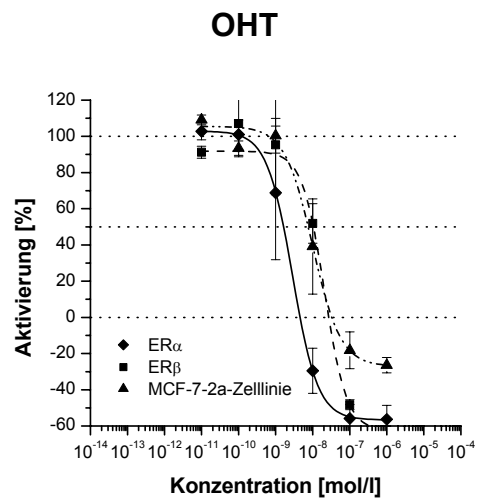
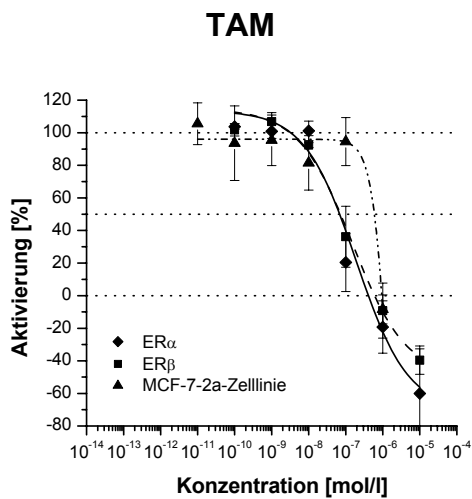
HEX



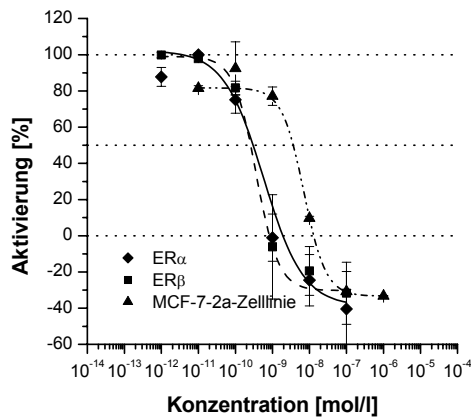


6.2.2 Untersuchung antiestrogen wirksamer Verbindungen

Kompetitionsexperiment mit E2 (C_{E2} : ER α = 0.030 nM; ER β = 0.30 nM; MCF-7-2a-Zelllinie = 1.0 nM)

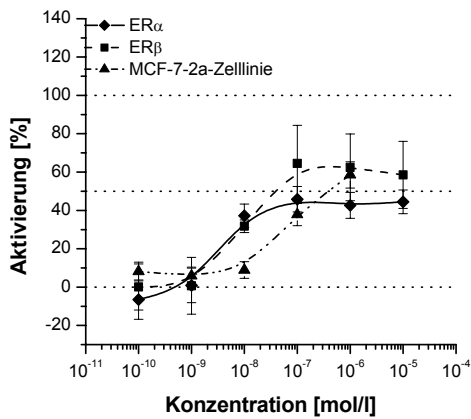


FUL

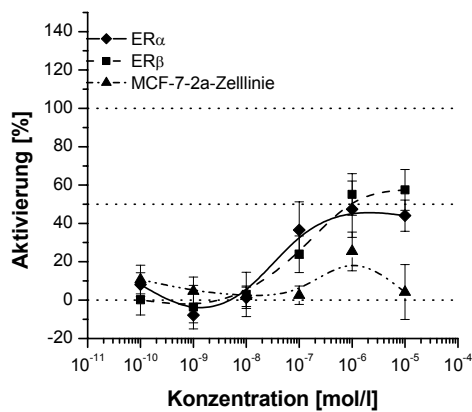


6.2.3 Untersuchung verschiedener Substanzen mit 1-(2,6-Dichlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hydroxy-/4-methoxyphenyl)ethan-Strukturelement

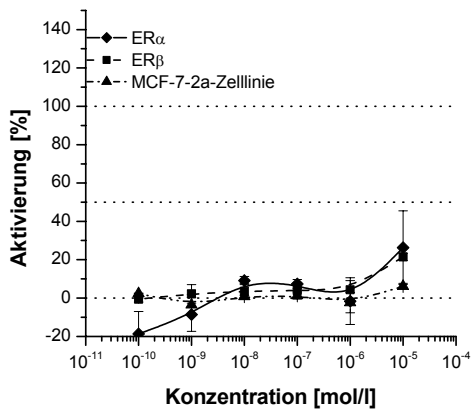
10 a (1R,2S)/(1S,2R)



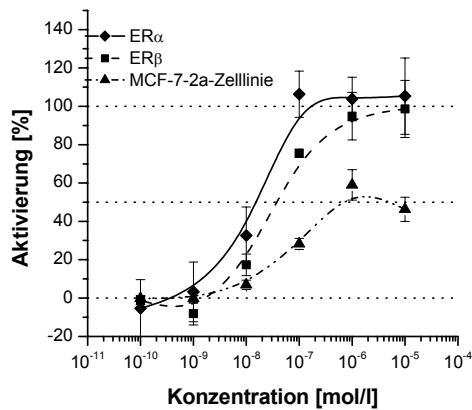
10 b (1R,2R)/(1S,2S)

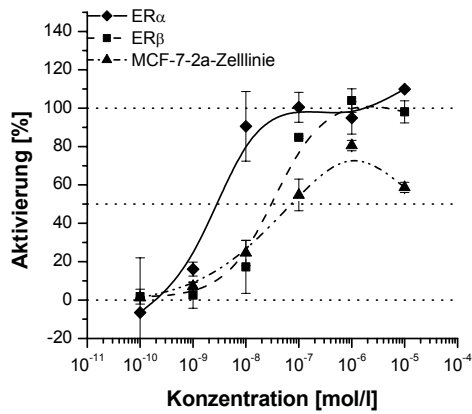
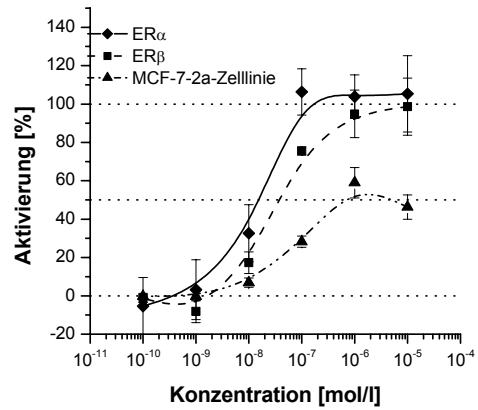
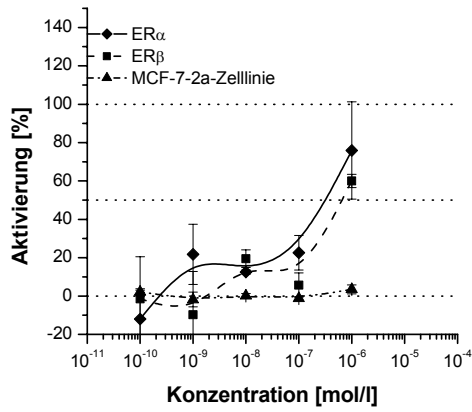
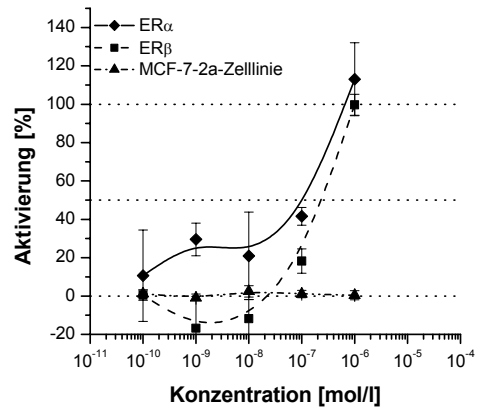
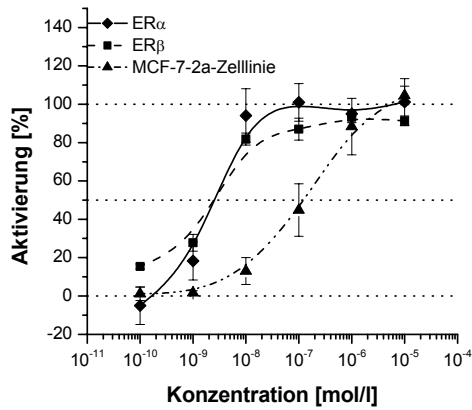
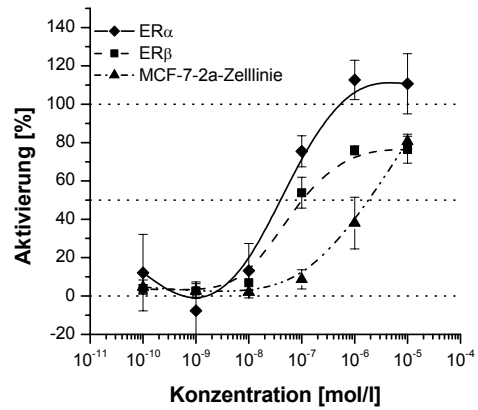


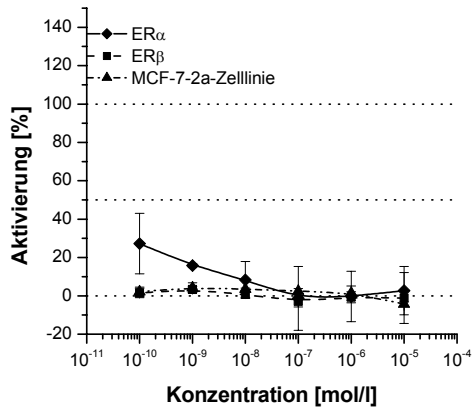
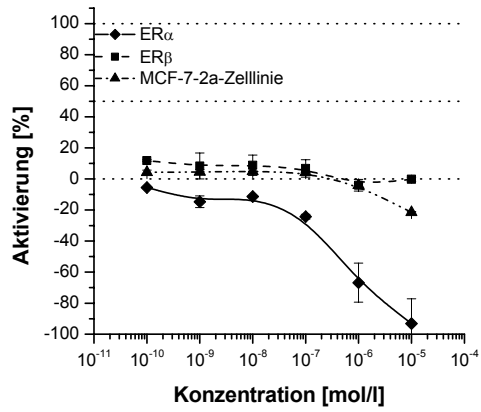
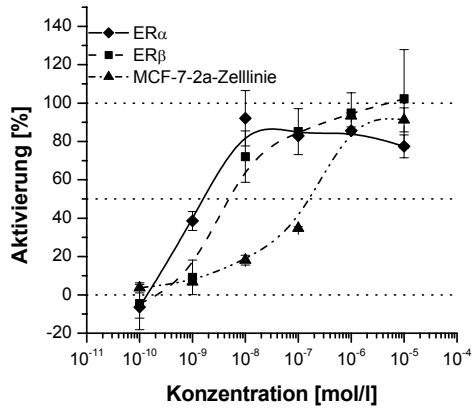
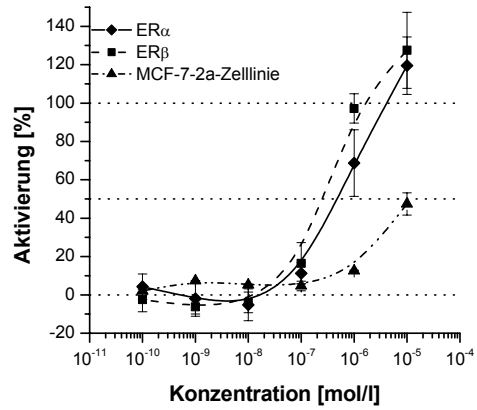
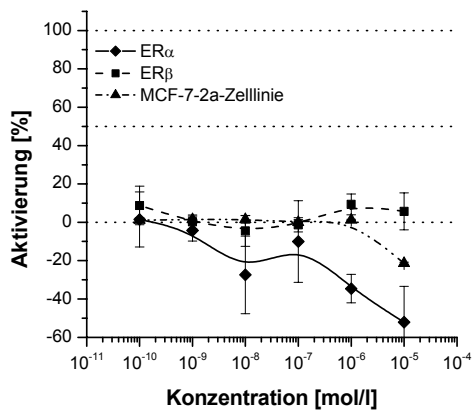
20 a (1R,2S)/(1S,2R)



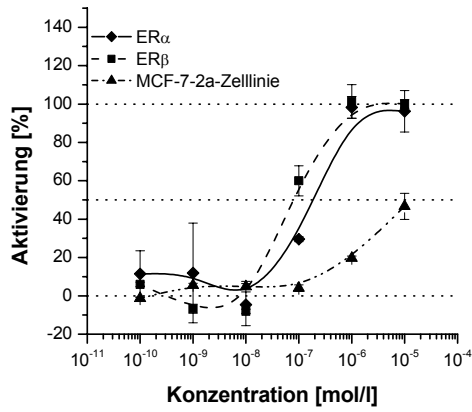
20 b (1R,2R)/(1S,2S)



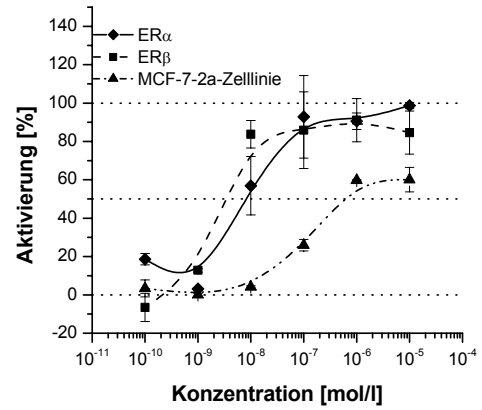
21 a (1R,2S)/(1S,2R)**21 b (1R,2R)/(1S,2S)****30 a (1R,2S)/(1S,2R)****30 b (1R,2R)/(1S,2S)****31 a (1R,2S)/(1S,2R)****31 b (1R,2R)/(1S,2S)**

40 a (4R,5S)/(4S,5R)**40 b (4R,5R)/(4S,5S)****41 a (4R,5S)/(4S,5R)****41 b (4R,5R)/(4S,5S)****70**

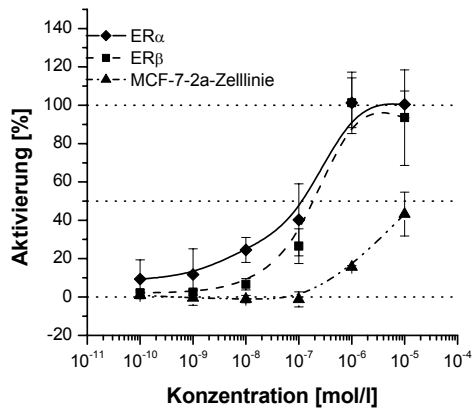
71



81 (4R,5R)/(4S,5S)

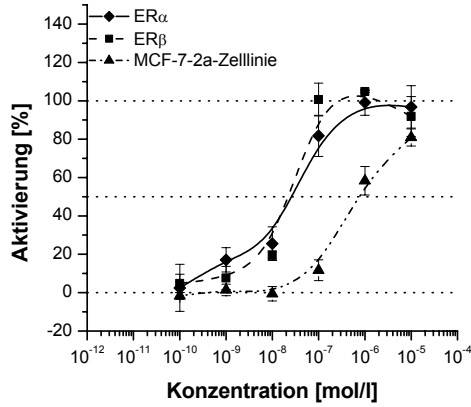


91 (2R,3S)/(2S,3R)

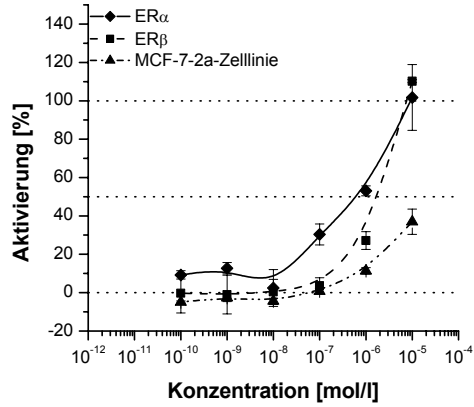


6.2.4 Untersuchung von 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin- dazolinen

42 a (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)

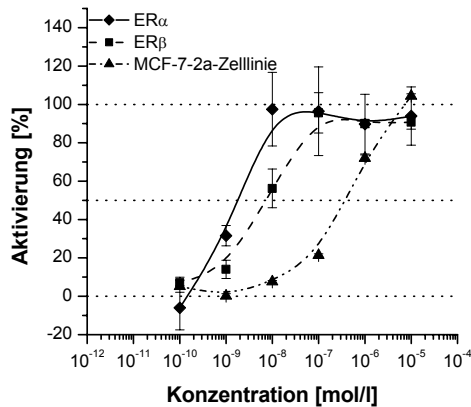


42 b (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)

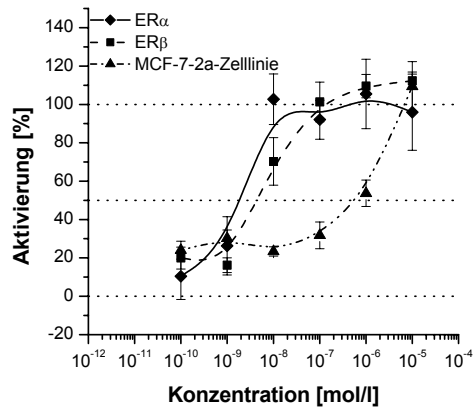


6.2.5 Untersuchung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazolin- und (2*R*,3*S*)/(2*S*,3*R*)-2,3-Diarylpiperazin-Derivaten mit ver- schiedenen Substituenten am Heterozyklus

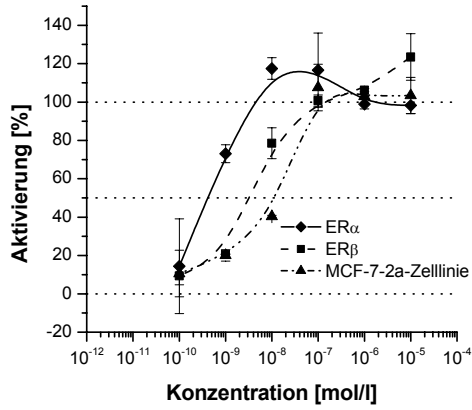
51 (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)



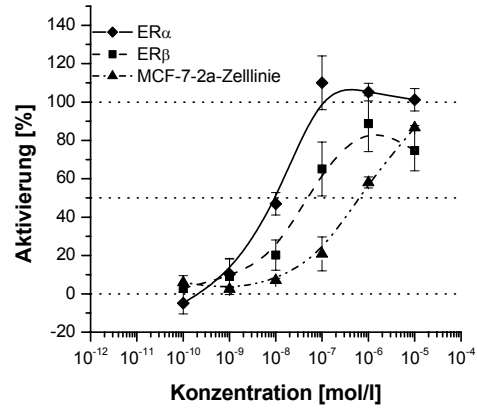
52 (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)



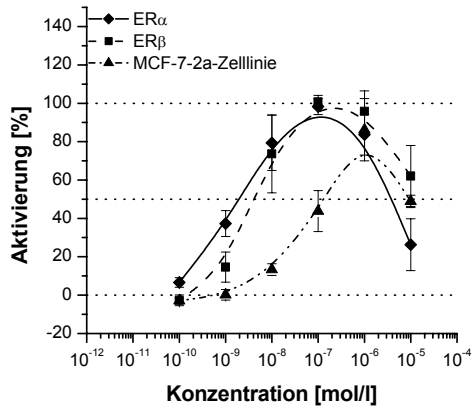
53 (4R,5S)/(4S,5R)



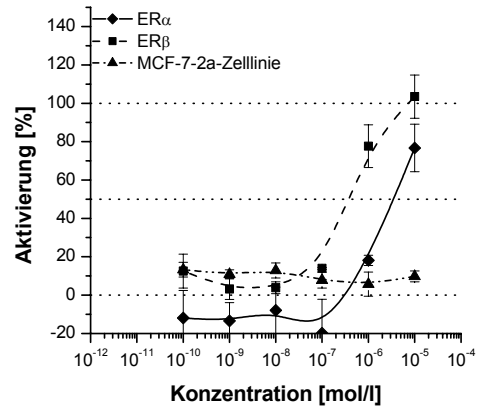
54 (4R,5S)/(4S,5R)



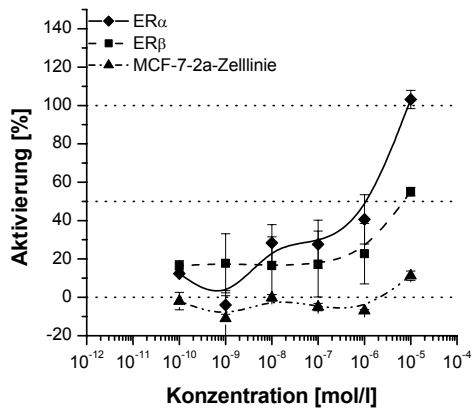
55 (4R,5S)/(4S,5R)

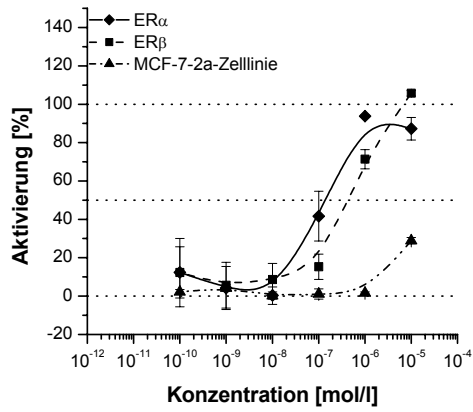
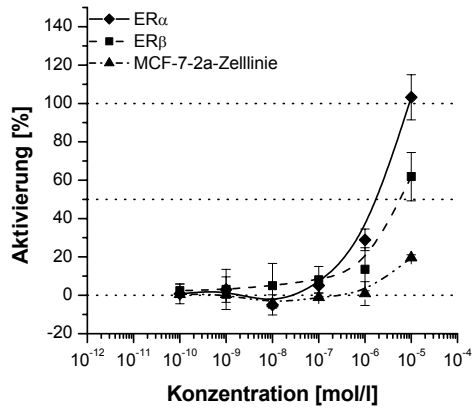
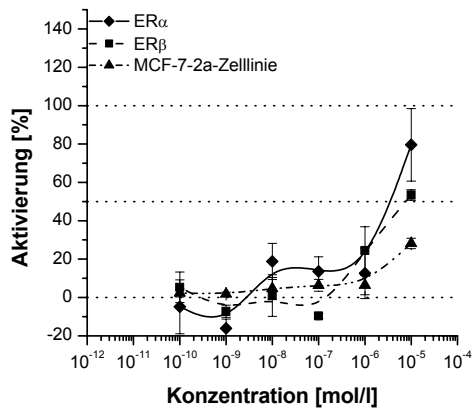


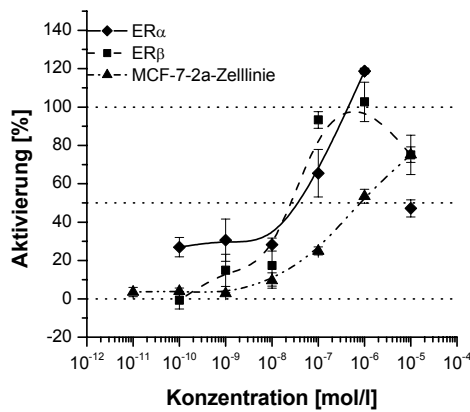
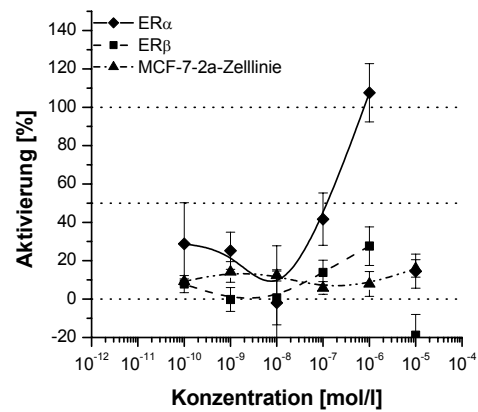
56 (4R,5S)/(4S,5R)



57 (4R,5S)/(4S,5R)

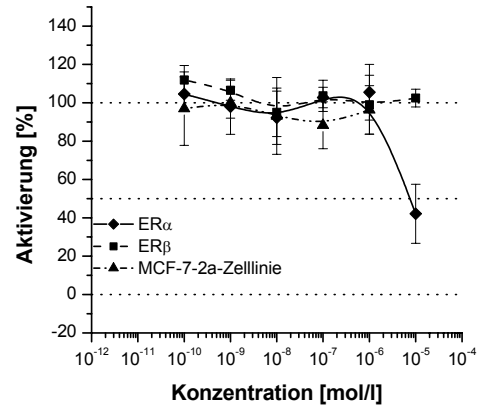
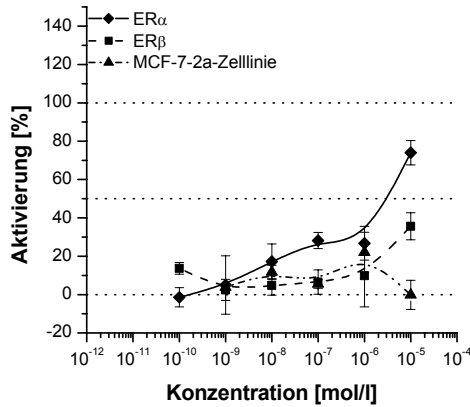


58 (4R,5S)/(4S,5R)**59 (4R,5S)/(4S,5R)****92 (2R,3S)/(2S,3R)**

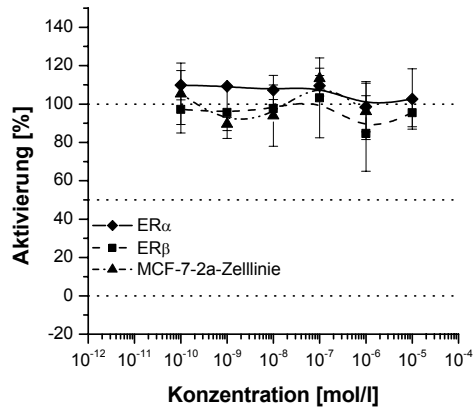
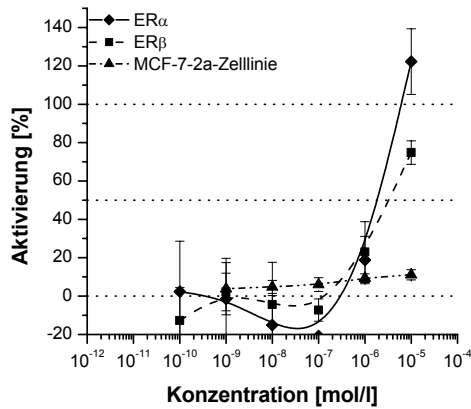
93 (2R,3S)/(2S,3R)**94 (2R,3S)/(2S,3R)**

6.2.6 Untersuchung von (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-2-imidazolinen mit basischer Seitenkette

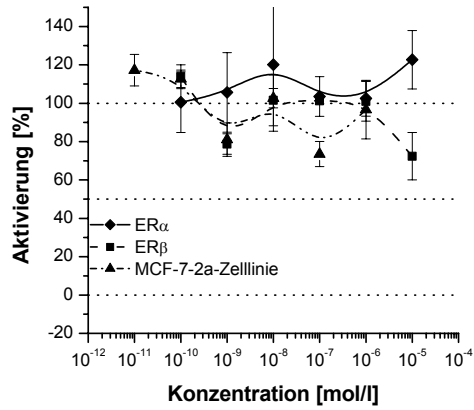
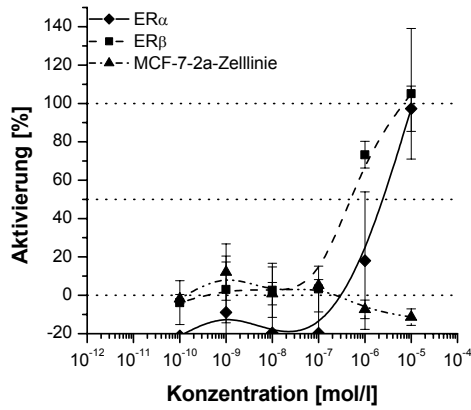
links: Test auf agonistische Eigenschaften; rechts: Test auf antagonistische Eigenschaften im Konkurrenzexperiment mit E2 (C_{E2} : ER α = 0.030 nM; ER β = 0.30 nM; MCF-7-2a-Zelllinie = 1.0 nM)

43 (4R,5S)/(4S,5R)

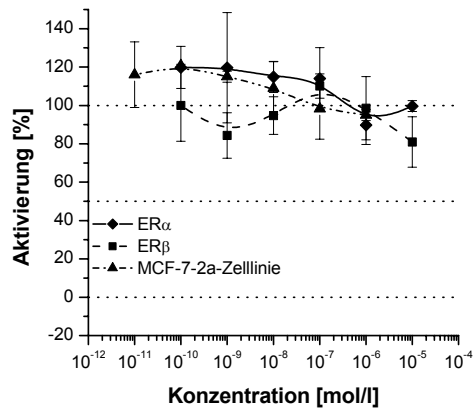
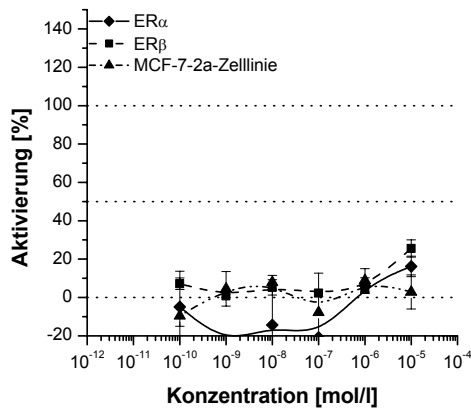
44 (4R,5S)/(4S,5R)



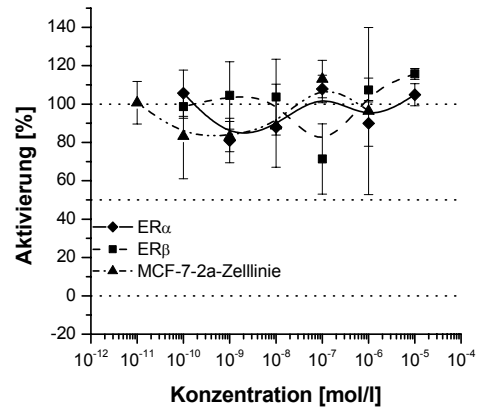
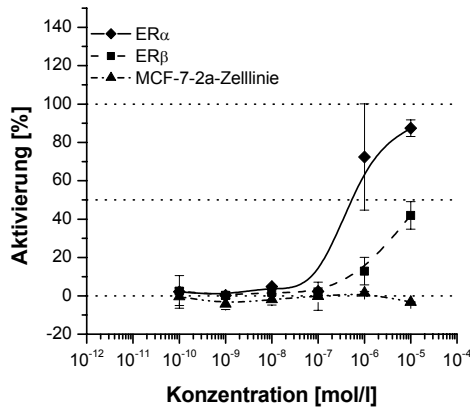
45 (4R,5S)/(4S,5R)



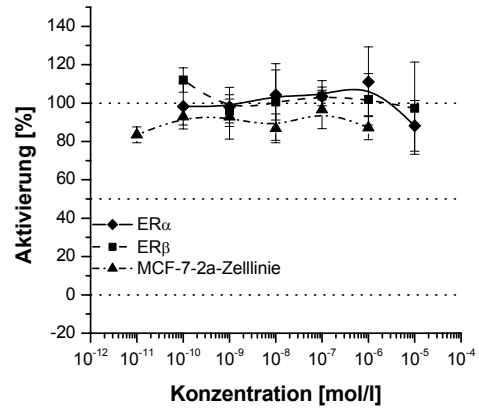
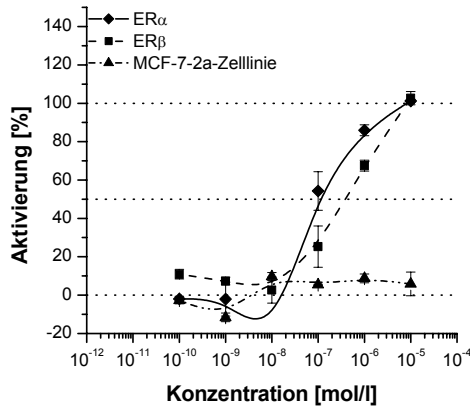
46 (4R,5S)/(4S,5R)



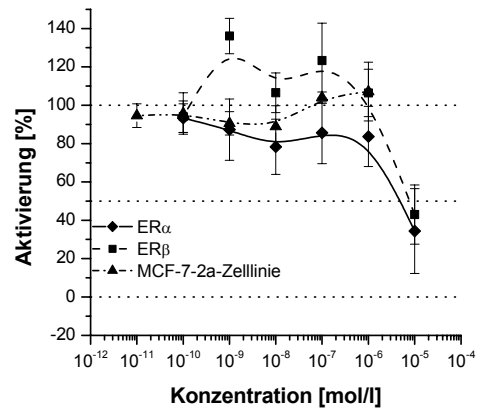
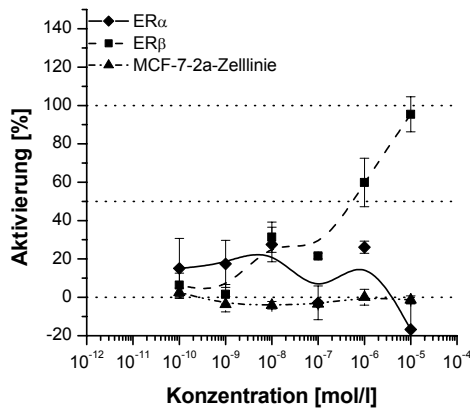
47 (4R,5S)/(4S,5R)



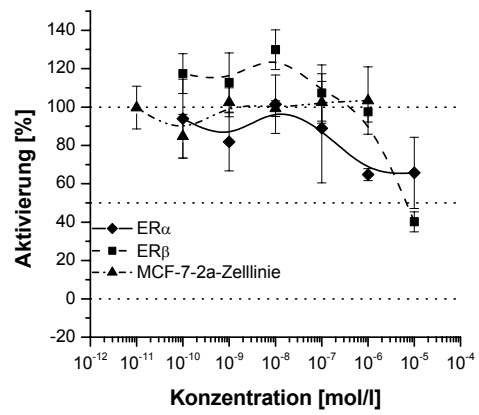
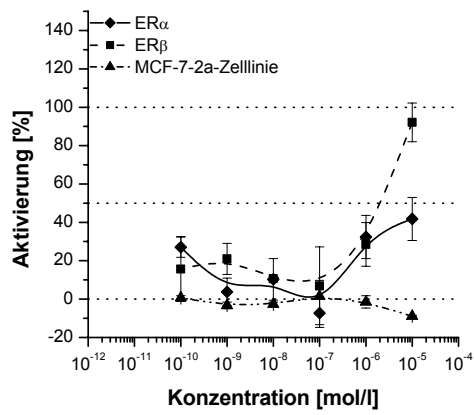
48 (4R,5S)/(4S,5R)



49 (4R,5S)/(4S,5R)



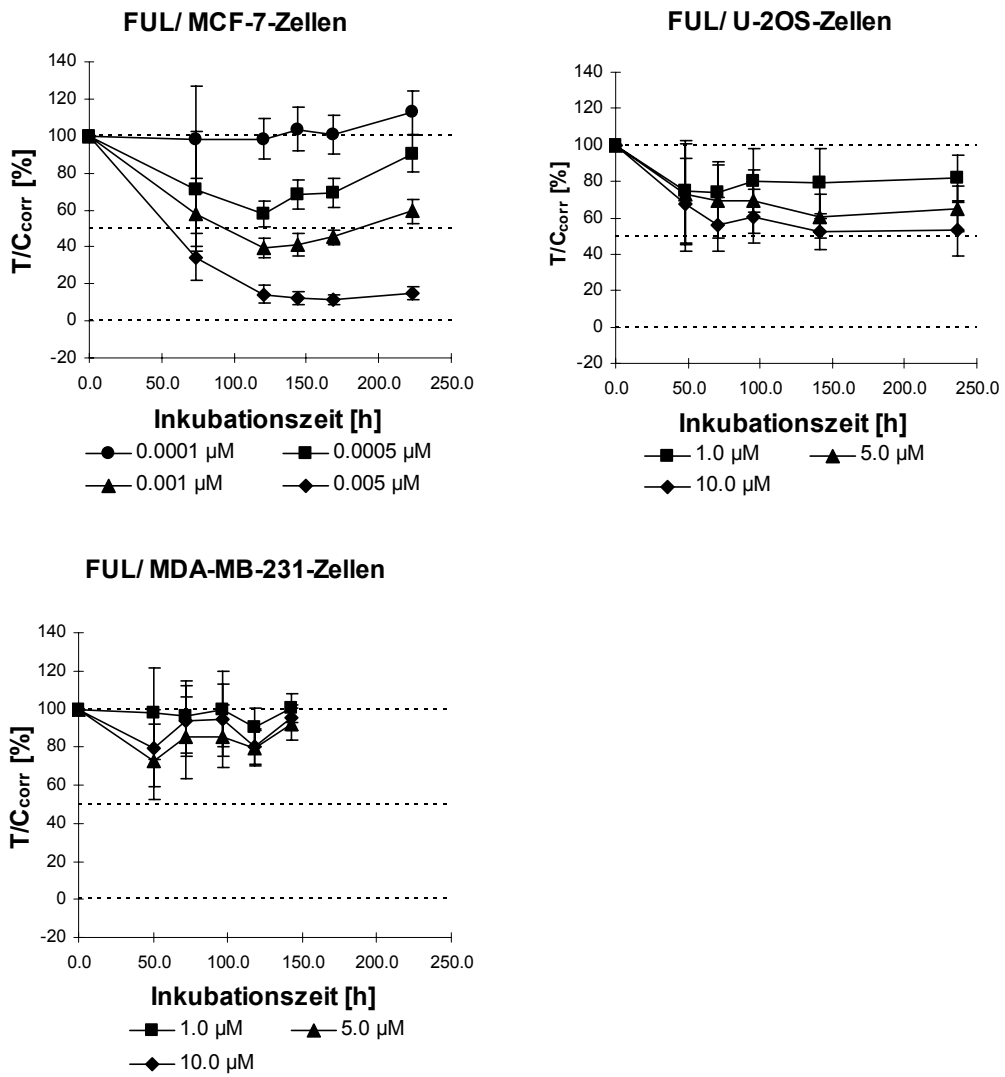
50 (4R,5S)/(4S,5R)



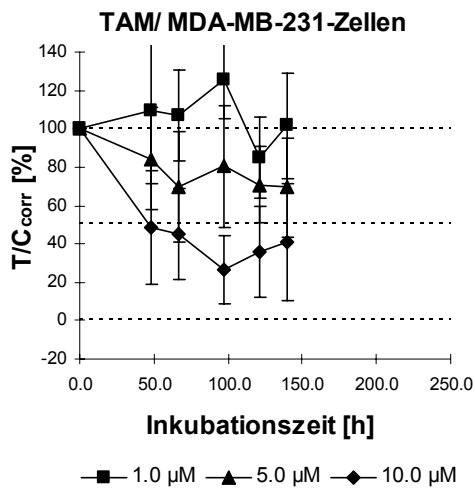
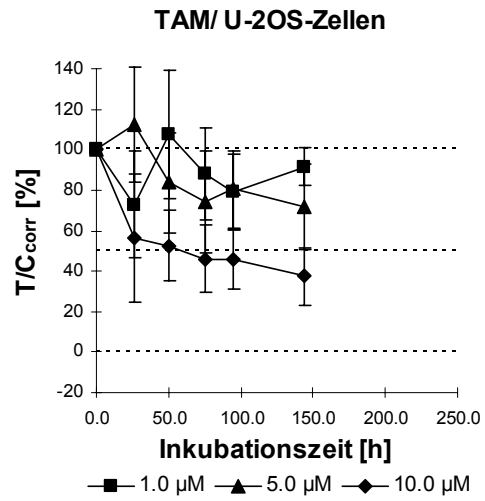
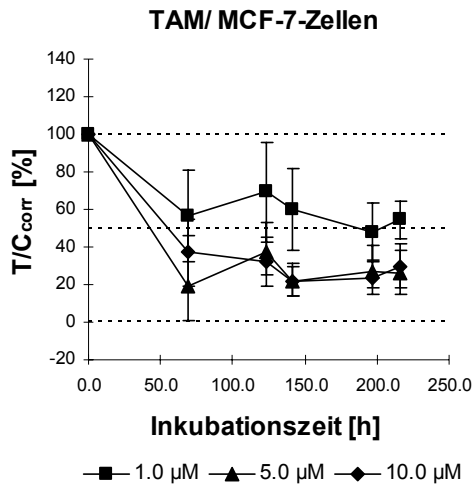
6.3 Zeit-Wirkungskurven der Zytotoxizitätstests

6.3.1 Untersuchung antiestrogen wirksamen Verbindungen auf Zytotoxizität

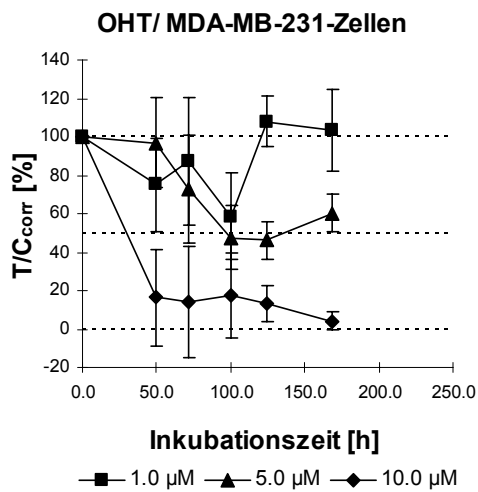
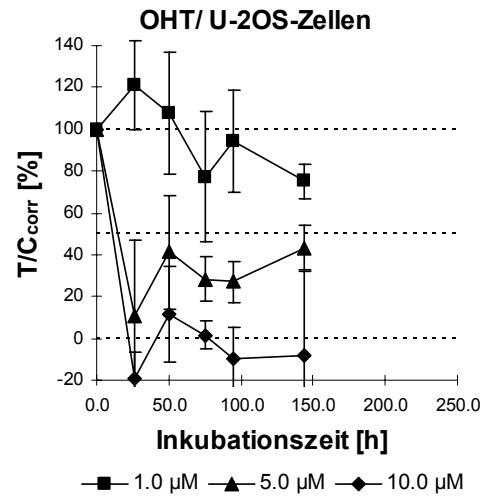
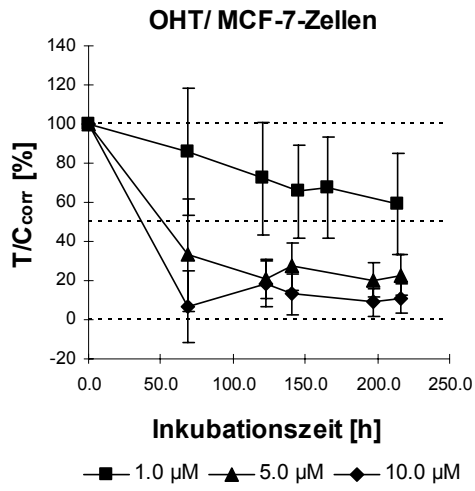
FUL



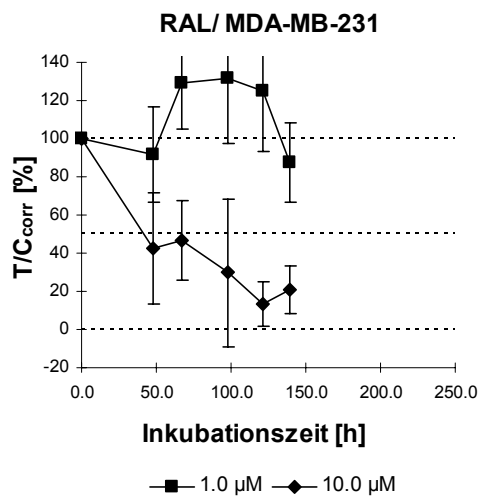
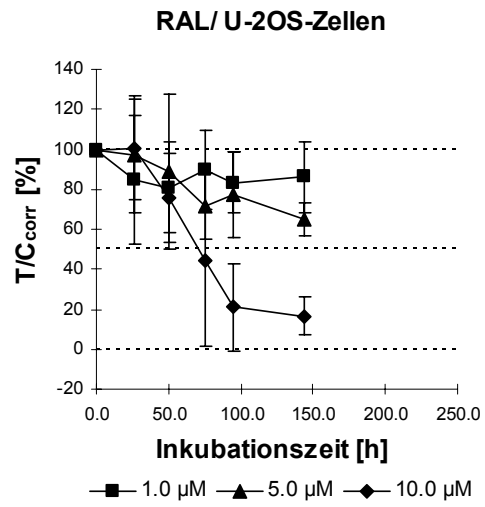
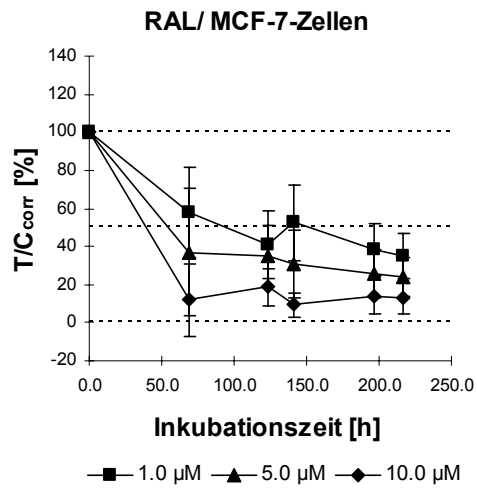
TAM



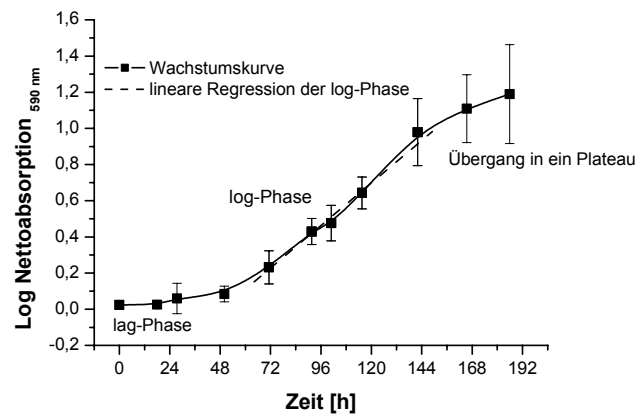
OHT



RAL



6.4 Wachstumskurve von U-2OS-Zellen



7 Literaturverzeichnis

7 Literaturverzeichnis

1. Jensen, E.V. and H.I. Jacobson, *Basic Guides to the Mechanism of Estrogen Action*. Recent Progress in Hormone Research, 1962. **18**: p. 387-414.
2. Jensen, E.V. and E.R. DeSombre, *Mechanism of action of the female sex hormones*. Annu Rev Biochem, 1972. **41**: p. 203-30.
3. Nardulli, A.M. and B.S. Katzenellenbogen, *Dynamics of estrogen receptor turnover in uterine cells in vitro and in uteri in vivo*. Endocrinology, 1986. **119**(5): p. 2038-46.
4. Nirmala, P.B. and R.V. Thampan, *Ubiquitination of the Rat Uterine Estrogen-Receptor - Dependence on Estradiol*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **213**(1): p. 24-31.
5. Pakdel, F., P. Legoff, and B.S. Katzenellenbogen, *An Assessment of the Role of Domain-F and Pest Sequences in Estrogen-Receptor Half-Life and Bioactivity*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1993. **46**(6): p. 663-672.
6. Green, S., et al., *Cloning of the Human Estrogen-Receptor Cdna*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1986. **24**(1): p. 77-83.
7. Green, S., et al., *Human Estrogen-Receptor Cdna - Sequence, Expression and Homology to V-Erb-A*. Nature, 1986. **320**(6058): p. 134-139.
8. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5925-30.
9. Enmark, E., et al., *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4258-65.
10. Hawkins, M.B., et al., *Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10751-6.
11. Sabo-Attwood, T., K.J. Kroll, and N.D. Denslow, *Differential expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isoforms alpha, beta, and gamma by estradiol*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **218**(1-2): p. 107-18.
12. Enmark, E. and J.A. Gustafsson, *Oestrogen receptors - an overview*. Journal of Internal Medicine, 1999. **246**(2): p. 133-138.
13. Greene, G.L., et al., *Sequence and Expression of Human Estrogen-Receptor Complementary-DNA*. Science, 1986. **231**(4742): p. 1150-1154.
14. Green, S. and P. Chambon, *A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors*. Nature, 1986. **324**(6098): p. 615-7.
15. Gronemeyer, H., et al., *Mechanisms of antihormone action*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **41**(3-8): p. 217-21.
16. Tsai, M.J. and B.W. Omalley, *Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members*. Annual Review of Biochemistry, 1994. **63**: p. 451-486.
17. Dutertre, M. and C.L. Smith, *Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **295**(2): p. 431-437.

18. Giguere, V., et al., *Functional Domains of the Human Glucocorticoid Receptor*. Cell, 1986. **46**(5): p. 645-652.
19. Godowski, P.J., D. Picard, and K.R. Yamamoto, *Signal Transduction and Transcriptional Regulation by Glucocorticoid Receptor-Lexa Fusion Proteins*. Science, 1988. **241**(4867): p. 812-816.
20. Berry, M., D. Metzger, and P. Chambon, *Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen*. EMBO journal, 1990. **9**(9): p. 2811-8.
21. McDonnell, D.P., et al., *Analysis of Estrogen-Receptor Function in-Vitro Reveals 3 Distinct Classes of Antiestrogens*. Molecular Endocrinology, 1995. **9**(6): p. 659-669.
22. Nilsson, S., et al., *Mechanisms of estrogen action*. Physiological Reviews, 2001. **81**(4): p. 1535-1565.
23. McInerney, E.M., et al., *Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras*. Endocrinology, 1998. **139**(11): p. 4513-4522.
24. Green, S. and P. Chambon, *Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation*. Trends Genet, 1988. **4**(11): p. 309-14.
25. Beato, M., *Gene-Regulation by Steroid-Hormones*. Cell, 1989. **56**(3): p. 335-344.
26. Schwabe, J.W.R., et al., *The Crystal-Structure of the Estrogen-Receptor DNA-Binding Domain Bound to DNA - How Receptors Discriminate between Their Response Elements*. Cell, 1993. **75**(3): p. 567-578.
27. Green, S. and P. Chambon, *The estrogen receptor: From perception to mechanism*. Nucl. Horm. Recept. 1991. 15-38.
28. Fuller, P.J., *The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity*. Faseb J, 1991. **5**(15): p. 3092-9.
29. Mader, S., et al., *Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 271-4.
30. Green, S. and P. Chambon, *Estradiol Induction of a Glucocorticoid-Responsive Gene by a Chimeric Receptor*. Nature, 1987. **325**(6099): p. 75-78.
31. Umesono, K. and R.M. Evans, *Determinants of Target Gene Specificity for Steroid Thyroid-Hormone Receptors*. Cell, 1989. **57**(7): p. 1139-1146.
32. Rosen, J., et al., *Intracellular Receptors and Signal Transducers and Activators of Transcription Superfamilies - Novel Targets for Small-Molecule Drug Discovery*. Journal of Medicinal Chemistry, 1995. **38**(25): p. 4855-4874.
33. Jackson, T.A., et al., *The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT*. Molecular Endocrinology, 1997. **11**(6): p. 693-705.
34. Forman, B.M. and H.H. Samuels, *Dimerization among nuclear hormone receptors*. New Biol, 1990. **2**(7): p. 587-94.
35. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones*. Endocr Rev, 1997. **18**(3): p. 306-60.

36. Ylikomi, T., et al., *Cooperation of Protosignals for Nuclear Accumulation of Estrogen and Progesterone Receptors*. *Embo Journal*, 1992. **11**(10): p. 3681-3694.
37. Horwitz, K.B., et al., *Nuclear receptor coactivators and corepressors*. *Mol Endocrinol*, 1996. **10**(10): p. 1167-77.
38. Mueller-Fahnow, A. and U. Egner, *Ligand-binding domain of estrogen receptors*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999. **10**(6): p. 550-556.
39. Brzozowski, A.M., et al., *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. *Nature*, 1997. **389**(6652): p. 753-8.
40. Norris, J.D., et al., *Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor*. *Molecular Endocrinology*, 1997. **11**(6): p. 747-754.
41. Jordan, V.C., et al., *Molecular classification of estrogens*. *Cancer Research*, 2001. **61**(18): p. 6619-6623.
42. Tzukerman, M.T., et al., *Human Estrogen-Receptor Transactivational Capacity Is Determined by Both Cellular and Promoter Context and Mediated by 2 Functionally Distinct Intramolecular Regions*. *Molecular Endocrinology*, 1994. **8**(1): p. 21-30.
43. Kraus, W.L., E.M. McInerney, and B.S. Katzenellenbogen, *Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**(26): p. 12314-8.:
44. Hansen, R.K. and S.A.W. Fuqua, *Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenesis and Therapeutics*, ed. A.M. Bowcock. 1999, Totowa, New Jersey: Humana Press. 1-6.
45. Montano, M.M., et al., *The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists*. *Mol Endocrinol*, 1995. **9**(7): p. 814-25.
46. Htun, H., et al., *Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor*. *Molecular Biology of the Cell*, 1999. **10**(2): p. 471-486.
47. GuiochonMantel, A., et al., *Intracellular traffic of steroid hormone receptors*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1996. **56**(1-6): p. 3-9.
48. Bagchi, M.K., et al., *Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(10): p. 4998-5004.
49. Legoff, P., et al., *Phosphorylation of the Human Estrogen-Receptor - Identification of Hormone-Regulated Sites and Examination of Their Influence on Transcriptional Activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(6): p. 4458-4466.
50. Denton, R.R., N.J. Koszewski, and A.C. Notides, *Estrogen-Receptor Phosphorylation - Hormonal Dependence and Consequence on Specific DNA-Binding*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(11): p. 7263-7268.
51. Pettersson, K., et al., *Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha*. *Molecular Endocrinology*, 1997. **11**(10): p. 1486-1496.

52. Little, M., P.I. Szendro, and P.W. Jungblut, *Hormone-Mediated Dimerization of Microsomal Estradiol Receptor*. Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie, 1973. **354**(12): p. 1599-1610.
53. Little, M., et al., *Biosynthesis and Transformation of Microsomal and Cytosol Estradiol Receptors*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1975. **6**(3-4): p. 493-500.
54. Katzenellenbogen, B.S., et al., *William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1997. **44**(1): p. 23-38.
55. Tjian, R. and T. Maniatis, *Transcriptional Activation - a Complex Puzzle with Few Easy Pieces*. Cell, 1994. **77**(1): p. 5-8.
56. Buratowski, S., *The Basics of Basal Transcription by Rna-Polymerase-ii*. Cell, 1994. **77**(1): p. 1-3.
57. Hennig, W., *Genetik*. Vol. 1. 1995, Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 258-263.
58. Sadovsky, Y., et al., *Transcriptional Activators Differ in Their Responses to Overexpression of Tata-Box-Binding Protein*. Molecular and Cellular Biology, 1995. **15**(3): p. 1554-1563.
59. Greenblatt, J., *Roles of Tfiid in Transcriptional Initiation by Rna Polymerase-ii*. Cell, 1991. **66**(6): p. 1067-1070.
60. Ing, N.H., et al., *Members of the Steroid-Hormone Receptor Superfamily Interact with Tfiib (S300-Ii)*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(25): p. 17617-17623.
61. Hernandez, N., *Tbp, a Universal Eukaryotic Transcription Factor*. Genes & Development, 1993. **7**(7B): p. 1291-1308.
62. Spencer, T.E., et al., *Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 194-198.
63. Bevan, C. and M. Parker, *The role of coactivators in steroid hormone action*. Experimental Cell Research, 1999. **253**(2): p. 349-356.
64. Migliaccio, A., et al., *Phosphorylation on tyrosine of in vitro synthesized human estrogen receptor activates its hormone binding*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(7): p. 1061-9.
65. Arnold, S.F., et al., *Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation*. Molecular Endocrinology, 1997. **11**(1): p. 48-53.
66. Migliaccio, A., A. Rotondi, and F. Auricchio, *Estradiol receptor: phosphorylation on tyrosine in uterus and interaction with anti-phosphotyrosine antibody*. Embo J, 1986. **5**(11): p. 2867-72.
67. Chen, D.S., et al., *Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(2): p. 1002-1015.
68. Endoh, H., et al., *Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(8): p. 5363-5372.
69. Smith, C.L., O.M. Conneely, and B.W. O'Malley, *Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6120-4.

70. Power, R.F., et al., *Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1636-9.
71. Pietras, R.J., et al., *HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells*. Oncogene, 1995. **10**(12): p. 2435-46.
72. McKenna, N.J., R.B. Lanz, and B.W. O'Malley, *Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology*. Endocrine Reviews, 1999. **20**(3): p. 321-344.
73. Paech, K., et al., *Differential ligand activation of estrogen receptors ER alpha and ER beta at AP1 sites*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1508-1510.
74. Hall, J.M. and D.P. McDonnell, *The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5566-78.
75. Cowley, S.M., et al., *Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 19858-62.
76. Ogawa, S., et al., *Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta cx: a potential inhibitor of estrogen action in human*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(15): p. 3505-3512.
77. Gustafsson, J.A., *Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action*. J Endocrinol, 1999. **163**(3): p. 379-83.
78. Muramatsu, M. and S. Inoue, *Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions?* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(1): p. 1-10.
79. Krege, J.H., et al., *Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(26): p. 15677-15682.
80. Leygue, E., et al., *Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis*. Cancer Research, 1998. **58**(15): p. 3197-3201.
81. Speirs, V., et al., *Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: Poor prognostic factors in human breast cancer?* Cancer Research, 1999. **59**(3): p. 525-528.
82. Matsuzaki, S., et al., *Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(6): p. 559-64.
83. Weihua, Z., et al., *Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5936-41.
84. Adlercreutz, H., H. Markkanen, and S. Watanabe, *Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men*. Lancet, 1993. **342**(8881): p. 1209-10.
85. Montano, M.M., A.K. Jaiswal, and B.S. Katzenellenbogen, *Transcriptional regulation of the human quinone reductase gene by antiestrogen-liganded estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25443-9.
86. Paech, K., et al., *Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1508-10.

87. Sherrington, R., et al., *Cloning of a Gene Bearing Missense Mutations in Early-Onset Familial Alzheimers-Disease*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 754-760.
88. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4252-63.
89. Shiau, A.K., et al., *The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen*. Cell, 1998. **95**(7): p. 927-37.
90. Jordan, V.C., *Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents*. J Med Chem, 2003. **46**(7): p. 1081-111.
91. Jordan, V.C., *Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. Receptor interactions*. J Med Chem, 2003. **46**(6): p. 883-908.
92. MacGregor Schafer, J., et al., *Allosteric silencing of activating function 1 in the 4-hydroxytamoxifen estrogen receptor complex is induced by substituting glycine for aspartate at amino acid 351*. Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5097-105.
93. Dauvois, S., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**: p. 4037-4041.
94. Dauvois, S., R. White, and M.G. Parker, J. Cell. Sci., 1993. **106**: p. 1377-1388.
95. Fawell, S.E. and M.G. Parker, Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **89**: p. 6883-6887.
96. Pike, A.C.W., et al., *Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen*. Structure, 2001. **9**(2): p. 145-153.
97. Mosselman, S., J. Polman, and R. Dijkema, *ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. Febs Letters, 1996. **392**(1): p. 49-53.
98. Pike, A.C., et al., *Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist*. Embo J, 1999. **18**(17): p. 4608-18.
99. Sun, J., et al., *Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-alpha or estrogen receptor-beta*. Endocrinology, 1999. **140**(2): p. 800-4.
100. Stauffer, S.R., et al., *Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists*. J Med Chem, 2000. **43**(26): p. 4934-47.
101. Mortensen, D.S., et al., *Synthesis and biological evaluation of a novel series of furans: Ligands selective for estrogen receptor alpha*. Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **44**(23): p. 3838-3848.
102. Stauffer, S.R., et al., *Triarylpyrazoles with basic side chains: development of pyrazole-based estrogen receptor antagonists*. Bioorg Med Chem, 2001. **9**(1): p. 151-61.
103. Sun, J., et al., *Antagonists selective for estrogen receptor alpha*. Endocrinology, 2002. **143**(3): p. 941-947.
104. Makela, S., et al., *Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 7077-82.

105. Shiau, A.K., et al., *Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(5): p. 359-64.
106. Meyers, M.J., et al., *Estrogen Receptor- β Potency-Selective Ligands: Structure-Activity Relationship Studies of Diarylpropionitriles and Their Acetylene and Polar Analogues*. Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **44**(24): p. 4230-4251.
107. Sun, J., et al., *Molecular basis for the subtype discrimination of the estrogen receptor- β -selective ligand, diarylpropionitrile*. Molecular Endocrinology, 2003. **17**(2): p. 247-258.
108. Schonenberger, H., et al., *Development of selectively acting platinum complexes*. Cancer Treat Rev, 1984. **11 Suppl A**: p. 125-30.
109. Wappes, B., et al., *Dichloro[1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes: an approach to develop compounds with a specific effect on the hormone-dependent mammary carcinoma*. J Med Chem, 1984. **27**(10): p. 1280-6.
110. von Angerer, E., et al., *N,N'-Dialkyl-1,2-bis(hydroxyphenyl)ethylenediamines and N,N'-dialkyl-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)imidazolidines: syntheses and evaluation of their mammary tumor inhibiting activity*. J Med Chem, 1982. **25**(7): p. 832-7.
111. Karl, J., et al., *Ring-substituted [1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum (II) complexes: compounds with a selective effect on the hormone-dependent mammary carcinoma*. J Med Chem, 1988. **31**(1): p. 72-83.
112. Gust, R. and H. Schönenberger, *Mammary tumor inhibiting [1,2-bis(2,6-dihalo-3-hydroxyphenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes, III: Relationship between structure and estrogenic activity of the diamine ligands, their sulfatoplatinum(II) and diiodoplatinum(II) complexes*. Arch Pharm (Weinheim), 1993. **326**(7): p. 405-13.
113. Gust, R., et al., *Aqua[1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamine](sulfato)platinum-(II) complexes with variable substituents in the 2-phenyl ring. 1. Synthesis and antitumor and estrogenic properties*. J Med Chem, 1990. **33**(9): p. 2535-44.
114. Schertl, S., et al., *1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-phenylethanes--new biological response modifiers for the therapy of breast cancer. Synthesis and evaluation of estrogenic/antiestrogenic properties*. Arch Pharm (Weinheim), 2001. **334**(4): p. 125-37.
115. Gust, R., K. Niebler, and H. Schonenberger, *Investigation of the configurational and conformational influences on the hormonal activity of 1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamines and of their platinum(II) complexes. 1. Synthesis, estradiol receptor affinity, and estrogenic activity of diastereomeric [N-alkyl- and N,N'-dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes*. J Med Chem, 1995. **38**(12): p. 2070-9.
116. Gust, R., et al., *Aqua[1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamine]sulfatoplatinum(II) complexes with variable substituents in the 2-phenyl ring, II: Correlation of molecular structure and estrogenic activity of breast and prostate cancer inhibiting. [erythro-1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-(2-halo-4-*

- hydroxyphenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes*. Arch Pharm (Weinheim), 1993. **326**(12): p. 967-76.
117. Schmidt, K., *Dissertation: Struktur-Wirkungs-Studien an estrogen wirksamen 1,2-Diarylethanderivaten sowie an antitumoraktiven Acetylenhexacarbonyldikobaltkomplexen*, in *Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie*. 2000, Freie Universität Berlin.
118. Gust, R., et al., *Structure activity studies on leaving group derivatives of [meso-1,2-bis-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine] platinum(II)*. Arch Pharm (Weinheim), 1999. **332**(8): p. 261-70.
119. Keilitz, R., *Dissertation: Struktur-Wirkungs-Studien an neuen estrogen wirksamen Verbindungen- Entwicklung eines Bindungsstellenmodells für Typ-II-Estrogene*, in *Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie*. 1995, Freie Universität Berlin.
120. Gust, R., R. Keilitz, and K. Schmidt, *Investigations of new lead structures for the design of selective estrogen receptor modulators*. J Med Chem, 2001. **44**(12): p. 1963-70.
121. Gust, R., K. Niebler, and H. Schönenberger, *Investigation of the configurational and conformational influences on the hormonal activity of 1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamines and of their platinum(II) complexes. 1. Synthesis, estradiol receptor affinity, and estrogenic activity of diastereomeric [N-alkyl- and N,N'-dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes*. J Med Chem, 1995. **38**(12): p. 2070-9.
122. von Rauch, M., S. Busch, and R. Gust, *Investigations on the effects of basic side chains on the hormonal profile of (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolines*. J Med Chem, 2005. **48**(2): p. 466-74.
123. Watanabe, T., et al., *Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(1): p. 140-5.
124. Ponten, J. and E. Saksela, *Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours*. Int J Cancer, 1967. **2**(5): p. 434-47.
125. Hay, R.J., *The seed stock concept and quality control for cell lines*. Anal Biochem, 1988. **171**(2): p. 225-37.
126. Reile, H., in *Naturwissenschaftliche Fakultät IV*. 1991, Universität Regensburg: Regensburg.
127. Biberger, C. and E. Von Angerer, *1-Benzyl-2-phenylindole- and 1,2-diphenylindole-based antiestrogens. Estimation of agonist and antagonist activities in transfection assays*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1998. **64**(5-6): p. 277-285.
128. Meyer, T., et al., *A rapid luciferase transfection assay for transcription activation effects and stability control of estrogenic drugs in cell cultures*. J Cancer Res Clin Oncol, 1994. **120**(6): p. 359-64.
129. Meyer, T., in *Naturwissenschaftliche Fakultät IV*. 1992, Universität Regensburg: Regensburg.
130. Hafner, F., *Dissertation: Wirkungen von Estrogenen, Antiestrogenen und Wachstumsfaktoren auf Funktionen des Estrogenrezeptors Untersuchungen mit transient und stabil transfizierten Reporterplasmiden*, in *Naturwissenschaftliche Fakultät IV, Chemie und Pharmazie*. 1996, Universität Regensburg.

131. Gust, R., et al., *(4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolines: ligands for the estrogen receptor with a novel binding mode*. J Med Chem, 2002. **45**(16): p. 3356-65.
132. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, *Determination of cell number in monolayer cultures*. Anal Biochem, 1986. **159**(1): p. 109-13.
133. Spruss, T., et al., *Different Response of Murine and Human Mammary-Tumor Models to a Series of Diastereoisomeric 1,2-Bis(Difluorophenyl) Ethylenediamine Dichloroplatinum(II) Complexes*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 1991. **117**(5): p. 435-443.
134. Skehan, P., J. Thomas, and S.J. Friedman, *Postconfluency MDCK monolayers as an in vitro model of solid tumor chemosensitivity*. Cell Biol Toxicol, 1986. **2**(3): p. 357-68.
135. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
136. Brooks, S.C., E.R. Locke, and H.D. Soule, *Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma*. J Biol Chem, 1973. **248**(17): p. 6251-3.
137. Horwitz, K.B., M.E. Costlow, and W.L. McGuire, *MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors*. Steroids, 1975. **26**(6): p. 785-95.
138. Horwitz, K.B., et al., *Steroid receptor analyses of nine human breast cancer cell lines*. Cancer Res, 1978. **38**(8): p. 2434-7.
139. Cailleau, R., et al., *Breast tumor cell lines from pleural effusions*. J Natl Cancer Inst, 1974. **53**(3): p. 661-74.
140. Grainger, D.J. and J.C. Metcalfe, *Tamoxifen: teaching an old drug new tricks?* Nat Med, 1996. **2**(4): p. 381-5.
141. Rauch, v.M., *Dissertation: 4,5-Diaryl-2-imidazoline als Liganden des Estrogenrezeptors: Untersuchungen zur Synthese, Stabilität, Struktur und Pharmakologie*, in *Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie*. 2003, Freie Universität Berlin.
142. von Rauch, M., M. Schlenk, and R. Gust, *Effects of C2-alkylation, N-alkylation, and N,N'-dialkylation on the stability and estrogen receptor interaction of (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolines*. J Med Chem, 2004. **47**(4): p. 915-27.
143. Gust, R., R. Keilitz, and K. Schmidt, *Synthesis, structural evaluation, and estrogen receptor interaction of 2,3-diarylpiperazines*. J Med Chem, 2002. **45**(11): p. 2325-37.
144. Pietras, R.J. and C.M. Szego, *Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells*. Nature, 1977. **265**(5589): p. 69-72.
145. Norman, A.W., M.T. Mizwicki, and D.P.G. Norman, *Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model*. Nature Reviews Drug Discovery, 2004. **3**(1): p. 27-41.
146. Levin, E.R., *Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors*. Steroids, 2002. **67**(6): p. 471-475.
147. Marquez, D.C. and R.J. Pietras, *Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells*. Oncogene, 2001. **20**(39): p. 5420-5430.
148. Powell, C.E., A.M. Soto, and C. Sonnenschein, *Identification and characterization of membrane estrogen receptor from MCF7 estrogen-*

- target cells*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2001. **77**(2-3): p. 97-108.
149. Castoria, G., et al., *Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis*. Embo Journal, 1999. **18**(9): p. 2500-2510.
150. Migliaccio, A., et al., *Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells*. Embo J, 1996. **15**(6): p. 1292-300.
151. Schmidt, K., *Struktur-Wirkungs-Studien an estrogen wirksamen 1,2-Diarylethanderivaten sowie an antitumoraktiven Acetylenhexacarbonyldikobaltkomplexen*, in *Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie*. 2000, Freie Universität Berlin: Berlin.
152. Kekenes-Huskey, P.M., et al., *A molecular docking study of estrogenically active compounds with 1,2-diarylethane and 1,2-diarylethene pharmacophores*. Bioorg Med Chem, 2004. **12**(24): p. 6527-37.
153. Schopfer, U., et al., *Toward selective ER beta Agonists for central nervous system disorders: Synthesis and characterization of aryl benzthiophenes*. 2002. **45**(7): p. 1399-1401.
154. Mewshaw, R.E., et al., *ERbeta ligands. 3. Exploiting two binding orientations of the 2-phenylnaphthalene scaffold to achieve ERbeta selectivity*. J Med Chem, 2005. **48**(12): p. 3953-79.
155. Henke, B.R., et al., *A new series of estrogen receptor modulators that display selectivity for estrogen receptor beta*. 2002. **45**(25): p. 5492-5505.
156. Gust, R., in *Naturwissenschaftliche Fakultät IV*. 1994, Universität Regensburg: Regensburg.
157. Jacquot, Y., et al., *Substituted benzopyranobenzothiazinones. Synthesis and estrogenic activity on MCF-7 breast carcinoma cells*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **36**(2): p. 127-136.
158. Jacquot, Y., et al., *Pharmacological profile of 6,12-dihydro-3-methoxy-1-benzopyrano 3,4-b 1,4 benzothiazin-6-one, a novel human estrogen receptor agonist*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(3): p. 335-341.
159. Hwang, K.J., et al., *Donor-acceptor tetrahydrochrysenes, inherently fluorescent, high-affinity ligands for the estrogen receptor: binding and fluorescence characteristics and fluorometric assay of receptor*. Biochemistry, 1992. **31**(46): p. 11536-45.
160. Hartmann, R.W., *Influence of alkyl chain ramification on estradiol receptor binding affinity and intrinsic activity of 1,2-dialkylated 1,2-bis(4- or 3-hydroxyphenyl)ethane estrogens and antiestrogens*. J Med Chem, 1986. **29**(9): p. 1668-74.
161. Hartmann, R.W., et al., *Ring-substituted 1,2-dialkylated 1,2-bis(hydroxyphenyl)ethanes. 3. Synthesis, estrogen receptor binding affinity, and evaluation of antiestrogenic and mammary tumor inhibiting activity of 2,2'-disubstituted butestrols and 6,6'-disubstituted metabutestrols*. J Med Chem, 1984. **27**(7): p. 819-24.
162. Edsall, R.J., et al., *ER beta ligands. Part 1: The discovery of ER beta selective ligands which embrace the 4-hydroxy-biphenyl template*. 2003. **11**(16): p. 3457-3474.

163. Edsall, R.J., et al., *Estrogen receptor b selective ligands: Exploiting different binding modes within the 6-H-Chromene[c,h] diol template*. Abstracts of Papers, 228th ACS National Meeting, Philadelphia, PA, United States, August 22-26, 2004, 2004: p. MEDI-296.
164. Rücker, G., M. Neugebauer, and G.G. Willems, *¹H-NMR-Spektroskopie*, in *Instrumentelle Pharmazeutische Analytik*. 1992, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart. p. 164.
165. Fife, T.H. and J.E.C. Hutchins, *General acid catalysis of the hydrolysis of acetal analogues of high basicity. The hydrolysis of 2-(substituted phenyl)-N,N-dimethyl-1,3-imidazolidines*. Journal of the American Chemical Society, 1976. **98**(9): p. 2536-43.
166. Fife, T.H., J.E.C. Hutchins, and A.M. Pellino, *General acid catalyzed imidazolidine hydrolysis. Hydrolysis of 2-(tert-butyl)-N,N'-dimethyl-1,3-imidazolidine and 2-(p-methoxyphenyl)-N-isopropyl-N'-phenyl-1,3-imidazolidine*. Journal of the American Chemical Society, 1978. **100**(20): p. 6455-62.
167. Fife, T.H. and A.M. Pellino, *General-acid-catalyzed imidazolidine ring opening. Hydrolysis of symmetrical and unsymmetrical 1,3-imidazolidines of p-dimethylaminocinnamaldehyde*. Journal of the American Chemical Society, 1980. **102**(9): p. 3062-71.
168. Fife, T.H. and A.M. Pellino, *General-acid catalysis of imidazolidine ring opening. The hydrolysis of ethyl N,N'-[1-(p-(dimethylamino)phenyl)propenediyl]-p-[(2-tetrahydroquinoliny)methylene]amino]benzoate*. Journal of the American Chemical Society, 1981. **103**(5): p. 1201-7.
169. Gassen, H.G. and G. Schrimpf, *Gentechnische Methoden*. Vol. 2. Auflage. 1999, Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH. 382-383.
170. Meyer, T., *Diplomarbeit*, in *Naturwissenschaftliche Fakultät IV, Chemie und Pharmazie*. 1992, Universität Regensburg.
171. Gassen, H.G. and G. Schrimpf, *Gentechnische Methoden*. 1999, Spektrum, Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg, Berlin. p. 382-383.

Struktur-Wirkungs-Studien an estrogen wirksamen Verbindungen mit 1,2-Diarylethan-Strukturelement

Untersuchungen von Typ-I- und Typ-II-Estrogenen an ER α und ER β

Estrogene vermitteln ihre Wirkung über den Estrogenrezeptor (ER), einen ligandeninduzierten Transkriptionsfaktor. Seit 1996 ist bekannt, dass es zwei Rezeptorsubtypen (ER α und ER β) mit unterschiedlichem Verteilungsmuster im menschlichen Organismus und gegenseitiger Beeinflussung gibt. Sie regulieren neben der weiblichen Reproduktionsendokrinologie Zellproliferation und -differenzierung in vielen weiteren Geweben, auch beim Mann. Physiologischer Ligand beider ER-Subtypen ist Estradiol (E2). Neben diesem sind weitere steroidale und eine Reihe nicht steroidaler Verbindungen mit agonistischer und antagonistischer Wirkung auf ER α und ER β bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Ergänzung des Testsystems mit ER α -abhängigen MCF-7-2a-Zellen ER-subtypselektive Transaktivierungsassays auf Basis transienter Transfektion genuin ER-negativer U-2OS-Zellen aufgebaut.

Die Testsysteme mit U-2OS-Zellen reagierten sowohl auf Agonisten als auch Antagonisten empfindlicher als MCF-7-2a-Zellen. Verantwortlich dafür wurden estrogenaffine Strukturen ohne Transkriptionsaktivität im Bereich der Zellmembran der MCF-7-2a-Zellen gemacht (membranständiger ER).

Verschiedene Verbindungen mit dem von Hexestrol abgeleiteten 1,2-Diarylethan-Strukturelement wurden auf ihre Wirkung am ER untersucht. Als wichtiges Merkmal stellte sich eine *para*-Hydroxygruppe in beiden Arylresten heraus. Nur Verbindungen mit zusätzlichen hydrophoben Strukturkomponenten wie Azidgruppen oder Diiodoplatineinheiten zeigten trotz *para*-Methoxygruppen estrogen Aktivität.

Eine (*R,S*)/(*S,R*)-Konfiguration des 1,2-Diarylethan-Strukturelements erwies sich bei allen Substanzklassen als überlegen gegenüber den diastereomeren Verbindungen.

Auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu E2 wurden offenkettige 1,2-Diazido- und 1,2-Diamino-1,2-diarylethane als Typ-I-Estrogene klassifiziert. Ihr Bindungsmodell geht von einer zu E2-analogen Assoziation im ER aus. (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-1,2-Diamino-1-(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-(2-chlor-4-hy-

droxyphenyl)ethan (**21 a**) war an ER α ca. 10-mal wirksamer als an ER β (EC₅₀: ER α = 2.8 nM; ER β = 31 nM). Sterische Behinderungen zwischen einer Aminogruppe und der Seitenkette von Met³³⁶ in ER β könnten hierfür verantwortlich sein.

In Abhängigkeit ihrer Grundstruktur zeigten (*R,S*)/(*S,R*)-konfigurierte zyklische Typ-II-Estrogene unterschiedliche estrogenische Wirkungen. Neben dem Prototyp dieser Klasse, den [1,2-Diamino-1,2-diarylethan]Pt(II)-Komplexen, zeigten 4,5-Diaryl-2-imidazoline eine gute estrogenische Wirksamkeit. Diese konnte bei 4,5-Diaryl-2-imidazolinen durch Steigerung der Lipophilie über Erhöhung des Chlorierungsgrades in den Arylresten, N-Alkylierung und teilweise durch N,N'-Dialkylierung verstärkt werden. Eine Alkylierung von C-2 führte hingegen zu einer Abnahme der estrogenischen Wirksamkeit.

Als wirksamste Verbindung zeigte sich (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-N-Ethyl-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**53**) (EC₅₀: MCF-7-2a-Zellen = 11 nM; ER α = 0.42 nM; ER β = 3.1 nM). Ihre 7-fach höhere Wirksamkeit an ER α kann in geringeren sterischen Behinderungen in der etwas größeren LBD begründet liegen. Im Vergleich zu **53** lag die Wirkung von E2 nur - abhängig vom Testsystem - zwischen dem Faktor 240 und 310 höher.

4,5-Diaryl-2-imidazoline mit basischer Seitenkette zeigten an der MCF-7-2a-Zelllinie weder agonistische noch antagonistische Eigenschaften. An den ER-Subtypen dagegen kam es zu unterschiedlich starker Reduktion der agonistischen Eigenschaften. Derivate mit zusätzlicher Ethylgruppe an C-2 zeigten schließlich auch antagonistische Wirkungen. (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-2-Ethyl-4-(4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**49**) zeigte an ER α nur antagonistische Effekte (ER α : IC₅₀ = 62 nM), während an ER β noch agonistische Aktivität festgestellt wurde (ER β : EC₅₀ = 510 nM; IC₅₀ = 8000 nM).

Durch die gewinkelte Strukturgeometrie musste für Typ-II-Estrogene ein zu E2 unterschiedliches Bindungsmodell angenommen werden. Ihre Strukturanalogie zu SERM ließ vermuten, dass der zweite Arylrest den β -Kanal in der LBD besetzt.

Structure-Activity-Relationship of Estrogenic Compounds with 1,2-Diarylethane Moiety

Examinations of Type-I- and Type-II-Estrogens on ER α and ER β

Estrogens mediated their effects via the estrogen receptor (ER) - a ligand-induced transcriptional factor. Since 1996 two receptor subtypes (ER α and ER β) are known. They show different distribution patterns within human organism and influence each other. Besides female reproduction they regulate proliferation and differentiation of cells within both man and woman. Additional to the physiological ligand estradiol (E2) other steroidal and numerous non-steroidal compounds exert agonistic and antagonistic effects on ER α and ER β . In order to complete the test system with ER α -depending MCF-7-2a-cells, new ER-subtype selective transactivation assays based on transient transfection of genuine ER-negative U-2OS-cells were established.

The test systems with U-2OS-cells turned out to be the more sensitive assays for agonists and antagonists by comparison with MCF-7-2a-cells.

Different compounds bearing the 1,2-diarylethane moiety derived from Hexestrol have been assayed on the ER. *Para*-hydroxy groups in both aryl residues proofed to be essential for estrogenic activity. Compounds with additional hydrophobic residues such as azido groups or a diiodoplatinum unit mediated estrogenic effects in spite of *para*-methoxy group. Throughout all classes of compounds (*R,S*)/(*S,R*)-configuration of the 1,2-diarylethane moiety showed better effects than the diastereomeric compounds.

Non-cyclic 1,2-diazido- and 1,2-diamino-1,2-diarylethanes show structural similarity to E2. It is the reason why they were classified as type-I-estrogens and their binding mode to the ER was assumed to be analogous to E2. (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-1,2-Diamino-1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-(2-chloro-4-hydroxyphenyl)ethane (**21 a**) showed a 10-time higher potency on ER α than on ER β (EC₅₀: ER α = 2.8 nM; ER β = 31 nM). This might be based on sterically hindrances between one amino group and the side chain of Met³³⁶ in ER β .

Depending on the basic structure (*R,S*)/(*S,R*)-configured cyclic type-II-estrogens showed different estrogenic activity. Besides [1,2-diamino-1,2-diarylethane]Pt(II) complexes - the prototype of type-II-estrogens - 4,5-diaryl-2-

imidazolines exerted efficient estrogenic activity. Estrogenic potency of 2-imidazolines was enhanced by increasing their lipophilic character. With the number of chlorine atoms in the aryl residues, N-alkylation and partly N,N'-dialkylation estrogenic potency improved. However C-2-alkylation caused a decrease of estrogenic response.

The most potent compound in this study was (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-N-ethyl-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline (**53**) (EC_{50} : MCF-7-2a-cells = 11 nM; ER_{α} = 0.42 nM; ER_{β} = 3.1 nM). Its 7-time higher potency on ER_{α} might be caused by less sterically hindrances in the slightly larger LBD. Depending on the test system, E2 was only 240- to 310-time more active compared to **53**.

Derivatives of 4,5-diaryl-2-imidazolines with basic side chains showed neither agonistic nor antagonistic effects. On the ER-subtypes a different reduction of agonistic activity was achieved. At last antagonistic effects were seen by derivatives with an additional C-2-ethyl group. (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-Ethyl-4-(4-(2-piperidine-1-ylethoxy)phenyl)-5-(4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline (**49**) showed only antagonistic effects on ER_{α} (ER_{α} : IC_{50} = 62 nM) whereas on ER_{β} agonistic activity was still established (ER_{β} : EC_{50} = 510 nM; IC_{50} = 8000 nM). According to their different spatial structure to E2 a different binding mode was assigned to type-II-estrogens. Due to their structural analogy to SERM the second aryl residues was supposed to occupy the β -canal of the LBD.