

6 Diskussion der Testergebnisse

Die Grundstruktur aller in dieser Arbeit präsentierten Verbindungen, Triphenylethylen, ist schon seit den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts bekannt. Robson und Schönberg berichteten, dass Triphenylethylen und 2-Chlor-1,1,2-triphenylethylen Estrogene von geringer Wirkung und außergewöhnlich langer Wirkdauer seien^[236]. Die estrogene Wirkung konnte durch Substitution von 2-Halo-1,1,2-triphenylethylenen mit unterschiedlichen Alkoxyresten^[151, 237, 238, 239, 240] an den Phenylringen gesteigert werden. Die Art der endokrinen Wirkung (Antagonismus oder Agonismus) kann durch geringfügige Modifikationen des Substitutionsmusters des 1,1,2-Triphenylethen-Grundgerüsts beeinflusst werden. Besonders wirksame Antagonisten werden erhalten, wenn eine basische Seitenkette, wie im Fall von TAM oder RAL eingeführt wird. Die meisten bekannten Antagonisten besitzen eine entsprechende Seitenkette. Laut Jordan et al. ist sie eine Grundvoraussetzung für die antiestrogene Wirkung^[76]. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine antiestrogene Wirkung auf molekularer Ebene durch Triarylalkene ohne basische Seitenkette hervorgerufen werden kann.

Vergleichbare Beobachtungen bezüglich der Rezeptoraffinität und der endokrinen Wirkung auf molekularer Ebene sind schon aus den Vorgängerarbeiten von Schneider^[150] und Bachmann^[149] bekannt. Die von ihnen untersuchten 1,1-Bis(4-acetoxyphenyl)-2-phenylalkene weisen im Tierexperiment am hormonabhängigen transplantablen MXT-Maus-Brusttumor eine inhibitorische Wirkung auf, die durch die Verlängerung der Seitenkette modifiziert werden kann. Im Uterusgewichtstest an der unreifen Maus zeigten diese Verbindungen eine estrogene Wirkung; d. h. ein SERM-artiges Wirkprofil konnte für diese Verbindungen beobachtet werden.

Neben alkylsubstituierten Verbindungen wurde auch eine große Anzahl an Verbindungen synthetisiert, die eine funktionelle Gruppe an der C2-Seitenkette tragen. Vor allem eine große Anzahl von Acrylnitrilen^[241, 242, 243, 244] und ihre Derivate (Amin, Dimethylamin, Amid)^[245, 246, 247] sind auf ihre Rezeptoraffinität und endokrine Wirkung untersucht worden. Sie weisen zumeist eine hohe Rezeptoraffinität, verbunden mit einer partialagonistischen Wirkung auf. Da die beschriebenen Verbindungen Derivate von BisOHMe darstellen, ist eine partialagonistische Wirkung naheliegend.

Der RBA-Wert der untersuchten Verbindungen wird ebenso wie die antagonistische Wirkung dadurch ermittelt, dass E2 kompetitiv aus seiner Bindungsstelle verdrängt

wird. Zur Interpretation der vorliegenden pharmakologischen Ergebnisse müssen deswegen die Wechselwirkungen des physiologischen Liganden E2 mit seinem Rezeptor sowie die Wechselwirkungen bekannter synthetischer Agonisten und Antagonisten in Betracht gezogen werden.

In seiner Fähigkeit, strukturell sehr unterschiedliche nichtsteroidale Liganden zu binden, ist der ER einzigartig unter den SHR. Das für die Ligandenbindung zur Verfügung stehende Volumen seiner Ligandenbindungstasche ist mit einem Volumen von 450 \AA^3 fast doppelt so groß wie das von E2 (245 \AA^3).^[45] Die Längen- und Breitenausdehnung der Bindungstasche wird von E2 gut ausgenutzt, aber es gibt große unbesetzte Bereiche ober- und unterhalb des Moleküllerns, die von nichtphysiologischen ER-Liganden ausgenutzt werden könnten.^[115] Einige ER-Liganden, wie E2 oder das synthetische Diethylstilbestrol (DES) verhalten sich als Agonisten, andere hemmen die E2-Bindung kompetitiv und wirken antagonistisch. Die agonistischen und antagonistischen Eigenschaften eines Liganden werden von der durch ihn hervorgerufenen Rezeptorkonformation bestimmt^[248]. ER-Antagonisten lassen sich aufgrund der unterschiedlichen ER-Konformationen, die sie hervorrufen, in verschiedene Klassen einteilen^[118]:

Selektive Estrogen Rezeptor Modulatoren (SERM), wie TAM und RAL wirken in Abhängigkeit vom zellulären und Promoterkontext ebenso wie von der Rezeptorisoform im Zielgewebe sowohl agonistisch, als auch antagonistisch^[118]. Die antagonistische Wirkung aller bekannten SERM scheint über AF-2 vermittelt zu sein und zumindest an ER α scheint AF-1 für den partiell agonistischen Charakter verantwortlich zu sein^[249].

„Reine“ Antagonisten, wie beispielsweise ICI 182 780 und ICI 164 384 (vgl. Abbildung 6.4) sind in der Lage, die Aktivität von E2 über die Hemmung beider Aktivierungsfunktionen AF-1 und AF-2 zu blockieren.^[250, 251] Solche reinen Antiöstrogene unterscheiden sich auch in pharmakologischer Hinsicht von den SERM. Sie eignen sich als second-line Therapie gegen fortgeschrittenen Brustkrebs bei Patientinnen, die eine Resistenz gegen TAM entwickelt haben.^[252]

Durch die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur der LBD von ER α und ER β kokristallisiert mit dem *R,R* Enantiomer von 5,11-*cis*-diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol (THC) durch Shiau et al.^[139] gelang die Identifizierung einer weiteren Klasse von Antiöstrogenen, die im Folgenden „passive“ Antagonisten genannt werden sollen. Auch sie haben, wie die SERM, vor allem einen Einfluss auf

die AF-2 Aktivität des ER, allerdings wird ihre Wirkung durch einen von den SERM unterschiedlichen Mechanismus hervorgerufen. ^[249]

6.1.1 Wechselwirkung von E2 mit der LBD des ER

1997 gelang es Brzozowski und Pike ^[45] sowie Tanenbaum ^[253] die Röntgenkristallstruktur der LBD des ER α kokristallisiert mit E2 aufzuklären. Die spezifische Hormonerkennung durch die LBD des ER erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen sowie über van der Waals Wechselwirkungen, was zu einer Reorientierung der Helix 12 der LBD führt ^[115]. Die phenolische Hydroxygruppe des E2 in 3-Position geht direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carboxylatgruppe des Glu 353, dem Guanidinrest von Arg 394 und einem Wassermolekül ein. Die Hydroxygruppe in 17 β -Position bildet eine Wasserstoffbrücke zum N-3 des Imidazolrings des His 524 aus. Der O-O Abstand zwischen den Hydroxygruppen des E2 beträgt 10.9 Å ^[254]. Die hydrophoben Kontakte konzentrieren sich hauptsächlich auf den A-Ring, die Verbindungsstelle zwischen A-Ring und B-Ring und den D-Ring des 2 zwischen den hydrophoben Seitenketten von Ala 350 und Leu 387 auf der β -Seite und Phe 404 und Leu 391 auf der α -Seite des Moleküls. Am distalen Ende der Bindungstasche tritt der D-Ring mit Ile 424, Gly 521 und Leu 525 in Kontakt ^[45].

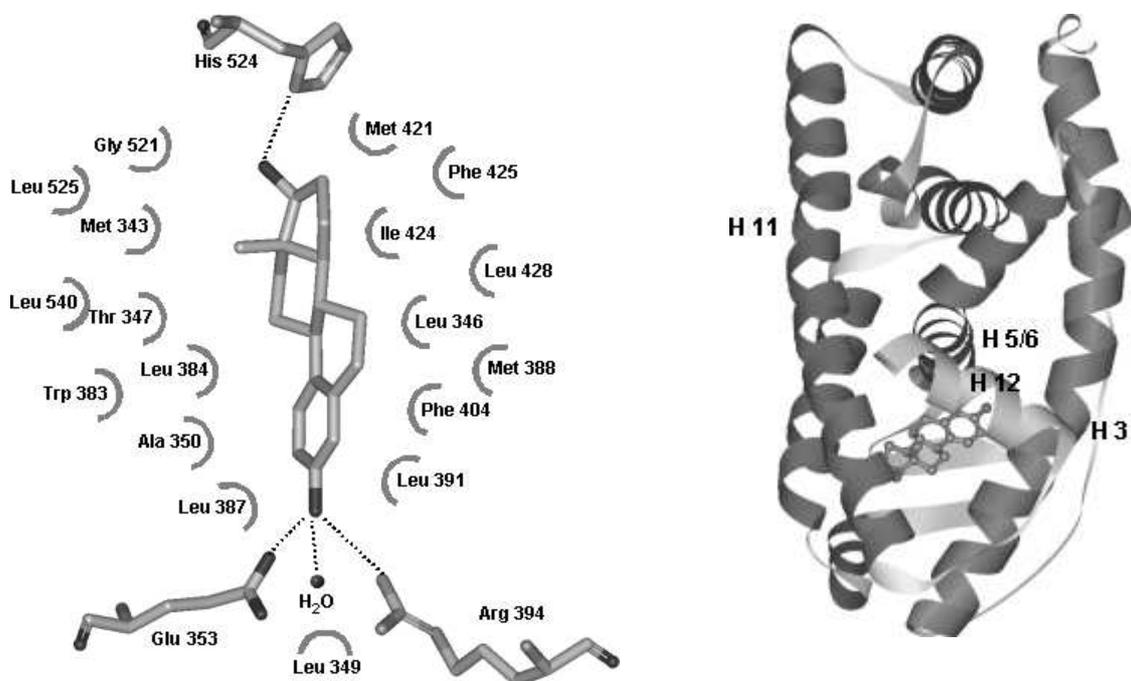


Abbildung 6.1 Wechselwirkungen von E2 mit der LBD des ER α nach Brzozowski ^[45]; links: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Kontakte; rechts: Röntgenkristallstruktur eines Monomeren, hellgrau im Vordergrund Helix 12

Im E2-ER α Komplex verschließt Helix 12 die Ligandenbindungstasche und kommt dabei in Kontakt mit den Helices 3, 5/6 und 11 (Siehe Abbildung 6.1, rechts). Obwohl Helix 12 selbst keinen direkten Kontakt zu E2 hat, bildet sie den Verschluss der Ligandenbindungstasche und richtet seine hydrophobe Oberfläche auf den Liganden. Ihre geladene Oberfläche, die unter anderem Asp 538, Asp 545 und das hochkonservierte His 524 beinhaltet, ist zur Seite gedreht und liegt senkrecht zum Dimerisierungsinterface, das vor allem aus Helix 11 gebildet wird. Diese präzise Ausrichtung der Helix 12 ist die Voraussetzung für eine Transkriptionsaktivierung, da durch das Verschließen der Ligandenbindungstasche eine kompetente AF-2 generiert wird, die mit Koaktivatoren interagieren kann.^[115] Durch Mutation oder Verlust dieser Region kann der Rezeptor nicht mehr auf den Liganden reagieren.

Eine Analyse dieser Kristallstruktur zeigt, dass hoch rezeptoraffine Wirkstoffe vergleichbare van der Waals Volumina und Wechselwirkungen wie E2 aufweisen sowie vergleichbare hydrophile Interaktionen mit der LBD eingehen müssen, um den ER zu aktivieren. Der Abstand der Hydroxygruppen sollte in den Wirkstoffen im Bereich des für E2 gefundenen Abstands von 10.9 Å liegen, ferner sollte der Wirkstoff eine planare Struktur besitzen.

Bei allen untersuchten Substanzklassen dieser Arbeit besitzen die O-methylierten Verbindungen wesentlich schwächere Bindungsaffinitäten als die korrespondierenden hydroxylierten Verbindungen. Auch beim endogenen Liganden E2 sinkt der RBA-Wert bereits durch eine einfache Methylierung der 17 β -Hydroxygruppe von 100% auf 7%^[255].

In Anbetracht der Wechselwirkungen, die für die Bindung von E2 in der LBD des ER α essentiell sind, ist dies nicht verwunderlich. Liegt die 17 β -Hydroxygruppe des E2 methyliert vor, kann eine Wasserstoffbrückenbindung analog E2 zu His 524 nicht mehr ausgebildet werden, was die Reduktion der relativen Bindungsaffinität auf 7% der Estradiolwirkung erklärt. Eventuell denkbar wäre eine Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoff der Methoxygruppe. Diese könnte nach Rotation des Imidazolringes über das Wasserstoffatom am N1 des Imidazolrings des Histidins oder nach Protonenwanderung vom N1 zum N3 ausgebildet werden. Doch scheint diese Wechselwirkung nicht sehr ausgeprägt zu sein, wie sich in der deutlichen Abnahme der Bindungsaffinität zeigt.

6.1.3 Antagonistische Wirkung

6.1.3.1 „Aktiver“ Antagonismus

Shiau et al. ^[115] klärten 1998 die Röntgenkristallstruktur von 4-OHT, dem aktiven Metaboliten von TAM ^[233], kokristallisiert mit der LBD des ER α auf.

Die Bindung von 4-OHT in der LBD des ER α erfolgt analog E2 bzw. DES über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der phenolischen Hydroxygruppe am A-Ring des 4-OHT und Glu 353, Arg 394 sowie einem Molekül Wasser, wie aus der Abbildung 6.3 hervorgeht. Auch die hydrophoben Interaktionen ähneln, mit geringfügigen Abweichungen in der Stellung der einzelnen Aminosäuren, denen von E2. Da 4-OHT keine Hydroxygruppe am C-Ring trägt, kann keine Wasserstoffbrückenbindung zu His 524 ausgebildet werden. Die Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxygruppe am A-Ring zu Glu 353, Arg 394 und einem Molekül Wasser reicht aus, um E2 mit einem RBA-Wert (vgl. 5.2.1, S. 79) von 15.6% aus seiner Bindungsstelle zu verdrängen.

Die Orientierung von 4-OHT in der Bindungstasche wird neben dieser OH-Gruppe von der Seitenkette am B-Ring bestimmt. Die Seitenkette verlässt die Bindungstasche zwischen den Helices 3 und 11. Der B-Ring bildet van der Waals Kontakte zu Met 343, Leu 346, Thr 347, Ala 350, Trp 383, Leu 384, Leu 387 und Leu 525 aus. Die Position der flexiblen Seitenkette wird ebenfalls durch van der Waals Kontakte zu Thr 347, Ala 350 und Trp 383 sowie eine „Salzbrücke“ zwischen der Dimethylamino-Gruppe von 4-OHT und der β -Carboxylatgruppe von Asp 351 stabilisiert. Durch die Position des A-Rings und der Seitenkette liegt die Ethylgruppe an C2 des 4-OHT fast in einem rechten Winkel zur Ethylgruppe des DES vor. Als Folge daraus ragt der C-Ring von 4-OHT tiefer in die Bindungstasche hinein, als der korrespondierende A'-Ring von DES. ^[115]

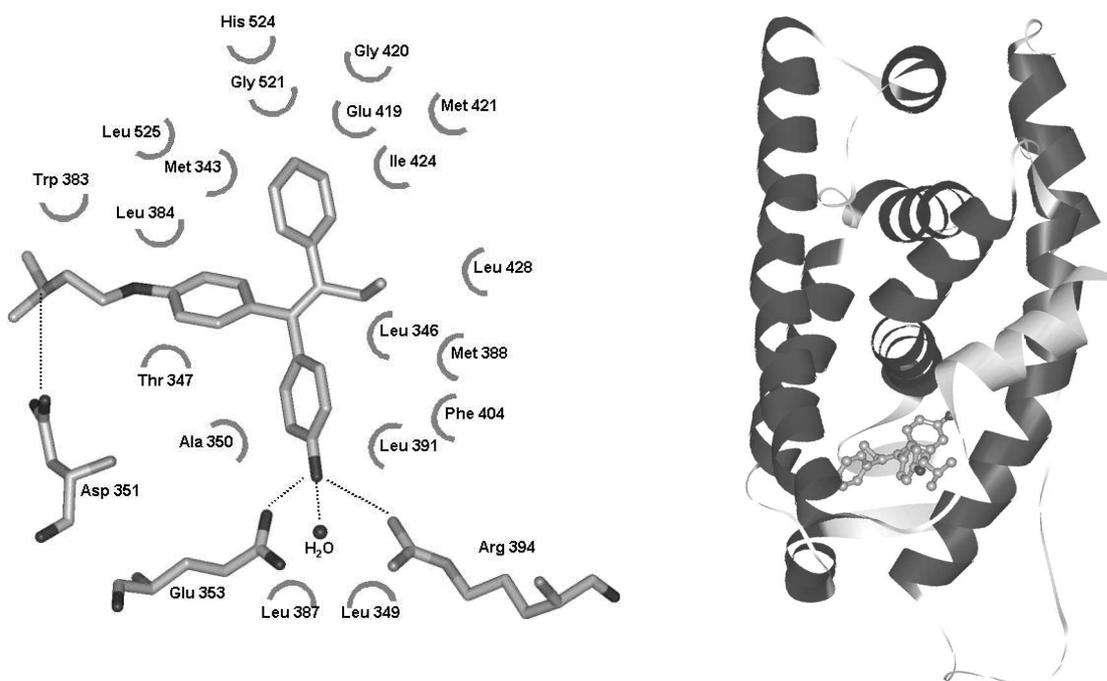


Abbildung 6.3 Wechselwirkungen von 4-OHT mit der LBD des ERα nach Shiau ^[115]; links: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und der van der Waals Kontakte; rechts: Nach Sekundärstruktur eingefärbtes ERα-Monomeres, Ansicht entlang der Dimerisierungsachse (dunkelgrau α-Helix, hellgrau im Hintergrund β-Faltblatt, hellgrau im Vordergrund: Helix 12)

Die Position des C-Rings von 4-OHT kann offensichtlich nicht auf dieselbe Art stabilisiert werden, wie die des korrespondierenden A'-Rings von DES oder des D-Rings von E2. Die Aminosäuren, die mit dem C-Ring in Wechselwirkung treten (Met 343, Leu 346, Met 421, Ile 424, Gly 521, His 524 und Leu 525) nehmen eine andere Konformation als im DES-Komplex ein. Die Ausrichtung des C-Rings hindert vor allem Met 421 daran, dieselbe Konformation wie im DES-Komplex einzunehmen. Dies führt dazu, dass auch die Position von Phe 404 und Phe 425 sich ändert. Die unterschiedlichen Konformationen der Seitenketten der Aminosäuren, die direkt mit dem C-Ring in Kontakt stehen und der Aminosäuren, die davon indirekt beeinflusst werden, bewirken, dass die Hauptkette der Bindungstasche eine unterschiedliche Konformation einnimmt.

Für die antiestrogene Wirkung in diesem Komplex ist die Dimethylaminoseitenkette des 4-OHT jedoch von größerer Bedeutung, wie Jordan et al. ^[256] durch Mutationsexperimente zeigen konnten. Durch ihr Volumen ^[257] und die Interaktion ihres Stickstoffs mit Asp 351 wird Helix 12 (Aminosäuren Leu 536 bis Leu 544) daran gehindert, sich wie ein Deckel über die Bindungshöhle zu legen, wie im Agonist-ERα-LBD-Komplex. Statt dessen bindet H 12 an die Koaktivatorbindungsstelle des ERα

und verhindert damit das Koaktivator-Recruitment. Dadurch wird die AF-2 auf zwei Arten beeinflusst. Helix 12 stellt einerseits selbst einen integralen Teil der AF-2-Oberfläche dar, so dass nach Bindung von Antagonisten die AF-2 unvollständig ist. Vor allem Leu 539, Glu 542 und Met 543 sind nicht korrekt für die Koaktivatorerkennung positioniert. Andererseits sind Aminosäuren, die zur AF-2 Oberfläche gehören, an Helix 12 gebunden und werden daran gehindert, mit Koaktivatoren zu interagieren.

Für eine dem 4-OHT vergleichbare Wirkung bedarf es der Verankerung des Liganden mit einer Hydroxygruppe durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu 353, Arg 394 und einem Molekül Wasser, sowie einer „Salzbrücke“ zwischen dem Stickstoff einer basischen Seitenkette und Asp 351. Von der Fähigkeit eines Liganden, die Ladung von Asp 351 abzuschirmen, hängt dessen partialagonistische Wirkung ab.

Zwar können die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen eine entsprechende Wasserstoffbrückenbindung eingehen, allerdings fehlt am B-Ring des Triarylalken-Grundgerüsts eine basische Seitenkette, die durch ihr Volumen und eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asp 351 die Helix 12 verschiebt. Somit ist der Wirkungsmechanismus des 4-OHT nicht vollständig geeignet, um die antagonistische Wirkung der untersuchten Verbindungen auf molekularer Ebene zu erklären.

6.1.3.2 „Reiner“ Antagonismus

Zu den „reinen“ Antagonisten gehören Verbindungen mit steroidalem Grundgerüst, wie RU 39 411, RU 58 668, ICI 182 780 (Faslodex) und ICI 164 384 (siehe Abbildung 6.4). Sie zeichnen sich durch äußerst lange Seitenketten an der 7 α - oder der 11 β -Position des E2-Grundgerüsts aus.

Proteolyse- und Peptidbindungsstudien deuten darauf hin, dass ICI 164 384 eine Rezeptorkonformation generiert, die sich von derjenigen, die durch SERM hervorgerufen wird, unterscheidet. ICI 164 384 beeinflusst außerdem die Rezeptordimerisierung^[258], das nukleozytoplasmatische Shuttling^[259] und den zellulären Turnover des ER^[260]. Die Röntgenkristallstruktur der mit ICI 164 384 kokristallisierten LBD des Ratten-ER β wurde 2001 von Pike und Mitarbeitern aufgeklärt^[118]. Der Ratten-ER β ist grundsätzlich analog zum humanen ER β aufgebaut, die dem menschlichen ER α entsprechenden Aminosäuren sind in Klammern aufgeführt.

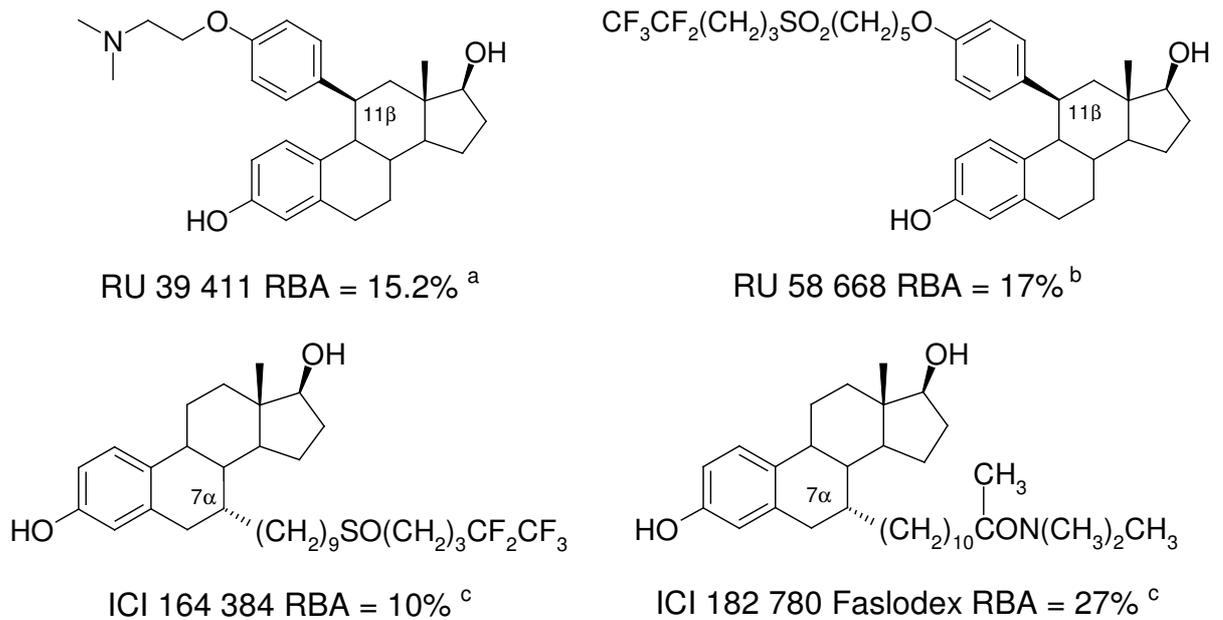


Abbildung 6.4 Strukturformeln „rein“ antagonistisch wirksamer Estradiolderivate; ^a nach Aliau ^[261], ^b nach van de Velde ^[262], ^c nach Gauthier ^[263]

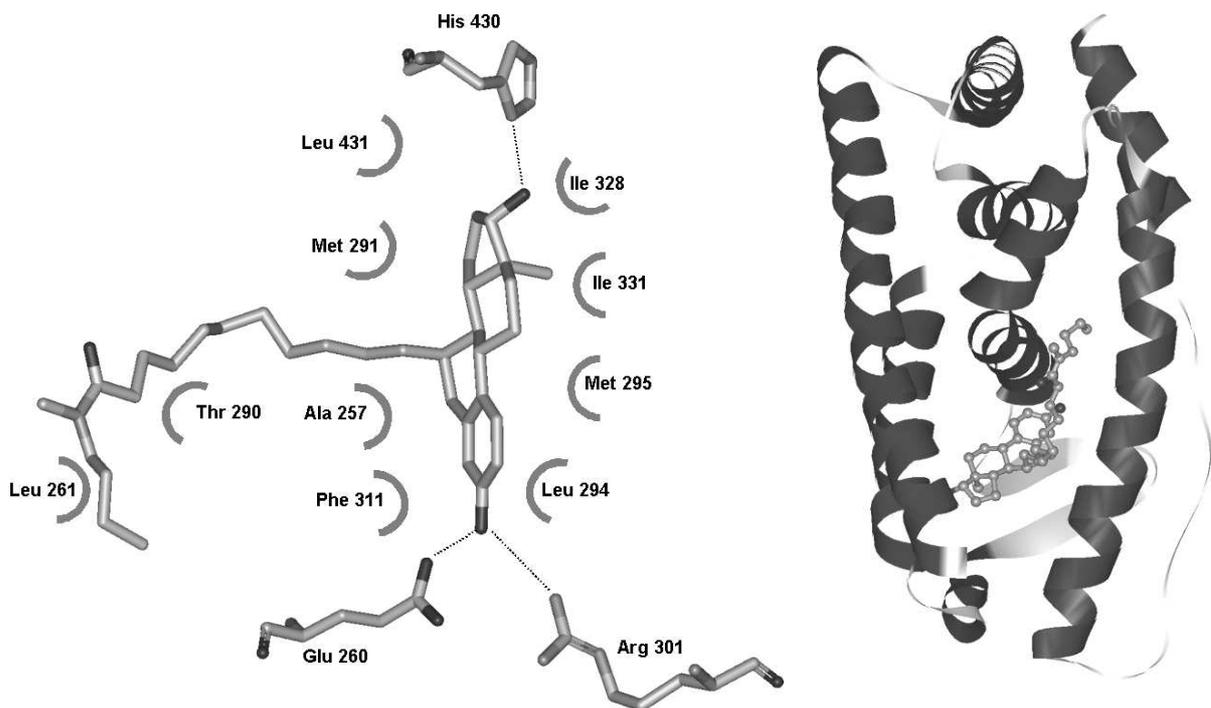


Abbildung 6.5 Wechselwirkungen der Ratten-ER β -LBD mit dem reinen Antagonisten ICI 164 384 nach Pike ^[118]; links: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Wechselwirkungen; rechts: Nach Sekundärstruktur eingefärbtes ER β -Monomeres, Ansicht entlang der Dimerisierungsachse (dunkelgrau: α -Helix, hellgrau: β -Faltblatt)

Die Größe und die Position der Seitenkette von ICI 164 384 rufen eine Rezeptorkonformation hervor, die sich durch die vollständige Destabilisierung der Helix 12 von

denen der anderen ER-Liganden unterscheidet. Folglich ist in der Abbildung 6.5 rechts Helix 12 nicht zu erkennen.

Die Orientierung von ICI 164 384 in der LBD wird von seinem 7α -Substituenten bestimmt. Vorangegangene Studien an der $ER\alpha$ -LBD haben einen engen Kanal identifiziert (11 β -Kanal), der die analogen raumfüllenden Seitenkettengruppen der SERM RAL und 4-OHT aufnimmt ^[45, 115]. Dieser Kanal ist auch im $ER\beta$ -Genistein-Komplex vorhanden, jedoch wird er durch Val 487 (Leu 536) verschlossen ^[264]. Der Kanal wird durch die Vergrößerung der vorgeformten hydrophoben Tasche auf der β -Seite der Höhle durch Verschieben von H 12 gebildet. Um den 7α -Substituenten von ICI 164 384 ähnlich wie bei den SERM in diesem 11 β -Kanal aufzunehmen, wird der hydrophobe Kern um 180° relativ zur Orientierung von E2 um seine Längsachse gedreht ^[45].

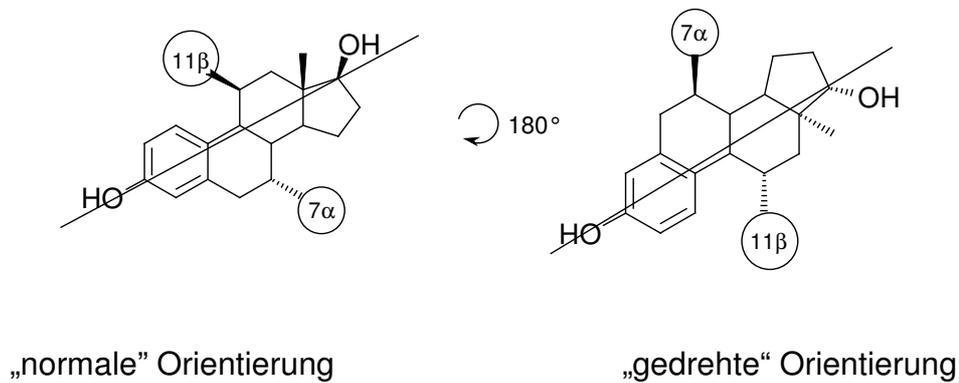


Abbildung 6.6 Mögliche Orientierung 7α - und 11β -substituierter E2-Derivate in der LBD des ER

Trotz dieser „gedrehten“ Orientierung des steroidalern Kerns bleiben die charakteristischen Wasserstoffbrückenbindungen unbeeinflusst. Der phenolische Wasserstoff des A-Rings interagiert mit dem Carboxylat von Glu 260 (Glu 353), einem konserviertem Wasser und der Guanidingruppe von Arg 301 (Arg 394). Die letzte Interaktion wird vermutlich durch die Verschiebung der Position des A-Rings geschwächt. Ähnlich behält die 17β -Hydroxygruppe ihre Interaktion mit His 430 (His 524) obwohl sie, verglichen mit dem unsubstituierten Hormon, auf der gegenüberliegenden Seite der Höhle liegt. Die Hauptkonsequenz des Bindungsmodus von ICI 164 384 ist eine Veränderung der van der Waals Kontakte des steroidalern Kerns mit der LBD und das Fehlen einer stabilen Orientierung von Helix 12. Analog zu den SERM behindert der weit aus der Ligandenbindungstasche herausragende 7α -Substituent von ICI 164 384 sterisch die Anordnung von Helix 12 über der Liganden-

bindungstasche. Zusätzlich bindet die terminale Amid-Funktion des Liganden selbst an eine Vertiefung in der Koaktivatorbindungsstelle von AF-2 und hindert damit Helix 12 an der Bindung, wie bei RAL oder 4-OHT^[118].

Obwohl durch die Röntgenkristallstruktur deutlich wird, wie AF-2 inhibiert wird, ist der Mechanismus der AF-1 Inhibierung noch unklar. Eventuell begünstigt ICI 164 384 die Bindung von Korepressoren, da Lys 269 (Lys 362), eine für die Bindung von Korepressoren erforderliche Aminosäure^[265], nicht durch Helix 12 verdeckt ist und somit fähig ist, Interaktionen einzugehen. Des weiteren könnte die freie Helix 12 in der Lage sein, die Funktion von AF-1 zu neutralisieren.

6.1.3.3 „Passiver“ Antagonismus

Erst kürzlich wurden die Röntgenkristallstrukturen der mit dem *R,R* Enantiomer von 5,11-*Cis*-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol (THC) kokristallisierten LBD von ER α und ER β veröffentlicht^[139]. THC verhält sich als Agonist an ER α und ist gegenüber ER β ein Antagonist^[266, 129]. Die Röntgenkristallstrukturen von OHT-ER α ^[115], RAL-ER α ^[45], Gen-ER β ^[264] und ICI 164 384-ER β ^[118] LBD-Komplexen zeigen, dass jeder dieser Antagonisten eine voluminöse Seitenkette besitzt, die keinen Platz in der Ligandenbindungstasche findet. Diese Seitenketten ragen aus der Ligandenbindungstasche durch eine Öffnung, die durch die Helices 3, 5 / 6 und 11 gebildet wird, heraus und hindern dadurch Helix 12 daran, die agonistgebundene Konformation einzunehmen.^[118] Während durch 4-OHT und RAL Helix 12 an die Koaktivatorbindungsstelle bindet und dort die NR-Box Interaktionen imitiert, bindet die Seitenkette von ICI 164 384 direkt an die Koaktivatorbindungsstelle von ER β , was zu einer vollständigen Destabilisierung der Helix 12 führt (siehe „reiner“ Antagonismus).

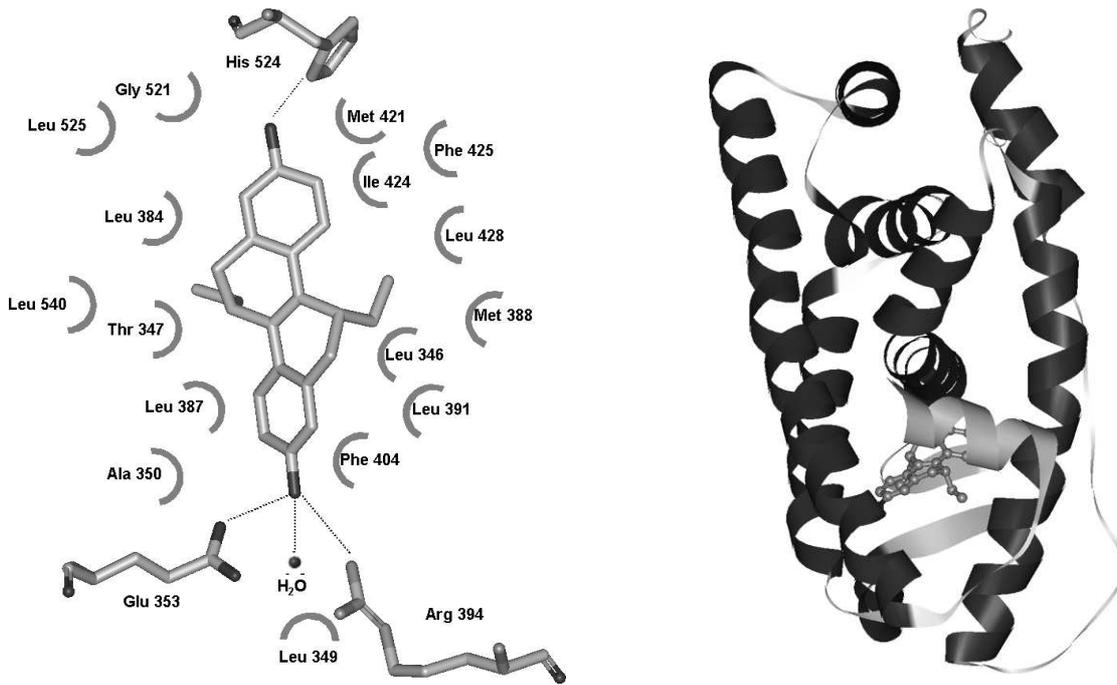


Abbildung 6.7 Wechselwirkungen der ER α -LBD mit THC nach Shiao ^[139]; links: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Wechselwirkungen; rechts: Nach Sekundärstruktur eingefärbtes ER α -Monomeres, Ansicht entlang der Dimerisierungsachse (dunkelgrau: α -Helix, hellgrau im Hintergrund: β -Faltblatt, hellgrau im Vordergrund: Helix 12)

Die Bindung von THC an ER α erfolgt analog der Bindung von E2 oder DES. Die Hydroxygruppe des A-Rings bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu 353, Arg 394 und einem Molekül Wasser aus. Die Hydroxygruppe des A'-Ring bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu His 524. Der A'-Ring bildet hydrophobe Kontakte zu Met 421, Ile 424, Gly 521 und Leu 525 aus. Helix 12 nimmt eine agonistgebundene Konformation ein.

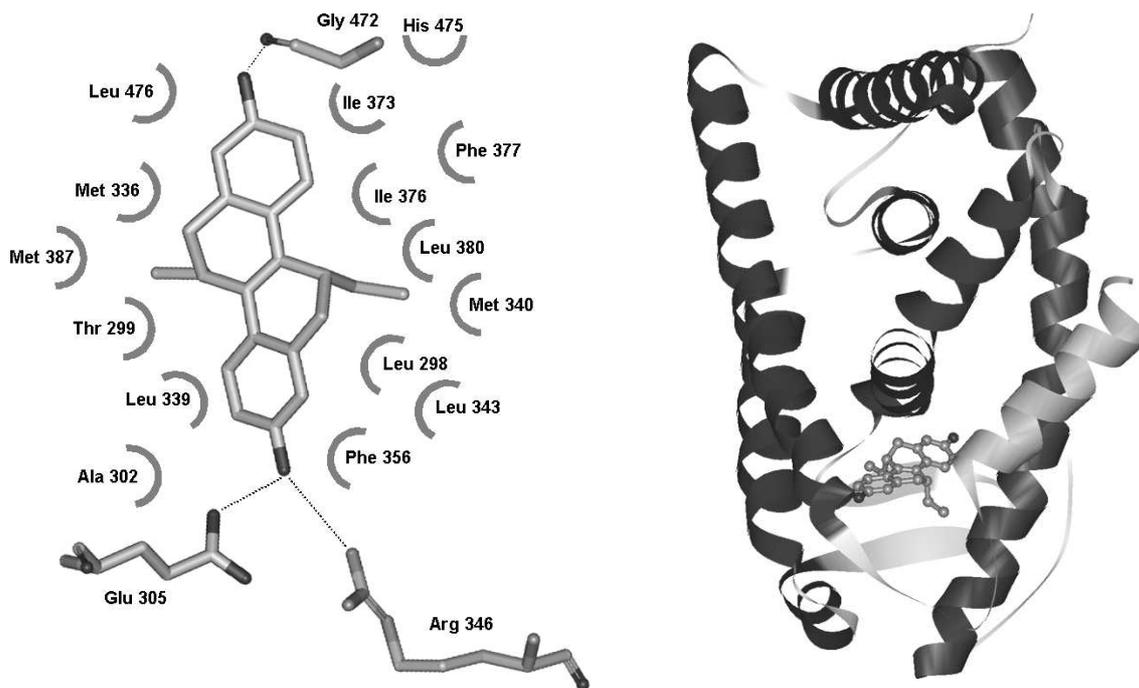


Abbildung 6.8 Wechselwirkungen der ERβ-LBD mit THC nach Shiau ^[139]; links: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Interaktionen; rechts: Nach Sekundärstruktur eingefärbtes ERα-Monomeres, Ansicht entlang der Dimerisierungsachse (dunkelgrau: α-Helix, hellgrau im Hintergrund: β-Faltblatt, hellgrau im Vordergrund: Helix 12)

Die Bindung von THC in der LBD des ERβ erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen der Hydroxygruppe am A-Ring zu Glu 305 (Glu 353) und Arg 346 (Arg 394), eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Molekül Wasser erfolgt nicht. Die Hydroxygruppe des A'-Rings bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu Gly 472 (Gly 521) statt zu His 475 (His 524) aus. Die Ethylgruppe am B-Ring nimmt eine ausge dehntere Konformation ein, was das Tetrahydrochrysenengerüst 5 Å in die Richtung des β-Kanals verschiebt. Obwohl die Bindung von THC an die ERβ-LBD in einer ähnlichen Weise, wie an die ERα-LBD erfolgt, ist es nicht in der Lage, die Interaktionen am A'-Ring analog zum ERα-Komplex zu stabilisieren, der um 0.7 Å verschoben ist. Dadurch sind die Seitenketten von His 475 und Leu 476 um 1.6 bzw. 2.3 Å weiter entfernt als ihre korrespondierenden His 524 und Leu 525 im ERα-Komplex. Als Resultat kann His 475 (His 524) nicht mit Met 479 (Met 528) in Kontakt treten. Folglich sind beide Leu 476 (Leu 525) und Met 479 (Met 528) nicht so positioniert, dass sie Wechselwirkungen mit den Resten von Helix 12 eingehen können, die die agonistgebundene Konformation der H 12 stabilisieren würden.

Als Resultat stabilisiert die Bindung von THC an die ERβ-LBD nicht die agonistgebundene Konformation von Helix 12. Allerdings bindet Helix 12 auch nicht, wie bei

4-OHT, an die Koaktivatorbindungsstelle, die durch die Helices 3, 4 und 5 generiert wird. Sie nimmt eine Orientierung ein, die am ehesten der im Genistein-ER β -Komplex ähnelt (siehe Abbildung 6.9) ^[264]. In beiden Komplexen wird Helix 12 durch hydrophobe Kontakte, die durch Val 487, Leu 491, Met 494 und Leu 495 mit dem Rest der LBD gebildet werden, stabilisiert ^[264]. In diesem Komplex ist Helix 12 so über der Ligandenbindungstasche angeordnet, dass sie die Koaktivatorbindungsstelle nur teilweise verschließt.

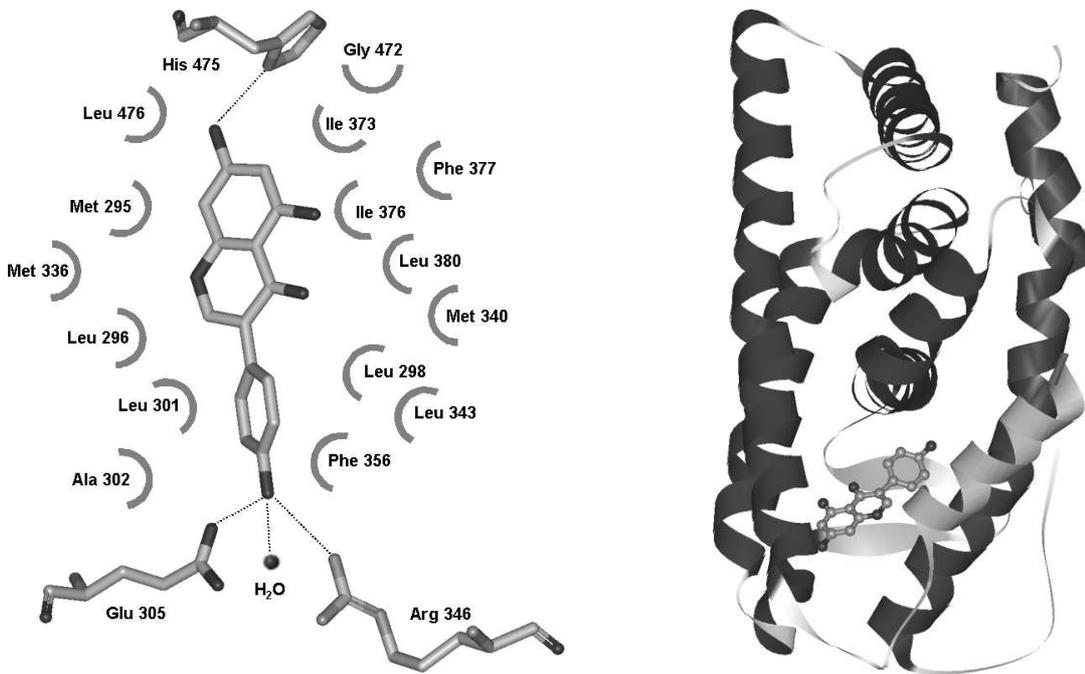


Abbildung 6.9 Wechselwirkungen der ER β -LBD mit Genistein nach Pike ^[264]; links: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Interaktionen; rechts: Nach Sekundärstruktur eingefärbtes ER α -Monomeres, Ansicht entlang der Dimerisierungsachse (dunkelgrau: α -Helix, hellgrau im Hintergrund: β -Faltblatt, hellgrau im Vordergrund: Helix 12)

Zwei Reste in der Ligandenbindungstasche, die sich bei beiden Subtypen unterscheiden, könnten die antagonistische Wirkung an ER β erklären. Met 336 und Ile 373 in ER β (Äquivalente von Leu 384 und Met 421) sind auf gegenüberliegenden Seiten des THC positioniert. Durch Modeling Studien wurde festgestellt, dass der THC A'-Ring 2.4 Å tiefer in die ER β -Bindungstasche hereinragen müsste, um mit diesen Aminosäuren zu interagieren und als Resultat His 475 und Leu 476 in produktiven Konformationen zu stabilisieren. Diese tiefere Position ist äußerst ungünstig, da sterische Zusammenstöße zwischen der Ethylgruppe am B'-Ring und der Seitenkette von Leu 298 am Boden der Bindungstasche verursachen würde. Um diese sterischen Zusammenstöße zu vermeiden, wird angenommen, dass THC in der in

der Kristallstruktur gefundenen Weise bindet. Passend hierzu reagiert das weniger sterisch gehinderte Dimethyl-THC als partieller ER β -Agonist ^[266].

Für die agonistische bzw. antagonistische Wirkung einer Verbindung scheinen also die Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Met 421, Ile 424 Gly 521 His 524 und Leu 525 (ER α) bzw. Ile 373, Ile 376, Gly 472, His 475 und Leu 476 (ER β) entscheidend zu sein.

6.1.4 Triaryllalkene ohne basische Seitenkette - passive Antagonisten ?

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Triaryllalkene weisen eine sehr starke strukturelle Ähnlichkeit zu 4-OHT auf. Der Hauptunterschied besteht darin, dass sie nicht über eine basische Seitenkette am B-Ring verfügen. Aufgrund ihrer sonstigen strukturellen Ähnlichkeit kann davon ausgegangen werden, dass sie sich ähnlich wie 4-OHT in die LBD des ER α einlagern und dort vergleichbare Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Interaktionen eingehen können.

Die phenolische Hydroxygruppe am A-Ring der Verbindungen könnte eine Wasserstoffbrückenbindung zu Glu 353, Asp 394 und einem Molekül Wasser eingehen. Die Hydroxygruppe am B-Ring könnte eine Wechselwirkung mit Asp 351 eingehen, obwohl der Abstand zwischen der Hydroxygruppe und Asp 351 relativ groß erscheint. Die mögliche Einlagerung von **13c** (BisOHET) in die LBD des ER α ist in Abbildung 6.10 (links) dargestellt. In Struktur-Wirkungsuntersuchungen konnte Keilitz eine vergleichbare Orientierung für den 1,2-Diarylethan / ethen - Rest in 2,3-Diarylpiperazinen, 4,5-Diarylimidazolinen und 4,5-Diarylimidazolen zeigen. ^[267] Die Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Interaktionen des (2*R*/3*S*)/ (2*S*/3*R*)-2-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-3-(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)piperazins sind in Abbildung 6.10 (rechts) ^[267] schematisch dargestellt.

gewiesen werden. Dies lässt schließen, dass durch ein THC analoges Verhalten der Triarylalkene in der LBD des ER die antagonistische Wirkung auf molekularer Ebene vermittelt werden kann. Die antiestrogene Wirkung wird durch die Einführung einer Hydroxygruppe am C-Ring leicht gesteigert. Diese kann analog zu RAL, E2 oder DES eine Wasserstoffbrückenbindung zu His 524 ausbilden. Auch der RBA-Wert kann dadurch gesteigert werden. Die Einführung von Fluor in das Triarylalken-Grundgerüst führt zu einer Verschiebung des Wirkoptimums zur Propylsubstitution, was eventuell durch die leicht partialagonistische Wirkung des Ethylderivats begründet ist.

Die Bedeutung der van der Waals Kontakte wird dadurch untermauert, dass Verbindungen mit hydrophilen Substituenten (CN, NH₂, etc) an der C2-Seitenkette im Verhältnis zu ihren korrespondierenden alkylsubstituierten Verbindungen einen deutlichen Wirkungsverlust aufweisen.

Die wirksamsten Verbindungen **13c** BisOHEt und **14c** TrisOHEt wurden von Busch ^[268] auf ihre Wirkung an ER α und ER β in einem Transkriptionsaktivierungsassay untersucht. Im Gegensatz zu THC zeigen **13c** und **14c** keine rezep-torsubtyp-spezifische Wirkung, sondern wirken an beiden ER-Subtypen als Antagonist.

6.1.5 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

Die zytotoxische Wirkung von TAM und 4-OHT an MCF-7-Zellen liegt in einer Konzentration von 5 μ M bei T/C_{korrr} = 12% / 27%. Auch auf MDA-MB-231-Zellen üben TAM und 4-OHT einen deutlichen proliferationshemmenden Einfluss aus.

Einen Hinweis auf die zytotoxische Wirkung in höheren Konzentrationen gibt auch das Ergebnis des Luciferase-Assays. Die Zellzahl ist nach einer 48-stündigen Inkubation in einem Konzentrationsbereich von 10⁻⁹ M - 10⁻⁵ M geringer als die Zellzahl bei den unbehandelten Kulturen. Auch Bursch et al. ^[234] untersuchten den Einfluss von TAM und 4-OHT auf MCF-7-Zellen. In einer Konzentration von 10 μ M verursachen TAM und 4-OHT schon nach 24 h Zelllyse, die auch durch E2-Gabe nicht aufgehoben werden kann. In geringeren Konzentrationen setzt der Zelltod erst nach drei Tagen ein und kann auch durch E2-Gabe wieder aufgehoben werden. Yao et al. ^[269] ermittelten die zytotoxische Wirkung von TAM, 4-OHT und Droloxifen an MDA-MB-231- und an S30-Zellen (mit ER α transfizierte MDA-MB-231-Zellen) und kamen zu dem Ergebnis, dass nach 18-stündiger Inkubation der Zellen mit den

Substanzen bei TAM eine Konzentration von 34 μM (23 μM) notwendig ist, um die Hälfte aller Zellen abzutöten. Bei 4-OHT genügen 29 μM (19 μM) und bei Droloxifen benötigt man 23 μM bzw. 32 μM um die Hälfte aller Zellen nach 18 h abzutöten.

Die zytotoxische Wirkung wird vermutlich auf eine ähnliche Weise vermittelt wie die bekannte kanzerogene Wirkung von TAM, wodurch der Mechanismus, der zur Karzinogenese führt, von Interesse ist.

Bei Brustkrebspatientinnen, die mit TAM behandelt wurden, wurde ein um den Faktor 3 erhöhtes Endometriumkarzinomrisiko festgestellt.^[270, 271, 272] Auch stellt TAM im Tierexperiment ein potentes Hepatokarzinogen dar^[273, 274, 275]. Eine solche karzinogene Wirkung wird in der Regel durch Interaktionen mit DNA ausgelöst. Tatsächlich wurden in Lebern von Nagern Tamoxifen-DNA-Addukte nachgewiesen, die eine Ursache für Krebs darstellen können. In Leberkarzinomen, die durch Tamoxifenbehandlung ausgelöst wurden, konnte außerdem eine hohe Anzahl von *p53* Mutationen festgestellt werden, was auch auf eine kanzerogene Wirkung hindeutet.^[276] TAM wird in der Leber vor allem zu 4-OHT, N-Desmethyltamoxifen und Tamoxifen-N-Oxid^[277] metabolisiert, dabei ist die Hydroxylierung der wichtigste Schritt in der Phase I des Metabolismus. Des weiteren wurde α -Hydroxytamoxifen als Metabolit im Plasma von tamoxifenbehandelten Brustkrebspatientinnen^[278] und Ratten identifiziert^[279] (siehe Abbildung 6.11).

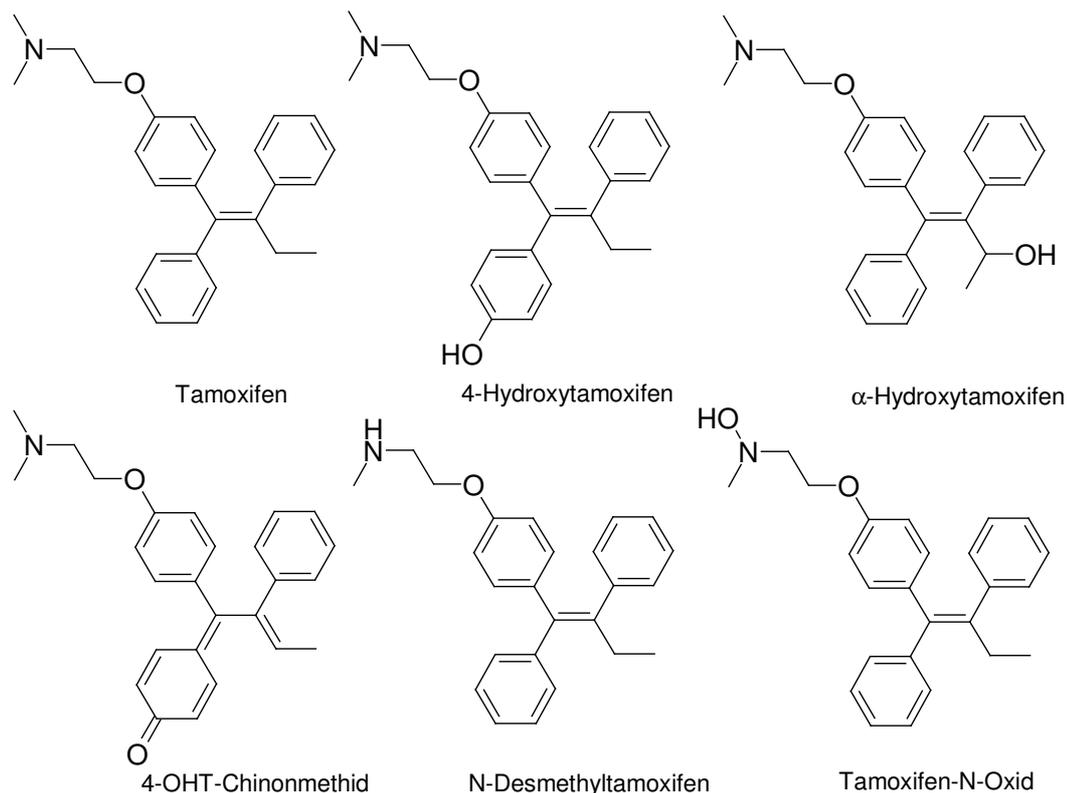


Abbildung 6.11 TAM und seine Metaboliten

Allerdings besitzt α -Hydroxytamoxifen *in vitro* nur eine geringe DNA-Aktivität. Möglicherweise wird die α -Hydroxygruppe sulfoniert, um dann mit DNA zu reagieren^[280, 284], wie es für synthetisches α -Sulfattamoxifen und α -Acetoxytamoxifen gezeigt werden konnte.^[281]

Es wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, um die TAM-DNA-Adduktbildung zu erklären^[286]. Oxidative Spezies wie 4-OHT-Chinon-Methid könnten die Reaktion mit DNA fördern^[282]. Tamoxifen-1,2-epoxid, eine andere oxidative Spezies, wurde ebenfalls schon als mit DNA reagierend beschrieben^[283], später wurden diese Ergebnisse jedoch von derselben Arbeitsgruppe revidiert^[284]. Andererseits kann α -Hydroxylierung von Tamoxifen und seiner Metaboliten 4-OHT, Tamoxifen-N-Oxid und N-Desmethyltamoxifen, auch eine Möglichkeit sein, DNA-Addukte mit Nucleosiden zu bilden^[285, 278, 279]. Potter et al.^[286] schlugen einen Mechanismus der Tamoxifenaktivierung durch Cytochrom P450 über ein reaktives Carbokation vor, der im Folgenden abgebildet ist:

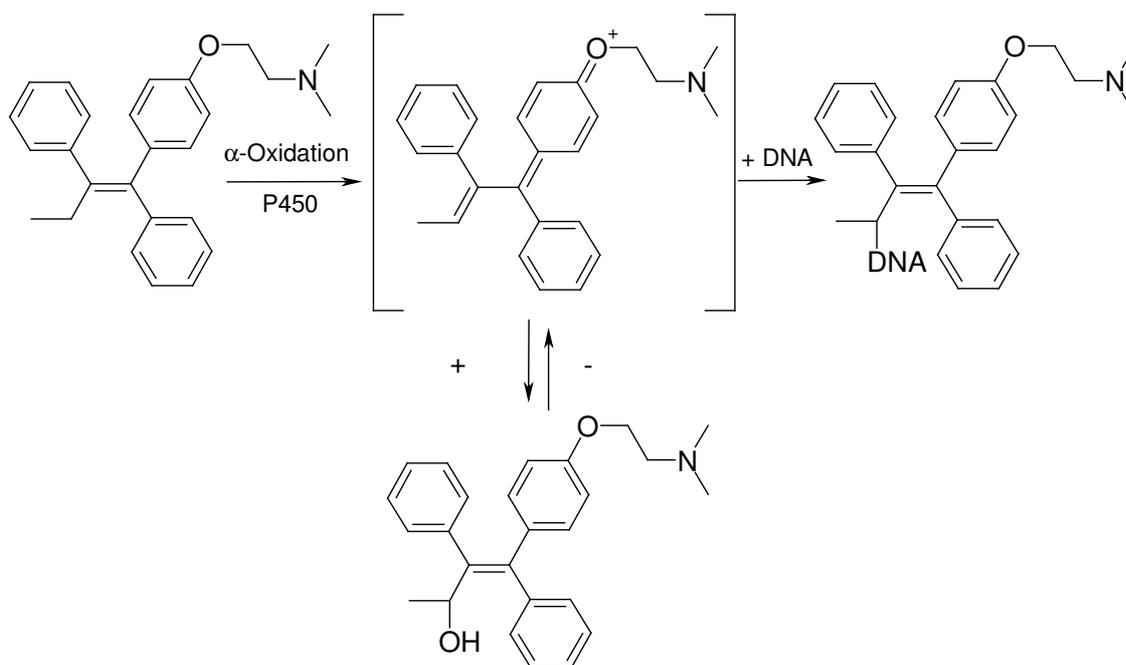


Abbildung 6.12 Mechanismus der Tamoxifen-DNA-Adduktbildung nach Potter ^[286]

Für die meisten in dieser Arbeit synthetisierten Verbindung sollte eine ähnliche Aktivierung möglich sein. Trotzdem lassen sich in den Zytotoxizitätstests der hydroxylierten Triarylalken-Derivate keine nennenswerten Einflüsse auf das Wachstum von MCF-7-Zellen feststellen. Vermutlich trägt die Seitenkette des TAM zur Stabilisierung der positiven Ladung bei. Da die in dieser Arbeit präsentierten Verbindungen nicht über eine solche Seitenkette verfügen, sinkt auch die zytotoxische Wirkung.

Es ist weiterhin nicht verwunderlich, dass die zytotoxische Wirkung der Methylether im Verhältnis zu den Phenolen steigt, da die Stabilität des intermediär auftretenden Karbokations (siehe Abbildung 6.12) durch die Methylierung der OH-Gruppe gesteigert werden kann.

Die O-Methylether der Amine (**10j** und **11j**) sind jeweils die am stärksten zytotoxischen Verbindungen. Eventuell können sie über ihre Aminofunktion, ohne vorher aktiviert zu werden, mit der DNA wechselwirken.

Interessanterweise lassen sich die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests nicht mit den Ergebnissen der Rezeptorbindungstests und der Luciferase-Assays korrelieren. Die potentesten Verbindungen im Zytotoxizitätstest, die beiden Amine **10j** und **11j** besitzen geringe RBA-Werte (0.05% und 0.01%) und sind nur in geringem Ausmaß in der Lage eine E2-induzierte Luciferase-Aktivierung zu inhibieren (67.7% und 73.3% Aktivierung bei 1 μ M). Dies lässt vermuten, dass die zytotoxische Wirkung dieser

Verbindungen nicht über einen estrogenabhängigen Mechanismus vermittelt wird. Um weitere Informationen darüber zu erhalten, inwiefern die zytotoxische Wirkung durch den ER vermittelt wird, wurden die wirksamsten Verbindungen an der ER-negativen MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie auf Proliferationshemmung untersucht. Auch an dieser Zelllinie wirkt TrisOMePrNH₂ **11j** in 5 µM und 10 µM zytozid, BisOMePrNH₂ **10j** dahingegen entfaltet nur eine starke antiproliferative Wirkung (T/C 26%) in der höchsten Konzentration. Somit scheint die zytotoxische Wirkung der Verbindung TrisOMePrNH₂ **11j** nicht ER-abhängig zu sein. Interessant wäre sicherlich eine weitere Untersuchung der Proliferationshemmung an weiteren Krebs-Zelllinien und gesunden Gewebezellen, um Rückschlüsse auf die Tumorselektivität zu erhalten.

6.1.6 Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Verbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Triarylalkene synthetisiert und die Auswirkung der Markierung auf die ER-Bindung untersucht. Für E2 konnten in zahlreichen Struktur-Wirkungs-Untersuchungen drei Positionen, 7α, 11β und 17α, identifiziert werden, an denen Modifikationen nur einen geringen Einfluss auf die Rezeptorbindung haben ^[287, 254]. Vor allem Modifikationen an 7α und 11β durch hydrophobe Substituenten werden gut vom ER toleriert ^[192]. Diese könnten sich in den 11β-Kanal einlagern und so die Ligandenbindungstasche verlassen, wie schon in Abschnitt 6.1.3.2 für ICI 164 384 beschrieben.

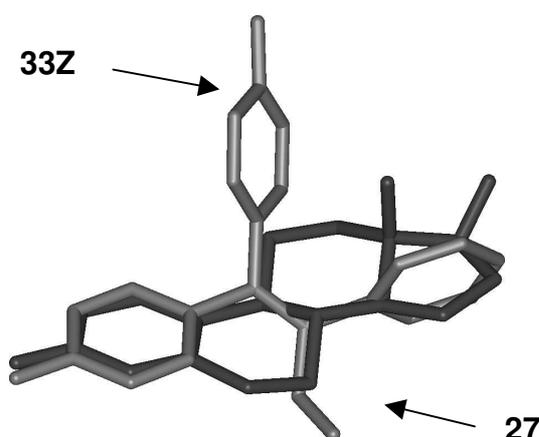


Abbildung 6.13 Überlagerung des Triarylalken-Grundgerüsts mit E2 (dunkel) am Beispiel von 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylbuten (hell); die zur Fluoreszenzmarkierung ausgewählte Positionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Analog zu Substituenten an der 11 β -Position in E2 der A-Ring des Triarylalken-Grundgerüsts (vgl. Abbildung 6.13). An seiner 4-Position wurde folglich eine Fluoreszenzmarkierung durchgeführt, was zu **33Z** (1OHeRho) führte. Relativ ähnlich zu Substituenten an der 7 α -Position könnten sich Substituenten an der C2-Alkylkette verhalten, weshalb auch diese Position für eine Fluoreszenzmarkierung ausgewählt wurde, was zu **27** (TrisOHPrNHRho) führte. Die erhaltenen Verbindungen wurden analog ihren unmarkierten Ausgangsverbindungen **29Z** (1OHEt) und **14h** (TrisOH-PrNH₂) auf ihre Rezeptoraffinität und ihre agonistische bzw. antagonistische Wirkung untersucht. Wiesen die unmarkierten Edukte noch RBA-Werte von 0.24% (**14h**) bzw. 1.9% (**29Z**) auf, waren die RBA-Werte nach Markierung deutlich geringer mit 0.04% (**27**) bzw. 0.02% (**33Z**).

Der Verlust der Rezeptoraffinität von **29Z** (1OHEt) zu **33Z** (1OHeRho) lässt sich dadurch erklären, dass keine Hydroxygruppe zur Verfügung steht, die mit den Aminosäuren Glu 353 und Arg 394 des ER in Wechselwirkung treten kann. Eine höhere Rezeptoraffinität wäre zu erwarten, wenn zusätzlich zu der Fluoreszenzmarkierung am A-Ring des Triarylalken-Grundgerüsts eine Hydroxygruppe analog zu 4-OHT vorhanden wäre, die zu der oben beschriebenen Interaktion fähig wäre. Weiterhin scheint der 11 β -Kanal hydrophobe Substituenten besser aufzunehmen als hydrophile, eventuell ist auch der Abstand zwischen dem Triarylalken-Kern und dem Rhodamin zu kurz, wie das auch für ein E2-Porphyrin-Konjugat vermutet wird, bei dem der Porphyrinrest über einen C₈-Spacer in 11 β -Position in das Molekül eingeführt wurde und das eine starke Abnahme der Rezeptoraffinität nach Konjugation aufwies (IC₅₀ E2 = 1 nM, IC₅₀ Konjugat = 274 nM) ^[192].

Die analog der 7 α -Position im E2 an der C2-Seitenkette substituierte Verbindung **27** (TrisOHPrNHRho) besitzt einen im Verhältnis zu **33Z** doppelt so hohen RBA-Wert mit 0.04%, allerdings ist die Rezeptoraffinität verglichen mit anderen Verbindungen immer noch sehr gering. Aufgrund der freien Hydroxygruppen würde eigentlich ein höherer RBA-Wert zu erwarten sein, da eine Interaktion mit den Aminosäuren Glu 353 und Arg 394, sowie mit His 524 bei dieser Verbindung möglich sein sollte. Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, spielt für die Rezeptoraffinität ebenfalls die Länge und Art der Seitenkette an C2 eine wichtige Rolle. Größere Substituenten oder längere Seitenketten an C2 toleriert der Rezeptor nicht so gut, weshalb trotz der freien Hydroxygruppen nur ein RBA-Wert von 0.04% zustande kommt. Würde man sich eine Drehung um 180° um die Längsachse vorstellen (vgl. auch Abbildung 6.14),

wie es für das an 7α substituierte E2-Derivat ICI 164 384 (vgl. auch Abbildung 6.6) beschrieben wurde, könnte sich die Seitenkette ebenfalls in den 11β -Kanal einlagern.

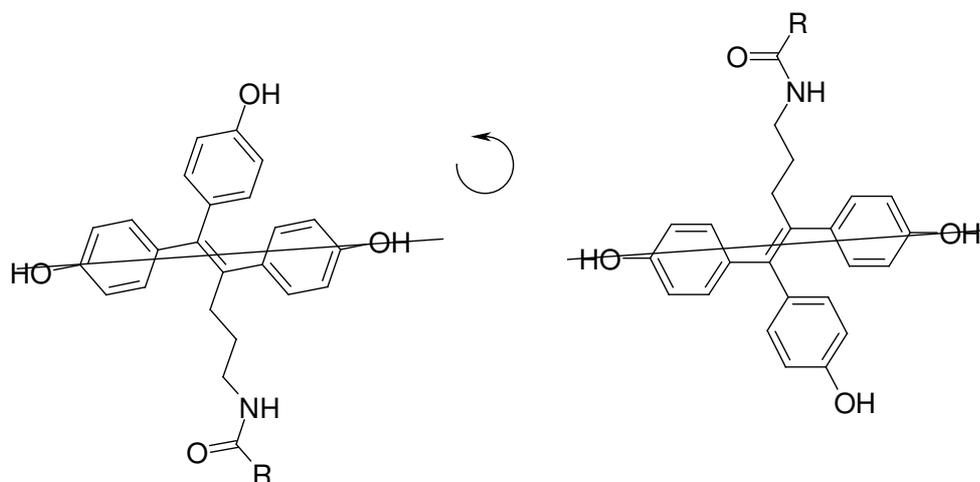


Abbildung 6.14 Potentielle Drehung von **27**

Wie oben beschrieben werden jedoch hydrophile Substituenten nicht optimal von diesem Kanal stabilisiert, so dass ein lipophilerer Spacer ohne Amidfunktion zu einem höheren RBA-Wert beitragen könnte. Der nicht ganz so voluminöse A-Ring des Triarylalkens würde sich an der zuvor von der Seitenkette eingenommenen Position einlagern. Da auch der A-Ring durch seine phenolische OH-Gruppe hydrophile Wechselwirkungen mit der LBD des ER eingehen kann, wird er ebenfalls nicht optimal stabilisiert werden. Korrelierend mit der geringen Rezeptoraffinität weisen die fluoreszenzmarkierten Verbindungen **33Z** und **27** nur eine geringe agonistische und antagonistische Wirkung auf.

Zur Steigerung der Rezeptoraffinität der fluoreszenzmarkierten Verbindungen könnte sicherlich der Einbau von längeren lipophilen Spacern analog ICI 164 384 und ICI 182 780 (siehe Abbildung 6.4) beitragen. Ferner wäre es von Interesse, ausgehend von **33Z** Verbindungen zu synthetisieren, die analog zu 4-OHT über eine freie OH-Gruppe am A-Ring des Triarylalken-Grundgerüsts verfügen.

