

**Evaluierung von Inhibitoren
der 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen
mittels enzymkinetischer und zellulärer Methoden**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Ruth Werth-Brill
Saarbrücken
2012

Diese Arbeit entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. R. W. Hartmann in der Fachrichtung 8.2 Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes von Januar 2007 bis Juni 2011.

Tag des Kolloquiums: 25.05.2012

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm F. Maier

Berichtersteller: Prof. Dr. Rolf W. Hartmann
Prof. Dr. Dr. Hans H. Maurer

Vorsitz: Prof. Dr. Uli Kazmaier

Akad. Mitarbeiter: Dr. Jessica Hoppstädter

Der sicherste Weg zum Erfolg besteht darin,
immer wieder einen neuen Versuch zu wagen.

Thomas A. Edison

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Estrogene - Physiologie	1
1.1 Biosynthese	2
1.2 Endokrine und intrakrine Regulation der Estrogensynthese	4
1.3 Vermittlung der Estrogeneffekte	5
2 Pathophysiologie der Estrogene	7
2.1 Estrogenabhängige Erkrankungen	7
2.2 Die Therapie estrogenabhängiger Erkrankungen	10
2.3 Estrogenmangelerkrankungen	12
3 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenasen	20
3.1 17 β -HSD1	23
3.2 17 β -HSD2	32
Ziel der Arbeit	36
Ergebnisse	38
4 Die Etablierung eines zellulären Assays zur Evaluierung von 17β-HSD1-Hemmstoffen	38
4.1 Ausgangspunkt	38
4.2 Voruntersuchungen	38
4.3 Optimierung des Assays im 24-well Format	40
4.4 Untersuchung des 17 β -HSD2 katalysierten E2-Umsatzes	45
4.5 Optimierung der Inkubationszeit nach Wechsel der FKS-Charge	45
4.6 Einführung einer Referenzverbindung	46
4.7 Testung neuer nichtsteroidaler 17 β -HSD1-Hemmstoffe	48
5 Die Cokristallisation von nichtsteroidalen Inhibitoren mit 17β-HSD1	64
5.1 Enzympräparation aus humaner Plazenta	65
5.2 Aufreinigung von 17 β -HSD1 durch Proteinchromatographie	66
5.3 Kristallisation	69
5.4 Röntgenstrukturanalyse	71

6	Kinetic studies on 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (17β-HSD2), a new target for the treatment of osteoporosis, using potent nonsteroidal inhibitors	72
6.1	Abstract	72
6.2	Introduction	72
6.3	Materials and Methods	75
6.4	Results	78
6.5	Discussion	85
7	SV-HFO Zellen als Modellsystem zur Untersuchung von 17β-HSD2-Hemmstoffen	88
7.1	Die Inhibition von 17 β -HSD2 in SV-HFO Zellen	89
7.2	Evaluierung von SV-HFO Zellen auf ihre Eignung für eine Proof of concept Studie	96
	Diskussion	101
8	Die Etablierung eines zellulären Testsystems zur Evaluierung von 17β-HSD1-Inhibitoren	101
8.1	Vergleichende Beurteilung der Ergebnisse des zellulären Assays	101
8.2	Mögliche Ursachen für die Abweichungen zwischen zellfreien und zellulären Hemmdaten	103
8.3	Rolle des zellulären Assays im Screening-System	105
8.4	Literaturbeschriebene zelluläre Assays zur Evaluierung von 17 β -HSD1-Inhibitoren	107
8.5	Ausblick: Zellkulturmodell für Endometriose	108
9	17β-HSD2-Hemmstoffe: Verschiedene Inhibitionsmechanismen vor dem Hintergrund struktureller Informationen	109
10	Etablierung eines zellulären Testsystems zur Untersuchung von 17β-HSD2-Hemmstoffen	113
10.1	Die Auswahl einer geeigneten Zelllinie zur Evaluierung von 17 β -HSD2-Inhibitoren für die Behandlung von Osteoporose	113
10.2	SV-HFO Zellen als Testsystem für 17 β -HSD2-Inhibitoren	115
10.3	Die Eignung von SV-HFO Zellen für ein <i>in vitro</i> Proof of concept	116
10.4	Diskussion der möglichen Ursachen für die fehlende E2-Stimulierbarkeit der SV-HFO Zellen	117
10.5	Screeningsystem für 17 β -HSD2-Inhibitoren	117
10.6	Ausblick	118

Zusammenfassung	121
Summary	122
Material und Methoden	123
11 Material	123
11.1 Reagenzien	123
11.2 Medien und Puffer	124
12 Methoden	130
12.1 Kultivierung von T47D Zellen	130
12.2 Kultivierung von SV-HFO Zellen	130
12.3 Testverfahren T47D Zellen	131
12.4 Testverfahren SV-HFO Zellen	133
12.5 Proteinaufreinigung	137
12.6 Kristallisation	144
Abkürzungsverzeichnis	146
Literaturverzeichnis	148

Einleitung

Hormone bilden die molekulare Grundlage für die Kommunikation zwischen Zellen. Sie überbringen Informationen über den Zustand eines Organs zu anderen und wirken so regulierend in der Homöostase des Körpers. Die Hormone lassen sich einteilen in Peptidhormone (z.B. Oxytocin, Insulin), Aminosäurederivate (Thyroxin, Catecholamine) und Steroidhormone. Die Steroidhormone lassen sich wiederum in fünf Klassen aufteilen: Mineralocorticoide, Glucocorticoide, Androgene, Gestagene und Estrogene. Steroidhormone beeinflussen somit zentrale Funktionen im menschlichen Körper wie den Mineral- und Wasserhaushalt (Mineralocorticoide), die Gluconeogenese (Glucocorticoide) und die Sexualfunktionen (Androgene, Gestagene und Estrogene). Klassischerweise bezeichnet man Androgene als männliche Sexualhormone, während die Gestagene und Estrogene zu den weiblichen Sexualhormonen zusammengefasst werden.

1 Estrogene - Physiologie

Das wichtigste Estrogen im Körper ist Estradiol (E2). Weitere Estrogene sind Estron (E1) und Estriol, die jedoch weniger potent sind. Estrogene entfalten ihre Wirkung als Wachstumshormone hauptsächlich an den Geschlechtsorganen. Dabei beeinflussen sie die Entwicklung und Reifung und spielen eine wichtige Rolle in der Funktion des reproduktiven Systems [2]. Daneben beeinflussen sie auch andere Organe und Gewebe. So sind sie beteiligt an der Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale, wie z.B. dem Brustwachstum, der Körperbehaarung und dem Fettverteilungsmuster [3]. Auch Stoffwechselfvorgänge im Knochen und in der Leber, die Synthese von Gerinnungsfaktoren und von Transport- und Lipoproteinen unterliegen der Regulation durch Estrogene. Weitere Zielorgane der Estrogene sind die Haut, Talgdrüsen und Haarfollikel sowie die ableitenden Harnwege [4]. Im Zentralnervensystem wirken sie im Bereich des Hypothalamus-Hypophysen-Systems in der Beeinflussung des neuroendokrinen Regelkreises zur Aufrechterhaltung des Menstruationszyklus [5]. Daneben werden den Estrogenen auch psychotrope Effekte zugeschrieben. Im Bereich des kardiovaskulären Systems wird die vasodilatorische Wirkung der Estrogene beobachtet.

1.1 Biosynthese

Die Biosynthese der Sexualhormone geht aus von Cholesterol, das durch das Zusammenspiel von CYP-Enzymen und Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSD) modifiziert wird (Abbildung 1). Cholesterol wird mit der Nahrung aufgenommen oder intrazellulär aus AcetylCoA synthetisiert. Durch die Abspaltung der Seitenkette zwischen C20 und C22 durch CYP11A1 entsteht Pregnenolon. Pregnenolon hat eine Doppelbindung zwischen C5 und C6 und zählt daher zu den Δ^5 -Steroiden, die nur wenig bis keine biologische Aktivität aufweisen. Δ^5 -Steroide können durch 3β -HSD, die als 3β -Reduktase und Δ^5 -4 Isomerase wirkt, in die biologisch aktiven Δ^4 -Steroide überführt werden. Dadurch entsteht aus Pregnenolon Progesteron. Die Synthese der Sexualsteroiden kann sowohl über den Δ^5 - als auch über den Δ^4 -Weg erfolgen. CYP17 katalysiert die Hydroxylierung zu 17α -Hydroxypregnenolon und 17α -Hydroxyprogesteron und ist außerdem verantwortlich für die Lyasereaktion zwischen C17 und C20, die zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion führt. DHEA kann durch 3β -HSD zu Androstendion umgewandelt werden, aus dem mittels Aromatisierung durch CYP19 Estron gebildet wird. Das schwach wirksame Estrogen Estron kann durch die 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (17β -HSD1) in das hoch potente Estradiol (E2) umgewandelt werden. Ein weiterer Weg zur Bildung von E2 führt über die Reduktion von Androstendion durch 17β -HSD3 zu Testosteron, welches dann weiter durch CYP19 zu E2 aromatisiert wird [6].

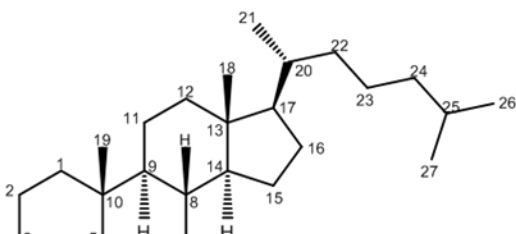


Abbildung 1 Biosynthese der Sexualhormone

1.2 Endokrine und intrakrine Regulation der Estrogensynthese

Prämenopausal unterliegt die Synthese der weiblichen Sexualhormone der strengen Regulation durch das hypothalamisch-hypophysäre System. Im Hypothalamus wird Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) ausgeschüttet, das in der Hypophyse die Produktion und Sekretion der Gonadotropine Lutropin (LH) und Follitropin (FSH) auslöst. LH bindet im Ovar an die LH-Rezeptoren der Stromazellen und der Thekazellschicht der Follikel und führt zur Synthese von Androgenen. Diese diffundieren in die Granulosazellen, in denen aufgrund des FSH-Stimulus Aromatase exprimiert wird, die die Androgene in Estrogene umwandelt. E₂, FSH und LH regulieren durch Feedbackmechanismen die weitere Sekretion. In der präovulatorischen Phase löst E₂ ein positives Feedback aus und führt so zu einer sehr hohen Freisetzung von LH, was dann die Ovulation auslöst. Unter dem Einfluss von LH kommt es weiterhin zu einer Luteinisierung des Follikels, der in der Folge Progesteron produziert [7]. Die Estradiolbiosynthese in den Ovarien und die Verteilung der aktiven Steroide mit dem Blutstrom zu den Estrogenzielgeweben bezeichnet man als endokrines System (Abbildung 2).

Mit dem Eintritt der Menopause entfallen die Ovarien als Estrogenproduzenten. Die Synthese der Estrogene findet dann hauptsächlich in peripheren Geweben wie Fett- und Muskelgewebe sowie in der Leber statt. Auch im Brustgewebe werden Estrogene produziert. Aufgrund der lokalen Estrogensynthese können hier Konzentrationen erreicht werden, die deutlich über den Estrogenplasmaspiegeln liegen. Die periphere Estrogensynthese nutzt androgene Vorstufen, wie Androstendion, DHEA und DHEA-sulfat und Testosteron, die zum größten Teil in der Nebenniere gebildet werden [8]. Betrachtet man die Plasmakonzentrationen der Estrogene, so fällt auf, dass die Estronplasmaspiegel postmenopausal höher liegen als die Estradiolplasmaspiegel. Estron ist postmenopausal das zirkulierende Estrogen und stellt als Estronsulfat die Speicherform für Estrogene dar [9]. Der Anteil der peripheren Estrogensynthese erhöht sich von 75% prämenopausal auf 100% in postmenopausalen Frauen [10]. An die Stelle des endokrinen Mechanismus tritt dann die intrakrine Synthese aktiver Sexualhormone, d. h. die Synthese der aktiven Steroide ausgehend von inaktiven Precursormolekülen erfolgt in der Zelle, in der sie auch ihre Wirkung ausüben [10] (Abbildung 2).

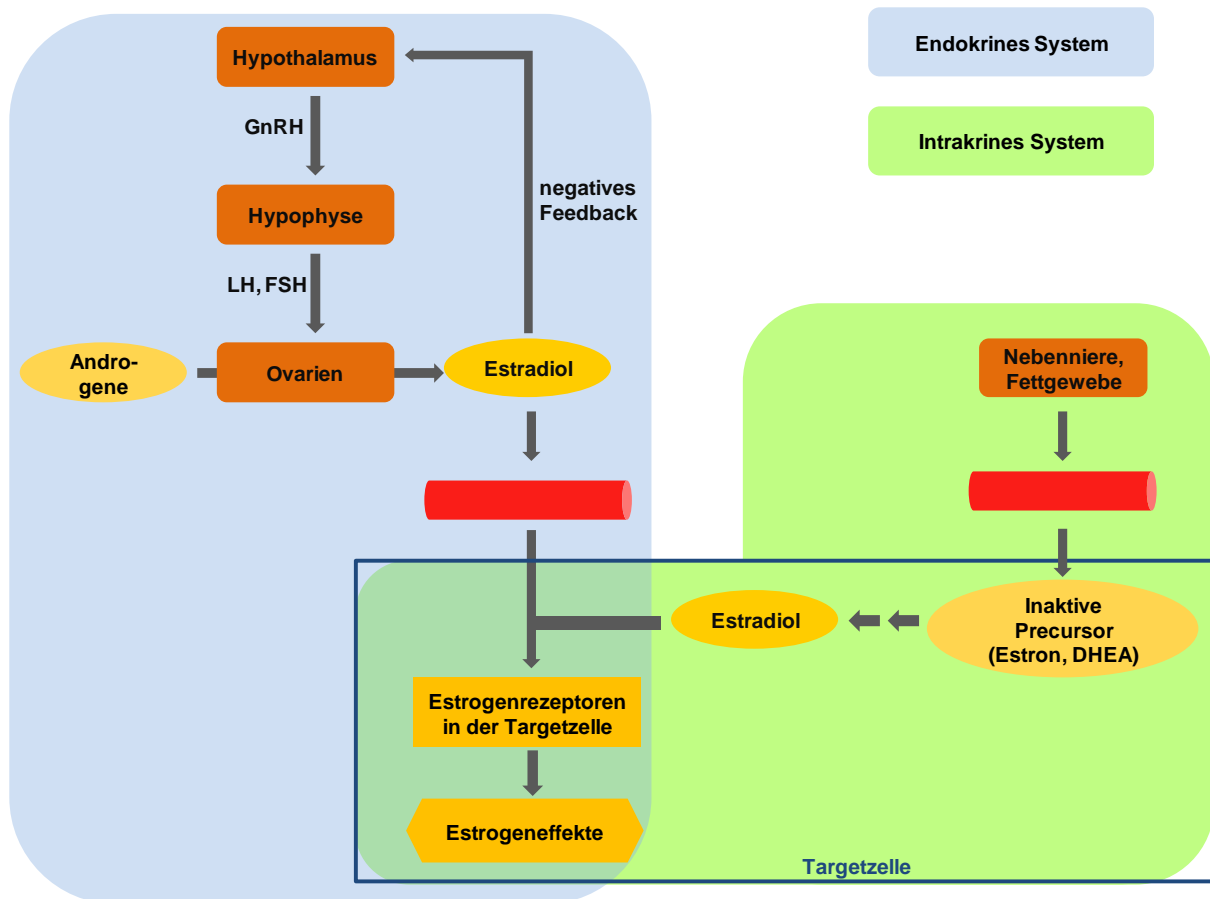


Abbildung 2 Endokrines und intrakrines System am Beispiel von Estradiol

1.3 Vermittlung der Estrogeneffekte

Die Wirkung der Estrogene wird über verschiedene Wege ausgelöst. Dabei können grundsätzlich die langsamen Estrogeneffekte, die durch Genexpression vermittelt sind, von den schnellen, sogenannten nichtgenomischen Effekten unterschieden werden. Die klassischen Estrogeneffekte erfolgen durch Bindung von E2 an die Estrogenrezeptoren α und β (Abbildung 3). Diese liegen im Cytosol gebunden an Chaperone, wie HSP90, vor. Bei Bindung des Liganden dissoziieren die Chaperone ab und der Rezeptor-Ligand-Komplex wandert in den Zellkern. Dort bilden sich Dimere des Rezeptor-Ligand-Komplexes, die dann direkt an „Estrogen response“-Elemente (ERE) an der DNA binden und die Gentranskription auslösen. Daneben kann auch indirekt durch Bindung der Dimere an Transkriptionsfaktoren die Gentranskription von „non estrogen response“-Elementen (Non-ERE) ausgelöst werden [11]. Neuere Studien haben ergeben, dass durch die Aktivierung von cytosolischen oder membranassoziierten Estrogenrezeptoren, Kinasesignalkaskaden wie MAPK oder PI3K/Akt aktiviert werden können, die dann zu schnellen

nichtgenomischen Effekten führen [12] (Abbildung 3). Die Entdeckung von GPR 30 (G-protein coupled receptor 30) als Rezeptor für Estradiol führt zu einem dritten Weg, wie Estrogeneffekte vermittelt werden können. Aktivierung von GPR30 führt cAMP vermittelt zur Aktivierung von Proteinkinasen und damit zu schnellen nicht genomischen Effekten [13] (Abbildung 3).

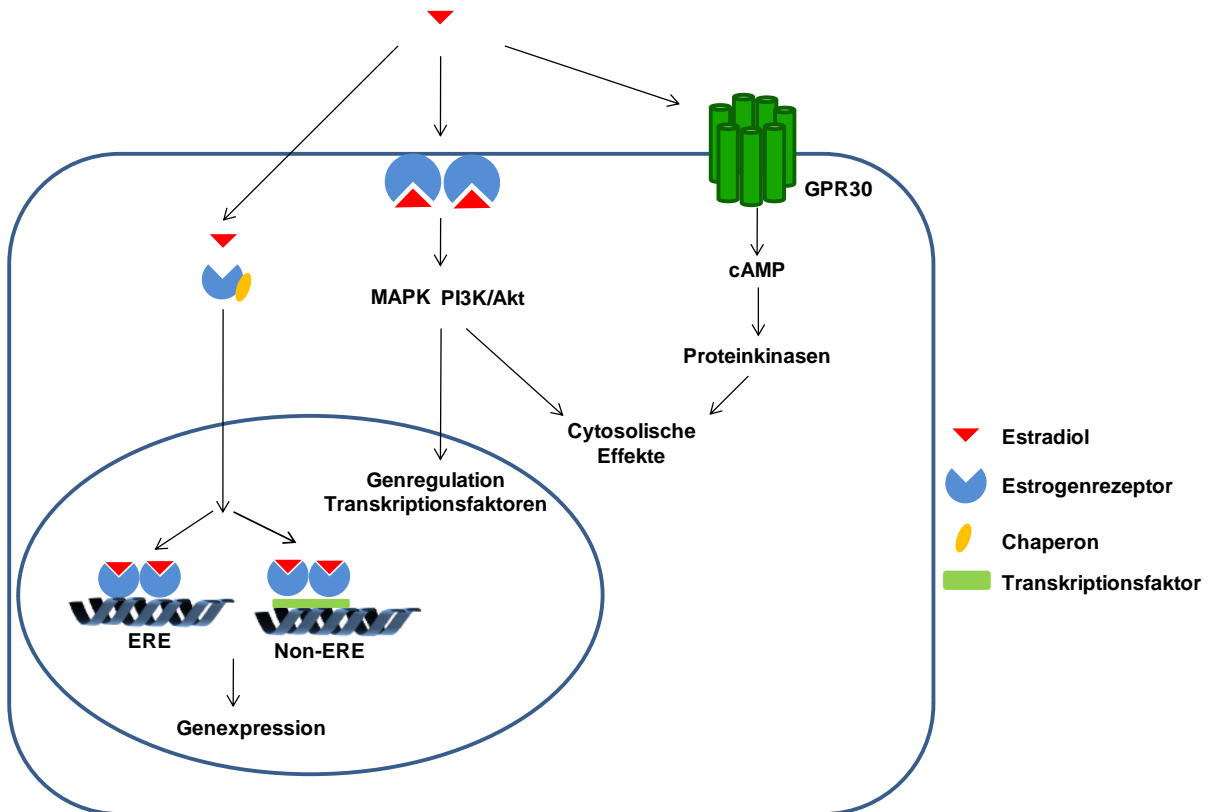


Abbildung 3 Intrazelluläre Vermittlung der Estrogeneffekte (modifiziert nach [11])

2 Pathophysiologie der Estrogene

Neben den physiologischen Effekten spielen Estrogene auch eine wichtige Rolle in der Entstehung und im Verlauf estrogenabhängiger Erkrankungen wie Brustkrebs und Endometriose. Ein Estrogenmangel, wie er zum Beispiel durch den Eintritt der Menopause oder durch die Entfernung der Ovarien ausgelöst wird, äußert sich in der Entwicklung von Osteoporose, die ein eigenes Krankheitsbild darstellt.

2.1 Estrogenabhängige Erkrankungen

2.1.1 Brustkrebs

Im Jahr 2006 erkrankten in Deutschland ca. 58000 Frauen an Brustkrebs. Damit ist Brustkrebs die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen [14].

Für die Entstehung von Brustkrebs sind verschiedene Risikofaktoren bekannt. Frauen, in deren naher Verwandtschaft Brustkrebserkrankungen aufgetreten sind, tragen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko. Mehrere Genveränderungen, die das Brustkrebsrisiko erhöhen, sind mittlerweile identifiziert worden, so wurde für Mutationen im BRCA-1- und BRCA-2-Gen ein 50-80% Risiko einer Brustkrebserkrankung innerhalb von 75 Jahren nachgewiesen [15]. Als weitere Risikofaktoren werden eine frühe erste Regelblutung, Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt und der späte Eintritt in das Klimakterium angesehen. Der Zeitpunkt der ersten Regelblutung und das Alter zum Zeitpunkt der Menopause bestimmen den Zeitraum, den das Brustgewebe hohen Estrogenspiegeln ausgesetzt ist. Dabei ist besonders zu berücksichtigen, dass bis zum Zeitpunkt der ersten Geburt das Brustgewebe noch nicht vollständig ausdifferenziert ist und eine hohe proliferative Aktivität aufweist. In dieser Zeit ist die Einwirkung kanzerogener Einflüsse besonders kritisch. Neben diesen kaum beeinflussbaren Risikofaktoren wurde eine Risikosteigerung auch durch Übergewicht, Bewegungsmangel und regelmäßigen Alkoholkonsum beobachtet.

Wie bereits beschrieben ist eine hohe Estrogenexposition ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Brustkrebs. Estrogene beeinflussen die Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung sowohl in gesundem Brustgewebe als auch in hormonsensitivem Brustkrebsgewebe [16].

Die Brustdrüse ist aufgebaut aus den Milchgängen (duktales System), die von den Drüsenläppchen (lobuläre Einheiten) ausgehen [17]. Wachstum und Differenzierung der Brustdrüse unterliegen der hormonellen Kontrolle durch Estradiol und

Progesteron. Die vollständige Ausbildung des duktales Systems wird während der Schwangerschaft erreicht [17]. Brustkrebs entsteht häufig in den Epithelzellen des duktales Systems.

Bei der Entstehung von Brustkrebs handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess. Dabei entwickelt sich das normale Gewebe über die Hyperplasie und Dysplasie, die als Präkanzerose einzustufen ist, hin zum hormonabhängigen Tumor [16]. Bei der primären Karzinogenese spielen sowohl proliferationsfördernde Substanzen wie Estrogene [18] als auch die Schädigung des genetischen Materials durch ionisierende Strahlung, Alkylierung oder freie Radikale eine Rolle. Nicht selten verlieren primär hormonabhängige Tumore ihre Hormonabhängigkeit. Als mögliche Erklärung für die Progression des Tumors zur Hormonunabhängigkeit wird die Entstehung von Estrogenrezeptormutanten diskutiert, die nicht funktionsfähig sind, so dass eine Reaktion auf hormonelle Stimulation unterbleibt [16]. Auch die Stimulation der Wachstumsfaktorrezeptoren und die Aktivierung anderer Signalwege innerhalb der Zelle, die zur Beeinflussung des Zellzyklus führen, sind Gründe für ein hormonunabhängiges Wachstum [19].

2.1.2 Endometriose

Das Vorkommen, Wachstum und Progression von Endometrium außerhalb des Uterus wird als Endometriose bezeichnet. Laut Schätzungen leiden 7-15% der Frauen an Endometriose. Die Zahl der Neuerkrankungen wird auf 40000 pro Jahr geschätzt [20]. Die Symptome sind der zyklisch auftretende Unterbauchschmerz und starke Blutungen. Daneben ist die Endometriose auch eine häufige Ursache für weibliche Unfruchtbarkeit.

Die Entstehung der Endometriose ist noch nicht geklärt. Am weitesten akzeptiert ist die Implantationstheorie nach Sampson [21]. Danach gelangen durch retrograde Menstruation Endometriumfragmente durch die Tuben in die Bauchhöhle, heften sich dort als ektopische Läsionen an und verursachen die charakteristische Symptomatik. Der Vorgang der retrograden Menstruation findet physiologisch bei allen Frauen statt und die Frage, warum sich bei manchen Frauen ektopische Läsionen entwickeln und bei anderen nicht, bleibt weiterhin Gegenstand der Forschung [22].

Untersuchungen des eutopen Endometriums von Frauen mit Endometriose und von gesunden Probanden haben ergeben, dass das Endometrium von Endometriosepatientinnen sich in der Expression verschiedener Proteine

unterscheidet [23]. Die Erkrankung ist durch das Wachstum der Läsionen und das Entzündungsgeschehen gekennzeichnet [24]. Estrogene und Wachstumsfaktoren sind dabei verantwortlich für das Wachstum, während Prostaglandine und Cytokine Entzündungsprozesse und Schmerzen auslösen. Beide Prozesse, die Estrogenbiosynthese und die Produktion der Prostaglandine, sind dabei eng miteinander verknüpft und halten sich im Sinne eines Teufelskreises gegenseitig aufrecht (Abbildung 4).

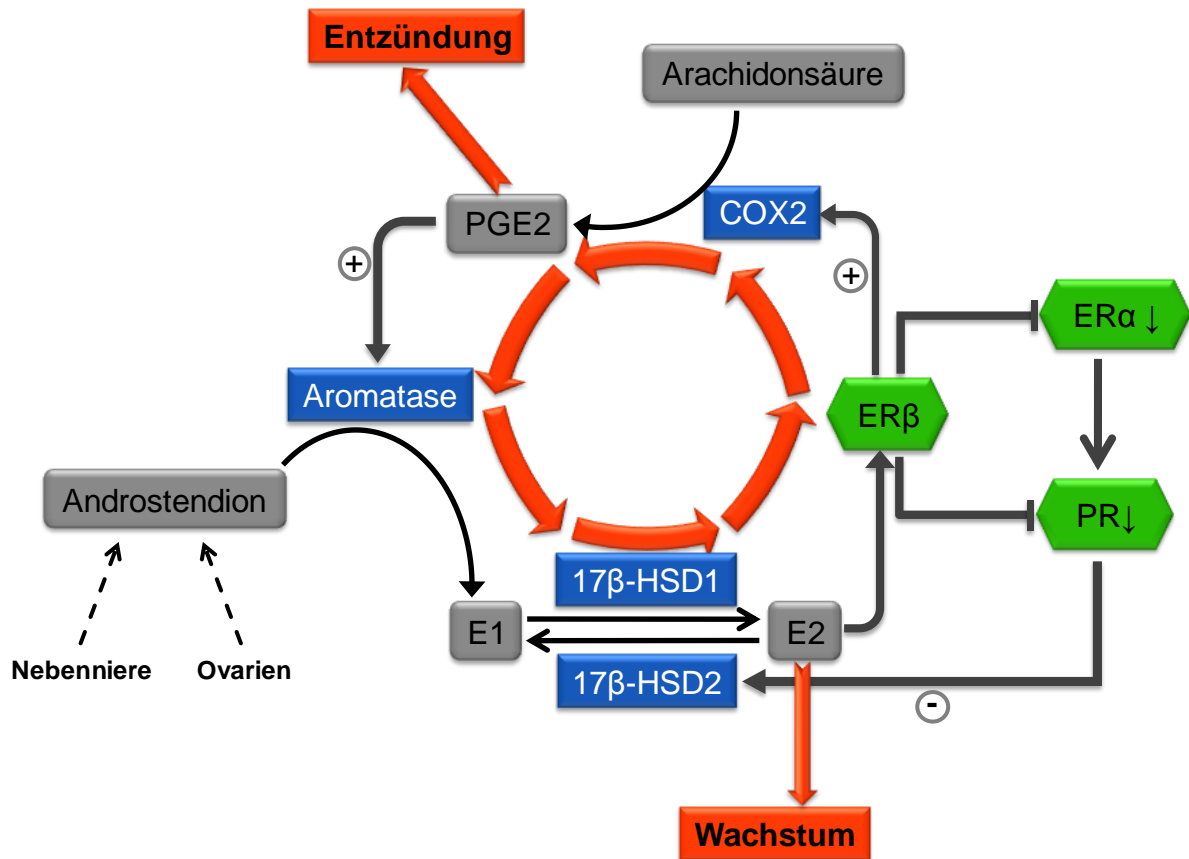


Abbildung 4 Teufelskreis in der Pathophysiologie der Endometriose (modifiziert nach Bulun 2009)

Im Gegensatz zu gesundem Endometrium werden in Stromazellen aus ektope Endometrium signifikante Level von StAR (Steroid Acute Regulatory protein - verantwortlich für den Cholesteroltransport in die Zelle) und Aromatase exprimiert, die für die *de novo*-Synthese der Estrogene erforderlich sind. Dadurch kann lokal in den ektope Läsionen aus Androstendion, das entweder in Ovar oder Nebenniere oder lokal in den Stromazellen synthetisiert wird, Estron gebildet werden, das dann durch 17β -HSD1 in Estradiol umgewandelt wird. Dadurch werden in den Läsionen lokal hohe Estradiolspiegel erreicht und das Wachstum der Läsionen gefördert.

Vermittelt über ER β induziert E2 die Expression von COX-2, die an der Produktion von PGE2 aus Arachidonsäure beteiligt ist. Durch die erhöhten Spiegel an PGE2 wird das Entzündungsgeschehen aufrecht erhalten. Außerdem induziert PGE2 die Expression von Aromatase, was wiederum zu einer erhöhten Bildung von Estron und somit auch Estradiol führt. Die erhöhten Estradiolspiegel führen vermittelt über ER β zusätzlich zu einer Suppression der Progesteron-Rezeptorspiegel. Das führt zum klinischen Bild der Progesteronresistenz und hat eine verminderte Expression von 17 β -HSD2 zur Folge, die E2 in E1 umwandelt. Dadurch fehlt der in gesundem Endometrium vorhandene Schutzmechanismus vor zu hohen Estradiolspiegeln und in den ektopen Läsionen wird weniger E2 zu E1 inaktiviert, wodurch die Estradiolspiegel lokal weiterhin hoch bleiben. Die intrazellulär hohen Estradiolspiegel spielen daher eine Schlüsselrolle für die Progression der Erkrankung [23, 25, 26].

2.2 Die Therapie estrogenabhängiger Erkrankungen

2.2.1 Brustkrebs

Neben der chirurgischen Entfernung des Tumors und Chemotherapie, spielen auch endokrine Therapien eine wichtige Rolle in der Behandlung von hormonabhängigen Brustkrebserkrankungen [27]. Diese können sowohl vor der operativen Entfernung der Tumoren zum Einsatz kommen, um die Größe des Tumors zu reduzieren oder als adjuvante Therapie nach der Operation in Kombination oder sequentiell mit einer Chemotherapie. Zudem werden endokrine Behandlungen auch als Rezidivprophylaxe durchgeführt [28].

Mittels endokriner Behandlungsmethoden kann auf verschiedenen Ebenen in die hormonellen Kreisläufe eingegriffen werden (Abbildung 5). Die Biosynthese der Estrogene kann bei prämenopausalen Krebspatientinnen durch Gabe von GnRH-Antagonisten unterdrückt werden. Diese blockieren in der Hypophyse die GnRH-Rezeptoren und verhindern so, dass FSH und LH ausgeschüttet werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Gabe von GnRH-Superagonisten [29]. Diese aktivieren die GnRH-Rezeptoren langanhaltend und führen durch dauerhafte Stimulation schließlich zur Downregulation der Rezeptoren, wodurch nach einem initialen Anstieg die FSH- und LH-Ausschüttung schließlich vollständig unterdrückt wird.

Einleitung

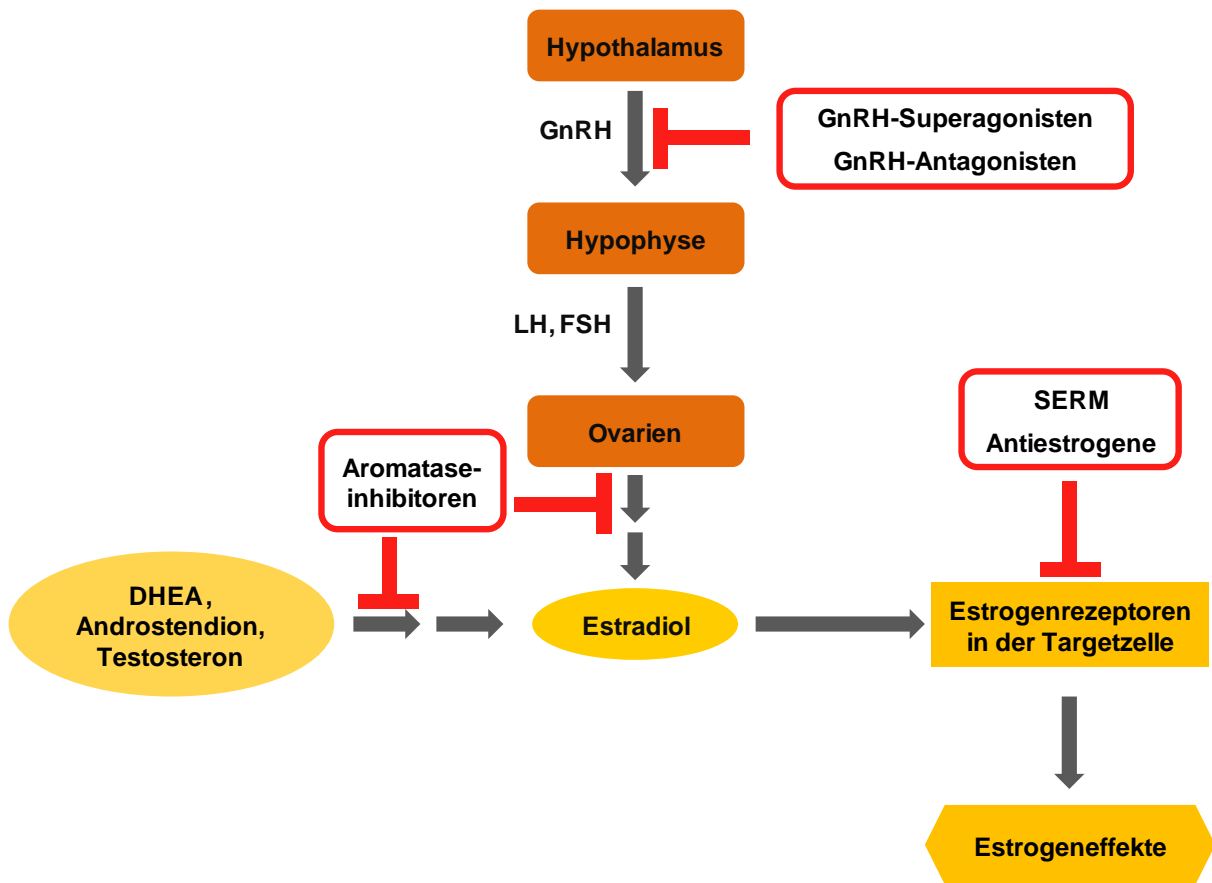


Abbildung 5 Endokrine Therapien zur Behandlung estrogenabhängiger Erkrankungen

Neben diesem indirekten Eingriff in die Estrogenbiosynthese bieten Aromataseinhibitoren die Möglichkeit die Produktion der Estrogene direkt zu hemmen. Aromataseinhibitoren verhindern die Bildung von Estrogenen sowohl in den Ovarien als auch im peripheren Gewebe und sind zur Therapie von postmenopausalen Frauen zugelassen [30]. Neben dem Eingriff in die Biosynthese besteht auch die Möglichkeit durch Blockade der Estrogenrezeptoren die Wirkung der Estrogene zu unterbinden. Mit selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERM) wie zum Beispiel Tamoxifen lassen sich dabei antagonistische Effekte im Tumorgewebe erreichen, während in anderen Geweben eher agonistische Effekte im Vordergrund stehen. Neben den SERMs kann auch das Antiestrogen Fulvestrant zum Einsatz kommen, das neben dem Rezeptorantagonismus zu einer Downregulation der Estrogenrezeptoren führt [31].

Allerdings bringen die eingesetzten Therapien auch Nachteile mit sich. Unterdrückung der Gonadotropin-Wirkungen kommt einer hormonellen Ovariectomie gleich und führt zu einer künstlichen Menopause mit Symptomen wie Hitzewallungen, vaginaler Atrophie und einer Abnahme der Knochendichte. Ähnliche Nebenwirkungen treten auch beim Einsatz von Aromataseinhibitoren, SERMs und

Antiestrogenen auf. SERMs können aufgrund ihrer partiell agonistischen Wirkung zusätzlich zu unerwünschten Effekten in estrogensensitiven Geweben wie dem Endometrium führen und dort zur Entwicklung von Endometriumkarzinomen beitragen.

2.2.2 Endometriose

In der Therapie der Endometriose spielt neben der Behandlung der Endometrioseherde auch die Schmerzbehandlung eine wichtige Rolle [32]. Hierzu kommen vor allem nichtsteroidale Antirheumatika zum Einsatz. Die operative Entfernung der ektopen Läsionen spielt eine wichtige Rolle, kann wegen der hohen Rezidivrate jedoch nur als temporäre Lösung betrachtet werden. Daher kommt der hormonellen Therapie eine große Bedeutung zu. Ähnlich wie in der Brustkrebstherapie hat sich die Unterdrückung der Gonadotropin-Sekretion als eine wirksame Behandlungsoption erwiesen. Zur Behandlung der Endometriose sind hier die GnRH-Analoga zugelassen. Allerdings sollten sie aufgrund der negativen Effekte auf die Knochendichte nicht zur Behandlung von jungen Patientinnen eingesetzt werden. Um dem Verlust an Knochendichte entgegenzuwirken wird die "add-back"-Gabe einer niedrigen Dosis einer Estrogen-Gestagen-Kombination empfohlen, die eben ausreicht, um den Knochenabbau zu stoppen, aber nicht zur Progression der Krankheit führt [32]. Durch Unterdrückung der Regelblutung mit oralen Kontrazeptiva, die dann nicht zyklisch, sondern durchgehend eingenommen werden, kann ebenfalls ein Rückgang der Zahl der Läsionen und eine Verbesserung der Schmerzsymptomatik erreicht werden. Daneben befinden sich derzeit niedrig dosierte Aromatasehemmer und das SERM Raloxifen in der klinischen Prüfung zur Behandlung der Endometriose [24, 33, 34].

2.3 Estrogenmangelerkrankungen

2.3.1 Osteoporose

Osteoporose ist eine Erkrankung des Knochens, die durch eine verminderte Knochendichte und ein erhöhtes Frakturrisiko charakterisiert ist. Dabei kommt es zu einer Zerstörung der Mikroarchitektur des Knochens, was zu einer Verschlechterung der Knochenqualität und einer erhöhten Fragilität des Knochens führt [35].

Die Prävalenz einer Osteoporose liegt bei 7% für postmenopausale Frauen im Alter von 55 Jahren und steigt auf 19% für Frauen im Alter von 81 Jahren [36]. Osteoporose-assoziierte Frakturen führen zu hohen Krankheitszahlen und in vielen Fällen zu Arbeitsunfähigkeit und einem Verlust an Lebensqualität. Die Mortalität im ersten Jahr nach einer Hüftfraktur liegt zwischen 20-30%. In den USA verursacht die Behandlung von Osteoporose Kosten in Höhe von 15 Milliarden Dollar im Jahr [37].

Bei der Osteoporose unterscheidet man die primäre oder idiopathische Form, bei der man die Ursache nicht kennt oder die physiologisch (Menopause, Typ I) oder als Alterserscheinung (Typ II) auftritt, von der sekundären Osteoporose, bei der die auslösenden Faktoren bekannt sind. Zu den Ursachen für eine sekundäre Osteoporose gehören endokrine Erkrankungen (Cushing-Syndrom, Hyperparathyreoidismus, Schilddrüsenerkrankungen), gastrointestinale Erkrankungen (entzündliche Darmerkrankungen, Zöliakie), hämatologische Erkrankungen (Myelome, Lymphome) und rheumatische Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, Morbus Bechterew). Auch die Einnahme bestimmter Medikamente, wie z.B. Glucokortikoide und Antiepileptika, kann eine Ursache für Osteoporose sein [38].

Sowohl Frauen als auch Männer erleiden einen Verlust an Knochenmasse. Bei Frauen gliedert sich der Knochenabbau in zwei Phasen. Mit dem Beginn der Menopause werden innerhalb von wenigen Jahren 20-30% der Knochenmasse abgebaut [39]. Charakteristisch ist dabei eine Erhöhung der Zahl der „Bone remodelling units“ (BMUs), ein Anstieg der Knochenresorption, die nicht durch einen Anstieg der Knochenbildung ausgeglichen wird. Nach dieser Phase des schnellen Abbaus, der hauptsächlich den trabekulären Knochen betrifft, folgt ein anhaltender langsamer Abbau der Knochenmasse, der vor allem im kortikalen Knochen stattfindet. Bei Männern findet man nur den langsamen altersabhängigen Knochenabbau, der der zweiten Phase des Knochenabbaus bei Frauen entspricht [39].

Knochen - Physiologie

Das gesamte Skelett unterliegt einem permanenten Remodelling, bei dem alte Knochensubstanz abgebaut und durch neue ersetzt wird.

Im menschlichen Körper können zwei verschiedene Knochenformen unterschieden werden: der kortikale Knochentyp und der trabekuläre Knochentyp. Kortikale Knochen machen 80% des Skeletts aus, die restlichen 20% bestehen aus trabekulären Knochen, die man vor allem an den Epiphysen der Röhrenknochen und

in den Wirbelkörpern findet [40]. Dabei findet im trabekulären Knochen aufgrund seiner großen Oberfläche der größte Teil des Remodellings statt.

Die Knochensubstanz besteht aus einem organischen und aus einem anorganischen Anteil. Der organische Teil der extrazellulären Matrix wird gebildet aus Typ 1 Kollagen, Proteoglykanen und nichtkollagenen Proteinen wie Osteocalcin, Sialoprotein, Osteonectin und Osteopontin. In diese Matrix eingelagert ist der anorganische Anteil des Knochens in Form von Hydroxyapatit [41].

Neben den nichtzellulären Bestandteilen des Knochens finden sich im Knochen verschiedene Zelltypen: Osteoblasten, Osteoclasten und Osteozyten [40].

Osteoblasten, die aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehen, sind die knochenbildenden Zellen. Sie produzieren die extrazellulären Matrixproteine und sind verantwortlich für die Mineralisation. Außerdem sezernieren sie verschiedene Wachstumsfaktoren, wie TGF β , BMP (bone morphogenetic protein) und IGF (insulin-like growth factor), und Cytokine, wie IL-6 und RANKL. Während der Synthese der Matrixproteine bilden Osteoblasten große Mengen an alkalischer Phosphatase, die die Matrix auf die Mineralisation vorbereitet. Während des Knochenaufbaus werden die Osteoblasten in der neu synthetisierten Substanz eingebaut und werden entweder apoptotisch oder wandeln sich um in Osteozyten und Lining-Zellen, die die Oberfläche des gebildeten Knochens auskleiden. Osteozyten bilden innerhalb des Knochens ein Netzwerk aus, über das mechanische und biochemische Informationen weitergegeben werden können [41].

Osteoclasten werden aus der Monozyten-Makrophagen-Linie gebildet. Osteoclasten sind große, mehrkernige Zellen und verantwortlich für den Knochenabbau. Charakteristisch für Osteoclasten ist die Ausbildung des sogenannten Bürstensaums an der Kontaktseite zur Matrix, die durch Einstülpungen der Plasmamembran zustande kommt. Osteoclasten weisen eine hohe Stoffwechselaktivität auf und sind reich an lysosomalen Enzymen, wie saure Phosphatase und Cathepsin K, die für den Abbau der Knochenmatrix notwendig sind [41].

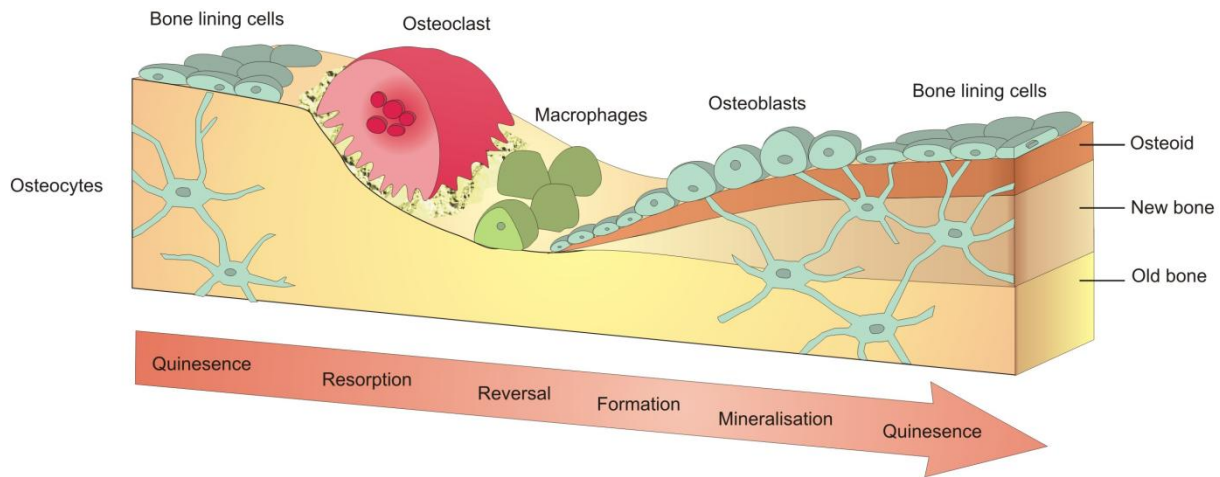


Abbildung 6 Die Phasen des Remodelling-Prozesses und daran beteiligte Zelltypen [42]

Der Prozess des Remodelling beinhaltet sowohl den Knochenabbau durch Osteoclasten als auch den Aufbau neuer Knochenmatrix durch Osteoblasten. Die Aktivitäten von Osteoclasten und Osteoblasten sind dabei eng miteinander verknüpft und das Remodelling verläuft in einer definierten Abfolge. Osteoclasten und Osteoblasten sind dabei in sogenannten Bone remodelling units (BMU) organisiert (Abbildung 6). Die Lebensdauer einer BMU beträgt zwischen 6 und 9 Monate [41], wobei der Knochenaufbau den größten Teil der Zeit einnimmt.

Im ersten Schritt des Remodellings wird dabei die Knochenoberfläche für die Resorption aktiviert, die Lining-Zellen werden entfernt und Osteoclasten-Vorläuferzellen wandern zu der freiliegenden mineralisierten Knochenoberfläche. Diese reifen durch Fusion zu Osteoclasten heran und beginnen den zweiten Schritt des Remodellings: die Resorption. Dadurch bildet sich eine Resorptionslakune, die im anschließenden Schritt der Knochenneubildung durch Osteoblasten wieder mit Osteoid, d. h. nicht mineralisierter Knochenmatrix gefüllt wird. Im vierten Schritt wird das neu gebildete Osteoid schließlich mineralisiert. Durch den Übergang der Osteoblasten in Lining-Zellen wird der Prozess des Remodellings abgeschlossen [40].

Im Remodelling-Prozess ist die Aktivität von Osteoblasten und Osteoclasten eng gekoppelt und Knochenabbau und -aufbau stehen im Gleichgewicht. Kommt es nun durch äußere Einflüsse zu einer Störung dieses feinregulierten Gleichgewichts, führt dies zu Erkrankungen des Knochens. Bekannte Störungen, die auf ein Überwiegen der Knochenneubildung zurückgehen, sind Osteopetrose und Akromegalie. Häufiger

jedoch sind Erkrankungen, bei denen der Knochenabbau überwiegt. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Osteoporose.

Die Rolle der Estrogene im Knochen

Die Wirkung der Estrogene im Knochen zeigt sich eindrucksvoll darin, dass die Knochenmasse mit dem Beginn der Wechseljahre stark abnimmt und dass diese Abnahme durch die Gabe von Estrogenen im Rahmen der Hormonersatztherapie rückgängig gemacht werden kann [43]. Aus klinischer Sicht haben Estrogene demnach eine antiresorptive Wirkung auf den Knochen. Diese ergibt sich aus den drei grundlegenden Wirkungen der Estrogene auf den Knochenstoffwechsel [44]:

1. Hemmung der Aktivierung des Remodellings und neuer BMUs
2. Hemmung der Differenzierung und Förderung der Apoptose der Osteoclasten
3. Förderung der Differenzierung und der Aktivität der Osteoblasten und Hemmung der Apoptose

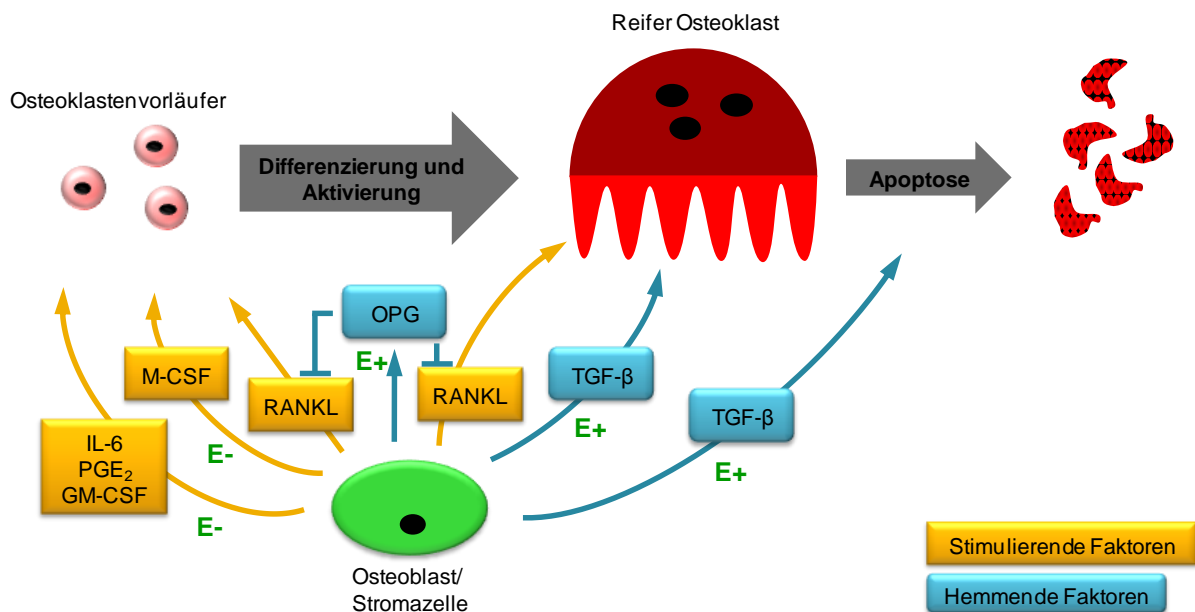


Abbildung 7 Parakrine Regulation der Osteoclasten durch Osteoblasten (nach [45])

Auf zellulärer Ebene wirkt Estradiol sowohl auf Osteoblasten als auf Osteoclasten, in denen die Estrogenrezeptoren nachgewiesen wurden. In Osteoblasten und Stromazellen unterdrückt Estradiol dabei die Produktion von PGE₂ und verschiedener Cytokine wie IL-1, IL-6, TNFα, GM-CSF und M-CSF, die ihrerseits die Zahl der Osteoclastenvorläufer erhöhen [39, 41] (Abbildung 7). Daneben wird durch

E2 die Ausschüttung von TGF β erhöht. TGF β hemmt die Knochenresorption, indem es die Aktivität der Osteoclasten erniedrigt und die Apoptoserate steigert [39] (Abbildung 7). Ein wichtiger Schritt im Verständnis der Regulation der Osteoclastenaktivität durch die Osteoblasten war die Entdeckung des OPG/RANKL/RANK-Systems [46, 47]. RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) ist ein Mitglied der TNF Ligand-Familie und ein wichtiges Cytokin in der Osteoclastogenese. RANKL wird in Zellen der Stroma-Osteoblasten-Linie exprimiert und existiert sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form. Durch Zell-Zell-Kontakt bindet RANKL an seinen membranären Rezeptor RANK auf der Oberfläche der Osteoclasten(-vorläufer) und löst dadurch die Differenzierung der Osteoclasten aus. Weitere Effekte der Aktivierung von RANK sind die Erhöhung der Osteoclastenaktivität und die Hemmung der Apoptose der Osteoclasten. Die Aktivierung der Osteoclasten durch die Interaktion zwischen RANKL und RANK wird durch das lösliche Rezeptorprotein Osteoprotegerin (OPG) reguliert. OPG fängt somit als löslicher "decoy receptor" RANKL ab und neutralisiert diesen. Estradiol stimuliert die Produktion von OPG in Osteoblasten und greift so über einen indirekten Mechanismus in die Osteoclastogenese und Aktivität der Osteoclasten ein [48, 49]. Als direkte Wirkungen von E2 auf die Osteoclasten wurden hemmende Effekte innerhalb der Signalkaskaden des RANK-Signallings nachgewiesen, wodurch die Differenzierung der Osteoclasten beeinflusst wird [50, 51].

2.3.2 Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Osteoporose

In der Pathogenese der Osteoporose spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle und so ergeben sich unterschiedliche pharmakologische Angriffspunkte.

Als Basistherapie wird eine ausreichende Zufuhr an Calcium und Vitamin D empfohlen. Lässt sich der Calciumbedarf nicht über die Nahrung decken und kann die Sonnenlichtexposition zur endogenen Bildung von Vitamin D nicht sichergestellt werden, sollte Calcium und Vitamin D supplementiert werden.

Als Goldstandard gilt der Einsatz von Bisphosphonaten [36]. Bisphosphonate hemmen die Farnesylpyrophosphat Synthetase in den Osteoclasten und führen dadurch zur Apoptose der Osteoclasten. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu anorganischem Pyrophosphat zeigen die Bisphosphonate eine hohe Affinität zum Hydroxyapatit der Knochen, an das sie sich selektiv anlagern. Obwohl die Anwendung von Bisphosphonaten sehr wirksam in der Reduktion des Frakturrisikos

ist, treten vor allem in der Langzeitanwendung schwerwiegende Nebenwirkungen wie Kiefernekrosen und untypische Oberschenkelfrakturen auf [52, 53].

Weitere antiresorptive Therapien umfassen Estrogensubstitution oder den Einsatz von SERMs. Die Hormonersatztherapie wird nicht mehr zur Osteoporosebehandlung empfohlen, hat aber bei Vorliegen anderer Indikationen, die eine Hormonsubstitution erforderlich machen, positive Auswirkungen auf die Knochendichte [36]. Stattdessen wird auf das SERM Raloxifen zurückgegriffen, das als Agonist an den Estrogenrezeptoren im Knochen antiresorptiv wirksam ist, ohne jedoch die für Estrogene typischen Nebenwirkungen am Brust- und Endometriumgewebe zu haben. Zu den Nebenwirkungen unter der Therapie mit Estrogenen und SERMs zählen vor allem thromboembolische Komplikationen, die den Einsatz bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren limitieren [37].

Ein dualer Wirkmechanismus wurde für Strontiumranelat nachgewiesen, d.h. es wirkt sowohl antiresorptiv als auch osteoanabol und wird daher als Alternative zu Bisphosphonaten eingesetzt, wenn diese kontraindiziert sind [54].

Zu den osteoanabolen Wirkstoffen zählen auch Parathormon, das als rekombinant hergestelltes Parathormon verfügbar ist, und das Parathormon-Derivat Teriparatid. Dabei wirkt die intermittierende Gabe von Parathormon stimulierend auf die Lining-Zellen und Osteoblasten. Außerdem sind Wirkungen auf die Osteozyten nachgewiesen worden. Die Therapie mit PTH-Analoga ist auf 18-24 Monate begrenzt und sollte von einer antiresorptiven Therapie gefolgt werden, um die dazugewonnene Knochenmasse zu erhalten [37].

Nur noch selten wird Calcitonin angewendet. Calcitonin hemmt die Osteoclastenaktivität und ist somit bei den antiresorptiven Therapien einzuordnen. Außerdem hat es analgetische Eigenschaften. Calcitonin ist indiziert zur Behandlung einer manifesten Osteoporose bei postmenopausalen Frauen, wenn andere Therapien nicht in Frage kommen, und zur Schmerzbehandlung im Rahmen von Wirbelkörpereinbrüchen [55].

Ebenfalls nur noch selten eingesetzt werden Fluoride in der Osteoporosetherapie. Sie stimulieren zwar die Osteoblasten und führen damit zu einer Erhöhung der Knochenmasse im trabekulären Knochen, allerdings ist die Qualität des neugebildeten Knochens minderwertig, so dass das Frakturrisiko nicht sinkt.

Einen neuartigen Ansatz in der Behandlung der Osteoporose bietet der RANKL-Antikörper Denosumab. Denosumab fängt wie das physiologische OPG RANKL ab

und verhindert dadurch die Aktivierung der Rezeptoren auf den Osteoclasten. Dadurch wird die Osteoclastendifferenzierung verhindert und die Aktivität herabgesetzt, was letztlich zur antiresorptiven Wirkung führt [37].

3 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen

Die Familie der 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen (17 β -HSD) umfasst 14 Subtypen, wobei davon 12 im Menschen nachgewiesen wurden. Alle bekannten 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen sind in der Lage 17-Ketosteroide und 17 β -Hydroxysteroid ineinander umzuwandeln, aber auch andere Substanzen, z. B. Fettsäuren oder Retinoide bilden Substrate der 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen [56, 57]. 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen gehören zur Familie der Shortchain Dehydrogenasen (SDR) mit Ausnahme von 17 β -HSD5, die zur Familie der Aldo-Keto Reduktasen gehört.

17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität, der katalysierten Reaktionsrichtung, ihrer Gewebeverteilung und ihrer subzellulären Lokalisation.

Während sie *in vitro* in der Lage sind, sowohl oxidative als auch reduktive Reaktionen zu katalysieren, verhalten sie sich unter *in vivo* Bedingungen unidirektional. Daher können sie entweder als oxidative oder reduktive 17 β -HSDs klassifiziert werden.

Tabelle 1 zeigt die 12 bekannten humanen 17 β -HSDs, ihre bevorzugte Katalyse-richtung, ihre Substrate und ihr Vorkommen (modifiziert nach [58]).

Tabelle 1 Übersicht über die humanen 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen

Typ	Katalyse- richtung	Substrate	Vorkommen
1	reduktiv	Estrogene	Ovarien, Placenta, Brust
2	oxidativ	Estrogene, Androgene, Gestagene	Placenta, Uterus, Leber, Gastrointestinaltrakt, Harnwege, Knochen
3	reduktiv	Androgene	Testes
4	oxidativ	Fettsäuren, Estrogene, Androgene	Ubiquitär
5	reduktiv	Prostaglandine, Estrogene, Androgene	Leber, Nebenniere, Testes, Prostata
7	reduktiv	Cholesterolsynthese, Estrogene	Ovarien, Placenta, Brust, Niere
8	oxidativ	Fettsäuren, Estrogene, Androgene	Niere, Leber, Gonaden, Milz
10	oxidativ	Gallensäuren, Estrogene Androgene	Gehirn
11	oxidativ	Lipide, Estrogene, Androgene	Auge, Lunge
12	reduktiv	Fettsäuren, Estrogene	Brust, Uterus, Ovarien
13			Leber
14	oxidativ	Fettsäuren, Estrogene, Androgene	Gehirn, Leber, Placenta

17 β -HSDs sind die Schlüsselenzyme für die Aktivierung und Inaktivierung der Sexualhormone. Durch Katalyse der Redoxreaktion in Position 17 des steroidal Grundgerüsts sind sie in der Lage durch Reduktion aus den schwach wirksamen Steroiden Androstendion und Estron die hoch potenten Sexualhormone Testosteron

und Estradiol zu bilden und diese durch Oxidation wieder zu deaktivieren. *In vivo* sind für die Umwandlung der Estrogene und Androgene hauptsächlich die Isoformen 1 und 3 (Reduktion) und 17 β -HSD2 (Oxidation) beteiligt (Abbildung 8). Diskutiert wurde in den vergangenen Jahren insbesondere die Bedeutung von 17 β -HSD12 als reduktive 17 β -HSD für die Aktivierung von Estradiol [59]. In einer detaillierten Studie von Day et al. konnte jedoch gezeigt werden, dass trotz hoher Expressionsspiegel von 17 β -HSD12 die reduktive Aktivität intrazellulär auf 17 β -HSD1 zurückzuführen ist [60].

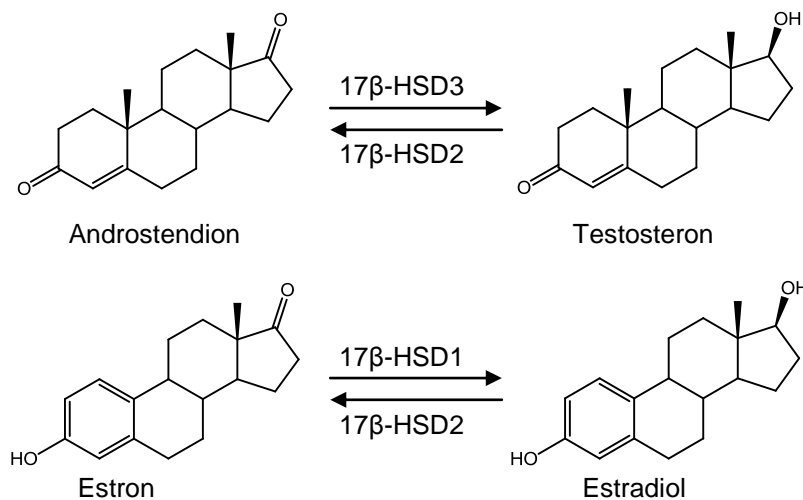


Abbildung 8 Regulation der aktiven Androgene und Estrogene durch 17 β -HSDs

17 β -HSDs regulieren somit die Verfügbarkeit aktiver Sexualsteroiden in der Zelle. Eine Hemmung der 17 β -HSDs stellt aufgrund ihrer gewebespezifischen Expression eine Möglichkeit dar, hormonabhängige Erkrankungen zu behandeln. Zudem wurden in hormonabhängigen Tumoren, wie beispielsweise Brustkrebs, abnorme Expressionsmuster der 17 β -HSDs gefunden. In diese krankhaften Verhältnisse kann durch selektive Inhibitoren regulierend eingegriffen werden.

3.1 17 β -HSD1

Bereits in den 50er Jahren wurde 17 β -HSD1 als erster Vertreter der 17 β -HSD-Familie untersucht. 17 β -HSD1 wurde erstmals von Langer und Engel aus Plazenta isoliert und als Estradiol-17 β Dehydrogenase beschrieben [61].

3.1.1 Katalyserichtung

In vivo katalysiert 17 β -HSD1 die Reduktion von Estron zu Estradiol und benutzt als Cofaktor NADPH. Unter *in vitro* Bedingungen akzeptiert 17 β -HSD1 auch NADH als Cofaktor, allerdings weist sie zu diesem eine deutlich niedrigere Affinität auf (K_m NADPH: 0,9 μ M vs. K_m NADH: 5,7 μ M) [62]. *In vitro* ist jedoch unter den entsprechenden Cofaktorverhältnissen und Substratangebot auch die Katalyse der Oxidationsreaktion von E2 zu E1 möglich. Da *in vivo* die Redoxverhältnisse innerhalb der Zelle durch die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und die Enzyme der Atmungskette streng reguliert sind, liegt physiologischerweise das Gleichgewicht auf Seite von NADPH für den phosphorylierten Cofaktor (NADPH:NADP⁺ > 500:1) und auf der Seite von NAD⁺ im Falle des nichtphosphorylierten Cofaktors (NAD⁺ : NADH>700:1) [63], so dass intrazellulär millimolare Konzentrationen von NADPH und NAD⁺ vorliegen. Für die unidirektionale Reaktion der 17 β -HSD1 *in vivo* sind daher zwei Faktoren verantwortlich: der intrazelluläre Überschuss von NADPH gegenüber NADP⁺ und die höhere Affinität der 17 β -HSD1 zum phosphorylierten Cofaktor.

3.1.2 Struktureller Aufbau

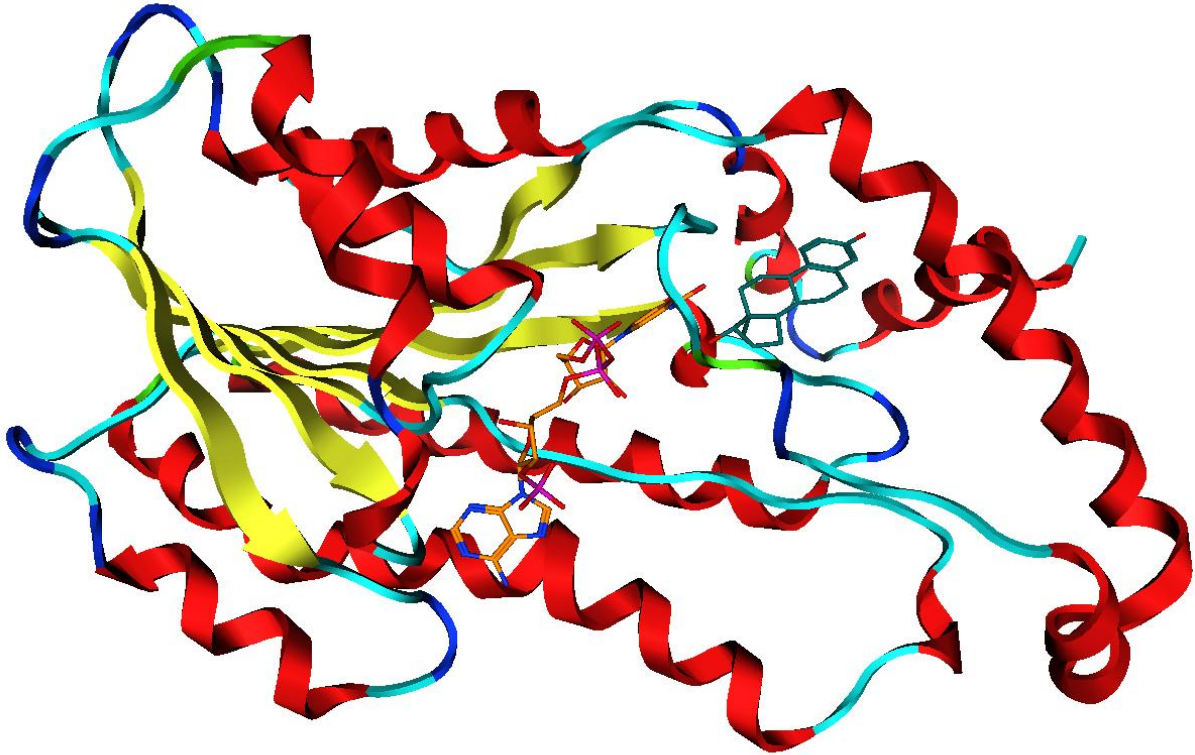


Abbildung 9 Struktur der 17 β -HSD1 mit E2 (türkis) und NADP⁺ (orange) (PDB 1A27)

17 β -HSD1 besteht aus 327 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 34,9 kDa. Das cytosolische Enzym ist als Homodimer katalytisch aktiv und trägt als typisches Strukturmerkmal die charakteristische β -Faltblatt-Struktur des Rossmann folds, der die Cofaktorbindetasche beinhaltet [64, 65] (Abbildung 9). Wie alle SDRs enthält sie im aktiven Zentrum die Tyr-X-X-X-Lys Sequenz, die Teil der katalytischen Tetrade ist, die aus den Aminosäuren Ser142, Tyr155, Lys159 und Asn114 gebildet wird [66].

Die Struktur der 17 β -HSD1 wurde in verschiedenen Kristallstrukturen aufgelöst, so dass detaillierte Kenntnisse über die Bindetasche gegeben sind. Dabei sind sowohl das Apoenzym (1BHS) als auch verschiedene binäre (1IOL, 1FDS, 1DHT, 3DHE, 1JTV, 1QYV) und ternäre (1FDT, 1A27, 1EQU, 1QYW, 1QYX) Komplexe kristallisiert und strukturell aufgelöst worden. Gemeinsam ist allen bekannten Strukturen, dass nur steroidale Liganden cokrystallisiert wurden und bis heute keine 3D-Struktur mit nichtsteroidalen Liganden existiert. Außerdem gibt es auch keine Kristallstruktur mit

dem Substrat Estron. Die Struktur des ternären Komplexes mit NADP⁺ und Estradiol lässt sich aber gut zur Beschreibung der Bindetasche heranziehen.

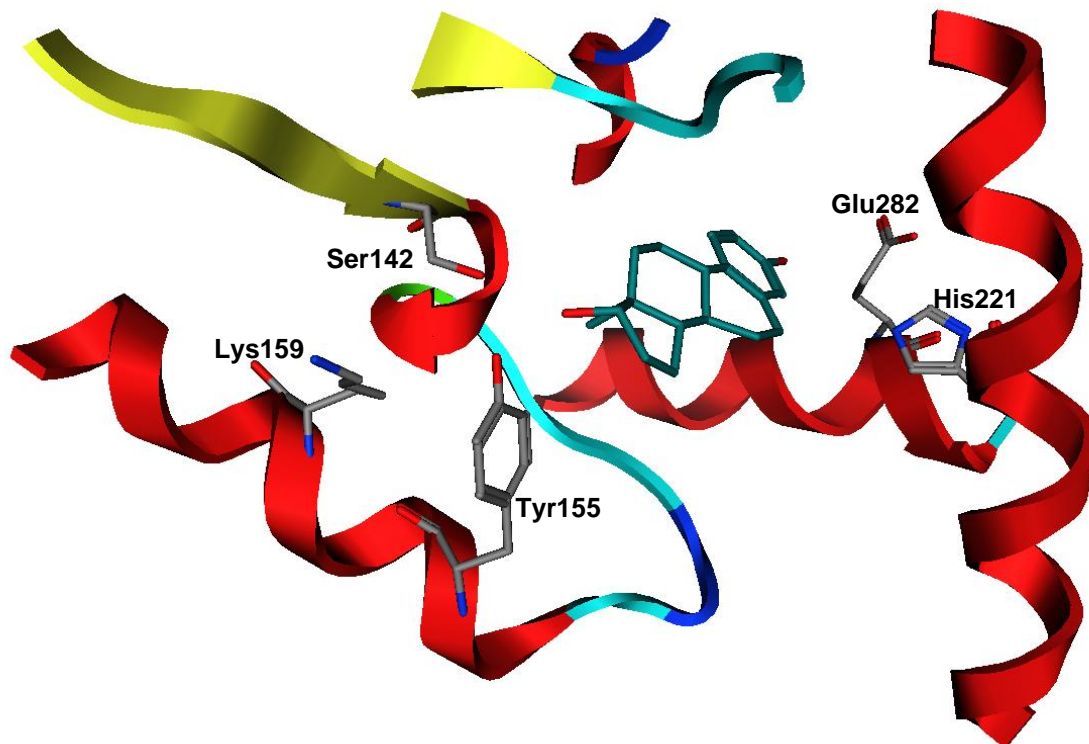


Abbildung 10 E2 (türkis) in der Substratbindetasche der 17 β -HSD1 komplexiert durch die polaren Aminosäuren an beiden Enden (PDB 1A27)

Die Bindetasche der 17 β -HSD1 ist ein enger hydrophober Tunnel, der an beiden Enden durch polare Aminosäuren begrenzt wird (Abbildung 10). Das obere Ende bilden die Aminosäuren Tyr155 und Ser142, die im aktiven Zentrum mit der Position 17 des steroidaligen Liganden wechselwirken, und das untere Ende der Tasche wird begrenzt durch His221 und Glu282, die durch Wasserstoffbrücken zur 3-OH-Gruppe das Steroid fixieren. Den hydrophoben Bereich der Bindetasche bilden die Aminosäuren Val143, Leu149, Pro187, Val225, Phe226 und Phe259 [65]. Eine wichtige Funktion kommt dabei Leu149 zu, das die Unterscheidung zwischen C19 und C18 Steroiden ermöglicht [67].

Neben der Substratspezifität lässt sich auch die Ursache für die Cofaktorpräferenz strukturell begründen. Durch die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Arg37 am N-terminalen Ende des Rossmann Fold und der Phosphatgruppe des Cofaktors in 2'-Position kann der phosphorylierte Cofaktor stabilisiert werden [68]. In 17 β -HSDs, die

NAD⁺ bevorzugen, findet sich an dieser Stelle eine negativ geladene Aminosäure (z.B. Asp), die zu einer Repulsion des phosphorylierten Cofaktors führt [69].

3.1.3 Katalysemechanismus

Die Reduktion des Ketosteroids Estron zum Hydroxysteroid Estradiol findet unter Mitwirkung der katalytischen Tetrade Ser142, Tyr155, Lys159 und Asn114 statt. Für den Mechanismus kommt sowohl ein konzertierter (gleichzeitige Übertragung von Hydrid und Proton) als auch ein sequentieller Ablauf in Frage, bei dem im ersten Schritt die Hydrid-Übertragung zur Bildung eines Oxyanions führt, das dann im zweiten Schritt zur Hydroxygruppe protoniert wird [1, 70] (Abbildung 11).

Estron wird durch Wasserstoffbrücken zwischen der C17-Ketofunktion und den Hydroxygruppen von Ser142 und Tyr155 fixiert. Im ersten Schritt erfolgt der pro-S-Hydridtransfer vom Nicotinamid-Ring des Cofaktors an die α -Seite des Steroids in 17-Position. Das so gebildete Oxyanion ist im Wasserstoffbrücken-Netzwerk der katalytischen Tetrade stabilisiert [65]. Im zweiten Schritt erfolgt der Proton-Transfer zwischen der aciden OH-Gruppe des Tyr155 auf das Oxyanion. Dies wird erleichtert durch die Wechselwirkung zwischen der protonierten Seitenkette von Lys159 und zwei konservierten Wassermolekülen [65], die unter Mitwirkung der Backbone-Carbonylfunktion von Asn114 ein Wasserstoffbrücken-Netz ausbilden. Zudem erhöht Phe192 durch T-Stacking-Wechselwirkung mit dem Phenyl-Core von Tyr155 die Acidität der phenolischen OH-Gruppe von pKa 9 auf 6 [71].

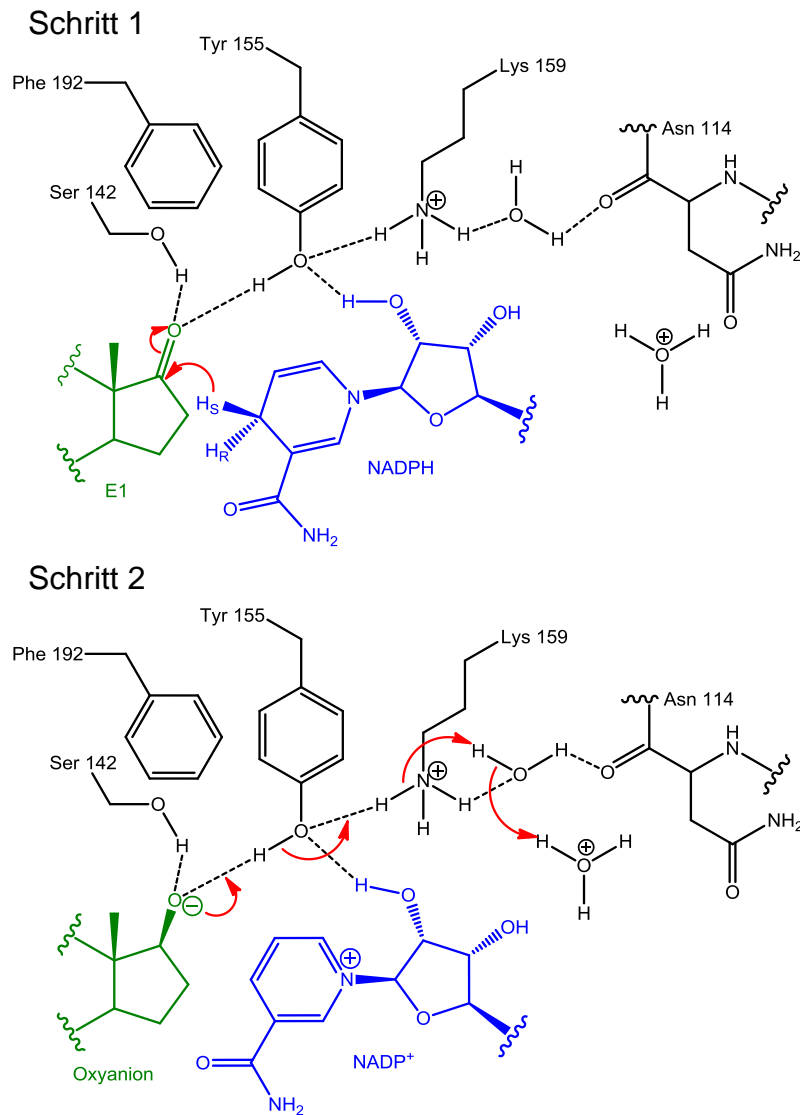


Abbildung 11 Vorgeschlagener schrittweiser Katalysemechanismus der 17 β -HSD1 (nach [1])

3.1.4 17 β -HSD1 als Target für die Behandlung estrogenabhängiger Erkrankungen

17 β -HSD1 katalysiert den letzten Schritt der Estradiol-Biosynthese: die Umwandlung des schwachen Estrogens Estron in das hochpotente Estradiol.

Die Bildung der Estrogene erfolgt prämenopausal - wie beschrieben - vor allem in den Ovarien, wo 17 β -HSD1 in den Granulosazellen [72] exprimiert wird und dort zusammen mit Aromatase für die Synthese von Estradiol aus androgenen Vorstufen verantwortlich ist. In der Placenta wird 17 β -HSD1 in den Syncytiotrophoblasten exprimiert und übernimmt dort eine wichtige Funktion in der Bereitstellung von Estradiol für die fetale Entwicklung [73]. Auch in peripheren Geweben wie den

Epithelzellen von Brust [74] und Endometrium wurde die 17 β -HSD1 Expression nachgewiesen. Das Vorkommen von 17 β -HSD1 in diesen klassischen Zielgeweben der Estrogene verdeutlicht die Rolle der 17 β -HSD1 in der intrakrinen Regulation der Estradiolspiegel.

Nach Eintritt der Menopause sinken die Estradiolspiegel im Serum aufgrund der fehlenden ovariellen Estrogensynthese auf ein Zehntel der prämenopausalen Werte ab [75]. Dennoch bleibt die intratumorale Estradiolkonzentration unverändert hoch [75, 76]. Die hohen Estrogenspiegel im Tumorgewebe werden durch die tumoreigene Synthese der Steroide erreicht, da dieses alle Enzyme enthält, die zur Biosynthese der Estrogene - ausgehend von den im Blut zirkulierenden androgenen Vorstufen - benötigt werden [16, 75]. Für die letzten Schritte der Estradiol-Bildung in Krebsgewebe werden zwei unterschiedliche Synthesewege vorgeschlagen: der so genannte Aromatase-Weg, bei dem Androgene in Estrogene umgewandelt werden und der Sulfatase-Weg, der unter Katalyse der Estronsulfatase Estronsulfat, das als Speicherform für Estron dient, in Estron umwandelt. Der letzte Schritt der Steroidbildung beinhaltet in beiden Wegen die Umwandlung von Estron in das biologisch aktive Estradiol durch die 17 β -HSD1 Aktivität. Quantitative Untersuchungen weisen darauf hin, dass in humanem Brustkrebsgewebe der Weg über die Sulfatase überwiegt [76, 77].

Untersuchungen zur Expression der drei wichtigsten an der Estradiolbiosynthese beteiligten Enzyme, Aromatase, Sulfatase und 17 β -HSD1, in Brustkrebsgewebe [75] ergaben eine deutlich höhere Expression der 17 β -HSD1 im Vergleich zu gesundem Brustgewebe. Die Beteiligung der 17 β -HSD1 am letzten Schritt der Estradiolbiosynthese und die hohe Expression des Enzyms in Brustkrebsgewebe machen es zu einem interessanten Target für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen estrogenabhängige Erkrankungen.

In gesundem Endometrium unterliegt die Expression von 17 β -HSD1 zyklischen Schwankungen und ist in der frühen und mittlutealen Phase am größten [78]. Allerdings wird der physiologische Gegenspieler 17 β -HSD2 in höherem Maße exprimiert, so dass in den Endometriumzellen die oxidative Reaktionsrichtung hin zu Estron überwiegt. Im Endometrium von Endometriosepatientinnen und in den ektopen Läsionen finden sich allerdings hohe Estradiolspiegel, die für die Entwicklung und Progression der Erkrankung von großer Bedeutung sind. Die Untersuchung der Expressionsmuster der an Estradiolsynthese und -metabolismus

beteiligten Enzyme ergab eine Expression von 17 β -HSD1 auf normalem Niveau, eine erhöhte Expression von Aromatase und ein Fehlen der 17 β -HSD2 [25, 26, 79]. Dadurch überwiegt die Estradiolbildung, während der protektive Mechanismus durch die Aktivität der 17 β -HSD2 wegfällt. Eine Hemmung der 17 β -HSD1 stellt auch hier eine Möglichkeit dar, die physiologischen Verhältnisse wiederherzustellen und ist somit ein attraktives Target in der Endometriose-therapie.

3.1.5 Targetvalidierung

Sowohl für die Indikation Brustkrebs als auch für Endometriose wurden Tiermodelle entwickelt, die zur Erbringung des *in vivo* Proof of concept für 17 β -HSD1-Inhibitoren genutzt werden können.

Bei der Etablierung eines *in vivo* Modells sind die ausgeprägten Speziesunterschiede der 17 β -HSD1 Enzyme humanen und tierischen Ursprungs zu berücksichtigen [80, 81]. Die Enzyme von Ratte und Maus, als klassische Modelltiere, weisen nur Sequenzidentitäten von 74 und 75% auf (Homologie 83%), wodurch die inhibitorische Aktivität der am humanen Enzym hochaktiven Hemmstoffe beeinflusst wird [80, 81]. Die Entwicklung von Xenograftmodellen in Nacktmäusen stellt eine gute Alternative dar. Nacktmäuse verfügen nicht über ein funktionierendes Immunsystem und eignen sich daher zur Implantation von fremden Gewebe oder Zellverbänden humanen Ursprungs. Durch Injektion von humanen Brustkrebszellen wie MCF-7 und T47D wurde in Nacktmäusen ein Tumorwachstum induziert, in dem das Targetenzym 17 β -HSD1 exprimiert ist. Durch Gabe von 17 β -HSD1-Inhibitoren ist es gelungen, die Tumorgöße zu verringern und damit das Proof of concept zu erbringen [60, 82].

Ein ähnliches Vorgehen wurde auch für Endometriose gewählt. Endometriotische Läsionen wurden durch Laparoskopie den Patientinnen entfernt und in die Bauchhöhle von Nacktmäusen eingebracht [83]. Durch die Gabe von 17 β -HSD1-Inhibitoren konnten die Expressionslevel verschiedener steroidmetabolisierender Enzyme beeinflusst werden [84, 85]. Eine Reduktion der Läsionsgröße wurde in diesem Modell bisher noch nicht berichtet. Ein weiterer Nachteil dieses Modells ist, dass vor Beginn des Versuchs keine Erkenntnisse darüber vorliegen, wie stark im Patientenmaterial das Targetenzym exprimiert wird, was den Erfolg der Gabe eines Inhibitors entscheidend beeinflusst.

Eine Alternative zum Nacktmausmodell wurde in Marmoset-Affen (*Callithrix jacchus*) etabliert [86]. Bei diesem Modell werden Endometriumfragmente in die Bauchhöhle des Affen gespült und entwickeln dort ektopische Läsionen. Dies kommt der Pathogenese der Endometriose, wie sie im Menschen postuliert wird, sehr nahe und stellt daher das natürlichste der beschriebenen Modelle dar. Zudem sind die Tiere nicht immunsupprimiert, wodurch die immunologischen Faktoren, die bei der Endometriose eine Rolle spielen, nicht unterdrückt sind. Die phylogenetische Nähe zwischen Affe und Mensch und die dadurch hohe Homologie der Enzyme machen das Modell im Marmoset-Affen sehr interessant für die Evaluierung von 17β -HSD1-Inhibitoren [81].

3.1.6 Inhibitoren der 17β -HSD1

17β -HSD1-Inhibitoren sind seit den 90er Jahren bekannt, allerdings ist bis heute kein Inhibitor in der klinischen Prüfung angekommen.

In der Klasse der steroidalen Inhibitoren wurden Substratanaloga durch Substitution des Estron- und Estradiol-Grundgerüsts in den Positionen 2, 15 und 16 synthetisiert [87-90] (Abbildung 12). Dadurch konnten hochpotente Inhibitoren mit IC_{50} -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich identifiziert werden. Aufgrund der steroidal Grundstruktur ist bei diesen Verbindungen das Risiko estrogenen Nebenwirkungen vergleichsweise hoch.

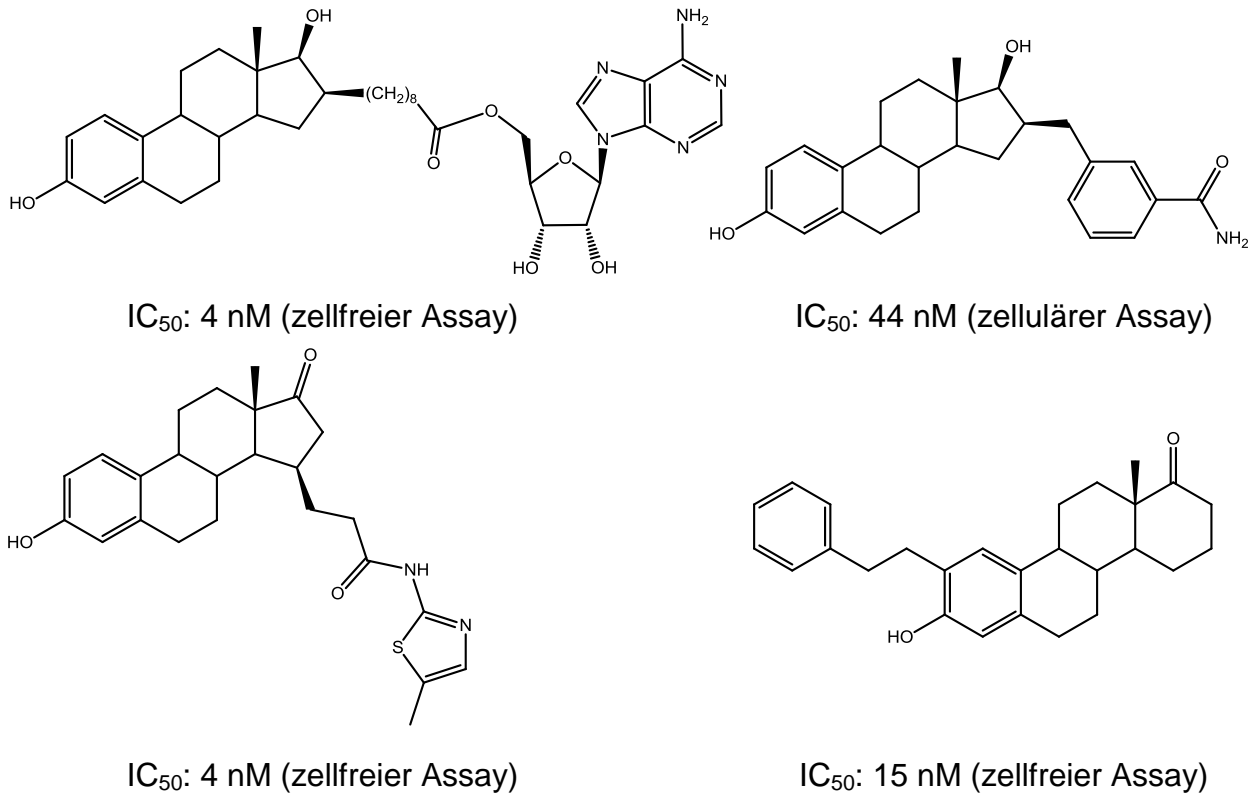
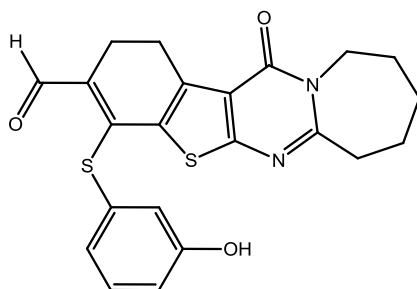


Abbildung 12 Steroidale Inhibitoren der 17 β -HSD1

Durch die Entwicklung nichtsteroidaler Inhibitoren kann mit weniger estrogenen Nebenwirkungen gerechnet werden. Hochaktive Verbindungen mit IC_{50} -Werten unter 100 nM wurden in der Klasse der Thiophenpyrimidinone identifiziert [91] (Abbildung 13). Durch die reaktive Aldehydgruppierung sind die Strukturen allerdings nicht zum *in vivo* Einsatz geeignet und müssen weiter optimiert werden.



94% Hemmung @0,1 μ M (zellfreier Assay)

Abbildung 13 Nichtsteroidaler Inhibitor der 17 β -HSD1

Ebenfalls zu den nichtsteroidalen Inhibitoren gehören die Verbindungen, die im Arbeitskreis Hartmann identifiziert wurden. Mit Verbindungen aus den Klassen der Hydroxyphenylnaphthole [92-95], der Bishydroxyphenyl-substituierten Arene und Hetarene [96-99], der Biphenylole und der heterozyklisch substituierten

Hydroxyphenylmethanone [100-102] konnten Inhibitoren mit IC_{50} -Werten im niedrig nanomolaren Bereich identifiziert werden. Für diese Inhibitorclassen wurde neben einer guten Aktivität am Targetenzym auch eine Selektivität gegenüber 17β -HSD2 erzielt. Dies ist im Hinblick auf einen späteren Einsatz als Arzneistoff wichtig, da die Inaktivierung von E2 zu E1 bei der Behandlung estrogenabhängiger Erkrankungen nicht inhibiert werden soll. Weiterhin zu berücksichtigen ist auch die Affinität der Verbindungen zu den Estrogenrezeptoren, da diese weder aktiviert noch antagonisiert werden sollen, um unerwünschte Nebenwirkungen, wie sie bei den etablierten therapeutischen Verfahren auftreten, zu vermeiden.

3.2 17β -HSD2

3.2.1 Vorkommen und Struktur

17β -HSD2 ist das zweite Mitglied, das aus der Familie der 17β -HSD-Familie identifiziert wurde [103]. 17β -HSD2 ist ein membranständiges Enzym, das intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist [104]. Wie bereits beschrieben, gehört 17β -HSD2 zu den oxidativen 17β -HSDs und katalysiert die Umwandlung von Estradiol zu Estron und von Testosteron zu Androstendion [103] (Abbildung 8). Außerdem besitzt 17β -HSD2 20α -HSD-Aktivität und wandelt 20α -Hydroxyprogesteron in Progesteron um [103].

17β -HSD2 ist aus 387 Aminosäuren aufgebaut und hat ein Molekulargewicht von 42,8 kDa [103]. Am aminoterminalen Ende findet sich ein Typ II Signal-Anker Motiv, das aus einem Cluster von Arginin- und Lysin-Resten besteht und auf das ein hydrophober Bereich aus 32 Aminosäuren folgt, dem sich wiederum ein Cluster mit negativ geladenen Aminosäuren anschließt. Das carboxyterminale Ende des Proteins enthält ein Motiv, das typisch ist für ein lumenales carboxyterminales ER-Retentionsmotiv. Dadurch ergibt sich eine N_{cyto}/C_{exo} -Orientierung für 17β -HSD2, das heißt das geladene N-terminale Ende ragt ins Cytoplasma, dann folgt der transmembranäre Bereich und das Core-Protein mit dem aktiven Zentrum liegt im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums.

Die katalytische Triade wird gebildet aus Ser219, Tyr232 und Lys236. Der katalytische Mechanismus verläuft analog zu dem der 17β -HSD1 über ein ausgeprägtes Wasserstoffbrücken-Netzwerk [66, 105].

Im Gegensatz zur cytosolischen 17 β -HSD1, deren Struktur durch eine Vielzahl von Kristallstrukturen bekannt ist, gibt es zur membrangebundenen 17 β -HSD2 keine Strukturinformationen, weder in Form von Kristallstrukturen, noch durch Protein-NMR-Studien. Die niedrige Homologie zu anderen Mitglieder der SDR-Enzymfamilie von ungefähr 20-30% erschwert die Erstellung von Homologiemodellen.

17 β -HSD2 wird in Placenta und Endometrium exprimiert, aber auch im Gastrointestinaltrakt, in Leber und Niere, Pankreas und Colon [106]. Außerdem wurde die Expression von 17 β -HSD2 im Knochen nachgewiesen [107-110]. Durch die Oxidation von aktiven Hydroxysteroiden zu den weniger aktiven Ketoformen kommt 17 β -HSD2 eine protektive Funktion vor überschießender Steroidwirkung zu.

3.2.2 17 β -HSD2 als Target in der Osteoporosetherapie

Wie bereits beschrieben, übernehmen die Estrogene eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Knochenmasse. Untersuchungen zum Estrogenstoffwechsel im Knochengewebe haben ergeben, dass hier die Enzyme vorhanden sind, um Estradiol aus zirkulierenden Vorstufen aufzubauen, dass aber auch estradiol-inaktivierende Enzyme wie 17 β -HSD2 exprimiert sind [107, 109]. In den Osteoblasten wurde in verschiedenen Studien die Expression von 17 β -HSD2 nachgewiesen, außerdem wurde gezeigt, dass in Osteoblasten die Estradiol-inaktivierung die vorherrschende Reaktionsrichtung ist [109]. Eine Hemmung der 17 β -HSD2 würde lokal zu erhöhten Estradiolspiegeln führen und hätte daher positive Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel. Neben dem Abbau von Estradiol würde auch die Umwandlung von Testosteron in Androstendion gehemmt und die positiven Auswirkungen von Testosteron (osteoanabole Wirkung) käme zusätzlich zum Tragen. In Osteoclasten wurde die Expression von 17 β -HSD2 bisher erst in Knochengewebe von Ratten nachgewiesen.

In einer Proof of concept-Studie in ovariectomierten Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) wurde der Effekt eines nichtsteroidalen 17 β -HSD2-Inhibitors auf den Erhalt der Knochendichte untersucht [111]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Knochenresorption reduziert und der Knochenumbau verringert werden konnte, außerdem wurde ein positiver Effekt auf die Knochenstärke erzielt. Während der Studie wurden auch die Blutspiegel von Estradiol, Testosteron und Androstendion überwacht. Die Gabe des 17 β -HSD2-Inhibitors hatte keinen Einfluss auf die Spiegel der untersuchten Steroide. Dies steht im Einklang mit dem therapeutischen Konzept,

nach dem die therapeutische Wirkung nur durch eine lokale Beeinflussung der Hormonspiegel erreicht werden soll, während die Serumspiegel unbeeinflusst bleiben, um Nebenwirkungen zu vermeiden.

3.2.3 Bekannte Inhibitoren der 17 β -HSD2

Bis heute sind nur wenige Inhibitoren der 17 β -HSD2 in der Literatur beschrieben. In einer frühen Studie untersuchten Blomquist *et al.* die inhibitorische Wirkung verschiedener Steroide auf die 17 β -HSD2-Aktivität in Lebermikrosomen. Dabei wurden Ethinylestradiol und Danazol als Inhibitoren mit K_i -Werten von 0,3 und 0,6 μ M identifiziert [112]. In der Folge wurden Untersuchungen mit Spirolactonderivaten von Estradiol durchgeführt, in der das C18 Spiro- δ -lacton als sehr potenter Inhibitor mit einem K_i -Wert von 29 nM identifiziert wurde [113]. In der Klasse der steroidal Inhibitoren wurden auch fluorierte Estratrien-Derivate mit moderater Hemmung der 17 β -HSD2 identifiziert (62-95% Hemmung bei 2 μ M Inhibitor) [114].

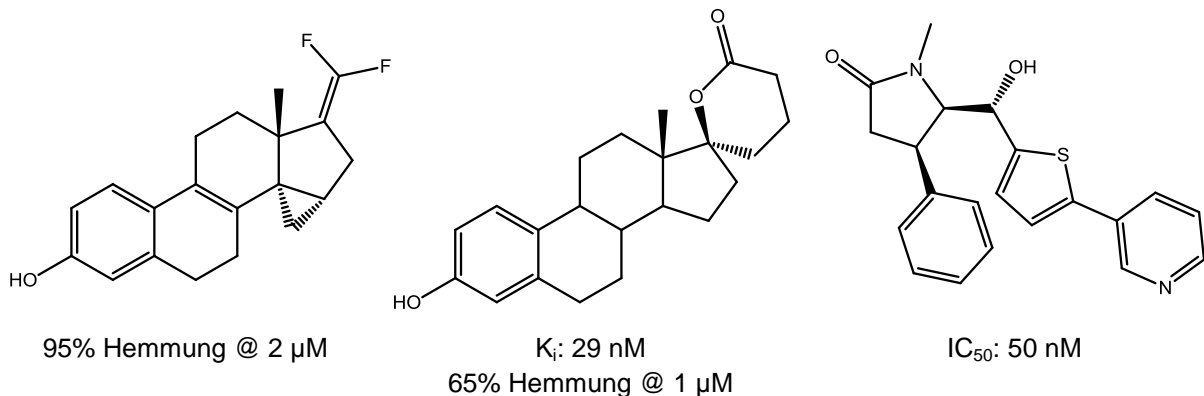


Abbildung 14 Inhibitoren der 17 β -HSD2

Pyrrolidinonderivate wurden als potente nichtsteroidale 17 β -HSD2-Hemmstoffe identifiziert [115, 116]. Die aktivste Verbindung dieser Serie hemmt 17 β -HSD2 mit einem IC_{50} von 50 nM. Dieser Inhibitor wurde auch für die Durchführung der oben beschriebenen Proof of concept Studie ausgewählt [111].

Im Arbeitskreis Hartmann wurden in der Klasse der Bishydroxyphenyltriazole [99] und -(is)oxazole Verbindungen mit inhibitorischer Aktivität gegenüber 17 β -HSD2 identifiziert. Auch in der Klasse der Hydroxyphenylnaphthole konnten in Abhängigkeit von der Stellung des Hydroxysubstituenten selektive 17 β -HSD2-Inhibitoren gefunden werden [117]. Ein ähnliches Phänomen wurde auch in der Klasse der heterozyklisch substituierten Biphenylole beobachtet. In diesem Fall führte die Art der

Pyridinsubstitution zu entweder 17β -HSD1 oder 17β -HSD2 selektiven Verbindungen [102].

Ziel der Arbeit

Estradiol hat als potentes weibliches Sexualhormon eine wichtige Funktion sowohl bei physiologischen als auch bei pathophysiologischen Vorgängen. So ist Estradiol beteiligt am Fortschreiten von estrogenabhängigen Erkrankungen wie Brustkrebs und Endometriose. Auf der anderen Seite spielt das Absinken der Estrogenspiegel im Rahmen der Menopause eine wichtige Rolle in der Entstehung der Osteoporose.

17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen regulieren die intrazelluläre Verfügbarkeit von Estradiol, indem 17 β -HSD1 das schwach aktive Estron zu Estradiol reduziert und 17 β -HSD2 als Gegenspieler das potente Estradiol zu Estron inaktiviert.

Ein Eingriff in dieses regulierende System der 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen bietet daher die Möglichkeit sowohl estrogenabhängige Erkrankungen durch Hemmung von 17 β -HSD1 positiv zu beeinflussen als auch Erkrankungen, die auf einem Estrogenmangel beruhen, durch Hemmung der 17 β -HSD2 zu behandeln.

An Inhibitoren der 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen sind daher verschiedene Anforderungen zu stellen. Neben der hohen Aktivität am jeweiligen Targetenzym ist eine Selektivität gegenüber dem anderen als Gegenspieler agierenden Subtyp erforderlich. Um Nebenwirkungen zu vermeiden, sollte keine Affinität zu den Estrogenrezeptoren α und β vorhanden sein. Die Hemmwirkung der Inhibitoren muss zudem auch intrazellulär nachgewiesen werden. Um als Arzneistoffe in Frage zu kommen, müssen die Hemmstoffe auch den pharmakokinetischen Anforderungen genügen. Zu diesem Zweck wurde im Arbeitskreis Hartmann ein Screeningsystem etabliert, mit dem schrittweise die oben genannten Anforderungen überprüft und so rechtzeitig nicht geeignete Substanzen aussortiert werden.

Dieses Screeningsystem sollte für die beiden Targetenzyme 17 β -HSD1 und 17 β -HSD2 durch einen zellulären Assay in Targetzellen erweitert werden.

Ein rationales Wirkstoffdesign nutzt verschiedene Ansätze, um zielgerichtet neue Verbindungen als mögliche Inhibitoren zu entwickeln. Bei Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Targetproteins liefert die Analyse der Bindetasche wichtige Informationen über die Aminosäuren, die als Wechselwirkungspartner für die Hemmstoffe genutzt werden können. Für 17 β -HSD1 stehen zahlreiche Kristallstrukturen zur Verfügung, allerdings gibt es keine Informationen über die

Bindung nichtsteroidaler Inhibitoren. Daher sollte in dieser Arbeit versucht werden ein Cokristalliat zwischen 17 β -HSD1 und nichtsteroidalen Inhibitoren herzustellen.

Stehen keine Strukturinformationen zur Verfügung kann ein ligandbasiertes Inhibitor-design zum Einsatz kommen, mit dem durch Imitation des physiologischen Substrates oder anderer bekannter Liganden neue Inhibitorstrukturen gefunden werden können. Durch diesen Ansatz wurden im Arbeitskreis Hartmann für 17 β -HSD2 mehrere Substanzklassen mit hochpotenten Hemmstoffen identifiziert. Für diese verschiedenen Inhibitor-klassen sollte der Hemmmechanismus mittels enzymkinetischer Untersuchungen überprüft werden.

Im Einzelnen sollten folgende Ziele mit der vorliegenden Arbeit verfolgt werden

- Etablierung eines zellulären Hemmstoffassays für 17 β -HSD1-Inhibitoren in T47D-Zellen
- Screening der 17 β -HSD1-Substanzbibliothek im etablierten Assay und Identifizierung von wirksamen Verbindungen, die für eine weitere Entwicklung in Frage kommen
- Enzympräparation, Aufreinigung und Cokristallisation von 17 β -HSD1 mit zwei nichtsteroidalen 17 β -HSD1-Inhibitoren
- Aufklärung des Hemmmechanismus ausgewählter 17 β -HSD2-Hemmstoffe mit Hilfe von Enzymkinetikstudien
- Auswahl von geeigneten Targetzellen und Etablierung eines zellulären Assays für 17 β -HSD2-Hemmstoffe
- Überprüfung der Eignung der ausgewählten Zellen für mögliches *in vitro* Proof of concept

Ergebnisse

4 Die Etablierung eines zellulären Assays zur Evaluierung von 17 β -HSD1-Hemmstoffen

4.1 Ausgangspunkt

In den bereits im Arbeitskreis etablierten zellfreien Assays konnten an 17 β -HSD1 hochaktive und gegenüber 17 β -HSD2 selektive Inhibitoren aus verschiedenen Substanzklassen identifiziert werden. Als nächster Schritt sollte die intrazelluläre Wirksamkeit der Substanzen in den Targetzellen evaluiert werden.

Für die Etablierung eines zellulären Hemmstoffassays sollte eine Zelllinie ausgewählt werden, die folgende Anforderungen erfüllt:

1. Expression des Targetenzym 17 β -HSD1
2. Eignung für weitere Assays zur Erbringung des Proof of concepts
3. Quelle der Zelllinie steht im Zusammenhang mit der zu behandelnden Indikation

Daraus ergeben sich konkret folgende Anforderungen neben der Expression von 17 β -HSD1. Zur Erbringung eines Proof of concept muss die Zelllinie die Estrogenrezeptoren α und β exprimieren. Eine Expression von 17 β -HSD2 ist kein Ausschlusskriterium, da dies die natürlichen Verhältnisse innerhalb des Tumorgewebes widerspiegelt.

Eine Zelllinie, die diese Anforderungen erfüllt, ist die Brustkrebszelllinie T47D [118]. Die aus einem duktalem Mammakarzinom isolierte Zelllinie exprimiert 17 β -HSD1 und 17 β -HSD2 sowie die Estrogenrezeptoren α und β und wurde für die Etablierung des zellulären Hemmstoffassays für 17 β -HSD1-Inhibitoren ausgewählt.

4.2 Voruntersuchungen

Im zu etablierenden Assay sollte die Umwandlung von E1 zu E2 durch die in den Zellen exprimierte 17 β -HSD1 untersucht werden. Analog zu dem bereits im Arbeitskreis etablierten zellfreien Assay sollte radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt werden, was eine einfache Analytik des entstehenden Produktes E2 mittels HPLC mit Radiodetektion erlaubt.

Da über die Aktivität der T47D-Zellen unter unseren Kulturbedingungen keine Informationen vorlagen, wurde als Startpunkt das 12-well Format benutzt, was den

Einsatz einer hohen Zellzahl im Assay möglich macht. Die Substratkonzentration betrug 500 nM E1 in Anlehnung an die Bedingungen im zellfreien Assay. Der E1-Umsatz wurde in Abhängigkeit von der Zellzahl nach 24 h gemessen. Wie in Abbildung 15 zu sehen, nahm der Umsatz mit steigender Zellzahl zu und lag bei Zellzahlen zwischen 1 und 2,25 Mio pro well zwischen 17 und 40%. Mit einer Zellzahl von 2 Mio Zellen pro well wurde dabei ein Umsatz von ca. 30% in 24 h erreicht.

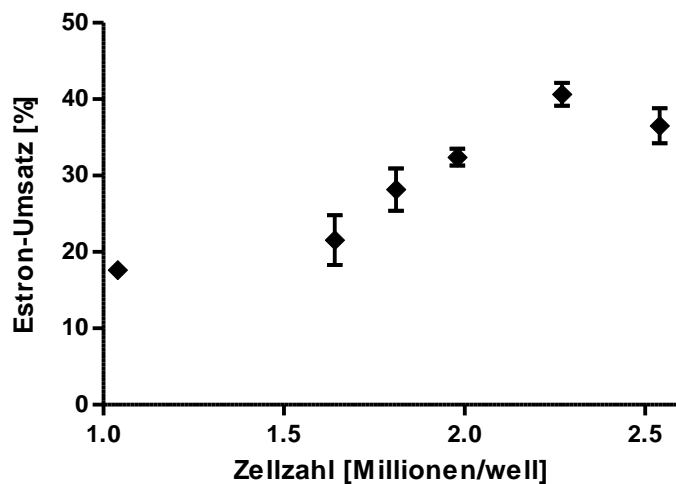


Abbildung 15 Umsatz von 500 nM E1 in Abhängigkeit von der Zellzahl nach 24h

4.2.1 Auswahl des geeigneten Mediums

Die Zellen wurden standardmäßig in RPMI-Medium mit Zusatz von 10% FKS kultiviert, dem Insulin als Wachstumsfaktor zugesetzt wurde. Dieser hohe Proteingehalt erwies sich in der Testdurchführung als problematisch, da nach Beendigung der Inkubation die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Steroide mit Ether extrahiert wurden. Dabei wurden die Proteine durch das organische Lösungsmittel denaturiert. Bei hoher Proteinkonzentration bildete sich dabei ein festes Gel und die Abtrennung der Etherphase wurde nahezu unmöglich.

Für die Durchführung der Inkubationen wurde daher auf den Zusatz von FKS im Testmedium verzichtet. Das verwendete RPMI-Medium bringt einen weiteren Nachteil mit sich. Aufgrund des enthaltenen Insulins zeigt RPMI-Medium ungünstige Benetzungseigenschaften, die während des Testvorgangs stören. Durch den Wechsel zu DMEM-Medium für die Testdurchführung konnten diese Schwierigkeiten umgangen werden.

4.2.2 Untersuchung des Einflusses von exogenem Cofaktor

Der für die Aktivität der 17 β -HSD1 benötigte Cofaktor NADPH wird intrazellulär gebildet und durch das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase System reguliert. Daher wird auch ohne Zusatz externer Cofaktoren E1 zu E2 umgewandelt. 17 β -HSD1 akzeptiert neben NADPH auch NADH als Cofaktor, weist jedoch zu dem intrazellulär im Überschuss vorliegenden NADPH eine höhere Affinität auf als zu NADH. Um nun festzustellen, ob die Reaktion durch Zugabe von Cofaktor beeinflusst werden kann, wurden dem Ansatz verschiedene Konzentration der reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH zugesetzt und die Produktbildung nach 24 h verglichen.

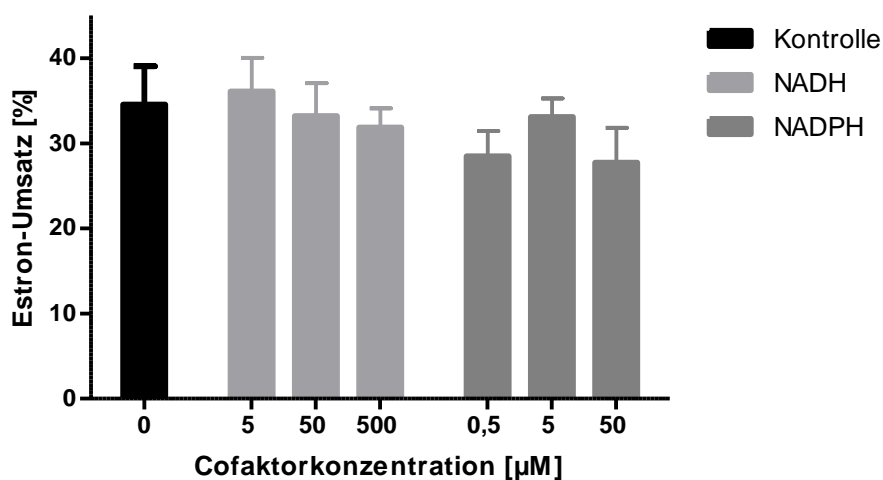


Abbildung 16 Einfluss von exogen zugesetztem Cofaktor auf den E1-Umsatz in T47D-Zellen

Wie in Abbildung 16 zu sehen, lässt sich der Umsatz nicht signifikant durch extern zugesetzte Faktoren beeinflussen, was dafür spricht, dass die Cofaktorverhältnisse durch die intrinsisch vorhandenen Enzymsysteme sehr gut reguliert werden und die unter den Kulturbedingungen vorhandenen Redoxverhältnisse den Ablauf der Reaktion nicht limitieren.

Eine Supplementierung der Testansätze mit Cofaktor kann daher unterbleiben.

4.3 Optimierung des Assays im 24-well Format

Durch die Untersuchungen im 12-well Format konnten wichtige Punkte für die Etablierung des Tests, wie eine grobe Einschätzung der Umsatzrate und die Bedeutung von Additiven, abgeklärt werden. Für einen Routineeinsatz ist jedoch ein kleineres Testformat zu bevorzugen, um den Probendurchsatz zu erhöhen und

Material einzusparen. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse wurden daher auf das 24-well Format übertragen.

4.3.1 Wahl der Zellzahl

Zur Auswahl der Zellzahl wurden die Zellen in verschiedener Dichte zwischen 200000 und 1,3 Mio Zellen pro well in einer 24 well-Platte ausgesät und visuell die Zellzahl ermittelt, mit der nach 24 h ein konfluenten Monolayer erreicht wird. Eine Zellzahl von 1 Mio Zellen pro well stellte sich dabei als optimal heraus.

4.3.2 Zeitreihe

Im Laufe der weiteren Etablierung des Zelltestes sollte untersucht werden, wie die E2-Bildung in Abhängigkeit von der Zeit erfolgt. Dazu wurden 1 Mio Zellen pro Vertiefung einer 24-well Platte ausgesät und die Zellen nach 24 Stunden mit 250 nM und 500 nM E1 für eine Dauer von 12 h inkubiert. In Intervallen von 1 h wurden die Zellüberstände abgenommen und die Umsetzung von E1 zu E2 analysiert (Abbildung 17). Der Umsatz nimmt proportional mit der Zeit zu und die Produktbildung erfolgt mit einer Rate von $5,14 \pm 0,55$ pmol/h/ 10^6 Zellen.

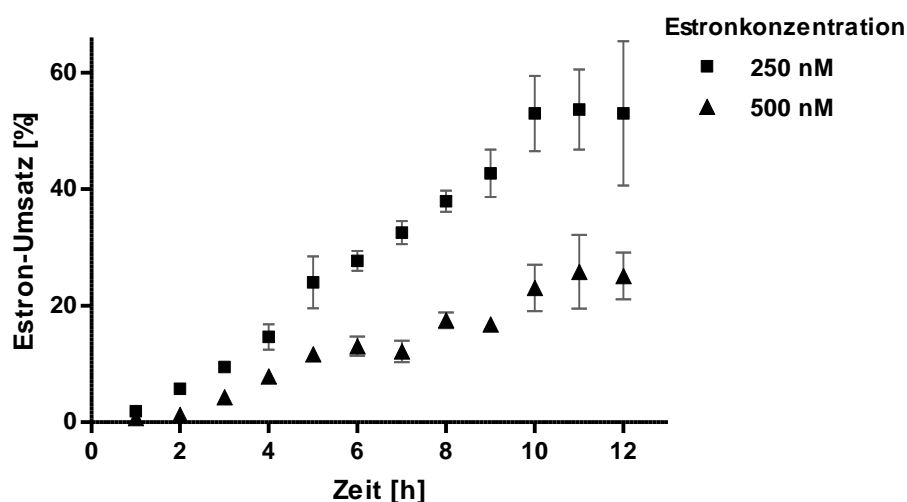


Abbildung 17 E1-Umsatz in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen

4.3.3 K_m -Wert Bestimmung

Ein für die Entwicklung eines Hemmstoff-Assays wichtiger Parameter ist der K_m -Wert des eingesetzten Substrates zum Targetenzym. Im späteren Hemmstoffassay sollte die Substratkonzentration so gewählt werden, dass sie in der Nähe des K_m -Wertes oder darunter liegt [119].

Für die K_m -Wert Bestimmung wurden die Zellen mit verschiedenen E1-Konzentrationen im Bereich von 25 nM – 500 nM inkubiert. Die Reaktionen wurden über acht Stunden zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. Aus den Steigungen der Umsatz-Zeitkurven wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten für die jeweiligen Substratkonzentrationen abgeleitet. Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration ergibt eine Hyperbel (Abbildung 18).

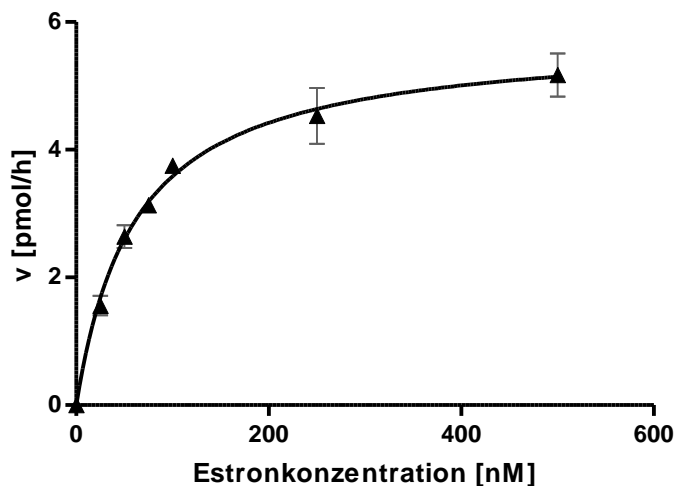


Abbildung 18 K_m -Wert-Bestimmung für E1 in T47D-Zellen

Die Hyperbel wird durch die Gleichung nach Michaelis und Menten beschrieben:

$$v = \frac{v_{\max} \times S}{K_m + S}$$

Dabei ist v die Reaktionsgeschwindigkeit in [pmol/h] bei einer bestimmten Estronkonzentration S . v_{\max} ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_m die Michaelis-Menten Konstante.

Der K_m -Wert wurde durch nichtlineare Regressionsanalyse bestimmt und liegt bei 66 nM. Auf den Einsatz von Linearisierungsverfahren zur Bestimmung des K_m -Wertes, wie den Lineweaver-Burk-Plot oder das Lee-Wilson-Verfahren, wurde bewusst verzichtet, weil durch die Berechnung reziproker Werte häufig große Fehler in die Bestimmung eingeführt werden.

Ergebnisse

Bei einem K_m -Wert von 66 nM ist die in den Vorversuchen verwendete Substratkonzentration von 500 nM E1 für die Testung von Hemmstoffen nicht zu vertreten, da man dabei unter den Bedingungen der Substratsättigung arbeiten würde, was insbesondere bei der Testung kompetitiver Hemmstoffe zu verfälschten Hemmwerten führen würde. Für die weiteren Hemmstofftests wurde die Substratkonzentration daher auf 50 nM E1 festgelegt und liegt somit um Faktor 10 niedriger als im zellfreien Assay.

4.3.4 Festlegung der Inkubationszeit

Nachdem die Substratkonzentration auf 50 nM fixiert worden war, sollte nun untersucht werden, über welche Inkubationszeit der Hemmstofftest durchzuführen ist. Für die spätere Testung ist wichtig, dass die Inkubationszeit im linearen Bereich der Umsatz-Zeitkurve liegt. Dies ist typischerweise bei einem Umsatz von 20-25% der Fall.

Die Zellen wurden daher mit 50 nM E1 für die Dauer von 8 h inkubiert und die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt (Abbildung 19).

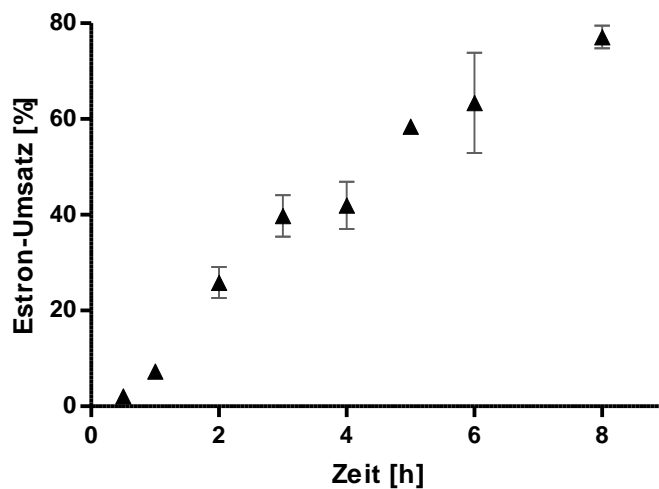


Abbildung 19 Zeitreihe für die Umsetzung von 50 nM E1 in T47D-Zellen

Der Umsatz nimmt über 3 h linear zu, danach flacht die Kurve langsam ab. Nach 2 h liegt der Umsatz bei 25%. Die Inkubationszeit wurde auf 2,25 h festgelegt.

4.4 Untersuchung des 17β -HSD2 katalysierten E2-Umsatzes

T47D-Zellen exprimieren neben 17β -HSD1 auch den physiologischen Gegenspieler, die 17β -HSD2, die E2 zu E1 umsetzt. Da bei einer zu starken 17β -HSD2-Aktivität in den T47D-Zellen die erhaltenen Hemmwerte dadurch verfälscht sein könnten, sollte das Ausmaß des E2-Umsatzes in den Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen entweder mit 50 nM E1 oder mit 50 nM E2 inkubiert und nach 2,25 h der Steroidumsatz bestimmt (Abbildung 20).

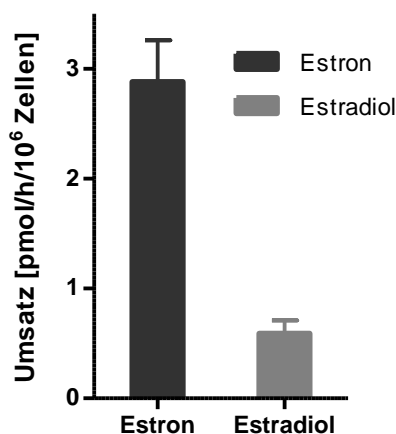


Abbildung 20 Umsetzung von E1 bzw. E2 unter Testbedingungen in T47D-Zellen

Die Aktivität der 17β -HSD1 überwiegt also deutlich, so dass ein Einfluss der 17β -HSD2 auf die bestimmten Hemmwerte vernachlässigbar sein sollte.

4.5 Optimierung der Inkubationszeit nach Wechsel der FKS-Charge

Da die während der Etablierung des Assays verwendete FKS-Charge von Sigma nicht mehr zur Verfügung stand, musste eine neue FKS-Charge gefunden werden, die zur Kultivierung der T47D Zellen geeignet ist. Sera Plus FKS von PanBiotech stellte sich dabei als geeigneter Ersatz heraus. Im Gegensatz zu herkömmlichen FKS-Produkten wird für die Herstellung von SeraPlus das Serum im Herstellungsprozess in einzelne Komponenten aufgetrennt. Anschließend werden diese in einem definierten Verhältnis wieder zusammengeführt. Dadurch lassen sich Schwankungen in der Zusammensetzung zwischen verschiedenen Chargen, die bei den Standardserumprodukten üblich sind, weitgehend vermeiden. T47D-Zellen wuchsen in Medium mit SeraPlus langsamer, jedoch erhöhte sich der Umsatz im Zelltest so stark, dass eine Anpassung der Inkubationszeit erforderlich war. Dazu wurde eine neue Umsatz-Zeit-Kurve über eine Dauer von 8 h aufgenommen (Abbildung 21).

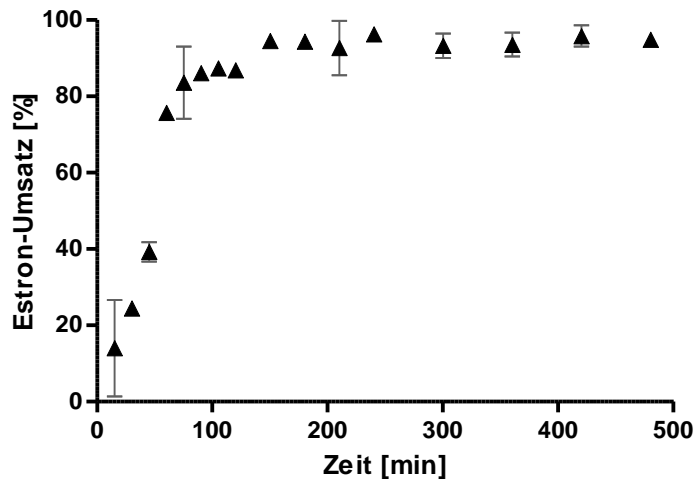


Abbildung 21 Zeitkurve für die Umsetzung von 50 nM E1 in T47D nach Wechsel auf SeraPlusFKS

Die Umsetzung verläuft für ca. 60 min linear. Nach 30 min ist ein Umsatz von ca. 25% erreicht. Unter Verwendung von Sera Plus FKS wurde daher die Inkubationszeit auf 30 min festgesetzt. Um auszuschließen, dass durch den FKS-Austausch auch andere Parameter beeinflusst werden, wurde die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse anhand von Verbindung EJB 230 überprüft. Dabei konnte der IC_{50} -Wert, der zuvor bestimmt worden war, bestätigt werden.

Der Einsatz von Sera Plus Medium bringt so zwei entscheidende Vorteile mit sich. Zum einen können durch die definierte Zusammensetzung des Serums erneute Anpassungen des Tests vermieden werden. Zweitens lässt sich die Testdauer um zwei Stunden verkürzen.

4.6 Einführung einer Referenzverbindung

Um die Vergleichbarkeit des entwickelten Assays mit den zellulären Testsystemen anderer Gruppen zu überprüfen, wurde eine Referenzverbindung evaluiert. Da keine 17β -HSD1-Inhibitoren käuflich zu erwerben oder als Therapeutika etabliert sind, wurde auf eine bereits beschriebene Substanz einer anderen Arbeitsgruppe zurückgegriffen. Das Thiophenpyrimidinonderivat **A** wurde uns freundlicherweise von der Hormos Medical Corporation (Turku, Finnland) zur Verfügung gestellt (Abbildung 22).

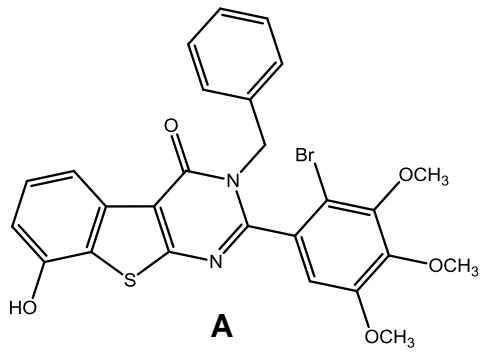


Abbildung 22 Referenzverbindung: 17 β -HSD1-Inhibitor [120]

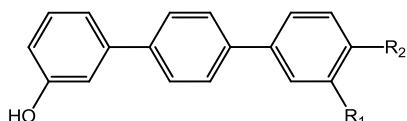
Die Verbindung erzielte in dem hier etablierten Assay bei einer Inhibitorkonzentration von 1 μ M eine Hemmung von $88,9 \pm 5,0\%$. Dies stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen Wert von 67% bei 1 μ M Hemmstoff recht gut überein [120].

4.7 Testung neuer nichtsteroidaler 17 β -HSD1-Hemmstoffe

Mit dem etablierten zellulären Assay konnten nun vielversprechende Inhibitoren, die in unserem Arbeitskreis entwickelt worden waren, auf ihre intrazelluläre Wirksamkeit am Targetenzym überprüft werden.

4.7.1 Bishydroxyphenyl-substituierte (Het-)Arene

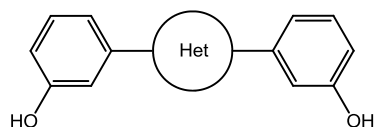
Bishydroxyphenyl-substituierte Benzene



Verb.	R ₁	R ₂	Hemmung	Hemmung	Selektivitätsfaktor	Hemmung
			17 β -HSD1 zellfrei	17 β -HSD2 zellfrei		17 β -HSD1 Zelltest
			IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]		
AO5	OH	H	173	2259	13	316
AO50	OH	F	51	253	5	203
AO44	CH ₃	OH	171	1248	7,3	676
AO52	F	OH	123	872	7	183

Aus der Klasse der Bishydroxyphenyl-substituierten Benzene wurden vier hochaktive Vertreter ausgewählt, die neben einer starken Hemmung der 17 β -HSD1 im zellfreien Assay auch selektiv gegenüber 17 β -HSD2 (SF \geq 5) waren. Die beiden Fluor-substituierten Derivate AO50 und AO52 zeigen dabei die stärkste intrazelluläre Hemmung mit IC₅₀-Werten von 203 bzw. 183 nM. AO50 weist intrazellulär einen 4-fach höheren IC₅₀-Wert (51 vs. 203 nM) als im zellfreien Assay, während die Hemmaktivität von Verbindung AO52 im zellulären System nur minimal abnimmt (123 vs. 183 nM). Die beiden äquipotenten Derivate AO5 und AO44 zeigen im Zellassay IC₅₀-Werte von 216 und 676 nM und damit eine um Faktor 2 bzw. 4 verringerte Hemmwirkung im Vergleich zum zellfreien Assay.

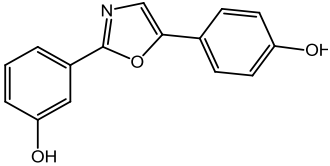
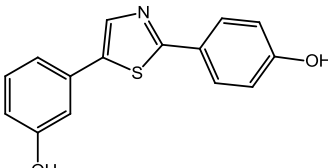
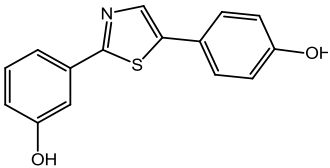
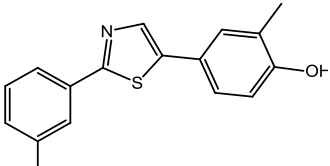
Bishydroxyphenyl-substituierte Azabenzene und Chinoline



Verb.		Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
		17 β -HSD1	17 β -HSD2	faktors-	17 β -HSD1
		zellfrei	zellfrei		Zelltest
		IC ₅₀	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]
LW01		101	3399	34	382
LW05		201	5102	4	225
AO55		258	86	0,3	480

Die Verbindungen LW01 und LW05 wurden als Vertreter der Bishydroxyphenyl-substituierten Azabenzene evaluiert. LW05 zeigt im Zelltest eine vergleichbare Hemmwirkung zum zellfreien System (225 vs. 201 nM). Die intrazelluläre Hemmung von 17 β -HSD1 durch das Pyridinderivat LW01 ist jedoch 3,8 fach schwächer als im zellfreien Assay (101 vs. 382 nM). Bei dem Chinolinderivat AO55 handelt es sich um einen 17 β -HSD2-Hemmstoff mit moderater Hemmung an 17 β -HSD1 (258 nM). Im Zellassay ist dieser Inhibitor um Faktor 2 schwächer wirksam als im zellfreien Assay (480 nM).

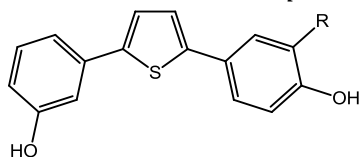
Bishydroxyphenyl-substituierte N-Heterozyklen

Verb.	Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
	17 β -HSD1 zellfrei	17 β -HSD2 zellfrei	faktor	17 β -HSD1 Zelltest
	IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]
EJB159C 	313	17470	56	384
EJB100A 	1142	2670	2,3	522
EJB102C 	50	4004	80	125
EJB226A 	143	2023	14	605

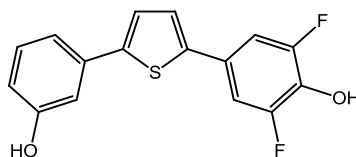
Das Bishydroxyphenyl-substituierte Oxazol EJB 159C ist ein moderater Hemmstoff der 17 β -HSD1 mit guter Selektivität gegenüber 17 β -HSD2. Die intrazelluläre Wirkung entspricht mit einem IC₅₀-Wert von 384 nM der Hemmung im zellfreien System (313 nM). Bioisosterer Austausch des Oxazols gegen ein Thiazol führt zu dem hochaktiven Inhibitor EJB102C, der mit einem IC₅₀ von 125 nM im Zellassay den stärksten Hemmstoff dieser Reihe darstellt. Interessanterweise handelt es sich bei dem Konstitutionsisomeren EJB100A nur um einen schwachen Hemmstoff der 17 β -HSD1 im zellfreien System (1142 nM), der jedoch im Zellassay mit einem IC₅₀ von 522 nM eine stärkere Hemmung aufweist. Das Methyl-substituierte Derivat EJB226A verliert mit einem zellulären IC₅₀ von 605 nM deutlich an Hemmaktivität.

Bishydroxyphenylthiophene

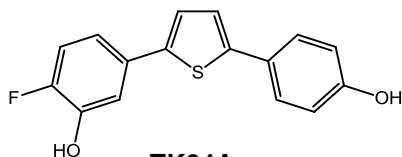
2,5 substituierte Thiophene



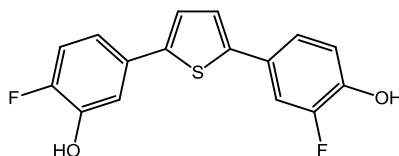
EJB110A EJB139A
EJB230A EJB245A



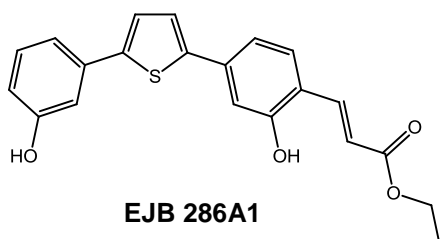
EJB 238A1



TK04A



TK13A



EJB 286A1

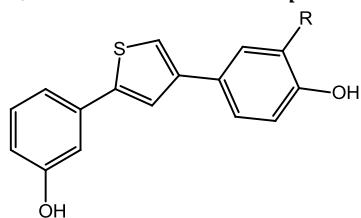
Verb.		Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
		17 β -HSD1	17 β -HSD2	faktor	17 β -HSD1
		zellfrei	zellfrei		Zelltest
		IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]
EJB110A	H	69	1953	28	469
EJB139A	CH ₃	46	1971	49	425
EJB230A	F	8	940	118	282
EJB245A	CF ₃	38	97	2,6	523
EJB238A	-	56	312	6	255
TK04A	-	42	463	11	387
TK13A	-	17	213	13	160
EJB286A1	-	130	502	4	812

In der Klasse der 2,5-Bishydroxyphenyl-substituierten Thiophene konnten im zellfreien Assay eine ganze Reihe hochaktiver Inhibitoren der 17 β -HSD1 identifiziert werden. Darunter das Fluor-substituierte Derivat EJB230, das die aktivste und selektivste Verbindung dieser Reihe darstellt. Leider musste bei allen Verbindungen

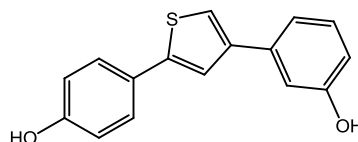
Ergebnisse

ein starker Wirksamkeitsverlust im zellulären System festgestellt werden. Die beste Hemmung erzielt mit einem IC_{50} -Wert von 160 nM das zweifach Fluor-substituierte Derivat TK13A.

2,4 substituierte Thiophene



EJB122A, EJB225A, AO36



EJB114A

Verb.		Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
		17 β -HSD1	17 β -HSD2	faktor	17 β -HSD1
		zellfrei	zellfrei		Zelltest
		IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]		IC_{50} [nM]
EJB114A	-	151	1690	11	404
EJB122A	H	77	1271	16	413
EJB225A	CH ₃	64	869	14	362
AO36	F	64	510	8	64

In der Klasse der 2,4-Bishydroxyphenyl-substituierten Thiophene wurde das para,meta-substituierte Derivat EJB 114A und die meta,para-substituierten Derivate EJB122A, EJB225A und AO36 getestet. Im zellfreien Assay ist dabei das meta,para-Substitutionsmuster im Hinblick auf die inhibitorische Wirkung an 17 β -HSD1 zu bevorzugen. Vergleicht man die Isomere EJB114A und EJB122A, lässt sich dieses Kriterium für die zelluläre Wirkung nicht übertragen: beide Isomere sind im zellulären System gleich aktiv mit IC_{50} -Werten im Bereich von 400 nM.

Interessanterweise lässt sich die intrazelluläre Wirksamkeit durch Derivatisierung am para-Hydroxyphenylring steigern. Das Methylderivat weist einen IC_{50} -Wert von 362 nM auf. Bei gleicher Wirksamkeit im zellfreien System wurde mit dem Fluor-substituierten Derivat AO36 mit einem IC_{50} -Wert von 64 nM der intrazellulär aktivste Hemmstoff dieser Substanzklasse gefunden.

Untersuchung der Rolle der Inkubationsbedingungen als Ursache für die Abweichungen zwischen Zelltest und zellfreiem Assay

Verbindungen aus der Klasse der Bishydroxyphenylthiophene wurden als hochaktive Inhibitoren der 17β -HSD1 im zellfreien Assay identifiziert. Im zellulären System zeigen sie jedoch um bis zu Faktor 70 schlechtere Hemmwerte. In beiden Testsystemen wird als Substrat E1 eingesetzt, im zellfreien Assay in einer Konzentration von 500 nM bzw. 50 nM im Zelltest. Neben der Substratkonzentration unterscheiden sich die Assays im verwendeten Cofaktor. Im zellulären Assay steht physiologisch NADPH als Cofaktor für die Umsetzung von E1 zu E2 zur Verfügung während im zellfreien Assay NADH als Cofaktor eingesetzt wird. 17β -HSD1 weist eine höhere Affinität zu NADPH auf und der K_m -Wert für E1 ändert sich ebenfalls in Abhängigkeit des eingesetzten Cofaktors und ist bei Einsatz von NADPH um Faktor 6 niedriger [62]. In Dockingstudien wurde für einige Vertreter der 2,5-Bishydroxyphenyl-substituierten Thiophene eine Wechselwirkung der Inhibitoren mit dem Cofaktor gefunden [97]. Um zu überprüfen, ob der unterschiedliche Cofaktor in den Assaysystemen die Ursache für das deutlich schlechtere Abschneiden der Hemmstoffe im zellulären Assay ist, wurde der zellfreie Assay modifiziert und einzelne Hemmstoffe im modifizierten zellfreien Assay erneut getestet.

Zunächst wurde im zellfreien Assay die Abhängigkeit der E1-Konversion von der NADPH-Konzentration bei einer Substratkonzentration von 500 nM untersucht. In Abbildung 23 ist die Umsatz-Konzentrationskurve bei einer Inkubationszeit von 30 min dargestellt.

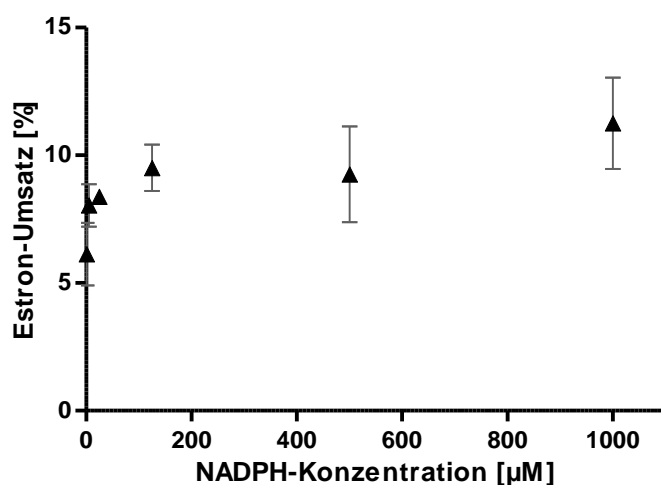


Abbildung 23 Einfluss der NADPH-Konzentration auf die Umsetzung von 500 nM E1 im zellfreien Assay

Wie zu erwarten nimmt der Umsatz mit steigender Cofaktorkonzentration zu und erreicht ein Plateau bei einer Konzentration von 125 μM NADPH. Auffallend ist, dass der Umsatz maximal bei 10% liegt. Im 17 β -HSD1-Routineassay, in dem als Cofaktor NADH eingesetzt wird, wird bereits nach 10 min ein Umsatz von ca. 20% erreicht. Dieser Unterschied weist darauf hin, dass, wie in der Literatur beschrieben, bei Einsatz von NADPH bei E1-Konzentrationen von mehr als 200 nM Substratinhibition auftritt [62].

Daher wurde im nächsten Schritt die Substratkonzentration auf 50 nM E1 verringert und wiederum mit verschiedenen Cofaktorkonzentrationen inkubiert. Dabei zeigte sich bei den gewählten NADPH-Konzentrationen zwischen 1 μM und 1000 μM kein signifikanter Unterschied in den Umsatzgeschwindigkeiten (nicht abgebildet). Der Umsatz erreichte nach 30 min durchschnittlich 75%.

Abbildung 24 zeigt die Umsatz-Zeitkurve für eine NADPH-Konzentration von 500 μM . Der Umsatz nahm über 10 min linear zu, danach flachte die Kurve etwas ab. Für die folgenden Inkubationen wurde eine Inkubationszeit von 7,5 min festgesetzt, innerhalb dieser Zeit wurde ein Umsatz von ca. 25% erreicht.

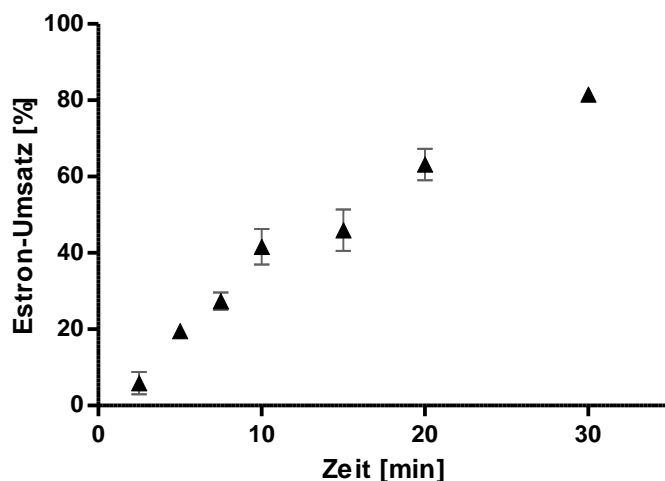


Abbildung 24 Umsatz-Zeitkurve im modifizierten zellfreien Assay ([E1]: 50 nM; [NADPH]: 500 μM)

Ausgewählte Inhibitoren wurden nun bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen im modifizierten zellfreien Assay mit reduzierter Substratkonzentration von 50 nM E1 und NADPH als Cofaktor untersucht. Die Hemmstoffkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie den Bereich der zellulären IC_{50} -Werte abdecken. Abbildung 25

Ergebnisse

zeigt die prozentualen Hemmungen im modifizierten zellfreien Assay, zusätzlich sind die IC₅₀-Werte im Zelltest angegeben.

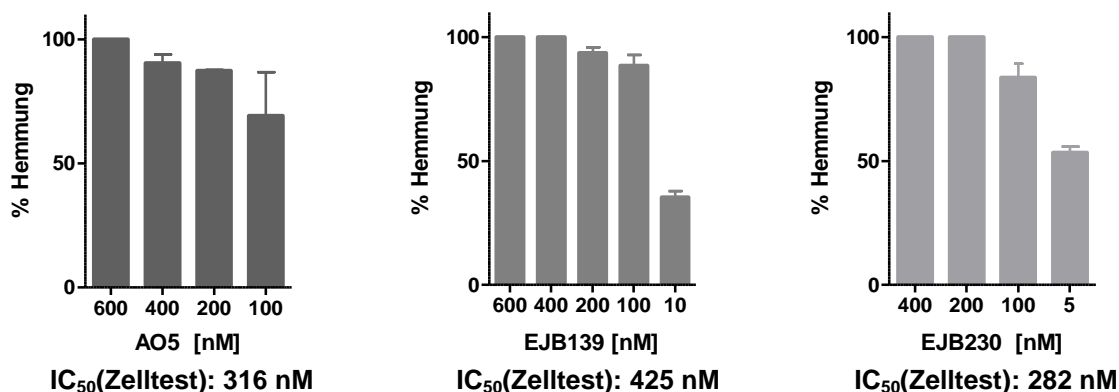
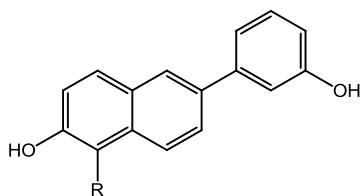


Abbildung 25 Hemmung von 17-HSD1 durch ausgewählte Verbindungen im modifizierten zellfreien Assay im Vergleich zu den IC₅₀-Werten im T47D-Zellassay

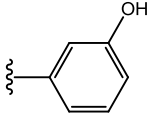
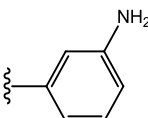
Alle Verbindungen zeigen bei einer Hemmstoffkonzentration von 100 nM noch mehr als 50% Hemmung und damit sollte der IC₅₀-Wert unter 100 nM liegen. Daher ist davon auszugehen, dass der Cofaktor keine entscheidende Rolle für die Abweichung zwischen den Hemmdaten aus zellfreiem und zellulärem Assay spielt.

4.7.2 Hydroxyphenylnaphthole



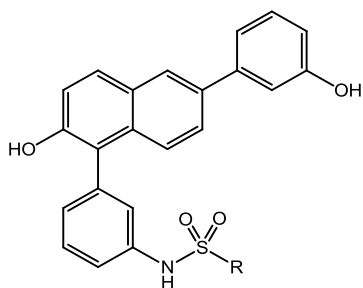
Verb.		Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
		17β-HSD1	17β-HSD2	faktor	17β-HSD1
		zellfrei	zellfrei		Zelltest
		IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]
EZ13E	H	116	5641	49	229
EZ128		26	1157	45	165
EZ140		33	530	16	670
EZ155		20	540	27	281

Ergebnisse

EZ111		36	959	27	115
EZ227		53	1757	33	683

In der Klasse der einfach substituierten Hydroxyphenylnaphthole wurden sowohl die Ausgangsubstanz EZ13E als auch in 1-Position substituierte Derivate untersucht. Diese weisen im zellfreien Assay IC_{50} -Werte unter 100 nM auf und sind selektiv gegenüber 17 β -HSD2. In dieser Reihe konnten im Zelltest als aktivste Verbindungen das Pyridinderivat EZ128 mit einem IC_{50} -Wert von 165 nM und die Hydroxyphenyl-substituierte Verbindung EZ111 mit einem IC_{50} -Wert von 115 nM identifiziert werden. Die Derivatisierung der Aminogruppe in EZ227 zum Sulfonamid eröffnete die Möglichkeit zur Synthese einer großen Substanzbibliothek mit vielfältig substituierten Sulfonamidderivaten.

Aliphatische Sulfonamide

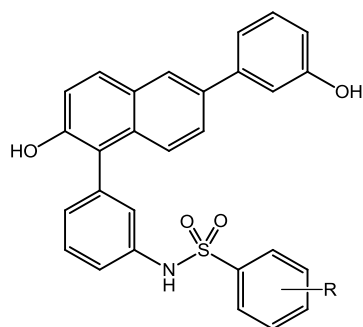


Verb.		Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
		17 β -HSD1	17 β -HSD2	faktor	17 β -HSD1
		zellfrei	zellfrei		Zelltest
		IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	
EZ141B	CH ₃	15	403	27	71
CH39	CH ₂ CF ₃	32	1211	38	246

Die beiden Vertreter der aliphatischen Sulfonamide sind hochaktive Verbindungen im zellfreien System. Das Methylsulfonamid EZ141B zeigt außerdem eine hohe intrazelluläre Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von 71 nM.

Ergebnisse

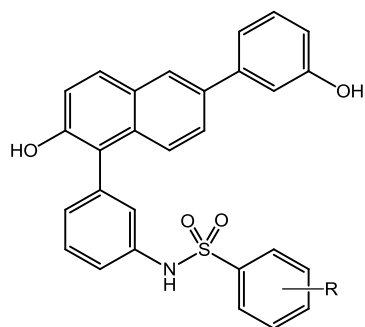
Aromatische Sulfonamide



Verb.		Hemmung	Hemmung	Selektivitätsfaktor	Hemmung
		17 β -HSD1 zellfrei	17 β -HSD2 zellfrei		17 β -HSD1 Zelltest
		IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]	
CH66	H	32	647	20	196
CH83	2-CH ₃	31	188	6	525
CH74	3-CH ₃	33	446	13	440
CH80	4-CH ₃	35	367	11	633
CH56	3-OH	14	999	73	701
CH81	4-OH	19	352	19	1009
CH72	2-F	29	749	26	429
CH73	3-F	22	396	18	462
CH45	4-F	53	834	16	637

In der Reihe der aromatischen Sulfonamide wurden die Ausgangsverbindung CH66 und die Methyl-, Fluor- und Hydroxy-substituierten Derivate untersucht. CH66 zeigt mit 196 nM noch einen moderaten IC₅₀-Wert im Zellassay, alle anderen Verbindungen dieser Reihe sind mit IC₅₀-Werten über 400 nM jedoch nur als schwache Hemmstoffe einzustufen.

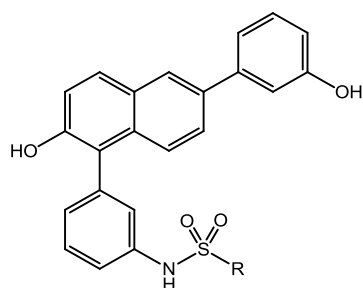
Ergebnisse



Verb.		Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
		17 β -HSD1	17 β -HSD2	faktor	17 β -HSD1
		zellfrei	zellfrei		Zelltest
		IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]
CH75	2-NO ₂	17	309	18	462
CH76	3-NO ₂	20	374	18	397
EZ513	4-NO ₂	49	1058	22	753
EZ518	2-CN	14	439	31	157
CH67	3-CN	29	604	21	402
CH71	4-CN	25	825	33	555

Neben Substituenten mit +M-Effekt wurden auch Nitro- und Cyano-substituierte Verbindungen untersucht. Bei Nitro-substituierten Derivaten lässt sich ebenfalls nur eine schwache intrazelluläre Wirksamkeit feststellen. Das in 2-Position substituierte Cyanoderivat EZ518 zeigt mit einem IC₅₀-Wert von 157 nM die beste Hemmung in dieser Verbindungsklasse.

Ergebnisse

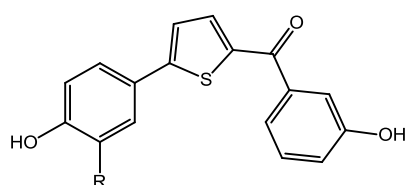


Verb.		Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
		17 β -HSD1	17 β -HSD2	faktor	17 β -HSD1
		zellfrei	zellfrei		Zelltest
		IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]
CH36		74	213	3	@ 1 μ M: 17%
EZ520		46	223	5	646
CH44		690	371	0.5	@1 μ M: 16%
EZ508		92	535	6	498
EZ509		28	1104	39	316

Durch die zuvor gezeigten Verbindungen wurde die inhibitorische Wirksamkeit von einfach substituierten Verbindungen untersucht. Daneben wurden auch Vertreter der mehrfach substituierten Phenylsulfonamide ausgewählt. Diese sind jedoch mit IC₅₀-Werten über 300 nM nur als moderate bis schwache intrazelluläre Hemmstoffe einzustufen.

4.7.3 Bicyclisch substituierte Hydroxyphenylmethanone

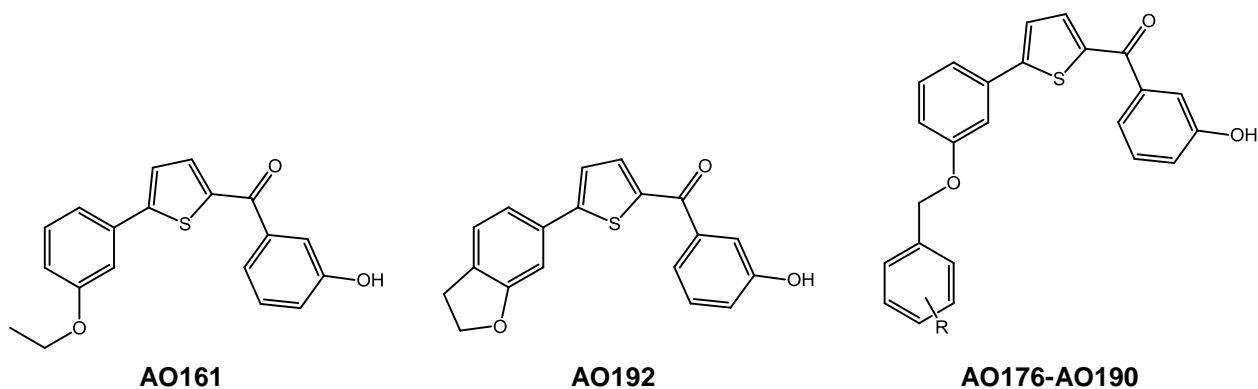
Bicyclisch substituierte Hydroxyphenylmethanone wurden von Alexander Oster als hochpotente 17 β -HSD1-Inhibitoren identifiziert. Insbesondere Thiophen-substituierte Verbindungen zeichneten sich im zellfreien Assay durch gute inhibitorische Aktivität am Target und Selektivität gegenüber 17 β -HSD2 aus.



Verb.		Hemmung	Hemmung	Selek-	Hemmung
		17 β -HSD1	17 β -HSD2	tivitäts-	17 β -HSD1
		zellfrei	zellfrei	faktor	Zelltest
		IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]
AO136	H	33	478	14	30
AO166	CH ₃	8	382	48	27
AO168	F	19	588	31	17
AO191	Cl	5	246	48	126
AO202	CH ₂ CH ₃	20	786	39	367

Für Vertreter der Klasse, die am p-Hydroxy-substituierten Phenylring kleine Substituenten tragen, wurden im zellfreien Assay IC₅₀-Werte im niedrigen nanomolaren Bereich identifiziert. Die Verbindungen AO166, AO168 und AO136 hemmen auch intrazellulär mit IC₅₀-Werten zwischen 17-30 nM. Verbindung AO191 zeigt mit 126 nM noch eine gute intrazelluläre Hemmung, während die Ethyl-substituierte Verbindung AO202 mit einem IC₅₀-Wert von 367 nM nur noch als moderater Inhibitor eingeordnet werden kann.

Ergebnisse

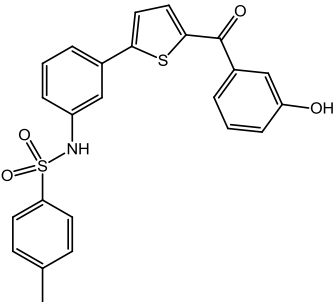
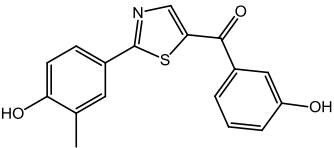


Verb.		Hemmung		Selektivitätsfaktor	Hemmung	
		17 β -HSD1			17 β -HSD2	
		zellfrei			zellfrei	
		IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]			
AO161	-	78	502	6	154	
AO192	-	55	319	6	357	
AO176	H	62	797	13	@ 1 μ M:53%	
AO184	4-OCH ₃	60	703	12	526	
AO185	2-OCH ₃	36	1065	30	441	
AO186	3-OCH ₃	48	766	16	565	
AO187	3,5-di-OCH ₃	32	789	25	@ 1 μ M: 40%	
AO188	4-Cl	36	1003	28	@ 1 μ M: 47%	
AO189	3-Cl	40	1034	26	@ 1 μ M: 49%	
AO190	2-Cl	54	1198	22	@ 1 μ M: 34%	

Bei den Verbindungen AO161 und AO192 wurde auf die 4-OH Gruppe verzichtet und stattdessen mit einer 3-Ethoxygruppe substituiert bzw. eine Cyclisierung durchgeführt. Die Aktivität im niedrig nanomolaren Bereich im zellfreien Assay blieb dabei erhalten, allerdings war die inhibitorische Aktivität im Zellassay nur noch moderat. Die Einführung eines Benzyloxy-Substituenten in 3-Position, der noch weiter substituiert wurde, führte zu einer Reihe hochaktiver Verbindungen im zellfreien Assay. Allerdings konnte im Zellassay nur noch eine schwache Hemmung der 17 β -HSD1 erzielt werden. Die einfach Methoxy-substituierten Verbindungen AO184-186 erzielten IC₅₀-Werte im Bereich von 500 nM. Disubstitution und Chlor-

Ergebnisse

Substituenten führten jedoch bei einer Hemmstoffkonzentration von 1 μM nur noch zu prozentualen Hemmungen von ungefähr 40%.

Verb.	Hemmung	Hemmung	Selektivitäts-	Hemmung
	17 β -HSD1	17 β -HSD2	faktors-	17 β -HSD1
	zellfrei	zellfrei	faktor	Zelltest
	IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]
AO182 	12	169	14	78
SH39 	35	485	14	107

Verbindung AO182 trägt als Vertreter der Sulfonamide einen Substituenten, der hinsichtlich der Größe mit den zuvor besprochenen Benzyloxyderivaten vergleichbar ist. Erfreulicherweise kann in diesem Fall jedoch mit einem IC₅₀-Wert von 78 nM eine hohe intrazelluläre Aktivität erreicht werden. SH39 repräsentiert die Klasse der Thiazol-substituierten Hydroxyphenylmethanone und zeigt im Zellassay einen IC₅₀-Wert von 107 nM.

5 Die Cokristallisation von nichtsteroidalen Inhibitoren mit 17 β -HSD1

Eine wesentliche Erleichterung für den Drug Design Prozess bringt die Kenntnis der 3D-Struktur des Targetproteins mit sich. Das cytosolische Enzym 17 β -HSD1 wurde Anfang der 90er Jahre zum ersten Mal in so hoher Qualität aufgereinigt [64, 121], dass eine Kristallisation erfolgreich war [122]. In der Folge wurde die Struktur aufgeklärt und viele weitere Kristallisationsstudien durchgeführt, so dass heute auf ein detailliertes Wissen um die Architektur der Bindetasche der 17 β -HSD1 zurückgegriffen werden kann. Neben dem Wildtyp-Protein wurden auch mutierte Proteine kristallisiert (Tabelle 2). Durch Cokristallate mit steroidaligen Liganden (Substrate und Inhibitoren) und den Cofaktoren konnten Informationen über die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand erhalten werden.

Bis heute ist jedoch keine Kristallstruktur verfügbar, die Informationen über die Bindung nichtsteroidaler Inhibitoren liefert.

Anhand von Dockingstudien wurde in unserem Arbeitskreis versucht, mögliche Bindungsmodi für die hochaktiven nichtsteroidalen Inhibitoren zu identifizieren. Ein steroidomimetischer Bindungsmodus scheint für die meisten Verbindungen sehr wahrscheinlich [94, 102]. Für Vertreter aus der Klasse der Bishydroxyphenylheterozyklen kommt jedoch auch ein alternativer Bindungsmodus in Frage, bei dem der Inhibitor zwischen Steroid und Cofaktor lokalisiert ist und mit der Phosphatgruppe des Cofaktors wechselwirkt [97].

Um diese Ergebnisse, die mit *in silico* Methoden gewonnen wurden, experimentell zu überprüfen, sollten Cokristalle hochaktiver nichtsteroidaler Inhibitoren und 17 β -HSD1 gewonnen werden.

Dazu wurden zwei Inhibitoren als Vertreter verschiedener Inhibitorklassen ausgewählt: EJB230 für die Klasse der Bishydroxyphenylthiophene und EZ141B für die Klasse der Hydroxyphenylnaphthole.

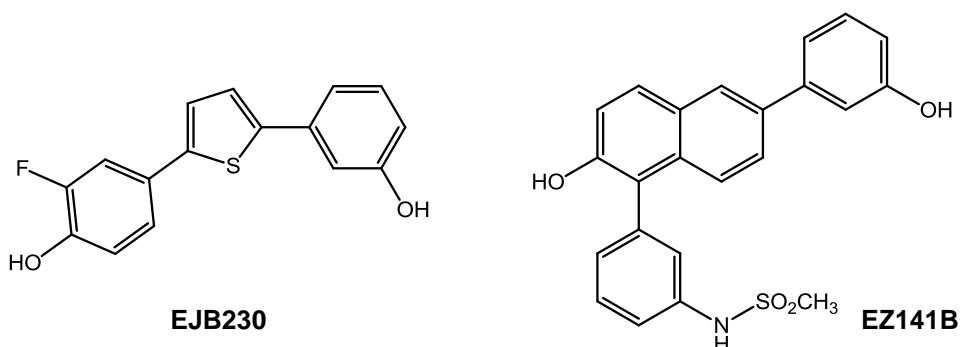


Tabelle 2 Übersicht über die bekannten Kristallstrukturen von 17 β -HSD1

PDB Code	Protein	Ligand(en)	Auflösung (Å)	Referenz
Apoenzym				
1BHS	Wildtyp	-	2,2	[65]
Binäre Komplexe				
1IOL	Wildtyp	E2	2,3	[123]
1FDS	Wildtyp	E2	1,7	[124]
1FDV	H221L	NAD ⁺	3,1	[125]
1FDW	H221Q	E2	2,7	[125]
1DHT	Wildtyp	DHT	2,24	[126]
1DHE	Wildtyp	DHEA	2,3	[126]
3DEY	Wildtyp	DHT	1,7	[127]
1JTV	Wildtyp	Testosteron	1,54	[67]
1QYV	Wildtyp	NADP ⁺	1,81	[128]
3KLM	Wildtyp	DHT	1,7	[129]
3KLP	Wildtyp	5-Androstendiol	2,5	[130]
3hb4	Wildtyp	E2B (Inhibitor)	2,21	[131]
1i5r	Wildtyp	Hybridinhibitor	1,6	[87]
Ternäre Komplexe				
1FDT	Wildtyp	E2/NADP ⁺	2,2	[124]
1A27	Wildtyp	E2/NADP ⁺	1,9	[132]
1FDU	H221L	E2/NADP ⁺	2,7	[125]
1EQU	Wildtyp	Equilin/NADP ⁺	3,0	[133]
1QYW	Wildtyp	Androstandion/NADP ⁺	1,63	[128]
1QYX	Wildtyp	Androstendion/NADP ⁺	1,89	[128]
3hb5	Wildtyp	E2B/NADP ⁺	2,0	[131]
3km0	Wildtyp	5 α -Androstandiol/NADP ⁺	2,3	[134]

5.1 Enzympräparation aus humaner Plazenta

Humanes Plazentagewebe diente als Quelle für die Gewinnung der humanen 17 β -HSD1, die in den Syncytiotrophoblasten exprimiert ist. Zur Präparation wurden

Bindegewebe und Blutgefäße abgetrennt und das Gewebe mit Homogenatpuffer homogenisiert. Mittels Ultraturrax wurden die Zellen aufgeschlossen und anschließend durch fraktionierte Zentrifugation die cytosolische Fraktion von den Mikrosomen getrennt. 17 β -HSD1 wurde durch Ammoniumsulfatfällung aus dem Cytosol ausgefällt und in dieser Form in Gegenwart von 50% Glycerol-haltigem Puffer bei -20°C gelagert.

5.2 Aufreinigung von 17 β -HSD1 durch Proteinchromatographie

17 β -HSD1 wurde aus dem Proteingemisch, das in der Ammoniumsulfatfällung aus Placentacytosol enthalten war, durch eine Kombination von drei chromatographischen Schritten aufgereinigt [64].

5.2.1 Ionenaustauschchromatographie

Für die chromatographische Aufreinigung wurden drei bis vier Ammoniumsulfat-Fällungspräparationen vereinigt. Da für die Bindung der Proteine an der Anionenaustauscher Säule (Q-Sepharose) die Ionenstärke nicht zu hoch sein darf, wurden die vereinigten Ammoniumsulfatfällungen mit Ladepuffer verdünnt (15-20 fach). Zudem wurde der verdünnten Proteinlösung Triton-X-100 zugesetzt, um eine Proteinaggregation zu vermeiden. Die so präparierte Proteinlösung wurde dann auf die Q-Sepharose-Säule geladen. Nach Abschluss des Beladens wurde die Säule mit Ladepuffer gewaschen und schließlich die Elution mit einem NaCl-Gradienten gestartet (Abbildung 26).

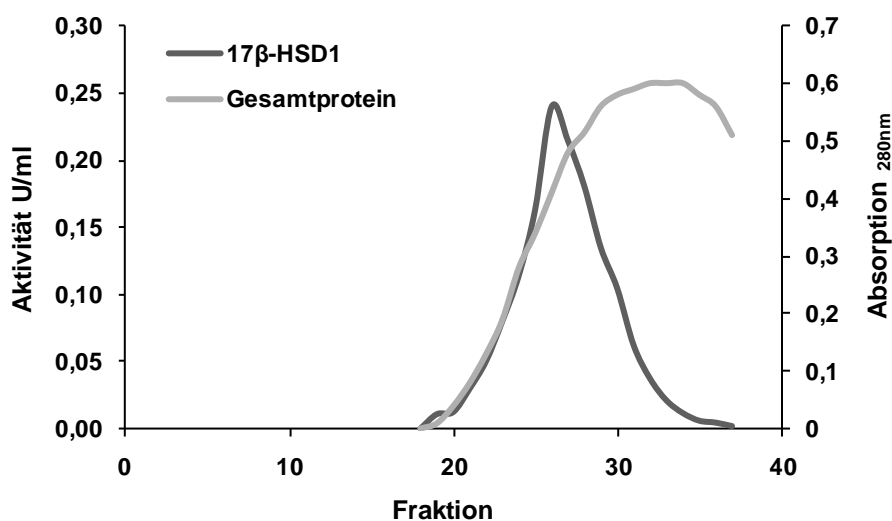


Abbildung 26 Chromatogramm der Aufreinigung von 17 β -HSD1 an einer Q-Sepharose-Säule

Die einzelnen Fraktionen (20 ml) wurden auf 17 β -HSD1-Aktivität getestet, aktive Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Die Auftrennung der Fraktionen in der SDS-PAGE zeigt, dass in den Fraktionen noch viele Fremdproteine enthalten sind. Diese sollten im zweiten chromatographischen Schritt, der Affinitätschromatographie, entfernt werden.

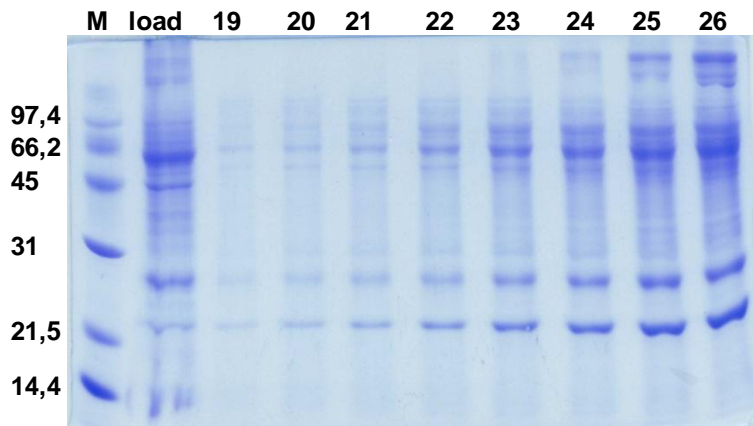


Abbildung 27 Auftrennung der durch Q-Sepharose-Chromatographie gereinigten Präparation durch SDS-PAGE (M: Marker [kDa])

5.2.2 Affinitätschromatographie

Als Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie wurde Blue-Sepharose ausgewählt. Der blaue Farbstoff Cibachrom, der an Sepharose immobilisiert ist, weist strukturelle Ähnlichkeit zum adeninhaltigen Cofaktor auf und ist deshalb geeignet NAD(P)H-abhängige Enzyme wie 17 β -HSD1 zu binden.

Die aufkonzentrierten Fraktionen, die nach dem ersten Chromatographieschritt erhalten worden waren, wurden verdünnt, um die NaCl-Konzentration zu erniedrigen und auf die Blue-Sepharose-Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem zweistufigen NADP⁺-Gradienten.

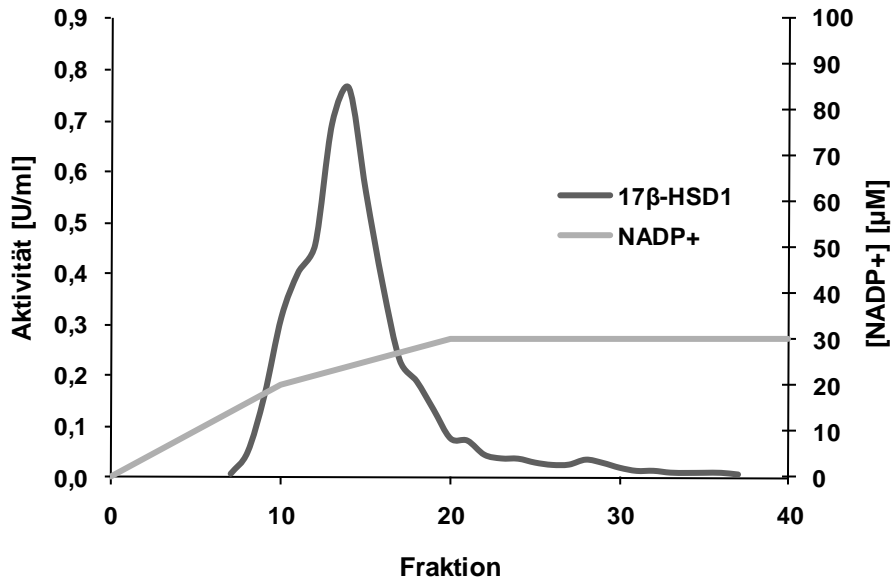


Abbildung 28 Chromatogramm der Aufreinigung von 17β-HSD1 an einer Blue-Sepharose-Säule
 Wie in der SDS-PAGE zu sehen, wurde mit dem zweiten chromatographischen Schritt eine zu ca. 95% reine Enzympräparation erhalten. Die Fraktionen (2 ml) wurden vereinigt und über Ultrafiltration aufkonzentriert. Um letzte Mikroheterogenitäten zu beseitigen, wurde als letzter chromatographischer Schritt eine Hydrophobe Interaktionschromatographie angeschlossen.

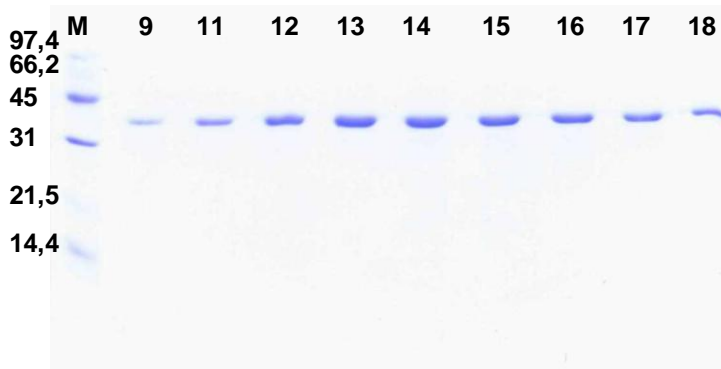


Abbildung 29 Auftrennung der durch Blue-Sepharose-Chromatographie gereinigten Präparation durch SDS-PAGE (M: Marker [kDa])

5.2.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Trennung über eine Phenylsepharose-Säule stellte den letzten Schritt der chromatographischen Aufreinigung dar. Die Elution erfolgte in einem fallenden Ammoniumsulfatgradienten.

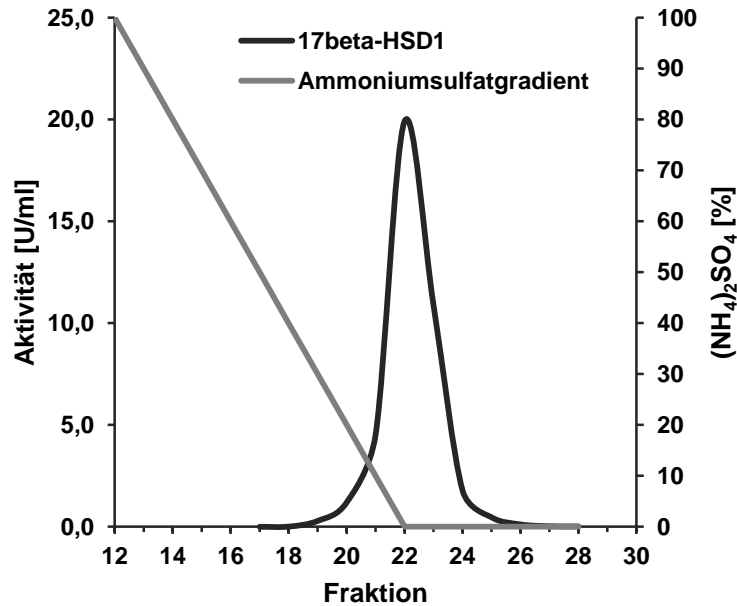


Abbildung 30 Chromatogramm der Aufreinigung von 17β-HSD1 an einer Phenylsepharose-Säule

Die Reinheit der Enzymaufarbeitung wurde mittels SDS-PAGE bestätigt. Die spezifische Aktivität betrug 7,2 U/mg und stimmt somit mit den Literaturwerten überein [64].

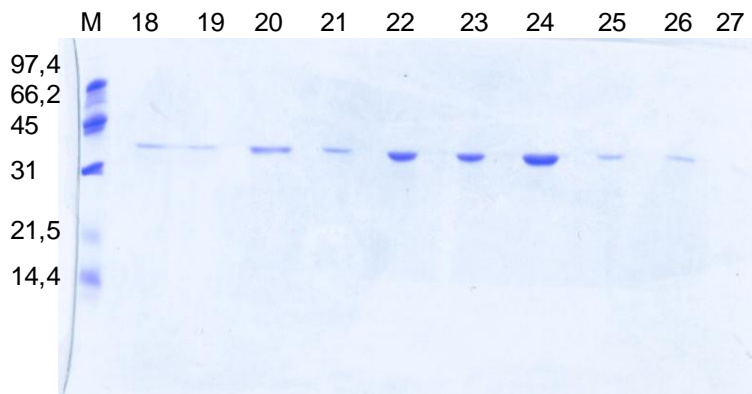


Abbildung 31 Auftrennung der durch Phenylsepharose-Chromatographie gereinigten Präparation durch SDS-PAGE (M: Marker [kDa])

5.3 Kristallisation

5.3.1 Vorbereitung zur Kristallisation

17β-HSD1 besitzt im Elutionspuffer eine Löslichkeit von 2-3 mg/ml. Für die Kristallisation wird eine hochkonzentrierte Proteinlösung benötigt. Um eine Aggregation der 17β-HSD1 während des Aufkonzentrierens zu vermeiden, wurde dem Puffer 0,06% β-Octylglucopyranosid zugesetzt. In Gegenwart dieses niedrig

konzentrierten Detergenzes konnte 17 β -HSD1 bis zu einer Konzentration von 16 mg/ml aufkonzentriert werden.

5.3.2 Cokristallbildung durch Soaking

Um geeignete Apoenzymkristalle für Soakingversuche zu erhalten, wurde 17 β -HSD1 aus der konzentrierten Lösung mittels der „*hanging drop*“-Methode kristallisiert. Dazu wurde das HEPES/MgCl₂/PEG3350-System bei einer Temperatur von 27°C verwendet. Als Kristallisationsbedingungen wurden Gemische aus 26-30% PEG3350, 0,15-0,16 MgCl₂, 0,06-0,1 M HEPES pH 7,5 und 20% Glycerol eingesetzt. Nachdem sich über einen Zeitraum von zwei Wochen Apoenzymkristalle gebildet hatten, wurde ein schrittweises Soaking durchgeführt. Dazu wurde eine ethanolische Inhibitorlösung zu dem Tropfen mit dem Kristall hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde, unterbrochen von einer Equilibrierungspause von 2-3 Tagen, mehrmals wiederholt. Für das Bishydroxyphenylthiophen EJB230 konnten die besten Kristalle in 26% PEG3350, 0,16 M MgCl₂, 0,08 M HEPES pH 7,5 und 20% Glycerol erhalten werden. Die Kristalle zeigten eine typische Größe von 0,24 x 0,12 x 0,05 mm³ (Abbildung 32).

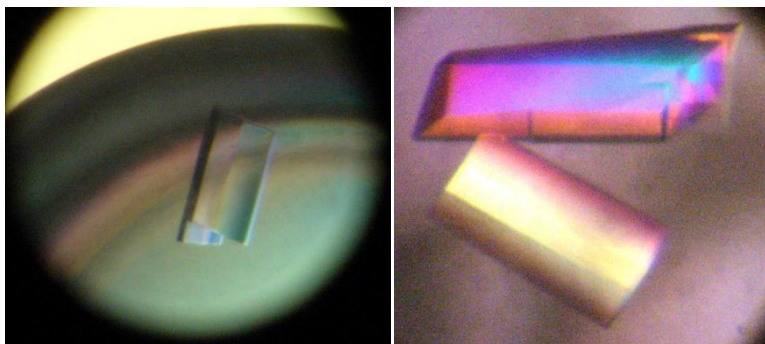


Abbildung 32 In Gegenwart der Inhibitoren gewonnene Kristalle (links EJB230, rechts EZ141B)

Für das Hydroxyphenylnaphthol EZ141B wurde die Soakingmethode ebenfalls durchgeführt, allerdings erfüllten die Kristalle nicht den Diffraktions-Cut-off von weniger als 3 Å, weshalb kein vollständiges Datenset aufgenommen wurde.

5.3.3 Cokristallbildung durch Komplexbildung in Lösung

Eine weitere Möglichkeit, um Cokristalle zwischen Protein und Ligand zu erhalten, stellt die sogenannte Cokristallisation dar. Dazu findet die Protein-Ligand-Komplexbildung in Lösung statt, der Protein-Ligand-Komplex wird mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und anschließend kristallisiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten Kristalle in Gegenwart von Verbindung EZ141B erhalten werden.

Die besten Kristalle wuchsen bei folgenden Bedingungen: 30% PEG3350, 0,15 M MgCl_2 , 0,08 M HEPES pH 7,5 und 20% Glycerol und 3,3% Methylpentandiol. Kleine Kristalle waren bereits nach 24-48 h zu sehen und wuchsen innerhalb von 10 Tagen zu einer Größe von $0,24 \times 0,12 \times 0,05 \text{ mm}^3$ heran (Abbildung 32).

5.4 Röntgenstrukturanalyse

Die besten Kristalle, die entweder durch Soaking oder durch Cokristallisation für beide Inhibitoren gewonnen werden konnten, wurden am Synchrotron (Advanced Photon Source (APS)) in Chicago vermessen.

Die nachfolgende Analyse der Röntgenstrukturdaten ergab allerdings, dass in der Bindetasche des Proteins keine eindeutige Elektronendichteverteilung für die Inhibitoren gefunden werden konnte. Daher war eine Strukturauflösung der Komplexstrukturen leider nicht möglich.

6 Kinetic studies on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (17 β -HSD2), a new target for the treatment of osteoporosis, using potent nonsteroidal inhibitors

Dieses Kapitel ist Teil eines Manuskriptes in Vorbereitung

Ruth Werth-Brill, Matthias Negri, Sandrine Marchais-Oberwinkler and Rolf W. Hartmann

6.1 Abstract

Estrogen deficiency during menopause often leads to the development of osteoporosis. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (17 β -HSD2) inactivates active estradiol (E2) to the weak estrogen estrone (E1). This membrane bound enzyme is expressed in the bone forming osteoblasts and its inhibition will lead to a local increase in E2 levels which will be beneficial for the treatment of osteoporosis.

Until now no structural information for 17 β -HSD2 is available. Using a ligand based approach several classes of highly active nonsteroidal inhibitors have been identified. Five representative inhibitors from structurally different classes were chosen and their inhibition mechanism was further characterized by the means of enzyme kinetic studies. The method was validated by using the alternative substrate testosterone as competitive inhibitor. Kinetic studies revealed that only compound **1** has a competitive inhibition mechanism. Three compounds show mixed inhibition pattern and for one compound noncompetitive inhibition mechanism was found. Interestingly, we could find inhibitors with preferential binding to the free enzyme whereas others bind with higher affinity to the enzyme-estradiol complex. The knowledge about the inhibition mechanism gives new information for the further drug design.

6.2 Introduction

Osteoporosis is defined as the destruction of the bone microarchitecture linked with a loss of bone density. This leads to increased fragility, following immobility and loss of life quality. Women are more often affected by the disease than men (39% vs. 9.7%, [135]). Furthermore, in women the disease is characterized by a rapid loss of bone density with the onset of menopause whereas in men bone loss is slow and age dependent [39].

The maintenance of bone quality is a complex interplay between bone forming osteoblasts and bone resorbing osteoclasts which influence each other and are both

needed for the physiological bone turnover and reconstruction of bone defects. In osteoporosis, osteoblastic activity can no longer equal the bone resorption by osteoclasts resulting in the formation of low quality bone, deterioration of the bone microarchitecture and lower bone density [41].

Osteoporosis has a variety of underlying causes, but there is consensus that estrogen deficiency is responsible for the rapid progression of the disease in women. Therapeutic options in the treatment of osteoporosis use bisphosphonates, Strontium ranelate, calcitonin or parathormon [55]. A new therapeutic approach is followed by denosumab, this monoclonal antibody influences the communication between osteoblasts and osteoclasts leading to reduced osteoclast maturation and activity. Endocrine therapies like hormone replacement therapy (HRT) with estrogens or the treatment with selective estrogen receptor modulators (SERMs) are also used for the treatment of osteoporotic women. Due to severe side effects like cancer and thromboembolic complications the use of HRT has been reduced over the last years. SERMs also bear the risk of venous thromboembolic events and are not suitable for all patient collectives. A new strategy for the treatment of osteoporosis is the local increase in E2 levels by inhibition of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases catalyze oxidation and reduction on position 17 of the steroidal scaffold and thereby play a critical role in the intracellular activation and inactivation of sex steroids (Figure 1).

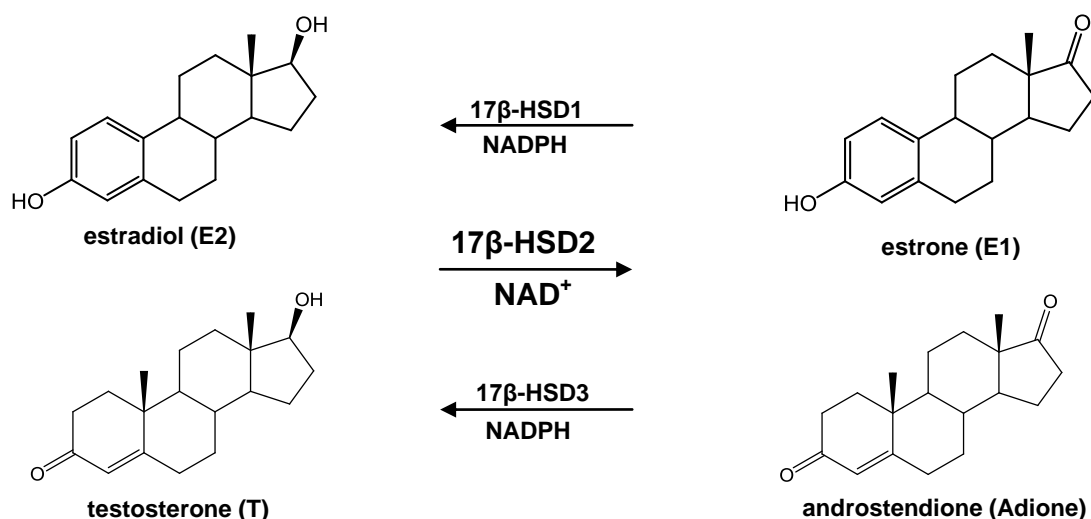


Figure 1 Interconversion of estradiol and testosterone to estrone and androstendione by 17 β -HSDs (type 1, 2 and 3)

The 14 subtypes of 17 β -HSD are members of the short chain alcohol dehydrogenase/reductase family except for type 5 which is a member of the aldo-keto reductase enzymes. 17 β -HSDs show specific tissue distribution and substrate

specificity. *In vitro* they are able to catalyze bidirectional reactions but *in vivo* only unidirectional catalysis is observed due to the intracellular cofactor availability [58].

The membrane bound 17β -HSD2 catalyzes the oxidative inactivation of E2 and T into estrone and androstenedione, respectively [103] (Figure 1). Besides its expression in placenta, liver, kidney and gastrointestinal tract, 17β -HSD2 has also been found in osteoblasts [107, 109]. Since E2 replacement therapy has been shown to be effective in the treatment of osteoporosis, the local increase in E2 levels by inhibition of 17β -HSD2 is a promising approach that might have less side effects.

Only few inhibitors of 17β -HSD2 have been described (Figure 2). The class of spiro-lactone derivatives has been extensively investigated [113, 136] and spiro- δ -lactone **A** is a highly active steroidal inhibitor. Inhibitors with nonsteroidal scaffold have been identified in the class of pyrrolidinones [116]. The highly potent pyrrolidinone **B** has been used in a proof of concept animal study in cynomolgus monkey [111]. Recently, 4-hydroxyphenyl-1-naphthol **C** was found as promising scaffold for the design of new non steroidal 17β -HSD2 inhibitors [117].

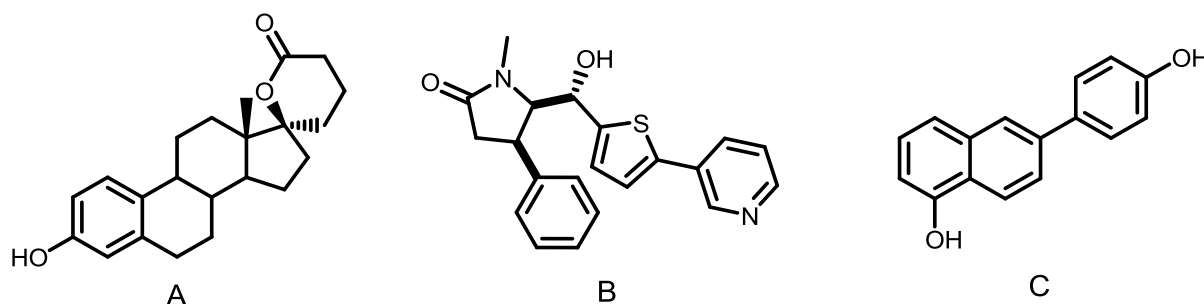


Figure 2 Inhibitors of 17β -HSD2

As 17β -HSD2 is a membrane-bound enzyme, no structural information in terms of X-ray structure is currently available. The low sequence identity of only 20% [103] to other 17β -HSD isoforms impedes the generation of a reliable homology model. Therefore our drug design strategy was built on a ligand-based approach using the steroidal substrate E2 as well as nonsteroidal compounds as templates for new structural classes. This approach has been used successfully in the design of inhibitors of 17β -HSD 1 [92, 96, 102].

Using this strategy structurally different classes of 17β -HSD2 inhibitors (Table 1) could be identified. As substrate analogues the compounds were designed to compete with E2 for the active site and thereby exerting the inhibitory effect. To get more insights in the inhibition mechanism, kinetic studies were undertaken. These

might provide further information about the binding and the interpretation of inhibition data of the SAR studies.

6.3 Materials and Methods

6.3.1 Chemicals

E2 and T were obtained from Sigma, Seelze. Radioactive labeled [2, 4, 6, 7-³H]-E2 (70-115 Ci/mmol) was purchased from Perkin Elmer, Boston. Quickszint Flow 302 was bought from Zinsser Analytic, Frankfurt. Other chemicals were received from Sigma, Roth or Merck.

6.3.2 Preparation of microsomes and standard assay for determination of IC₅₀ values

17 β -HSD2 was obtained from the microsomal fraction of human placental tissue according to a previously described procedure [121]. Protein concentration was determined by the Bradford method [137].

Inhibitory activities of the compounds were evaluated as described before with minor modifications [96]. Briefly, for determination of 17 β -HSD2 inhibition the microsomal fraction (0.05 mg protein/mL) was incubated with [2, 4, 6, 7-³H]-E2 (500 nM, 0.135 μ Ci) and NAD⁺ (1.5 mM) in presence of potential inhibitors at 37 °C in a phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) supplemented with 20% of glycerol and EDTA 1 mM. After 20 min, the incubation was stopped with HgCl₂ and the mixture was extracted with diethylether. Inhibitor stock solutions were prepared in DMSO. The final concentration of DMSO was adjusted to 1% in all samples. After evaporation, the steroids were dissolved in acetonitrile/water (45:55). E2 and E1 were separated using acetonitrile/water (45:55) as mobile phase in a C18 reversed phase chromatography column (Nucleodur C18, 3 μ m, Macherey-Nagel, Düren) connected to a HPLC-system (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn). Detection and quantification of the steroids were performed using a radioflow detector (Ramona Star, RayTest, Straubenhardt; Quickszint Flow 302).

6.3.3 Kinetic studies

For characterization of the enzymatic reaction the standard assay was slightly modified to determine suitable conditions for the kinetic study. The microsomal enzyme preparation was incubated with labelled E2 (500 nM) and various concentrations of NAD⁺ (0.005 - 10 mM) for 20 min. To determine the substrate

dependency the enzyme was incubated with NAD⁺ (1.5 mM) and various concentrations of E2 (0.125 - 10 μM).

To determine the mode of inhibition and the kinetic constants of 17β-HSD2 inhibition, the assay was performed in duplicate in presence of a constant saturating NAD⁺ concentration (1.5 mM) and different substrate (125 - 1000 nM) and inhibitor concentrations (testosterone 250 - 2000 nM; compound **1** 25 - 500 nM; compound **2** 50 - 1000 nM; compound **3** 5 - 200 nM; compound **4** 12.5 - 200 nM; compound **5** 125 - 2000 nM). The reaction was stopped after 5, 10, 15, 20 and 40 min. Sample preparation and analysis was performed as described above.

6.3.4 Data analysis

To identify the mechanism of 17β-HSD2 inhibition by the different inhibitors initial reaction velocities were plotted against the substrate concentration and fitted to equations for different inhibition models using nonlinear regression in GraphPad Prism [138]. The investigated inhibition patterns are competitive (eqs 1), noncompetitive (eqs 2), uncompetitive (eqs 3) and mixed type (eqs 4). For each mode of inhibition full (a) and partial (b) inhibition were distinguished.

$$v = v_{\max} \times [S] / \{K_s \times (1 + [I]/K_i) + [S]\} \quad (\text{eq 1a})$$

$$v = v_{\max} \times [S] / \{K_m \times (1 + [I]/K_i) / (1 + [I]/\alpha K_i) + [S]\} \quad (\text{eq 1b})$$

$$v = v_{\max} \times [S] / \{K_m \times (1 + [I]/K_i) + [S] (1 + [I]/K_i)\} \quad (\text{eq 2a})$$

$$v = v_{\max} \times [S] / \{K_m \times (1 + [I]/K_i) / (1 + \beta [I]/K_i) + [S] \times (1 + [I]/K_i) / (1 + \beta [I]/K_i)\} \quad (\text{eq 2b})$$

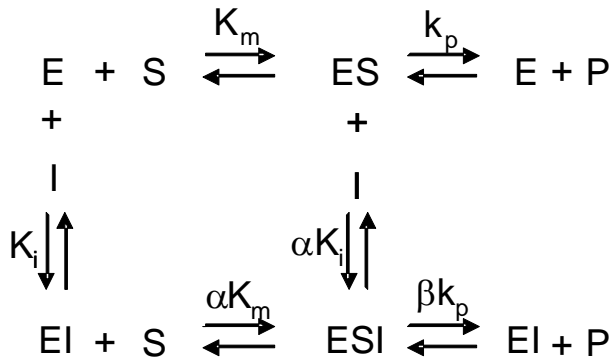
$$v = v_{\max} \times [S] / \{K_m + [S] (1 + [I]/K_i)\} \quad (\text{eq 3a})$$

$$v = v_{\max} \times [S] / \{K_m / (1 + \beta [I]/K_i) + [S] \times (1 + [I]/K_i) / (1 + \beta [I]/K_i)\} \quad (\text{eq 3b})$$

$$v = v_{\max} \times [S] / \{K_m \times (1 + [I]/K_i) + [S] (1 + [I]/\alpha K_i)\} \quad (\text{eq 4a})$$

$$v = v_{\max} \times [S] / \{K_m \times (1 + [I]/K_i) / (1 + \beta [I]/\alpha K_i) + [S] (1 + [I]/\alpha K_i) / (1 + \beta [I]/\alpha K_i)\} \quad (\text{eq 4b})$$

[S] and [I] are the concentration of substrate E2 and inhibitor, respectively. v_{\max} is the maximum velocity observed under conditions $[S] \gg K_m$, in the absence of inhibitor; K_m is the Michaelis Menten constant for the formation of the enzyme-substrate complex. K_i is the inhibition constant. α is the factor by which K_i or K_m is altered upon binding of substrate or inhibitor, respectively. β describes the factor by which the rate constant k_p is changed. k_p is the rate constant for the formation of product P as depicted in Scheme 1.



Scheme 1 General description of an enzymatic reaction

The mode of inhibition can be depicted in a general scheme (Scheme 1). Competitive and noncompetitive inhibition can be interpreted as special cases within this general consideration. For full competitive inhibition the inhibitor I will only combine with the free enzyme E to form a non productive EI complex ($\alpha = \infty$ and β does not apply). Partial competitive inhibition allows binding of both substrate and inhibitor but the binding affinity of inhibitor to E is different from that to the enzyme substrate (ES) complex ($\alpha < \infty$). The formed enzyme substrate inhibitor complex (ESI) catalyzes the reaction with the same efficiency as the enzyme substrate complex ($\beta = 1$). In full noncompetitive inhibition the inhibitor binds either to E or to the ES complex with equal affinity ($\alpha = 1$). The resulting ESI complex can not form product (dead-end complex) ($\beta = 0$). However, in partial noncompetitive inhibition the ternary complex is able to yield product but with less catalytic efficiency ($\beta < 1$). The combination of both common inhibition principles is the mixed type inhibition. In full mixed inhibition ESI complexes are formed as in partial competitive inhibition but in contrast to competitive inhibition the ternary complex is a dead end complex ($\beta = 0$). A combination of partial competitive and partial noncompetitive mechanism is found in partial mixed inhibition. First, the inhibitor has different affinities to E and the ES complex ($\alpha \neq 1$). Second, product is formed by the ternary complex ($0 < \beta < 1$). Binding of the inhibitor only to the ES complex is known as uncompetitive inhibition. The formed ternary complex can be either inactive (full uncompetitive) or partially active (partial uncompetitive).

The best-fit model was identified by ranking the above mentioned models according to the AICc (Akaike information criterion) values, the lowest value identifying the best model. AICc values were calculated according to equation (eq 9).

$$AIC = N \times \ln(SS/N) + 2K \quad (\text{eq 8})$$

$$AICc = AIC + 2K(K+1)/(N-K-1) \quad (\text{eq 9})$$

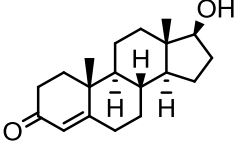
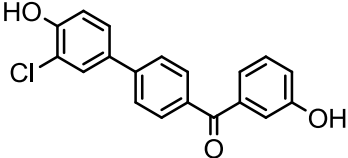
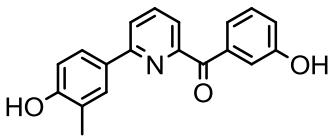
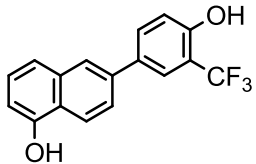
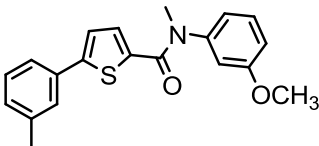
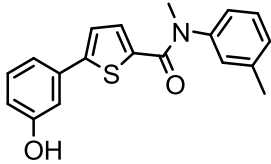
where N is the number of data points, K is the number of parameters fit by the regression plus one and SS is the sum of the square of the vertical distances of the points from the curve.

6.4 Results

6.4.1 Selection of compounds of interest

From our in house 17β -HSD2 inhibitor library five compounds were selected for further characterization (Table 1). The inhibitors belong to different structural classes, namely bicyclic substituted hydroxyphenylmethanones, hydroxyphenylnaphthols, and *N*,5-diphenylthiophene-2-carboxamides. The selected compounds inhibit microsomal 17β -HSD2 with IC_{50} values between 19 nM and 645 nM and are selective towards 17β -HSD1, the physiological counterpart of 17β -HSD2, with selectivity factors ranging from 4 to 116.

Table 1 Selected 17 β -HSD2 inhibitors

Cmpd		Inhibition of	Inhibition of	Selectivity factor
		17 β -HSD2	17 β -HSD1	
		IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]	
testosterone		2930	@100 μ M: 0%	n.d.
1		153	570	4
2		263	20000	76
3		19	610	32
4		58	6750	116
5		645	6800	11

6.4.2 Experimental setup for the inhibition studies and method validation

Prior to starting the mode of inhibition analyses, the enzymatic reaction was characterized to find the optimal conditions for the kinetic inhibition studies.

The microsomal fraction of human placental tissue was used as enzyme source and was incubated with [³H]-E2 and NAD⁺ as cofactor. First the influence of the cofactor concentration on the velocity was investigated. The microsomes were incubated with a constant concentration of E2 and various concentrations of NAD⁺ and the initial velocities were plotted against the cofactor concentration (Figure 3).

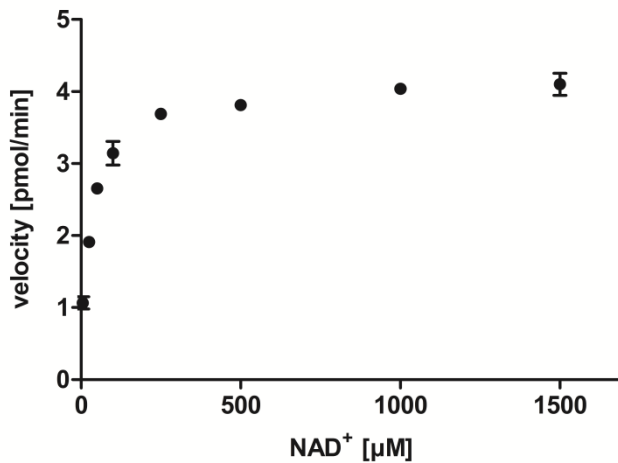


Figure 3 Dependence of the reaction velocity on the NAD⁺ concentration ([E2] = 500 nM)

The velocity of the reaction reaches a plateau at concentrations higher than 500 µM. As the cofactor must not play a limiting role during the studies, its concentration was determined at saturating concentration of 1500 µM.

In the next step the substrate concentration was varied whereas the cofactor concentration was held constant at 1500 µM (Figure 4). Up to a concentration of 1200 nM the velocity increases but is decreased at very high E2 concentrations (5 and 10 µM) due to substrate inhibition.

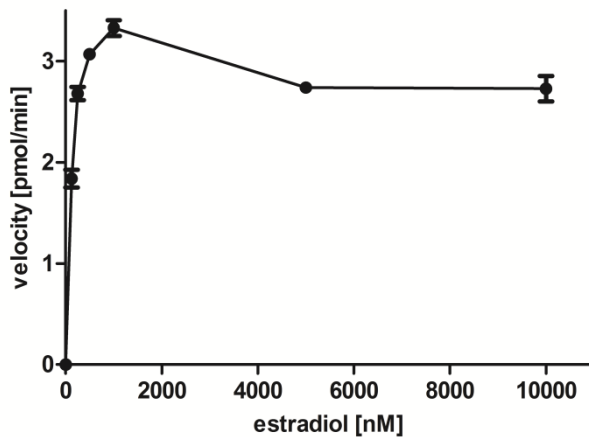


Figure 4 Substrate inhibition by E2 ([NAD⁺] = 1.5 mM)

In subsequent incubations the mode of inhibition of the selected 17β-HSD2 inhibitors was investigated at a fixed saturating cofactor concentration (1500 µM) and variable substrate concentration ranging up to 1000 nM to avoid complications by substrate inhibition.

The data fitting was performed with the hyperbolic Michaelis Menten plots using nonlinear regression techniques. For the presentation of the results the Lineweaver-

Burk and Dixon Plots were chosen. Interpretation of the Lineweaver-Burk Plots gives information about the mode of inhibition depending on the intersection pattern of the lines. Parallel lines are a characteristic of uncompetitive inhibition. Whereas intersecting lines are representative for competitive, noncompetitive or mixed type inhibition. Lines intersecting on the $1/\text{velocity}$ axis are found in case of competitive inhibition pattern, whereas lines crossing on the $1/\text{substrate}$ axis can be referred to as noncompetitive inhibition. Intersection points in the 2nd or 3rd quadrant correspond to mixed type inhibition.

Further information about the mode of inhibition can be seen from the Dixon Plots ($1/v$ vs $[\text{inhibitor}]$). Straight lines will represent full inhibition whereas hyperbolic plots result from partial enzyme inhibition.

The used methodology was validated by testosterone which is a substrate for 17β -HSD2. Its influence on the reaction should demonstrate competitive inhibition pattern since it will compete with the labelled E2 for the binding in the active site.

Figure 5A shows the corresponding plots. The lines intersect on the $1/v$ axis and thereby prove the competitive mode of inhibition.

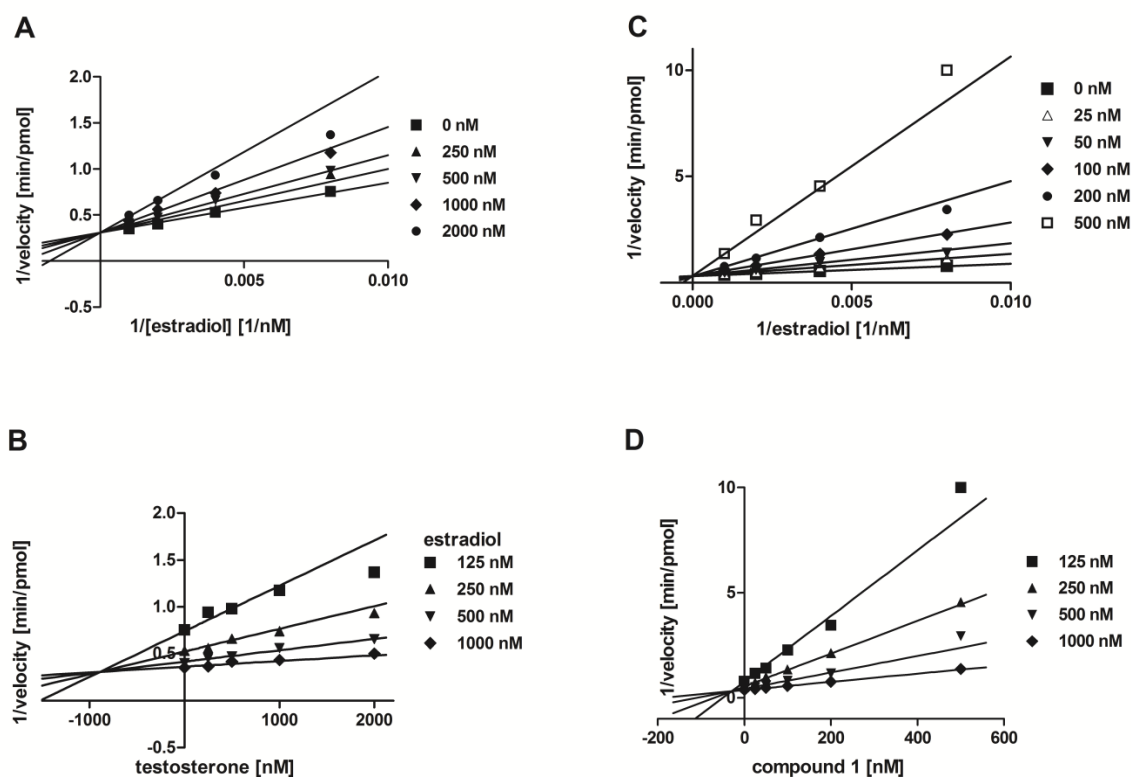


Figure 5 Kinetic analysis of inhibition of 17β -HSD2 by testosterone (A,B) and compound 1 (C,D). A and C: Lineweaver-Burk plot of the reciprocals of the initial velocity versus the reciprocal concentrations of substrate E2 at different fixed concentrations (as indicated in the figure) of

testosterone (A) and compound 1 (C). **B and D:** Dixon plot of the reciprocals of the initial velocity versus concentration of testosterone (B) or compound 1 (D) at different fixed concentrations of E2.

6.4.3 Inhibition studies with selected inhibitors

After validation of the method we started the investigation of the new inhibitors. Competitive inhibition pattern like for testosterone was also found for compound **1** (Figure 5C) with a K_i of 30 nM (Table 2).

Table 2 The tested compounds with their mode of inhibition and kinetic constants

Cmpd	mode of inhibition	K_i [nM]	α	β
testosterone	competitive (full)	811 ± 115	∞	-
1	competitive (full)	30 ± 1	∞	-
2	mixed (partial)	105 ± 32	2.29	0.36
3	mixed (partial)	15 ± 2	2.36	0.19
4	mixed (partial)	65 ± 8	0.42	0.25
5	noncompetitive (partial)	583 ± 11	1	0.14

The biphenylsubstituted hydroxyphenylmethanone derivative **1** shows some structural similarity in the hydroxyphenylmethanone part to the hydroxyphenylpyridyl-substituted compound **2**. However, the kinetic studies pointed out that compound **2** follows a different inhibition mechanism (Figure 6A).

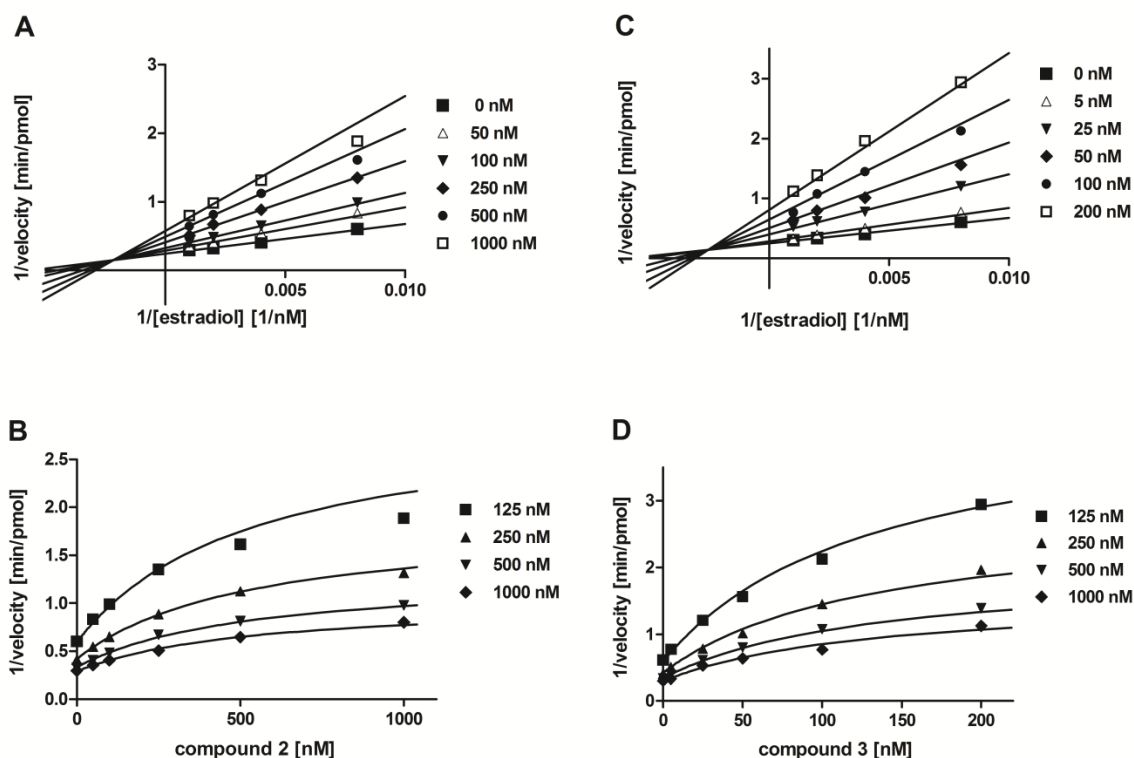


Figure 6 Kinetic analysis of inhibition of 17β-HSD2 by compound 2 (A,B) and compound 3 (C,D). **A and C:** Lineweaver-Burk plot of the reciprocals of the initial velocity versus the reciprocal concentrations of substrate E2 at different fixed concentrations (as indicated in the figure) of compound 2 (A) and compound 3 (C). **B and D:** Dixon plot of the reciprocals of the initial velocity versus concentration of compound 2 (B) or compound 3 (D) at different fixed concentrations of E2.

In the Lineweaver-Burk Plot the intersection point lies in the 2nd quadrant which is a sign for mixed-type inhibition yielding in a different affinity of the inhibitor for the enzyme and the enzyme substrate complex (Scheme 1). The K_i was determined as 105 nM and the factor alpha was found to be 2.29 (Table 2) which implies that the inhibitor binds preferentially to the enzyme and not to the enzyme substrate complex. Interpretation of the Dixon plot (Figure 6B) shows that compound 2 is a partial enzyme inhibitor: the enzyme inhibitor complex is still catalytically active but at a reduced rate ($\beta = 0.36$). Similar behaviour was also found in the case of compound 3 (Figure 6 C and D). This hydroxyphenylnaphthol derivative is a highly active inhibitor with a K_i of 15 nM (Table 2). The binding constant to the enzyme-substrate complex is 2.36 fold increased compared to the enzyme, and the ternary complex catalyzes the enzymatic reaction with a reduced rate ($\beta = 0.19$).

The mixed partial inhibition mechanism was also found for compound 4. However, analysis of the Lineweaver-Burk plots reveals a difference to the aforementioned examples (Figure 7A). The lines are intersecting in the 3rd quadrant. This is due to

the alpha factor of 0.42 (Table 2). In contrast to compounds **2** and **3**, compound **4** has a higher affinity to the enzyme substrate complex than to the enzyme (K_i 65 nM) (Scheme 1). Dixon plot reveals again the partial nature of the inhibition ($\beta = 0.25$) (Figure 7B).

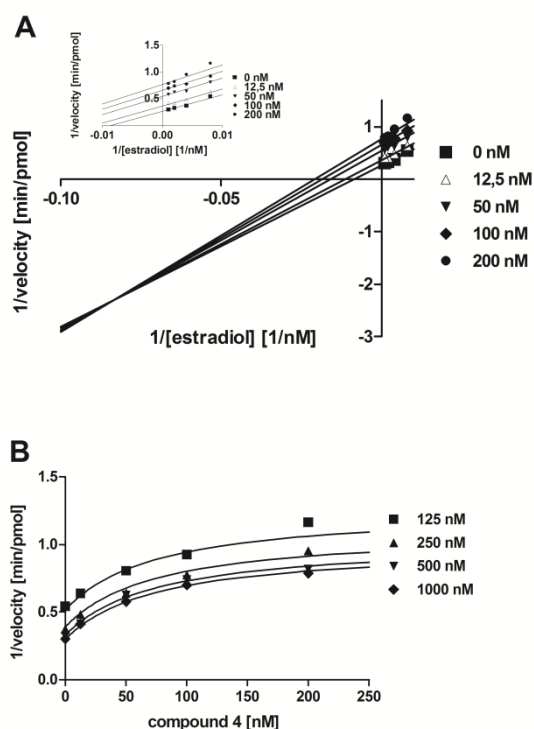


Figure 7 Kinetic analysis of inhibition of 17β-HSD2 by compound 4. **A:** Lineweaver-Burk plot of the reciprocals of the initial velocity versus the reciprocal concentrations of substrate E2 at different fixed concentrations (as indicated in the figure) of compound 4. **B:** Dixon plot of the reciprocals of the initial velocity versus concentration of compound 4 at different fixed concentrations of E2.

The structural analogue compound **5** shows noncompetitive inhibition as can be seen from the intersection point on the 1/substrate axis in the Lineweaver-Burk plot (Figure 8A). Compound **5** is a rather weakly potent inhibitor with a K_i of 582 nM (Table 2). The hyperbolic curves in the Dixon Plot demonstrate partial inhibition ($\beta = 0.14$) (Figure 8B).

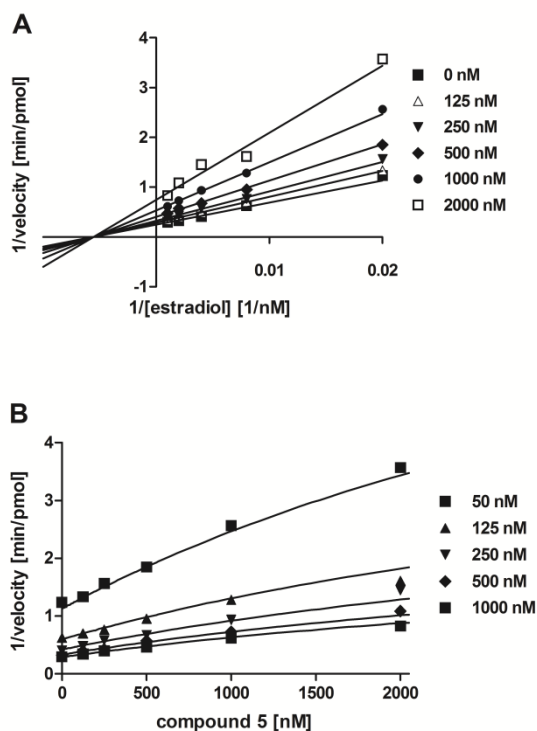


Figure 8 Kinetic analysis of inhibition of 17β-HSD2 by compound 5. **A:** Lineweaver-Burk plot of the reciprocals of the initial velocity versus the reciprocal concentrations of substrate E2 at different fixed concentrations (as indicated in the figure) of compound 5. **B:** Dixon plot of the reciprocals of the initial velocity versus concentration of compound 5 at different fixed concentrations of E2.

6.5 Discussion

Little is known about the three dimensional structure of 17β-HSD2 since neither X-ray nor NMR data are available. The development of inhibitors for this enzyme was therefore based on known ligands of the enzyme. These can be either the steroidal substrates E2 and T as well as steroidal and nonsteroidal inhibitors which were identified in previous studies [100]. From the pool of inhibitors available we have chosen five representatives of several structural classes and evaluated their mode of inhibition.

The hydroxyphenylnaphthol **3** which has been designed as a mimetic of estradiol acts as a mixed type inhibitor and not as expected in a pure competitive manner with respect to the substrate. Binding of the compound interferes with both the substrate binding and the catalytic activity. Calculation of the kinetic parameters leads to $\alpha > 1$ which shows that the inhibitor binds to E preferentially compared to the ES complex. β was determined to be < 1 yielding an ESI complex which is still catalytically active and the enzyme is only partially inhibited. The same inhibitory properties were identified for compound **2**. This compound was chosen as representative of the

bicyclic substituted hydroxyphenylmethanones. The compound is a weaker inhibitor of 17 β -HSD2 with a K_i of 105 nM but shows similar factor α . A possible explanation for the mixed type inhibition might be that the inhibitor binds to a pocket near the substrate binding site and hinders the perfect positioning of the substrate without completely abrogating the catalytic activity of the enzyme.

Mixed type inhibition was also found for compound **4**, the representative of the class of N,5-diphenylthiophene-2-carboxamides. Interestingly, in the presence of the substrate the inhibitor shows higher affinity to the ES complex than to the pure enzyme in contrast to the aforementioned examples. At first sight this pattern points to uncompetitive inhibition but data analysis figured out that the mixed type inhibition model describes the data best. As in the case of the above mentioned compounds it is also a partial inhibitor leading to a catalytically active ESI complex. Binding of the substrate might lead to a better stabilization of compound **4** in the enzyme. Hypothetical mechanisms might be conformational changes induced by binding of the substrate which could facilitate the entrance for the inhibitor or additional interactions between substrate and inhibitor which could yield a stronger binding of the compound in the enzyme's active site. Compound **4** is a highly active inhibitor with a K_i of 65 nM. The structural analogue compound **5** which only differs in the substitution pattern on the phenyl moieties displays a completely different mode of inhibition. Acting as noncompetitive inhibitor, binding of **5** has no influence on substrate binding but decreases the catalytic activity of 17 β -HSD2. Similar to compound **4** it is also a partial enzyme inhibitor leading to an ESI complex with reduced catalytic activity.

Knowledge about the mode of inhibition is highly desirable in rational drug design since drug development strategies and reasonable SAR studies can only be conducted for inhibitors with the same mode of inhibition [105]. Identification of different binding modes can be a hint that the inhibitors cover different binding pockets within the enzyme and use different amino acids as interaction partners.

A deeper understanding of the inhibition can be gained by a combination of the experimental results with a homology model of the enzyme. This combined approach might open new ideas for drug design since specific targeting of interaction partners in the different binding pockets is possible. However data generated by homology model have to be interpreted with caution and should be substantiated by experimental results. Beside the kinetics on the wild-type enzyme, site directed

mutagenesis can produce new enzyme derivatives that can be used for the elucidation of the specific role of special amino acids as interaction partners.

In the present study we were focussing on the inhibition mechanism of structurally different inhibitors with respect to the steroidal substrate E2. We expected to find competitive inhibition for the majority of the inhibitors. Interestingly, only compound **1** showed competitive inhibition. For the other inhibitors it could be shown that the formation of a ternary complex is possible. The role of the cofactor for inhibitor binding was not considered but this will be investigated in future studies to get further insight into the binding mechanism of the inhibitors.

7 SV-HFO Zellen als Modellsystem zur Untersuchung von 17 β -HSD2-Hemmstoffen

17 β -HSD2 ist ein neues Target für die Behandlung der Osteoporose, da durch Inhibition des Enzyms die Estradiolinaktivierung im Knochen verhindert werden kann und dadurch die lokalen Estradiolspiegel erhöht werden. Die positiven Effekte von Estradiol auf den Erhalt der Knochenmasse sind bekannt und wurden lange Zeit im Rahmen der Estrogensersatz-Therapie genutzt, um dem postmenopausalen Knochenabbau entgegenzuwirken.

In unserem Arbeitskreis wurden in zellfreien Assays hochaktive und selektive 17 β -HSD2-Inhibitoren aus verschiedenen strukturell unterschiedlichen Substanzklassen identifiziert. Als nächster Schritt sollte die Wirksamkeit dieser Substanzen in den Targetzellen nachgewiesen werden. Als Targetzellen kommen die verschiedenen Zelltypen im Knochengewebe in Frage. Dabei handelt es sich um Osteoblasten, Osteoclasten und Osteozyten. Für Osteoblasten ist dabei die Datenlage günstig: viele Studien, die Estrogeneffekte auf diese Zellen untersucht haben, sind publiziert und die Expression des Targetenzym 17 β -HSD2 wurde beschrieben [107-109].

Die weitere Evaluierung der Hemmstoffe sollte daher in Zellen erfolgen, die als Modellsystem für Osteoblasten genutzt werden können. Dazu wurden SV-HFO Zellen eingesetzt. Diese Zellen wurden aus fetalem Schädelknochen isoliert und durch Infektion mit dem Simian Virus 40 immortalisiert. Die Zellen zeigen den Phänotyp von Osteoblastenvorläuferzellen [139]. Unter Zugabe von Dexamethason differenzieren sie zu reifen Osteoblasten, produzieren extrazelluläre Matrix und mineralisieren diese. Literaturbeschrieben ist die Expression unseres Targetenzym 17 β -HSD2 [109] und der Estrogenrezeptoren ER α und β [140]. Neben der Expression von 17 β -HSD2 wurde auch 17 β -HSD3 und 4 mRNA und Aromatase und Sulfatase nachgewiesen, Transkripte von 17 β -HSD1 wurden jedoch nicht gefunden [109]. Die Untersuchung der Enzymaktivitäten zeigte ein Überwiegen der oxidativen Reaktionsrichtung für die Umsetzung von Estradiol zu Estron [109].

Aufgrund der Expression verschiedener steroidhormonumsetzender Enzyme sollte in einem ersten Schritt die Eignung der SV-HFO Zellen für die Testung von 17 β -HSD2-Inhibitoren näher untersucht werden. In einem zweiten Schritt sollte überprüft werden, ob die Zellen für die Durchführung eines *in vitro* Proof of concepts in Frage kommen.

7.1 Die Inhibition von 17 β -HSD2 in SV-HFO Zellen

7.1.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens

Für SV-HFO Zellen ist die Differenzierung unter Dexamethason-Einfluss beschrieben [141]. Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Differenzierungsprozess auf das Wachstumsverhalten hat, wurden Wachstumskurven für differenzierende und nicht differenzierende Zellen aufgenommen. Dazu wurden die Zellen in 24-well-Platten ausgesät und über einen Zeitraum von 23 Tagen in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Resazurin-Assays gezählt. Der Resazurin-Assay beruht auf der Reduktion des blauen Resazurins zum pinkfarbenen Resorufin. Das Ausmaß der entstehenden Pinkfärbung korreliert mit der Zellzahl. Trägt man die Zellzahl gegen die Zeit auf, so erhält man die Wachstumskurve (Abbildung 33). Für SV-HFO Zellen lässt sich die Kurve in zwei Phasen unterteilen. Bis zum Tag 9 nach der Aussaat folgen die Zellen einem exponentiellen Wachstum. In dieser Phase gibt es keinen Unterschied zwischen differenzierenden und undifferenzierten Zellen. Ab Tag 12 verläuft das Wachstum langsamer und erreicht zwischen Tag 16 und 19 ein Plateau. In dieser zweiten Phase wachsen die differenzierenden Zellen nach Tag 12 stärker als die undifferenzierten Zellen.

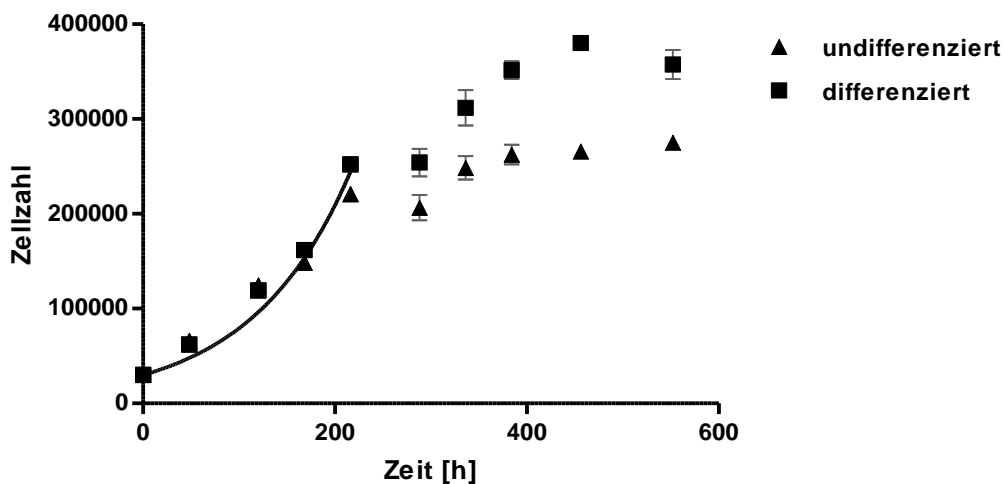


Abbildung 33 Wachstumskurve von undifferenzierten und differenzierenden SV-HFO Zellen

Die Generationszeit t_d ist die Zeit, die zur Verdopplung der Zellzahl benötigt wird. Sie wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$t_d = \ln 2/n$$

n ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{n \cdot t}$$

Dabei ist $N(t)$ die Zellzahl zum Zeitpunkt t und N_0 die Zellzahl zum Zeitpunkt $t=0$ h. Für die Berechnung der Verdopplungszeit wurden die Zellzahlen bis zum Zeitpunkt $t=216$ h zugrunde gelegt. Daraus ergibt sich für SV-HFO Zellen eine Verdopplungszeit von 71 h. Differenzierende und undifferenzierte Zellen zeigen dabei keinen signifikanten Unterschied.

7.1.2 Charakterisierung der Estradiolumwandlung in SV-HFO Zellen

Einfluss des Differenzierungszustandes auf die Rate der Estradiolumsetzung

Die SV-HFO Zellen sollen als Testsystem für 17β -HSD2-Inhibitoren genutzt werden, daher ist die Charakterisierung der E2-Umsetzung erforderlich.

Da es sich bei SV-HFO Zellen um Osteoblastprecursorzellen handelt, die unter Glucocorticoideinfluss differenzieren, wurde untersucht, ob die Differenzierung Einfluss auf die Umsetzung von E2 hat. Für das undifferenzierte Stadium wurden SV-HFO Zellen 24 h vor dem Test ausgesät, für das differenzierte Stadium wurden SV-HFO Zellen über 12 Tage unter Zugabe von Dexamethason kultiviert. Die Zellzahl wurde mittels der Resazurin-Methode bestimmt, um gleiche Zellzahlen in beiden Versuchsreihen zu gewährleisten. Die Zellen wurden für 12 h mit 10 nM radioaktiv markiertem E2 inkubiert. Danach wurden E2 und gebildetes radioaktives E1 mittels HPLC und Radiodetektor analysiert. Undifferenzierte Zellen setzen E2 mit einer Rate von $39,6 \text{ fmol/h}/10^5$ Zellen um, während differenzierte Zellen eine Umsatzrate von $68,6 \text{ fmol/h}/10^5$ Zellen zeigen (Abbildung 34). Differenzierte Zellen haben daher einen signifikant höheren Umsatz an E2 zu E1 als undifferenzierte Zellen.

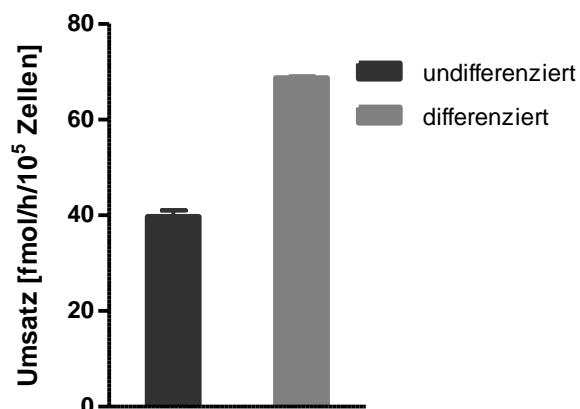


Abbildung 34 Vergleich der E2-Umsatzraten zwischen differenzierten und undifferenzierten SV-HFO Zellen

Für die nachfolgenden Versuche wurde daher der Differenzierungstag 13 als Testtag festgelegt. Diese Vorgehensweise ist mit einem vergleichsweise hohen experimentellen Aufwand verbunden, da die Zellen über zwei Wochen in den Multiwellplatten kultiviert werden müssen und der Zelllayer somit einer Vielzahl von Interventionen zwecks Mediumwechsel ausgesetzt ist. Durch diese Vorgehensweise wird jedoch ein stabiler Zelllayer erreicht, während der Zelllayer, der im undifferenzierten Stadium gebildet wird, äußerst labil ist und auf kleinste mechanische Beanspruchung (z.B. durch Bewegung der Zellkulturplatte oder Zugabe neuen Mediums) mit partiellem Ablösen von der Kulturplatte reagiert.

Zeitreihe der Estradiol-Inaktivierung

Die im Vorversuch gewählte Inkubationszeit von 12 h erscheint für einen häufigeren Testeinsatz nicht geeignet, da dies inklusive Vorbereitungszeit und der Präparation der Proben für die Analytik nicht innerhalb eines Arbeitstages zu bewältigen ist.

Daher wurde die Estradiolinaktivierung bei einer Substratkonzentration von 10 nM über einen Zeitraum von 48 h untersucht (Abbildung 35). Die Umsetzung von Estradiol steigt proportional mit der Zeit an. Für die nachfolgenden Versuche wurde eine Inkubationszeit von 8 h festgelegt, innerhalb dieser Zeit werden durchschnittlich 12,1% des Substrates umgesetzt. Die Inkubationszeit liegt innerhalb des linearen Bereiches der Umsatzkurve, was für eine Auswertung von später durchgeführten Hemmstofftests von Bedeutung ist.

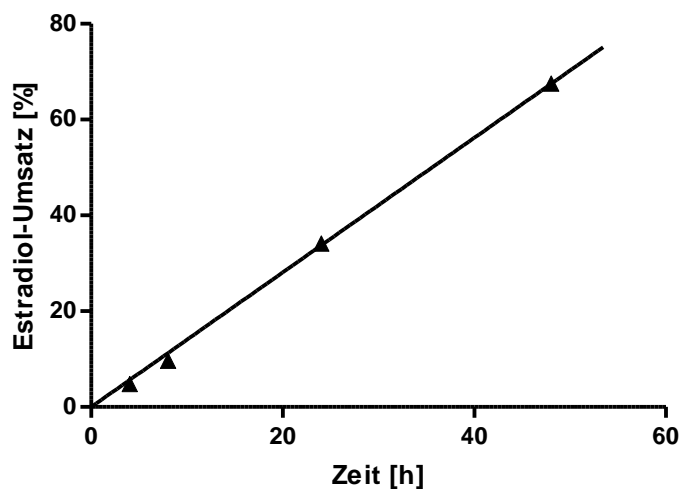
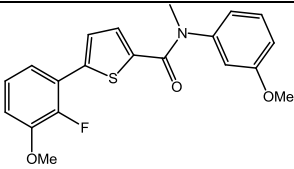
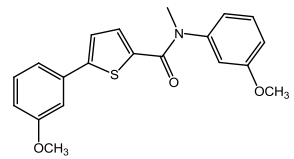
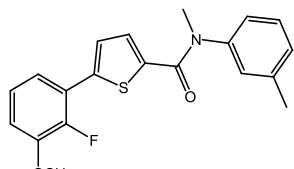


Abbildung 35 Umsatz-Zeitkurve der Estradiolinaktivierung in differenzierten SV-HFO Zellen ([E2]: 10 nM)

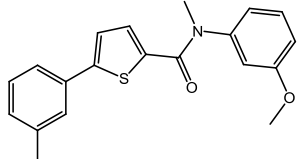
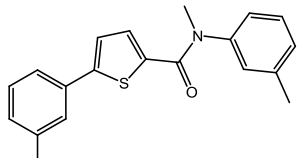
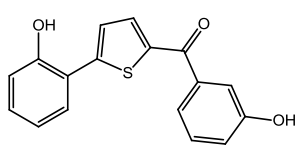
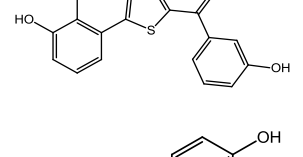
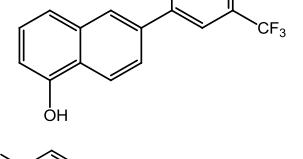
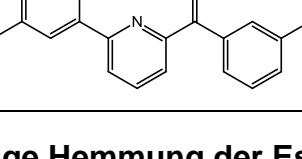
Screening ausgewählter Hemmstoffe bei 10 μM Inhibitorkonzentration

Mit den zuvor bestimmten Assayparametern wurde ein Set an ausgewählten 17 β -HSD2-Inhibitoren in einer Konzentration von 10 μM auf die inhibitorische Wirkung in SV-HFO Zellen untersucht (Tabelle 3). Die Thiophencarboxylamid-Derivate KX186-215 sind hochaktive Inhibitoren der 17 β -HSD2 im zellfreien Assay an Placentamikrosomen mit IC_{50} -Werten im Bereich von 60 nM. Wider Erwarten zeigen sie nur eine schwache Hemmung der Estradiolinaktivierung in SV-HFO Zellen. Das im zellfreien Assay um Faktor 10 schwächere Derivat KX182 zeigt intrazellulär eine vergleichbare Hemmwirkung wie die hochaktiven Derivate KX186-215. 17 β -HSD2-Inhibitoren aus anderen Substanzklassen zeigen hingegen eine vollständige Hemmwirkung in einer Konzentration von 10 μM . Neben den Verbindungen aus der Reihe der Thiophencarboxylamide wurden als Vertreter der Bis(hydroxyphenyl)-methanone die Verbindungen AO142 und AO148 ausgewählt. Beide zeigen im zellfreien Assay IC_{50} -Werte im Bereich von 20 nM. AO142 ist eine 17 β -HSD2 selektive Verbindung, während AO148 stärkere Hemmung der 17 β -HSD1 zeigt. ML376 ist mit einem IC_{50} -Wert von 19 nM ein hochaktiver Vertreter der Hydroxyphenylnaphthole. Die Verbindung SH77 zeigt mit 263 nM zwar eine etwas schwächere Potenz an 17 β -HSD2 wurde jedoch als Vertreter der Pyridin-substituierten Hydroxyphenylmethanone in die Untersuchung eingeschlossen.

Tabelle 3 Screening von 17 β -HSD2-Inhibitoren in einer Konzentration von 10 μM in SV-HFO Zellen

Verb.		Hemmung 17 β - HSD2 IC_{50} [nM] zellfrei	Selektivitäts- faktor	Hemmung [%] @10 μM SV-HFO
KX186		62 \pm 2	> 800	27 \pm 3
KX157		68 \pm 9	111	58 \pm 7
KX201		62 \pm 9	132	52 \pm 9

Ergebnisse

KX215		58 ± 8	116	53 ± 5
KX182		645 ± 91	11	32 ± 4
AO142		18 ± 1	5	98 ± 3
AO148		19 ± 3	0,32	98 ± 3
ML376		19 ± 2	32	99 ± 2
SH77		263 ± 41	75	93 ± 8

Dosisabhängige Hemmung der Estradiolinaktivierung

Für die heterocyclisch substituierten Hydroxyphenylmethanone AO142, AO148 und SH77 und für das Hydroxyphenylnaphtholderivat ML376 wurde die Hemmwirkung bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen untersucht. Alle vier Inhibitoren hemmen dosisabhängig die Estradiolinaktivierung (Abbildung 36).

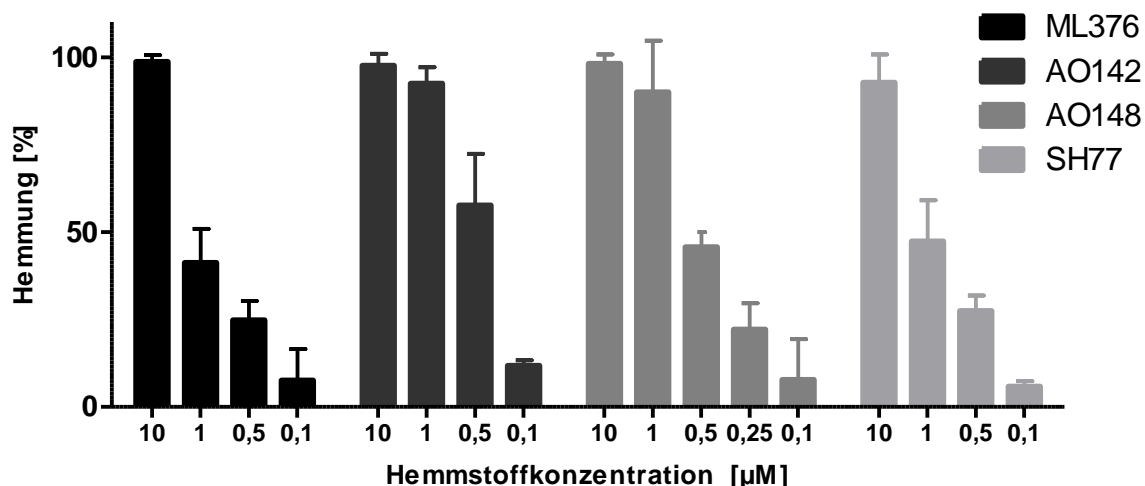


Abbildung 36 Dosisabhängige Hemmung der Estradiolinaktivierung in SV-HFO Zellen

Die Thiophen-substituierten Hydroxyphenylmethanone AO142 und AO148 wurden als potenteste Inhibitoren innerhalb der ausgewählten Verbindungen identifiziert. Bei einer Konzentration von 0,5 µM führen sie zu 58% bzw. 46% Hemmung der Estradiolinaktivierung. ML376 und SH77 können als moderate Inhibitoren der intrazellulären Estradiolumwandlung klassifiziert werden. Sie zeigen bei einer Konzentration von 1 µM eine Hemmung von 41% und 47% (Abbildung 36).

Diese Ergebnisse zeigen starke Abweichungen zwischen den Hemmwerten, die im zellfreien Test an Placentamikrosomen bestimmt wurden und den Hemmwerten in SV-HFO Zellen. Die äußerst potenten Inhibitoren der KX-Reihe zeigen um etwa Faktor 160 schlechtere Werte im zellulären System. Verschlechtert haben sich auch die Werte für die Hydroxyphenylmethanone AO142 und AO148, allerdings nur um Faktor 25. Um Faktor 50 verringert sich die Wirksamkeit des Hydroxyphenylmethanons ML376. Am wenigsten beeinflusst ist die Wirkung des Pyridin-substituierten Hydroxyphenylmethanons SH77, die Hemmwirkung im Zellaussay nimmt nur um Faktor 5 ab.

7.1.3 Charakterisierung der Testosteronumwandlung in SV-HFO Zellen

Zeitreihe der Testosteroninaktivierung

Neben Estradiol ist auch Testosteron Substrat für 17β-HSD2. Eine Hemmung der Testosteroninaktivierung ist im Rahmen des therapeutischen Konzeptes ebenfalls von Nutzen, da für Testosteron anabole Effekte auf Osteoblasten nachgewiesen wurden.

SV-HFO Zellen setzen Testosteron zu Androstendion um. Nach 12 h wird bei einer Substratkonzentration von 10 nM ein durchschnittlicher Umsatz von 11,2% erreicht (Abbildung 37).

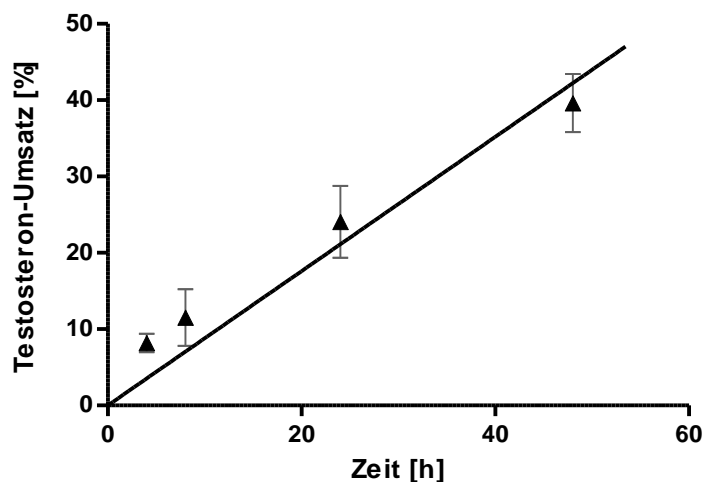


Abbildung 37 Umsatz-Zeitkurve der Testosteroninaktivierung in differenzierten SV-HFO Zellen ([Testosteron]: 10 nM)

Screening der Inhibitoren bei einer Hemmstoffkonzentration von 10 μ M

Um die Hemmwerte für die Inhibitoren gegenüber Testosteron mit den Hemmwerten der E2-Umwandlung vergleichen zu können, wurden die gleichen Inkubationsbedingungen gewählt, nämlich 10 nM Substrat und eine Inkubationszeit von 8 h.

Die Ergebnisse des Substanzscreening sind in Abbildung 38 im Vergleich zu den prozentualen Hemmungen der Estradiolinaktivierung aufgetragen.

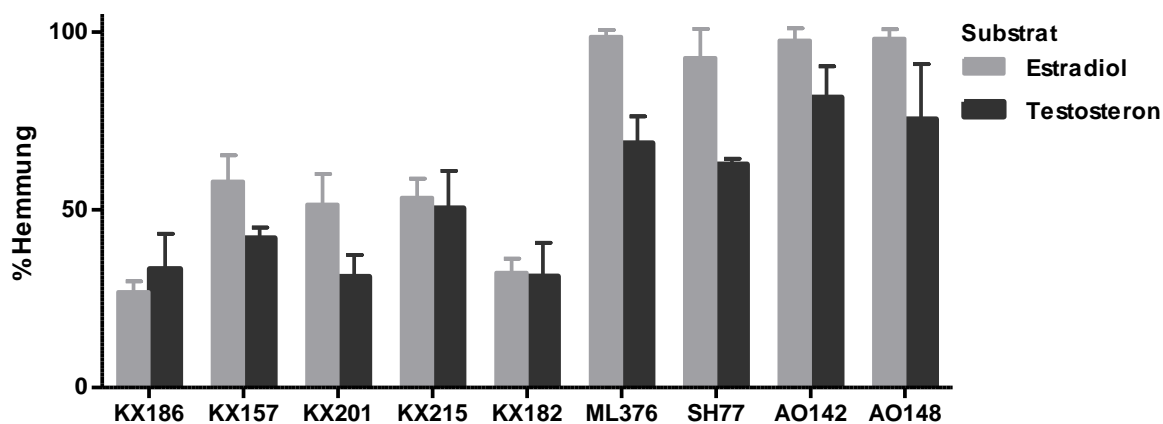


Abbildung 38 Vergleich der Hemmung der Testosteron- bzw. Estradiolumwandlung durch ausgewählte 17 β -HSD2-Inhibitoren bei einer Konzentration von 10 μ M

Dosisabhängige Hemmung der Testosteroninaktivierung

Für die Verbindungen, die bei 10 μM mehr als 60% Hemmung zeigten, wurde die Hemmung der Testosteronkonversion bei verschiedenen Konzentrationen untersucht (Abbildung 39).

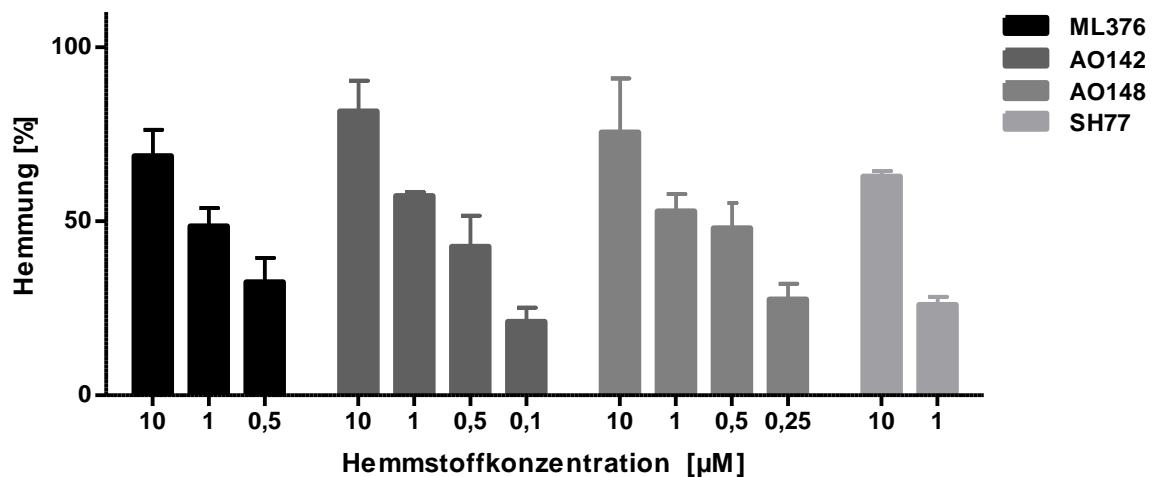


Abbildung 39 Dosisabhängige Hemmung der Testosteroninaktivierung in SV-HFO Zellen

Die untersuchten Inhibitoren hemmen konzentrationsabhängig die Testosteronkonversion. Im Vergleich zur Hemmung der Estradiolkonversion fällt auf, dass die Verbindung ML376, AO142 und AO148 die Testosteronumwandlung nur leicht schwächer hemmen, während SH77 eine deutlich schwächere Hemmung der Testosteronkonversion zeigt.

7.1.4 Fazit

Die getesteten 17β -HSD2-Inhibitoren sind in der Lage in Targetzellen die Inaktivierung der Sexualhormone Estradiol und Testosteron zu hemmen. Im Vergleich zu den Hemmdaten aus dem zellfreien Assay ist allerdings festzustellen, dass hier ein Großteil der inhibitorischen Potenz eingebüßt wurde.

7.2 Evaluierung von SV-HFO Zellen auf ihre Eignung für eine Proof of concept Studie

Neben der Charakterisierung der SV-HFO Zellen als geeignetes Modell zur Testung der inhibitorischen Aktivität von Hemmstoffen sollte im zweiten Schritt festgestellt werden, ob auch weiterführende Tests mit den Zellen möglich sind.

Eine *in vitro* Proof of concept Studie für 17 β -HSD2-Inhibitoren soll den Nachweis erbringen, dass durch Gabe eines 17 β -HSD2-Inhibitors über die lokale Erhöhung der Estradiolspiegel ein positiver Effekt hervorgerufen wird, der *in vivo* mit einer Verbesserung der Qualität der Knochensubstanz korreliert.

Das von Osteoblasten produzierte Protein Osteoprotegerin ist einer der Regulatoren der Aktivität der knochenresorbierenden Osteoclasten. Die Steigerung der Osteoprotegerin-Expression durch Estradiol wurde in verschiedenen Osteoblastenmodellen (Primärkulturen und Zelllinien) nachgewiesen [48, 49]. Mittels ELISA lässt sich OPG schnell und zuverlässig quantifizieren. Daher wurde die OPG-Expression als Marker für ein mögliches Proof of concept ausgewählt.

7.2.1 Zeitabhängige Osteoprotegerin-Expression in SV-HFO Zellen

In einem ersten Schritt sollte die Zeitabhängigkeit der OPG-Bildung in SV-HFO Zellen untersucht werden. Als Ausgangspunkt wurde eine physiologische Estradiolkonzentration von 1 nM gewählt.

Undifferenzierte konfluente SV-HFO Zellen wurden für 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden mit 1 nM E2 inkubiert. In den Zellkulturüberständen wurde das sezernierte OPG mittels ELISA bestimmt. Abbildung 40 zeigt die zeitabhängige Expression von OPG in SV-HFO Zellen. Die OPG-Konzentration nimmt mit der Zeit zu, allerdings gibt es keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und den mit Estradiol behandelten Zellen in der physiologischen Konzentration von 1 nM.

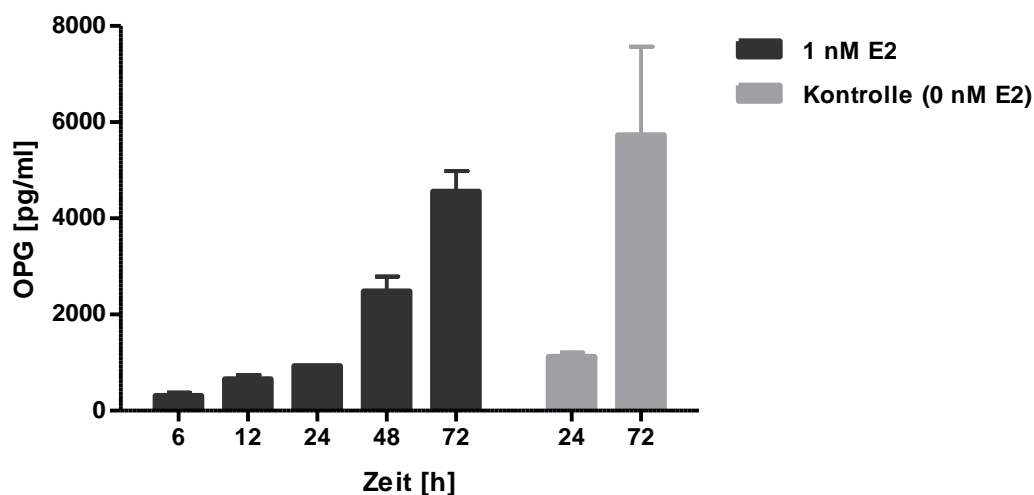


Abbildung 40 Zeitabhängige Produktion von OPG in SV-HFO Zellen

7.2.2 Untersuchung der OPG-Expression in Abhängigkeit von der Estradiolkonzentration

Daher wurde weiterhin untersucht, ob die OPG-Produktion konzentrationsabhängig gesteigert werden kann. Konfluente undifferenzierte Zellen wurden dazu mit E2 im Konzentrationsbereich zwischen 10 pM und 100 nM für 24h inkubiert (Abbildung 41). Die Bildung von OPG wird nicht konzentrationsabhängig durch Estradiol stimuliert.

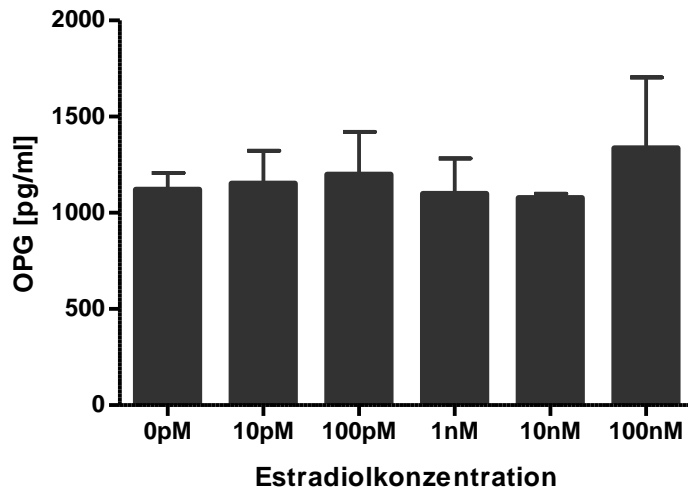


Abbildung 41 Einfluss der Estradiolkonzentration auf die OPG-Produktion

7.2.3 Untersuchung des Einflusses der Mediumzusammensetzung auf die OPG-Expression

Die Zellen wurden in Medium kultiviert, das mit 10% steroidhormonfreiem FKS supplementiert war. Um auszuschließen, dass die fehlende Stimulierbarkeit der OPG-Expression auf residuales E2 aus dem Serum zurückzuführen ist, wurde untersucht, ob die Serumkonzentration reduziert werden kann. Dazu wurden SV-HFO Zellen in 10% und 2% FKS-haltigem Medium und zum Vergleich in serumfreiem Medium, das mit 0,1% BSA versetzt wurde, kultiviert (Abbildung 42).

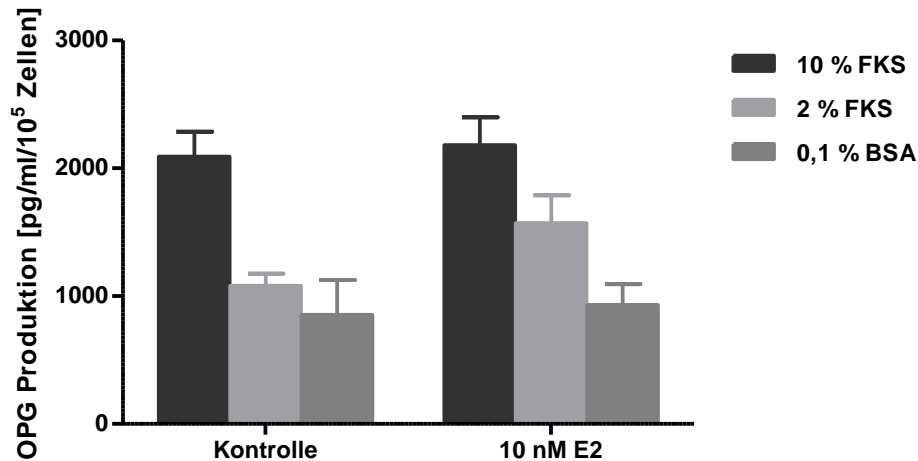


Abbildung 42 Einfluss der Mediumzusammensetzung auf die OPG-Produktion

Eine Reduktion der Serumkonzentration wirkt sich deutlich auf die gebildete OPG-Konzentration aus. Dies spricht dafür, dass die OPG-Sekretion durch das Serum stimuliert wird. Ein vollständiger Austausch des FKS-Anteils gegen eine niedrige Konzentration an BSA führt zu einer weiteren Reduktion der Expression. Der Ersatz des Serums durch BSA führt allerdings zu einer verringerten Viabilität der Zellen.

Eine Konzentration von 2% FKS wurde als geeignet für weitere Versuche betrachtet.

7.2.4 Untersuchung des Einflusses von Estrogenrezeptor-Antagonisten auf die OPG-Expression

Um in dieser reduzierten Formulierung störende Effekte durch verbleibendes E2 auszuschließen, wurde das Antiestrogen Fulvestrant (ICI 182,780) zum Medium zugesetzt, das neben der Blockade auch zu einer Downregulation der Estrogenrezeptoren führt. Falls die basale OPG-Expression durch E2 verursacht würde, sollte diese durch Zusatz von Fulvestrant abgesenkt werden. Jedoch zeigt auch dieses Vorgehen keine signifikanten Unterschiede in der OPG-Expression.

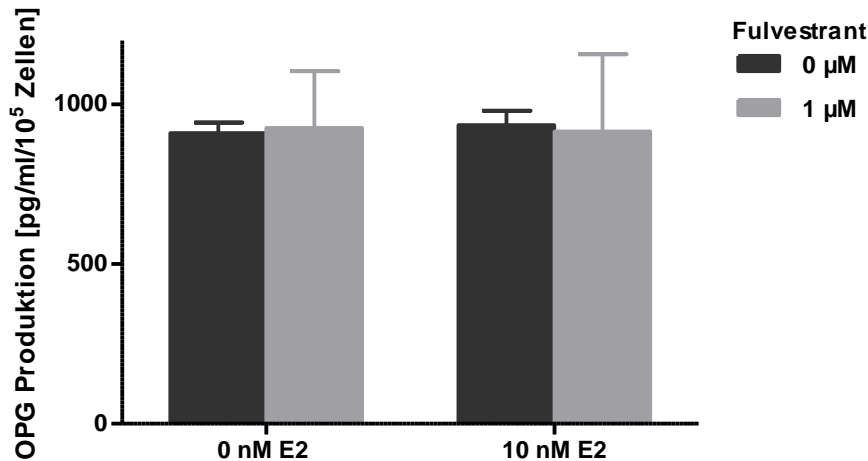


Abbildung 43 Einfluss des Estrogenrezeptorantagonisten Fulvestrant auf die OPG-Produktion in SV-HFO Zellen

7.2.5 Fazit

Für die Durchführung eines Proof of concepts für 17 β -HSD2-Inhibitoren ist es erforderlich, dass ein Biomarker gefunden wird, der sich in Abhängigkeit von der Estradiolkonzentration ändert und in funktionellem Zusammenhang mit der (Patho-)Physiologie des Knochens steht. Osteoprotegerin spielt als Decoy-Rezeptor im RANKL/RANK/OPG-System eine wichtige Rolle in der Regulation der Osteoclastenaktivität durch die Osteoblasten. Die estrogenabhängige Expression von OPG in anderen Osteoblastenzelllinien und Primärkulturen ist beschrieben. Daher wurde die OPG-Expression in SV-HFO Zellen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass SV-HFO Zellen OPG produzieren, allerdings ließ sich die Expression nicht durch E2-Zusatz stimulieren. Aufgrund der fehlenden Stimulierbarkeit der SV-HFO Zellen durch Estradiol, ist es nicht möglich die Zellen in der vorliegenden Form für ein Proof of concept zu nutzen.

Diskussion

8 Die Etablierung eines zellulären Testsystems zur Evaluierung von 17 β -HSD1-Inhibitoren

Die Untersuchung der intrazellulären Aktivität nimmt einen wichtigen Platz in der präklinischen Charakterisierung von potentiellen Arzneistoffkandidaten ein. Die Zelle als komplexes Assaysystem erlaubt ein umfassenderes Screening im Hinblick auf Permeation biologischer Membranen und Stabilität im physiologischen Milieu. Die Durchführung eines zellulären Assays zu einem frühen Zeitpunkt im Drug Discovery Prozess ermöglicht daher ein rechtzeitiges Ausschließen von Substanzen mit ungünstigen Eigenschaften von der weiteren Entwicklung und spart so Zeit und Kosten [142].

Im Rahmen der Entwicklung von 17 β -HSD1-Hemmstoffen für die Behandlung von Brustkrebs und Endometriose wurde ein zellulärer Assay in der Brustkrebszelllinie T47D entwickelt und darin die intrazelluläre Wirksamkeit der Inhibitoren am Target untersucht.

8.1 Vergleichende Beurteilung der Ergebnisse des zellulären Assays

Mit Hilfe des hier etablierten Assays in T47D-Zellen konnten Vertreter von drei strukturell verschiedenen Klassen von 17 β -HSD1-Inhibitoren untersucht werden. In allen Klassen konnten intrazellulär aktive Hemmstoffe identifiziert werden. Die aktivste Verbindung aus der Klasse der Bishydroxyphenylheterocyclen ist Verbindung AO36, ein Fluor-substituiertes 2,4-Bis(hydroxyphenyl)-Thiophen, mit einem IC₅₀-Wert von 64 nM. Mit 71 nM zeigt das Sulfonamid EZ141 die stärkste Hemmung in der Klasse der Hydroxyphenylnaphthole. Die aktivsten Verbindungen wurden in der Klasse der Hydroxyphenylmethanone gefunden. Hier ist insbesondere die Verbindung AO168 mit einem IC₅₀-Wert von 17 nM hervorzuheben.

Der Vergleich der Ergebnisse des zellulären Assays mit den Resultaten des zellfreien Assays macht deutlich, dass die Ergebnisse nur in seltenen Fällen korrelieren.

Trägt man die Ergebnisse aus dem zellfreien Assay gegen die Hemmwerte aus dem zellulären Assay in Form der pIC₅₀-Werte auf, so ergibt sich der in Abbildung 44 dargestellte Plot. Je größer der pIC₅₀-Wert, desto niedriger ist der IC₅₀. Deutlich zu

erkennen ist, wie bereits oben beschrieben, dass die hochaktiven Substanzen ($IC_{50} < 100$ nM) vor allem in der Gruppe der Hydroxyphenylmethanone identifiziert werden konnten. Weiterhin lassen sich Sulfonamide in der Klasse der Hydroxyphenylnaphthole zu einem Cluster (gelb) zusammenfassen, die mit zellfreien IC_{50} -Werten von 20-40 nM im Schnitt 10-fach höhere IC_{50} -Werte im Zellassay haben. Nur für wenige Substanzen kann die Hemmaktivität im zellfreien Assay auf das zelluläre System übertragen werden (Punkte auf der Diagonale).

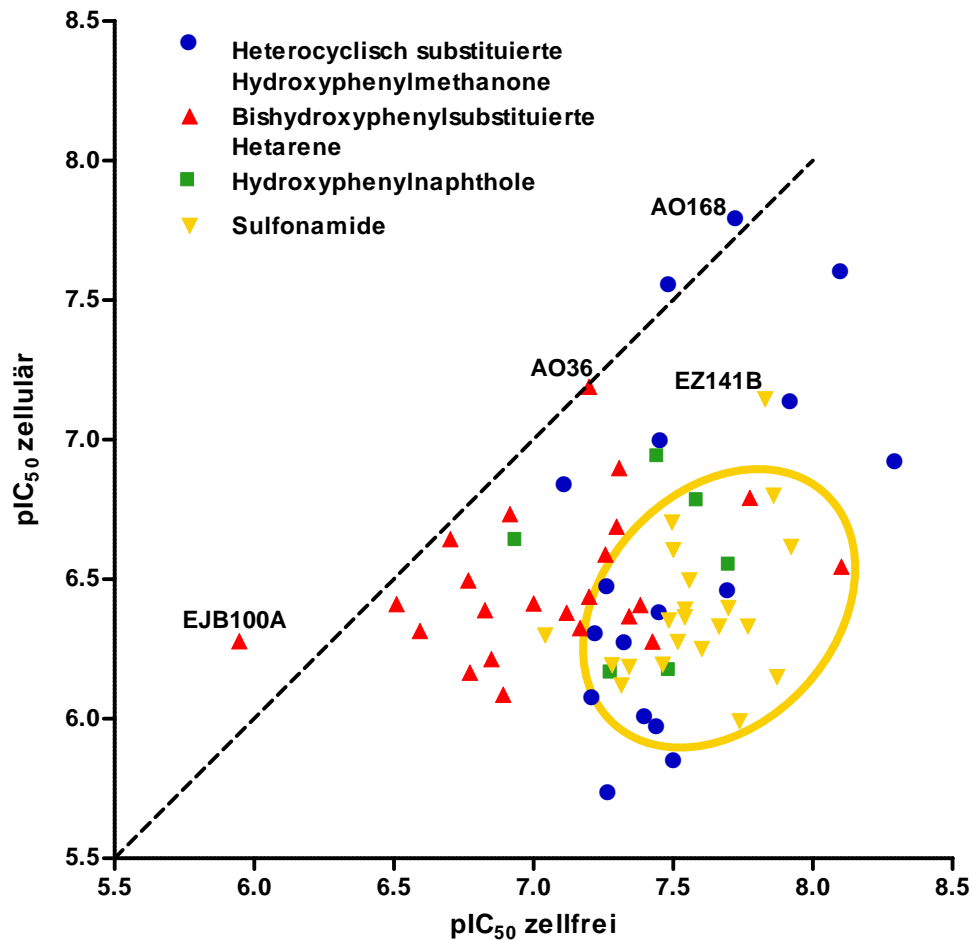


Abbildung 44 Vergleich der Hemmung von 17β -HSD1 im zellfreien und zellulären Assays anhand der pIC_{50} -Werte

An der Abbildung ist außerdem abzulesen, dass keine Verbindungen identifiziert wurden, die eine höhere Aktivität im Zelltest aufweisen, als im zellfreien Test. Die einzige Ausnahme bildet Verbindung EJB100A, die jedoch mit einem zellulären IC_{50} -Wert von 522 nM nur als schwach aktiver Inhibitor einzuordnen ist.

8.2 Mögliche Ursachen für die Abweichungen zwischen zellfreien und zellulären Hemmdaten

Abweichungen zwischen Hemmwerten in zellfreien und zellulären Assay werden im Drug Development Prozess häufig festgestellt. Als Ursachen kommen verschiedene Faktoren in Frage, die häufig von den physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs bestimmt werden.

Permeation der Zellmembran

Damit ein Hemmstoff auch intrazellulär wirken kann, muss die Zellmembran überwunden werden. Die Molekülgröße ist dabei einer der begrenzenden Faktoren und könnte im Falle der Sulfonamide innerhalb der Gruppe der Hydroxyphenylnaphthole (CH75, CH76, EZ513, CH36, EZ520, CH44, EZ508) mit Molekulargewichten über 500 Da ausschlaggebend sein. Ein weiterer Parameter, der die Permeation über die Membran beeinflusst, ist die Lipophilie einer Verbindung. Diese kann mit Hilfe des logP-Wertes dargestellt werden. Eine Korrelation zwischen den zellulären Hemmwerten und den logP-Werten besteht nicht (Abbildung 45). Allerdings fällt auf, dass ein großer Anteil der getesteten Hemmstoffe logP Werte über 5 aufweist und damit im Hinblick auf die Permeation der Zellmembran als kritisch anzusehen ist [143].

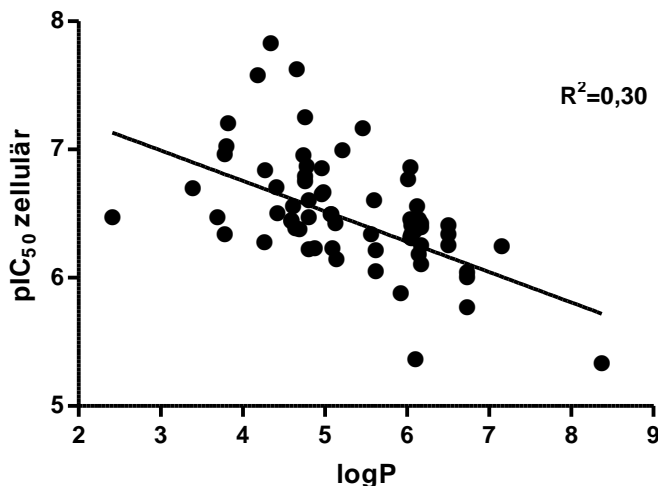


Abbildung 45 Korrelation zwischen zellulären IC₅₀-Werten und den logP-Werten

Intrazellulärer Metabolismus

Eine weitere Möglichkeit, warum die Inhibitoren intrazellulär schwächer wirken, könnte der Abbau durch metabolisierende Enzyme sein. T47D Zellen exprimieren verschiedene Enzyme, die zum Metabolismus der Hemmstoffe beitragen könnten.

Als Enzyme des Phase-I-Metabolismus sind CYP1A1 und CYP1B1 zu nennen, deren Funktion die Hydroxylierung von Estrogenen in Position 2 bzw. 4 ist und die diese durch die Überführung in die entsprechenden Catechole einem weiteren Abbau zugänglich machen [144]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der in allen Inhibitoren vorkommenden Hydroxyphenylstruktur mit dem aromatischen A-Ring der Estrogene könnten die Verbindungen ebenfalls in ortho-Position zu der Hydroxygruppe hydroxyliert werden. Neben CYP1A1 und CYP1B1, die eine vergleichsweise hohe Substratspezifität zu Estrogenen aufweisen, werden auch CYP3A4, CYP3A5 und CYP2C8 exprimiert [145]. CYP3A4 und CYP3A5 weisen dabei eine sehr breite Substratspezifität auf und könnten für den Metabolismus der Hemmstoffe an verschiedenen Positionen verantwortlich sein.

Neben den Phase-I-Enzymen werden auch Sulfotransferasen (SULT1A1, SULT1A3) und Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) als Phase-II-Enzyme exprimiert. Insbesondere SULT1A1 hat eine breite Substratspezifität, akzeptiert phenolische Hydroxygruppen und kann auch relativ große Moleküle sulfatieren. Die COMT ist verantwortlich für die Bildung der 2- bzw. 4-Methoxyestrogen-Metabolite, die im Laufe der Estrogenmetabolisierung entstehen. Die Enzymausstattung der T47D-Zellen macht also eine Phase-II-Metabolisierung der Inhibitoren möglich. Denkbar wäre entweder eine direkte Sulfatierung der phenolischen Hydroxygruppen oder zunächst die Hydroxylierung durch CYP1A1, CYP1B1 oder CYP3A4 und die anschließende Sulfatierung durch SULT oder im Falle von Catecholmetaboliten die Methylierung durch COMT. Die so entstandenen sulfatierten oder methylierten Metaboliten würden sehr wahrscheinlich keine hemmende Wirkung mehr ausüben.

Effluxpumpen

Die Expression von Effluxpumpen kann ebenfalls Unterschiede zwischen Hemmstoffen verursachen, die in zellfreien und zellulären Assays bestimmt wurden. Für T47D konnte die Expression der Effluxpumpen p-gp (MDR1) und des in Brusttumoren exprimierten Effluxtransporters (BCRP) jedoch nicht nachgewiesen werden [146]. Das Ausschleusen der Verbindungen durch Effluxpumpen ist daher als Ursache für die schlechten intrazellulären Hemmwerte unwahrscheinlich.

8.3 Rolle des zellulären Assays im Screening-System

Zur Evaluierung von 17 β -HSD1-Inhibitoren ist im Arbeitskreis ein Screeningsystem etabliert worden, mit dem sich effektiv vielversprechende Hemmstoffe für die weitere Entwicklung herausfiltern lassen [147]. Darin ist als wichtiger Bestandteil auch der in dieser Arbeit etablierte Zelltest in T47D-Zellen integriert.



Abbildung 46 Integration des etablierten zellulären Assays in das Screeningsystem [147]

Die synthetisierten Verbindungen werden in einem zellfreien Assay zunächst auf ihre inhibitorische Aktivität an 17 β -HSD1 aus humaner Plazenta getestet. Die so identifizierten Hemmstoffe werden dann auf Selektivität gegenüber 17 β -HSD2 und den Estrogenrezeptoren überprüft. Zur weiteren Evaluierung wurden Grenzwerte für die Aktivität und Selektivität definiert, die schwach aktive bzw. unselektive Verbindungen schon in einem frühen Stadium aussortieren. Im Anschluss an die Selektivitätsassays wird die Zytotoxizität in T47D-Zellen bestimmt, damit im nachfolgenden zellulären Assay Artefakte ausgeschlossen werden können. Mit dem zellulären Assay in T47D-Zellen können neben der intrazellulären Hemmung des Targetenzym 17 β -HSD1 auch Informationen über die Absorptionseigenschaften erhalten werden. Außerdem können die Ergebnisse des Zelltests auch Hinweise auf einen möglichen intrazellulären Metabolismus liefern.

Ein weiterer Test, der in T47D-Zellen durchgeführt werden kann, ist ein Test auf Estrogenizität, in dem das Potenzial der Hemmstoffe untersucht wird, selbst proliferationsfördernd zu wirken. Die Evaluierung der ADME-Eigenschaften vervollständigt das Screeningsystem. Dazu gehört der CaCo2-Permeationsassay, der detaillierte Aufschlüsse über die intestinale Absorption gibt. Außerdem kann der Einfluss von aktiven Transportern zur Aufnahme der Inhibitoren und von Effluxpumpen abgeschätzt werden, die die Hemmstoffe aktiv aus der Zelle fördern. Die Untersuchung der metabolischen Stabilität der Substanzen in Lebermikrosomen liefert weitere Aufschlüsse über den Phase-I-Metabolismus. Das Interaktionsrisiko mit anderen Arzneistoffen kann durch Inhibitionsstudien an den wichtigsten hepatischen CYP-Enzymen abgeschätzt werden. Pharmakokinetikstudien geben schließlich Aufschluss über den gesamten Prozess *in vivo* und erlauben die Berechnung von Bioverfügbarkeitswerten.

Durch dieses Screeningsystem identifizierte Hemmstoffe stellen vielversprechende Kandidaten für eine weitere Evaluierung dar. Dazu zählen sowohl das *in vitro* Proof of concept, das für ausgewählte Verbindungen von Patricia Kruchten durchgeführt wurde [148], als auch *in vivo* Versuche in einem geeigneten Tiermodell. Hierzu muss allerdings je nach Versuchsdesign zuvor noch die Wirksamkeit am Targetenzym der entsprechenden Tierart gezeigt werden.

Das Screeningsystem könnte zukünftig noch durch weitere Assays ergänzt werden. Die Ergebnisse des in dieser Arbeit etablierten Zellassays zeigen, dass für eine ganze Reihe von Verbindungen intrazellulär eine deutlich reduzierte Hemmaktivität in Kauf genommen werden muss. Aufgrund der phenolischen Struktur, die in fast allen Inhibitoren enthalten ist, wäre es sinnvoll den Phase-II-Metabolismus zu überprüfen. Dazu können zum einen die Metabolisierung durch einzelne Enzyme überprüft werden, z.B. mittels Sulfotransferase- oder Glucuronyltransferase-Assays. Zum zweiten können auch S9-Fraktion-Zubereitungen eingesetzt werden, die ein Gemisch der in der Leber exprimierten Enzyme enthalten, die am Phase-II-Metabolismus beteiligt sind. Ein weiterer Assay, der vor einer *in vivo* Testung durchgeführt werden könnte, ist ein Test auf Stabilität im Plasma, da auch hier zum Beispiel Sulfotransferasen exprimiert sind. Die Aufklärung der Gründe für eine verminderte intrazelluläre Aktivität macht ein gezieltes Design von in dieser Hinsicht optimierten Verbindungen möglich.

8.4 Literaturbeschriebene zelluläre Assays zur Evaluierung von 17 β -HSD1-Inhibitoren

T47D-Zellen werden auch von Poirier *et al.* [149], Gobec *et al.* [150] und von Sterix [151] zur Evaluierung von 17 β -HSD1-Inhibitoren eingesetzt. Die Substratkonzentrationen in den Assays von Poirier und Gobec liegen dabei mit 60 nM E1 bzw. 50 nM E1 vergleichbar mit dem hier etablierten Assay. Mit einer Zellzahl von 30000 Zellen pro well liegen die beiden Testsysteme jedoch deutlich unter der hier eingesetzten Zellzahl von 1000000 Zellen pro well. Dadurch verlängert sich die Inkubationszeit der Konkurrenz-Assays auf 24 h. Der hier etablierte Zelltest bietet demgegenüber mit einer Inkubationszeit von nur 30 min den Vorteil eines höheren Probendurchsatzes. Außerdem müssen bei einer Inkubationszeit von 24 h Veränderungen innerhalb der Medienzusammensetzung wie pH-Wert-Veränderungen in Kauf genommen werden und die zu testenden Substanzen sind länger dem intrazellulären Metabolismus unterworfen, was Auswirkungen auf das Hemmpotential haben kann.

Im von Sterix etablierten Zelltestsystem wird eine Substratkonzentration von nur 2 nM E1 eingesetzt. Dies wird dadurch begründet, dass diese Substratkonzentration den physiologischen Verhältnissen entspricht. Im Fall von kompetitiven Enzyminhibitoren wäre durch die äußerst niedrige Substratkonzentration ($0,03 \cdot K_m$) von einer starken Abweichung der Ergebnisse im Vergleich zu anderen Assaysystemen auszugehen.

Neben T47D-Zellen wird auch die Brustkrebszelllinie MCF-7 als zelluläres Modellsystem von HORMOS benutzt [89]. Aufgrund der äußerst niedrigen endogenen Expression von 17 β -HSD1 wurden die verwendeten Zellen mit 17 β -HSD1 transfiziert, um höhere Expressionslevel zu erreichen. Die Substratkonzentration liegt wie auch im Assaysystem von Sterix bei 2 nM E1.

Poirier *et al.* setzen neben dem oben beschriebenen Assay in T47D auch intakte HEK293-Zellen ein, in denen humane 17 β -HSD1 überexprimiert wird. Da in der gleichen Gruppe als Enzymquelle im zellfreien Assay ein HEK-Homogenat eingesetzt wird, bietet der zelluläre Assay im gleichen System den Vorteil der direkten Vergleichbarkeit von zellfreien und zellulären Hemmdaten. Allerdings bestehen zwischen den Hemmwerten im HEK-Zelltest und im T47D-Zelltest deutliche Unterschiede [149].

8.5 Ausblick: Zellkulturmodell für Endometriose

Neben Brustkrebs stellt Endometriose eine weitere estrogenabhängige Erkrankung dar. Für die Validierung von 17 β -HSD1 als Target zur Behandlung von Endometriose können Zelllinien, die aus Tumorgewebe isoliert wurden, nur eingeschränkt verwendet werden.

Eine interessante Alternative stellen immortalisierte Zellen dar, die aus ektopen Läsionen isoliert wurden. Zeitvogel *et al.* beschreiben die Isolierung und erste Charakterisierung von epithelialen Zellen und von Stromazellen aus Endometrioseherden [152]. Diese Zellen wurden in einer sehr detaillierten Untersuchung von Banu *et al.* weiter auf ihr steroidogenes Potential und die Expression der Estrogenrezeptoren untersucht. Dabei konnte für epitheliale Zellen die Expression von 17 β -HSD1, ER α und β sowie eine moderate Expression von 17 β -HSD2 nachgewiesen werden [153]. Diese enzymatische Ausstattung und die Präsenz der Estrogenrezeptoren machen die Zellen zu interessanten Modellsystemen für die Analyse der Wirkung von 17 β -HSD1-Inhibitoren.

In einer weiterführenden Studie wurde zudem die Etablierung eines Nacktmaus-Modells beschrieben [154]. Dabei konnten durch Injektion eines Gemisches der oben beschriebenen Stroma- und Epithelzellen in die Bauchhöhle der Mäuse endometriotische Läsionen induziert werden. Das so geschaffene Endometriosemodell hat den Vorteil, dass die Expression des Targetenzym innerhalb der Läsionen gegeben ist und dass durch die Verwendung humaner Zellen keine Speziesunterschiede überwunden werden müssen. Daher könnte das Modell zur Evaluierung der 17 β -HSD1-Hemmstoffe und zur Erbringung des *in vivo* Proof of concepts genutzt werden.

9 17 β -HSD2-Hemmstoffe: Verschiedene Inhibitionsmechanismen vor dem Hintergrund struktureller Informationen

Für das transmembranäre Enzym 17 β -HSD2 stehen kaum Informationen über den räumlichen Aufbau zur Verfügung. Das Inhibitor-Design orientiert sich daher an der Struktur der physiologischen Substrate Estradiol und Testosteron. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die literaturbekannten Inhibitoren überwiegend steroidale Grundstruktur aufweisen [136]. Ausnahmen bilden hierbei nur die von Bayer erforschte Substanzklasse der Pyrrolidinonderivate [116] und die im Arbeitskreis Hartmann entdeckten Verbindungen aus strukturell verschiedenen Substanzklassen [99, 102, 117].

Um mehr über die Wechselwirkungen unserer Inhibitoren mit dem Enzym zu erfahren, wurden enzymkinetische Studien durchgeführt, die Aufschluss über den Hemmmechanismus der Inhibitoren geben. Aufgrund des steroidomimetischen Ansatzes, der beim Design der Verbindungen verfolgt worden war, wurde für die Verbindungen ein kompetitiver Hemmmechanismus vermutet. Die Ergebnisse der Kinetikstudien konnten diesen jedoch nur für das biphenylisch substituierte Hydroxyphenylmethanon-Derivat belegen. Alle anderen Verbindungen wiesen „*mixed-type*“ oder nichtkompetitiven Hemmmechanismus auf.

Diese Ergebnisse bringen wichtige Information für das weitere Inhibitor-Design, da für die Inhibitoren ohne kompetitiven Hemmmechanismus aufgrund der abweichenden Positionierung in der Bindetasche andere Aminosäuren als Wechselwirkungspartner zur Verfügung stehen. Das bedeutet, dass Struktur-Wirkungsbeziehungen einer Klasse nicht auf Inhibitoren, die andere Hemmmechanismen aufweisen, übertragen werden können.

Die Kombination der experimentellen Ergebnisse mit Docking-Studien, die an einem ersten Homologiemodell von Matthias Negri durchgeführt wurden, weisen auf zwei verschiedene Bereiche innerhalb der Bindetasche hin, die von den Inhibitoren zur Bindung genutzt werden. Das natürliche Substrat Estradiol und kompetitive Inhibitoren überlappen nur über die Distanz eines Phenylrings mit dem Nicotinamidring des Cofaktors NAD⁺ (Abbildung 47). Im Gegensatz dazu schieben sich „*mixed-type*“ Inhibitoren weit in die Bindetasche hinein und kommen in einer Subpocket unter dem Cofaktor zu liegen.

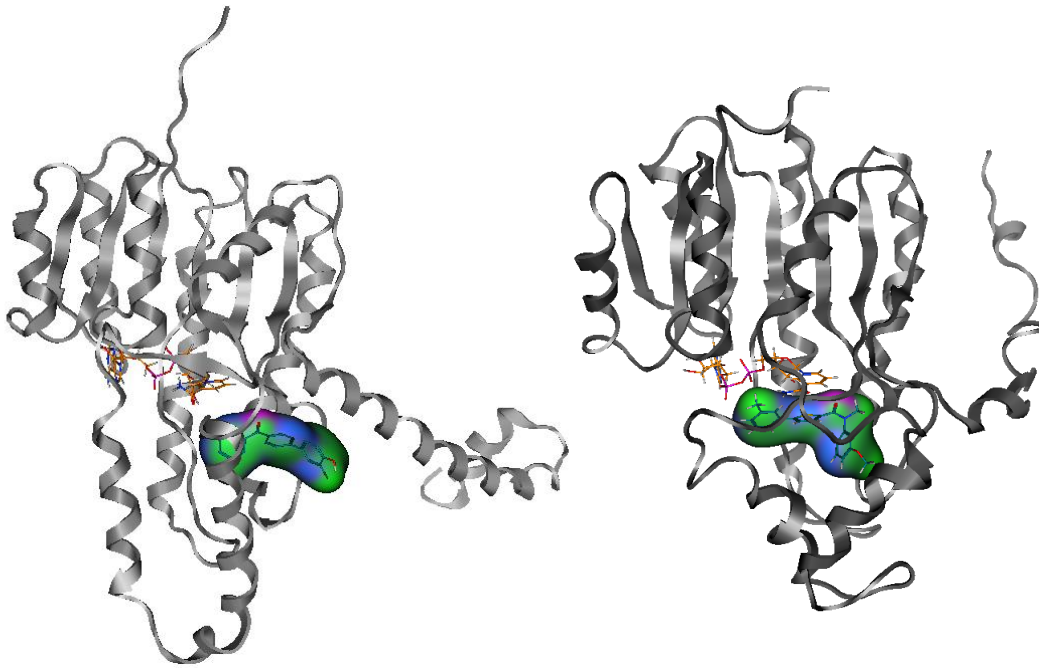


Abbildung 47 Vergleich der Positionierung des gedockten kompetitiven (links) und „mixed-type“ (rechts) Hemmstoffes innerhalb der Bindetasche der 17β-HSD2 (Homologiemodelle)

Estradiol wird durch Wechselwirkung der Hydroxygruppe in Position 17 des Steroidgrundgerüsts mit Ser219 in der Bindetasche fixiert (Abbildung 48). Leu171 ist aufgerichtet und begrenzt somit die Tasche. Das Steroidgerüst füllt die hydrophobe Tasche aus, die von Met220, Met226, Leu229, Phe306 und Leu309 gebildet wird. Die Hydroxygruppe in Position 3 des Steroidgrundgerüsts bildet eine Wasserstoffbrücke zu Asn305.

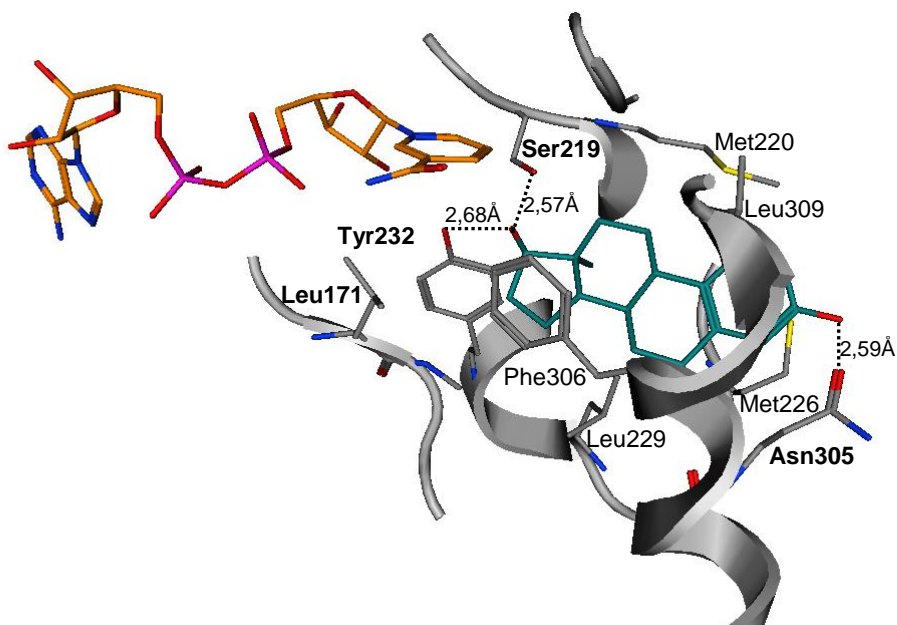


Abbildung 48 Wechselwirkungen von Estradiol gedockt in die Bindetasche des Homologiemodells der 17β-HSD2

Eine wichtige Rolle bei der Positionierung der Liganden kommt Leu171 zu, das entweder aufgerichtet oder liegend vorkommt und durch seine jeweilige Lage den Zugang zu der Subpocket unterhalb des Cofaktors öffnet oder verschließt. Im Falle von kompetitiven Inhibitoren oder des Substrates Estradiol ist Leu171 aufgerichtet und die Subpocket verschlossen (Abbildung 48 und Abbildung 49).

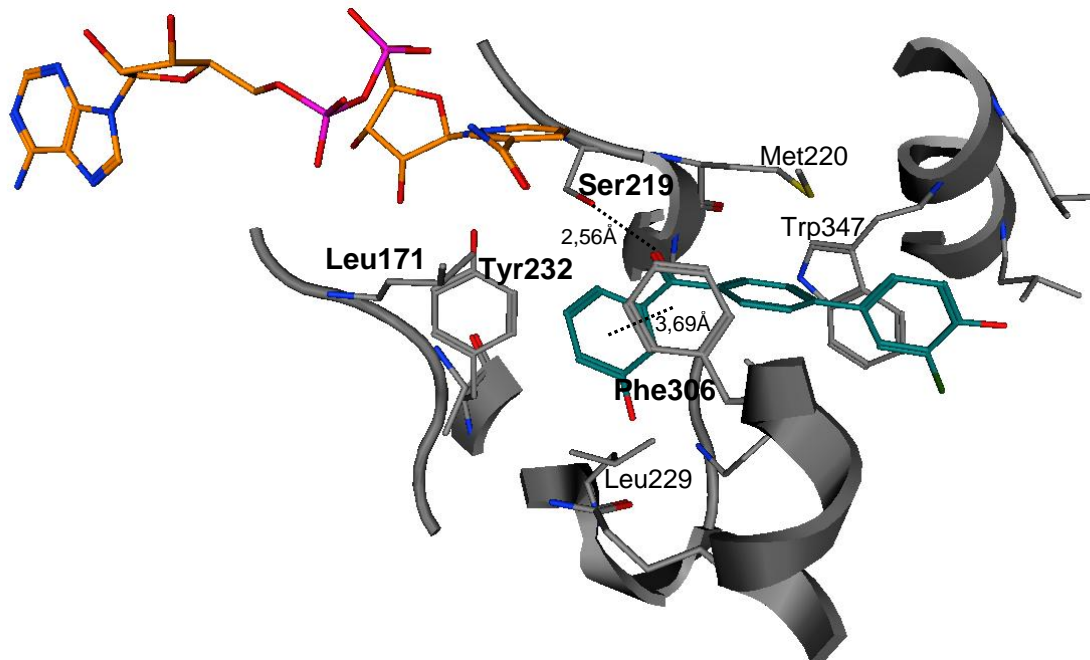


Abbildung 49 Wechselwirkungen von compound 1 gedockt in die Bindetasche des Homologie-modells der 17 β -HSD2

Der kompetitive Inhibitor compound 1 bildet mit der Ketofunktion eine Wasserstoffbrücke zu Ser219 aus (Abbildung 49). Der m-OH-Phenylring kommt in einer Tasche zu liegen, die durch das aufgerichtete Leu171 begrenzt wird und ist durch eine π - π -Wechselwirkung mit Phe306 stabilisiert. Der biphenylische Teil des Inhibitors liegt im hydrophoben Bereich der Bindetasche, die unter anderem durch Met220, Met226 und Trp347 gebildet wird.

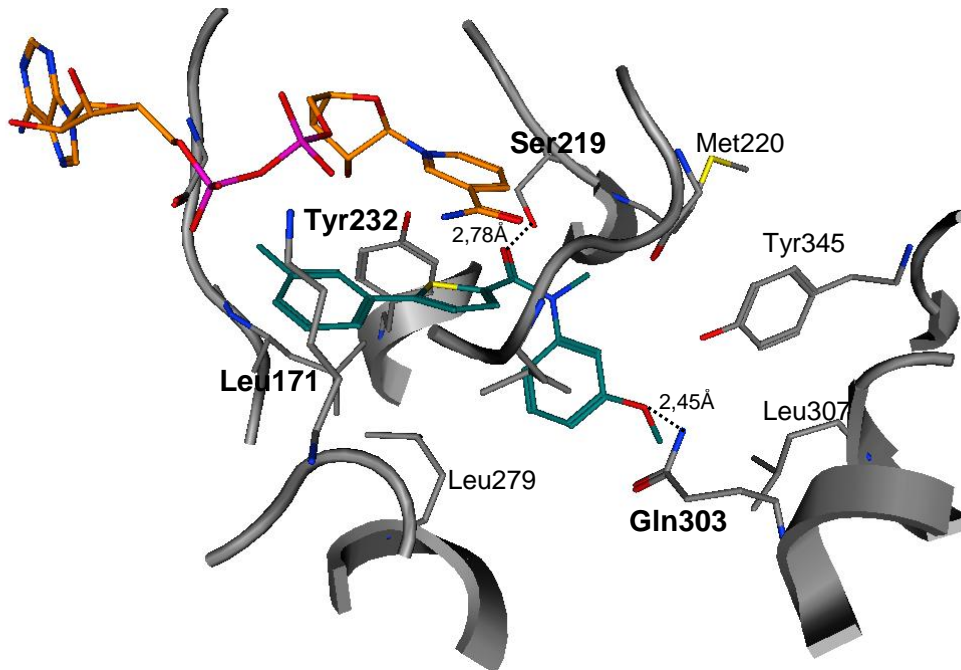


Abbildung 50 Wechselwirkungen von compound 4 gedockt in die Bindetasche des Homologie-modells der 17 β -HSD2

Der „*mixed-type*“ Inhibitor compound 4 liegt anders positioniert in der Bindetasche (Abbildung 50). Fixiert wird auch dieser Inhibitor über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amidsauerstoff und Ser219. Der m-Methoxy-substituierte Phenylring ragt in die Tasche, die durch Met220, Leu279, Leu307 und Tyr345 gebildet wird, und wird am unteren Ende der Tasche durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoffatom der Methoxygruppe und Gln303 stabilisiert. Das nach unten geklappte Leu171 öffnet wie oben bereits beschrieben eine Subpocket unterhalb des Cofaktors und bildet einen Sattel, der den Inhibitor zusätzlich stabilisiert. Dadurch wird es möglich, dass der Inhibitor, anders als der kompetitive Inhibitor, weit unter den Cofaktor ragt (vgl. auch Abbildung 47).

Die Durchführung der Inhibitionsstudien brachte Klarheit über den Hemmmechanismus, über den die Inhibitoren ihre Wirkung auf die 17 β -HSD2 vermitteln. Zusammen mit den Ergebnissen der Dockingstudien können nun gezielt neue Designstrategien entwickelt werden, um weitere Interaktionspartner in der Bindetasche zu nutzen und so potentere Inhibitoren zu erhalten.

Aus dem Homologiemodell können weiterhin interessante Positionen für die Durchführung von Mutagenesestudien abgeleitet werden, mit denen die oben beschriebenen Dockingpositionen experimentell verifiziert werden können.

10 Etablierung eines zellulären Testsystems zur Untersuchung von 17 β -HSD2-Hemmstoffen

10.1 Die Auswahl einer geeigneten Zelllinie zur Evaluierung von 17 β -HSD2-Inhibitoren für die Behandlung von Osteoporose

Im Arbeitskreis Hartmann wurde eine große Bibliothek von 17 β -HSD2-Inhibitoren entwickelt. Neben der guten Wirksamkeit an der 17 β -HSD2 in Placentamikrosomen ist für eine spätere *in vivo* Anwendung auch eine Wirksamkeit im zellulären System zu fordern. Wie in der Einleitung dargestellt, wird 17 β -HSD2 in Mammakarzinomen, Ovarkarzinomen, in Colon-Zellen und in einer Vielzahl weiterer Gewebe exprimiert. Naheliegend ist daher der Einsatz einer 17 β -HSD2-positiven-Zelllinie aus Tumorgewebe zur Durchführung eines zellulären Assays. Dazu wurde in unserem Arbeitskreis die Estrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 ausgewählt, in der die Expression von 17 β -HSD2 nachgewiesen wurde [155].

Mit Hilfe dieser Zelllinie kann die intrazelluläre Wirksamkeit der 17 β -HSD2-Inhibitoren evaluiert werden. Für ein mögliches *in vitro* Proof of concept kommt ein solches zelluläres System jedoch nicht in Frage, da sich diese Brustkrebszelllinie in ihren physiologischen Eigenschaften deutlich von den späteren Targetzellen im Knochengewebe unterscheidet.

An eine für ein *in vivo* Proof of concept geeignete Zelllinie sind verschiedene Anforderungen zu stellen. Erstens muss das Targetenzym 17 β -HSD2 exprimiert werden. Da die Effekte der 17 β -HSD2-Inhibitoren auf einer intrazellulären Erhöhung der E2-Konzentration beruhen, ist ebenfalls eine Expression der Estrogenrezeptoren α und β zu fordern, über die die Estrogeneffekte vermittelt werden. Zudem sollte die Zelllinie ihren Ursprung im Knochengewebe oder in dessen Vorläufern haben. Da die Studienlage für E2-vermittelte Effekte in Osteoblasten günstig ist, sollte ein zelluläres Modell zur Untersuchung in Osteoblasten ausgewählt werden. Tabelle 4 gibt einen Überblick über häufig verwendete Zelllinien, die als Modellsysteme für Osteoblasten benutzt werden.

Tabelle 4 Übersicht über häufig verwendete Zellen als Modellsysteme für Osteoblasten

	Zellen	17 β -HSD2	ER α	ER β	17 β -HSD4	17 β -HSD1	17 β -HSD3	Aro-matase
Primärkultur	HOB	+			+	-	-	
Osteosarkom-Zelllinien	SaOs2	-	+	+	+	-	-	+
	MG63	+	+	+	+	+	-	+
	TE85	+			+	-	-	
Immortalisierte Zellen	hFOB.1.19/ ER9	-	+	+		+	+	+
	SV-HFO	+	+	+	+	-	+	+

Primärkulturen von humanen Osteoblasten stellen ein mögliches Modell zur Charakterisierung von Hemmstoffen dar. Primärkulturen bieten den Vorteil, dass sie den Zustand *in vivo* am besten abbilden, ohne dass durch Eingriffe von außen die Zellphysiologie beeinflusst wurde. Allerdings sind auch einige Nachteile in Kauf zu nehmen. Die begrenzte Kultivierbarkeit der Zellen erfordert ein häufiges Isolieren der Zellen aus neuem Patientenmaterial. Damit verbunden sind ein hoher experimenteller Aufwand und die Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Gewebeproben. Außerdem ist mit einer vergleichsweise hohen Batch-to-Batch-Variabilität zu rechnen, die den Erhalt reproduzierbarer Ergebnisse erschwert. So berichten Dong *et al.*, dass in primären Osteoblasten 17 β -HSD2 und 4, nicht jedoch Typ 1 und 3 exprimiert werden [107], während Feix *et al.* die Expression aller vier Enzyme nachgewiesen hat [108].

In der Literatur ist eine Vielzahl von Zelllinien beschrieben, die aus Tumoren des Knochengewebes abgeleitet wurden [40]. Diese Zelllinien bieten den Vorteil der leichten Kultivierbarkeit und vergleichsweise hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Der Einsatz dieser Zelllinien ist jedoch kritisch zu bewerten, da Tumorzellen ein anderes physiologisches Verhalten, z.B. unkontrolliertes Wachstum, zeigen und somit nicht den Phänotyp normaler Knochenzellen widerspiegeln [156, 157]. Neben den Osteosarkom-Zelllinien HOS, TE85 und SaOS-2 wurde auch MG-63 auf Expression der 17 β -HSDs untersucht [107]. Das Expressionsprofil ist in Tabelle 4 dargestellt. MG-63 wurde als zelluläres System von Wood *et al.* zur Evaluierung der inhibitorischen Potenz von 17 β -HSD2-Inhibitoren genutzt [116].

Eine sehr gut charakterisierte Zelllinie stellt hFOB1.19/ER9 dar [158]. Bei diesen Zellen handelt es sich um fetale Osteoblasten, die temperaturabhängig immortalisiert sind. Die Zellen exprimieren die Estrogenrezeptoren und wurden in zahlreichen Studien als Modellsystem für die Untersuchung estrogenabhängiger Effekte eingesetzt [48, 159], leider wird das Targetenzym 17β -HSD2 nicht exprimiert (persönliche Mitteilung, Prof. H. Sasano), so dass sie für unsere Zwecke nicht in Frage kommen.

SV-HFO Zellen wurden als Alternative ausgewählt [139]. Darin werden sowohl 17β -HSD2 [109] als auch die Estrogenrezeptoren [140] exprimiert und die Zellen sind durch Immortalisierung für einen Zeitraum von ungefähr 19 Passagen kultivierbar. SV-HFO Zellen entsprechen in ihrem Phänotyp dem von Osteoblasten. Dies zeigt sich in ihrem Differenzierungsverhalten, der Produktion extrazellulärer Matrix und deren Calcifizierung [109]. Der Nachteil der SV-HFO Zellen liegt in dem im Vergleich zu etablierten Tumorzelllinien relativ langsamen Wachstum und der begrenzten Passagenzahl der Zellen.

SV-HFO Zellen wurden in der Literatur von verschiedenen Arbeitsgruppen benutzt. Watanabe *et al.* charakterisierten die Regulation der Aromatase-Expression durch verschiedene Cytokine [160]. Die Bedeutung von Glucocorticoiden und deren intrazelluläre Regulation durch 11β -HSD wurden von van Leeuwen *et al.* untersucht [161, 162].

10.2 SV-HFO Zellen als Testsystem für 17β -HSD2-Inhibitoren

SV-HFO Zellen wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um die Hemmung des Estradiol- und Testosteron-Umsatzes intrazellulär zu untersuchen. Die getesteten Inhibitoren waren in der Lage die Inaktivierung beider Sexualhormone zu hemmen. Allerdings unterscheidet sich die Hemmung im zellulären Assay deutlich von der inhibitorischen Aktivität an Placentamikrosomen. Als zusätzliche Barriere ist im Zelltest die Membran zu überwinden. Die Membranpermeation wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielt das Molekulargewicht. Die bekannte Lipinski „Rule of Five“ gibt als Grenze ein Molekulargewicht von 500 Da vor [143]. Da alle getesteten Inhibitoren jedoch unter einem Molekulargewicht von 400 Da liegen, sollte dies kein Permeabilitätshindernis darstellen. Neben dem Molekulargewicht spielt auch die Lipophilie einer Verbindung eine wichtige Rolle in der passiven Diffusion über die Zellmembran. Ein Maß für die Lipophilie einer Verbindung ist der logP Wert, der aus

dem Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen Wasser und Octanol abgeleitet wird. Die berechneten logP-Werte liegen in diesem Fall im Bereich zwischen 3,71 und 4,87 und erfüllen somit auch den von Lipinski geforderten Wert von kleiner als 5. Als Besonderheit im Hinblick auf die verwendeten Zellen soll hier die gebildete extrazelluläre Matrix betrachtet werden, die als zusätzlicher Interaktionspartner zur Verfügung steht. Extrazelluläre Matrix besteht zu einem großen Teil aus Kollagen, das zu einer Bindung der Inhibitoren führen könnte [163]. Zudem wird in diese Kollagenmatrix im Laufe der Mineralisierung Hydroxyapatit eingelagert, was ein zusätzliches Diffusionshindernis darstellen könnte.

Trotz der Unterschiede der Hemmaktivität zwischen Mikrosomenassay und Zellassay konnten Inhibitoren identifiziert werden, deren IC₅₀-Werte unter 1 µM liegen. Die Substanzklasse der Diphenyl-substituierten Thiophencarboxylamide schneidet im Zellassay generell schlechter ab. In zukünftigen Designstrategien sollten diese Ergebnisse berücksichtigt werden und so durch gezielte Modifizierung Inhibitoren gefunden werden, die auch im SV-HFO Zellassay gute Aktivitäten zeigen.

10.3 Die Eignung von SV-HFO Zellen für ein *in vitro* Proof of concept

Das Konzept zum Einsatz von 17β-HSD2-Inhibitoren zur Behandlung von Osteoporose basiert darauf, durch Hemmung der 17β-HSD2 die intrazellulären E2-Spiegel zu erhöhen. Für ein Proof of concept muss daher gezeigt werden, dass dies mit einer positiven Auswirkung auf die Knochenphysiologie verbunden ist. Im Fall von 17β-HSD2-Inhibitoren ist der positive Effekt durch E2 oder T vermittelt. Für die Analyse muss also ein Parameter gewählt werden, der durch die Sexualhormone beeinflusst wird. Die im Fall von Targets zur Behandlung von Tumoren häufig gewählte Analyse der Zellproliferation ist im Falle von 17β-HSD2 und E2 mit Vorsicht zu betrachten, da in der Literatur uneinheitliche Effekte von E2 auf das Zellwachstum beschrieben sind [157]. Zudem ist die Anzahl der Osteoblasten nicht der limitierende Faktor in der Pathogenese der Osteoporose, weil es zu einer Erhöhung der Zahl der BMUs und somit einer Zunahme der Osteoblastenzahl kommt, so dass die Relevanz der Analyse in Frage stünde. Für Osteoblasten sind mehrere Parameter beschrieben, die durch E2 beeinflusst werden (Alkalische Phosphatase, Osteocalcin). Allerdings ist für diese Parameter kein direkter Zusammenhang mit der Erkrankung beschrieben. Weiterhin ist zu beachten, dass E2 *in vivo* antiresorptiv wirksam ist. Daher sollte für das *in vivo* Proof of concept ein Parameter gewählt werden, der von Osteoblasten

gebildet wird und dann selbst hemmende Effekte auf die Osteoclasten vermittelt. Ein Parameter, der alle diese Anforderungen erfüllt, ist Osteoprotegerin. Die Bildung von Osteoprotegerin durch SV-HFO Zellen konnte gezeigt werden, allerdings wurde das Ausmaß der Expression weder positiv durch Estradiol noch negativ durch den Estrogenrezeptor-Antagonisten Fulvestrant beeinflusst.

10.4 Diskussion der möglichen Ursachen für die fehlende E2-Stimulierbarkeit der SV-HFO Zellen

SV-HFO Zellen wurden ausgewählt, da neben der Expression des Targetenzym 17 β -HSD2 auch die Expression der Estrogenrezeptoren α und β nachgewiesen ist. Die fehlende Stimulierbarkeit durch E2 kommt daher unerwartet. Eine mögliche Ursache könnten zu niedrige Expressionslevel für die Rezeptoren sein, aufgrund derer kein messbarer Effekt erzielt wird. Die Expression der Steroidhormonrezeptoren liegt auch in anderen Osteoblastenzelllinien deutlich niedriger als in steroidhormonabhängigen Krebszelllinien [158, 164].

Neben der niedrigen Rezeptorzahl können aber auch andere Gründe in Frage kommen. So kann ein nichtfunktionaler Rezeptor vorliegen, der zwar Estradiol bindet, jedoch keine Transkription Estrogen-abhängiger Gene mehr auslöst. Das Vorliegen von nichtfunktionalem Rezeptorprotein wird zum Beispiel auch im Zusammenhang mit estrogenunabhängigen Tumoren beschrieben und wird in diesem Fall zurückgeführt auf Mutationen und alternative Splicingvarianten [165, 166].

Um zu untersuchen, ob das Nichtansprechen auf Rezeptorebene begründet liegt oder ob es im Rezeptordownstream-Signaling zu Störungen kommt, sind weitere Studien erforderlich.

Der Einsatz von „-omics“-Technologien könnte Aufschluss darüber bringen, ob die Behandlung mit Estradiol generell zu Veränderungen der Gentranskription, des Metaboloms oder der Proteinexpression in den SV-HFO Zellen führt.

10.5 Screeningsystem für 17 β -HSD2-Inhibitoren

Im Arbeitskreis Hartmann entwickelte Enzyminhibitoren werden anhand eines effektiven Screeningsystems hinsichtlich ihrer Aktivität und Selektivität evaluiert. Dabei werden ADME Parameter ebenso berücksichtigt wie Toxizitätsuntersuchungen. Die Testung der Verbindungen in einer definierten Reihenfolge und das

Filtern nach festgelegten Grenzwerten führen zu einer effizienten Auswahl der besten Verbindungen. Das für das 17 β -HSD1-Projekt entwickelte Testsystem [147] kann in modifizierter Art und Weise auch für Inhibitoren der 17 β -HSD2 angewandt werden. Den ersten Schritt bildet die Überprüfung der Aktivität im Placentamikrosomen-Assay. Daten, die in diesem Test ermittelt werden, bilden die Grundlage für die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen. Die Selektivität gegenüber dem physiologischen Gegenspieler 17 β -HSD1 und den Estrogenrezeptoren α und β filtert im zweiten Schritt unselektive Verbindungen. Nach der Testung auf Cytotoxizität erfolgt dann die Evaluierung der intrazellulären Wirksamkeit im MDA-MB-231-Zelltest. Da sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt hat, dass die Hemmwerte zwischen MDA-MB-231-Zelltest und Osteoblasten-Zelltest in SV-HFO Zellen nicht korrelieren, sollte dieser als Aktivitätstest in den Targetzellen in das Screeningsystem eingeschlossen werden.

Sind alle diese Schritte erfolgreich passiert, schließen sich als Modell für die intestinale Absorption der Permeationstest in CaCo-Zellen sowie Metabolismusuntersuchungen in Lebermikrosomen an. Das mögliche Interaktionsrisiko kann durch Inhibitionstests an hepatischen CYP-Enzymen überprüft werden.

Für eine spätere Evaluation der Substanz in einem geeigneten Tiermodell werden für ausgewählte Substanzen die Hemmtests der entsprechenden homologen Enzyme zum Ausschluss von Speziesunterschieden [80] und Pharmakokinetik-Studien durchgeführt.

10.6 Ausblick

10.6.1 Die Bedeutung von Osteoclasten als Targetzellen von 17 β -HSD2-Hemmstoffen

Weiteres Potential als Targetzellen für 17 β -HSD2-Inhibitoren bieten die Knochen abbauenden Osteoclasten. Dabei ist allerdings festzustellen, dass die Datenlage hinsichtlich der Expression sowohl von 17 β -HSD2 als auch der Estrogenrezeptoren schlechter ist als für Osteoblasten. In der Ratte wurden die Expression von 17 β -HSD2 und ER α und β durch van der Eerden *et al.* beschrieben [110]. In humanen Osteoclasten ist die Expression beider Estrogenrezeptortypen nachgewiesen [167, 168], allerdings finden sich widersprüchliche Aussagen zu den direkten Effekten von E2 auf die Osteoclasten. Abhängig von der Quelle der Osteoclasten, den verwendeten Bedingungen zur Induktion der Differenzierung und dem

Differenzierungsstadium, werden sowohl direkte Effekte gefunden [169], als auch direkte Effekte ausgeschlossen [170].

Ein erster Schritt bei der Untersuchung von 17 β -HSD2-Inhibitoren in Osteoclasten wäre daher der Nachweis der 17 β -HSD2 Proteinexpression in humanen Osteoclasten bzw. Osteoclastenvorläuferzellen (z.B. in CD14+-Monocyten).

10.6.2 Potentielle Targets in der Osteoporosetherapie

Trotz der bereits dargestellten verfügbaren Osteoporosetherapeutika besteht der Bedarf zur Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung der Osteoporose. Neben der Entwicklung von Inhibitoren der 17 β -HSD2 werden auch andere Ansätze verfolgt.

Antiresorptive Wirkstoffe

Die bisher verfügbaren Bisphosphonate hemmen die Aktivität der Osteoclasten. Dadurch verringert sich die Zahl der BMUs und es kommt zeitverzögert auch zu einer Verringerung der Knochenneubildung, was langfristig zu einer Verschlechterung der Knochenqualität führt.

Daher gibt es Bestrebungen eine antiresorptive Therapie zu entwickeln, die nicht den Nachteil der verminderten Knochenneubildung mit sich bringt.

Glucagon-like peptide 2

Das Polypeptidhormon Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) wird bei Nahrungsaufnahme aus der intestinalen Mukosa ausgeschüttet. Da die Knochenresorption durch die Nahrungsaufnahme getriggert wird, mit erhöhter Resorption im Zusammenhang mit dem Fasten während der Nacht, kann durch die abendliche Gabe von GLP-2 die nächtliche Resorption verhindert werden. Dabei wird die Neubildung von Knochen nicht verhindert [171].

Cathepsin K-Inhibitoren

Die Cysteinprotease Cathepsin K wird selektiv in Osteoclasten exprimiert und ist verantwortlich für den Abbau von Proteinen der Knochenmatrix wie Kollagen. Hemmung von Cathepsin K führt zu einer Hemmung der Resorption. Die Selektivität von Cathepsin K-Inhibitoren gegenüber anderen Cathepsinen spielt eine wichtige Rolle, da unselektive Cathepsin K Inhibitoren in klinischen Studien zu Hautirritationen als Nebenwirkung geführt haben, was einen Stopp der Weiterentwicklung dieser Substanzen zur Folge hatte. Der selektive Cathepsin K Inhibitor Odanacatib befindet sich zurzeit in Phase III der Klinischen Prüfung [172].

Anabole Wirkstoffe

Der einzige Arzneistoff mit anaboler Wirkung, der derzeit zugelassen ist, ist das rekombinant hergestellte humane Parathormonderivat Teriparatid. Die Anwendung ist jedoch zeitlich begrenzt auf eine Dauer von zwei Jahren. Alternative Wirkstoffe, um den Knochenaufbau zu fördern, sind in der Pipeline.

Modulatoren Calcium-sensitiver Rezeptoren

Die Beeinflussung des Calcium-sensitiven Rezeptors stellt einen Eingriff in das Parathormon-System dar. Für die Behandlung der Osteoporose werden negative allosterische Modulatoren des G-Protein-gekoppelten Rezeptors entwickelt. Diese sogenannten Calcilytika führen bei Verabreichung zu einem Parathormon-Puls. Die oral verfügbaren Substanzen könnten daher die täglichen Injektionen von Teriparatid ersetzen. Die Entwicklung von Ronacalceret, einem Vertreter dieser Klasse, wurde jedoch in Phase II eingestellt, da die Effekte auf die Knochendichte zu gering waren.

Eingriff in das Wnt-Signalsystem

Die Aktivierung des Wnt-Signalsystems führt zu einer Verstärkung der Knochenneubildung. Wnt-Proteine gehören zur Familie der extrazellulär Cysteinreichen Glycoproteine. Vermittelt über den Frizzled-Rezeptor und Lipoprotein-Rezeptor-related protein 5/6 kommt es zur intrazellulären Anhäufung von β -Catenin, was zur Transkription Wnt-positiver Gene führt. Der Wnt-Signalweg wird durch die Anwesenheit physiologischer Inhibitoren reguliert. Eine Eingriffsmöglichkeit besteht daher in der Entwicklung von Hemmstoffen dieser endogenen Inhibitoren. Die Störung der Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Targetmolekülen und den endogenen Inhibitoren stellt dabei eine besondere Herausforderung für das Drug Design dar [173].

Zusammenfassung

17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen sind wichtige Regulatoren der intrazellulären Aktivität von Steroidhormonen. Ihre Hemmung ist ein interessanter Ansatzpunkt zur Behandlung von Erkrankungen, die ihre Ursache in einem Überschuss oder Mangel an intrazellulär verfügbaren aktiven Hormonen haben.

Im Rahmen der Entwicklung von 17 β -HSD1-Hemmstoffen zur Behandlung von Brustkrebs und Endometriose wurde ein zellulärer Assay entwickelt und die intrazelluläre Wirksamkeit der Inhibitoren untersucht. Mit Hilfe des etablierten Assays in T47D-Zellen konnten strukturell verschiedene 17 β -HSD1-Inhibitoren untersucht und intrazellulär aktive Hemmstoffe mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich identifiziert werden.

17 β -HSD2-Inhibitoren werden als potentielle Wirkstoffe zur Behandlung von Osteoporose untersucht. Für ausgewählte Inhibitoren aus verschiedenen Substanzklassen wurde der Hemmmechanismus mittels enzymkinetischer Studien aufgeklärt. Dabei wurden sowohl ein kompetitiver Inhibitor als auch „*mixed-type*“ und nichtkompetitive Inhibitoren identifiziert. Die Kenntnis der unterschiedlichen Hemmmechanismen bildet in Kombination mit *in silico* Methoden die Grundlage für das weitere Inhibitor-design.

17 β -HSD2-Hemmstoffe werden in einem Screeningsystem auf ihre Wirksamkeit und Selektivität überprüft. Zum Nachweis der Wirksamkeit der 17 β -HSD2-Hemmstoffe in Targetzellen wurde ein zellbasierter Assay in Osteoblasten entwickelt, mit dem eine Verbindung mit IC₅₀-Werten unter 1 μ M identifiziert werden konnte.

Summary

17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases are important regulators of the intracellular activity of steroid hormones. Hence, inhibition of 17 β -HSDs is an interesting approach for the treatment of diseases caused by excess or deficiency of intracellular active hormones.

Since 17 β -HSD1 inhibitors are a therapeutic option for breast cancer and endometriosis, a cell-based assay was established in T47D breast cancer cells to investigate the inhibitor's intracellular efficacy. Non steroidal 17 β -HSD1 inhibitors of three structurally different classes were tested and in each of them compounds with IC₅₀ values in the nanomolar range were identified.

Inhibition of 17 β -HSD2 is a new therapeutic approach for the treatment of osteoporosis. The inhibition mechanism of selected structurally different inhibitors was elucidated by enzyme kinetics. Competitive as well as mixed type and non competitive inhibition mechanisms were found. Knowledge of the different inhibition mechanism in combination with *in silico* methods will improve the further inhibitor design.

Activity and selectivity of 17 β -HSD2 inhibitors are evaluated in a comprehensive screening system. A cell based assay for 17 β -HSD2 inhibitors was established in osteoblastic target cells and an inhibitor with an IC₅₀ value below 1 μ M was identified.

Material und Methoden

11 Material

11.1 Reagenzien

Die eingesetzten Chemikalien wurden in p. a. Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Roth und Serva bezogen.

Außerdem wurden folgende Produkte verwendet:

RPMI Pulvermedium	PM-16-S	c.c.pro
DMEM Pulvermedium	PM-13-S	
L-Glutamin	Z-10-M	
Natriumpyruvat	Z-20-M	
Trypsin/EDTA	Z-26-M	
Zink-Insulin	G-15-U	
FKS steroidhormonfrei	S-15-M	
α MEM	M0894	Sigma
Penicillin/Streptomycin	P4333	
Estron Vetranal	46573	
17 β -Estradiol hemihydrat Vetranal	46542	
Testosteron Vetranal	46923	
FKS SeraPlus	P30-3702	PanBiotech
α MEM phenolrotfrei Pulvermedium	90-012-PB	cellgro
[2,4,6,7- ³ H(N)]-Estron	NET-319	Perkin-Elmer
[2,4,6,7- ³ H(N)]-Estradiol	NET-317	
[1,2,6,7- ³ H(N)]-Testosteron	NET-370	
Quickszint Flow 302	1006000	Zinsser Analytic
SDS-PAGE Standards, low range	161-0304	BioRad

11.2 Medien und Puffer

11.2.1 Zellkultur und Assays

PBS

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O bidest	ad 1l

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

DMEM

DMEM-Pulvermedium	13,4 g
NaHCO ₃	3,7 g
L-Glutamin (200mM)	10,0 ml
Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (0,1 mg/ml)	10,0 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	10,0 ml
H ₂ O bidest	ad 1l

DMEM-Pulvermedium wurde in einen Standzylinder überführt und in ca. 700 ml Wasser gelöst. Danach wurden NaHCO₃, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin und Natriumpyruvat zugegeben, der pH auf 7,4 eingestellt und mit Wasser auf 900 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert.

Vor Gebrauch wurde die benötigte Menge steril entnommen und die gewünschte Menge FKS zugesetzt.

RPMI

RPMI Pulvermedium	10,4 g
NaHCO ₃	2,0 g
Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (0,1 mg/ml)	10,0 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	10,0 ml
Insulin-Zn	0,01 g
FKS	100 ml
H ₂ O bidest	ad 1l

RPMI-Pulvermedium wurde in einen Standzylinder überführt und in ca. 700 ml Wasser gelöst. Danach wurden NaHCO₃, Penicillin/Streptomycin und Natriumpyruvat zugegeben. Insulin wurde in ein Becherglas eingewogen und unter vorsichtigem Schwenken in etwas Wasser gelöst. Die Insulinlösung wurde in den Standzylinder überführt, der pH auf 7,4 eingestellt und mit Wasser auf 900 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch des Mediums wurde steril 50 ml FKS dazugegeben.

αMEM phenolrotfrei

αMEM Pulvermedium	9,78 g
NaHCO ₃	2,2 g
Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (0,1 mg/ml)	10,0 ml
HEPES 1 M	20,0 ml
CaCl ₂ 180 mM	10,0 ml
FKS	100 ml
H ₂ O bidest	ad 1l

αMEM-Pulvermedium wurde in einen Standzylinder überführt und in ca. 700 ml Wasser gelöst. Danach wurden NaHCO₃, Penicillin/Streptomycin, HEPES und CaCl₂ zugegeben, der pH auf 7,4 eingestellt und mit Wasser auf 900 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde die benötigte Menge steril entnommen und die gewünschte Menge FKS zugesetzt.

Osteogenes Medium

αMEM phenolrottfreies Medium
10 mM β-Glycerophosphat
10 nM Dexamethason

HSD-Puffer pH 7,4

KH ₂ PO ₄	6,80 g
EDTA-Na ₂	0,37 g
Glycerol	200 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

11.2.2 Lösungen für die Gewebepräparation

Homogenatpuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,2
0,25 M Saccharose
5 mM EDTA
7 mM Mercaptoethanol
1 mM PMSF

Mercaptoethanol und PMSF (als 0,2 M Stocklösung in Ethanol) werden in der benötigten Konzentration erst unmittelbar vor dem Gebrauch des Puffers zugesetzt.

200 mM PMSF – Stocklösung in EtOH

1,0452 g PMSF in 30 ml EtOH

1M DTT – Stocklösung

1,5425 g DTT in 10 ml H₂O

Einfrierpuffer

40 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

50% Glycerol

0,2 mM DTT

0,5 mM PMSF

DTT (als wässrige 1 M Stocklösung) und PMSF (als 0,2 M Stocklösung in Ethanol) werden in der benötigten Konzentration erst unmittelbar vor dem Gebrauch des Puffers zugesetzt.

11.2.3 Lösungen für die Proteinchromatographie

Puffer A

40 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

20% Glycerol

0,2 mM DTT

0,5 mM PMSF

DTT (als wässrige 1 M Stocklösung) und PMSF (als 0,2 M Stocklösung in Ethanol) werden in der benötigten Konzentration erst unmittelbar vor dem Gebrauch des Puffers zugesetzt.

Puffer A'

40 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

0,2 mM DTT

0,5 mM PMSF

DTT (als wässrige 1 M Stocklösung) und PMSF (als 0,2 M Stocklösung in Ethanol) werden in der benötigten Konzentration erst unmittelbar vor dem Gebrauch des Puffers zugesetzt.

Puffer B

Puffer A mit 0,5 M NaCl

Puffer A mit 60 mM NaCl

Puffer B'

Puffer A mit 30 μ M NADP⁺ (3,74 mg in 150 ml)

Puffer C

Puffer A mit 1,7 M (NH₄)₂SO₄

Puffer C'

Mischung aus gleichen Teilen Puffer A und Puffer C

11.2.4 Photometrischer Aktivitätstest

Mastermix:		<i>Endkonzentration</i>
1 ml	1 M Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ -Puffer pH 9,2	50 mM
25 μ l	20 mM Estradiol in Ethanol	25 μ M
1 ml	10 mM NAD ⁺ in Wasser	0,5 mM

11.2.5 SDS-PAGE

Acrylamid 30%

87,6 g Acrylamid

2,4 g N'N'-Bis-methylen-acrylamid

ad 300 ml H₂O

Bei 4°C vor Licht geschützt aufbewahren

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

27,23 g Tris in ca. 80 ml H₂O lösen, pH mit HCl auf 8,8 einstellen, mit H₂O auf 150 ml auffüllen, bei 4°C lagern

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

6 g Tris in ca. 60 ml H₂O lösen, pH mit HCl auf 6,8 einstellen, mit H₂O auf 100 ml auffüllen, bei 4°C lagern.

Ammoniumpersulfat (APS) 10%

100 mg APS in 1 ml H₂O lösen, täglich frisch zubereiten.

Reduzierender Probepuffer (5x)

H ₂ O	4 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1 ml
Glycerol	0,8 ml
10% SDS	1,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
0,05% Bromphenolblau	0,2 ml

Bei Raumtemperatur lagern.

Probe 1:5 mit reduzierendem Probenpuffer verdünnen und 5 min bei 95°C erhitzen.

Laufpuffer (5x)

Tris	9 g
Glycin	43,2 g
SDS	3 g
H ₂ O	ad 600 ml

Bei 4°C lagern. Vor Gebrauch 1:5 mit H₂O verdünnen.

Färbelösung

0,5 g Coomassie in 40 ml Methanol lösen, mit 50 ml Wasser und 10 ml Eisessig mischen

Entfärbelösung

Methanol	800 ml
Eisessig	200 ml
H ₂ O	1000 ml

12 Methoden

12.1 Kultivierung von T47D Zellen

T47D Zellen wurden in RPMI-Medium in Zellkulturschalen im Inkubator bei 37°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei einem ca. 80% konfluenten Zelllayer wurden die Zellen passagiert.

Dazu wurde der Zelllayer zweimal mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin/0,02% EDTA in PBS) für 3-4 Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 x 7,5 ml RPMI abgespült und bei Raumtemperatur mit 500 x g für 5 min abzentrifugiert. Das trypsinhaltige Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml RPMI resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit RPMI verdünnt. Die Zellsuspension wurde auf neue Zellkulturschalen verteilt, so dass sich ein Splittingverhältnis von 1:3 ergab und mit RPMI-Medium auf das Kulturvolumen der jeweiligen Zellkulturschale verdünnt.

12.2 Kultivierung von SV-HFO Zellen

SV-HFO Zellen wurden in α MEM-Medium in Zellkulturschalen im Inkubator bei 37°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei einem ca. 80% konfluenten Zelllayer wurden die Zellen passagiert.

Dazu wurde der Zelllayer zweimal mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA für 1 Minute im Inkubator bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 x

5 ml α MEM ab gespült und bei Raumtemperatur mit 500 x g für 5 min abzentrifugiert. Das trypsinhaltige Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml α MEM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit α MEM verdünnt. Die Zellsuspension wurde auf neue Zellkulturschalen verteilt, so dass sich ein Splittingverhältnis von 1:3 ergab und mit α MEM-Medium auf das Kulturvolumen der jeweiligen Zellkulturschale verdünnt.

SV-HFO Zellen wurden über maximal 18 Passagen kultiviert, da es danach zu einer schnellen Abnahme der Viabilität kam.

12.3 Testverfahren T47D Zellen

12.3.1 Testvorbereitung

Konfluent bewachsene Kulturschalen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst, mit DMEM+10%FKS abgeerntet und das Zellpellet pro abgeernteter Schale in 10 ml DMEM+10%FKS aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels des CASY TT-Zellzählers bestimmt. Dazu wurden zu 10 ml CASYton 50 μ l DMEM+10%FKS und 50 μ l Zellsuspension gegeben, durch Invertieren vorsichtig gemischt und direkt im Anschluss vermessen. Die Zellsuspension wurde durch Verdünnen mit DMEM+10% FKS auf 1 000 000 Zellen/ml eingestellt. In eine 24 well-Platte wurden pro Vertiefung 1 ml verdünnte Zellsuspension ausgesät. Nach 20-24 h im Inkubator konnten die Zellen für den Zelltest eingesetzt werden.

12.3.2 Herstellung der Substrat-Lösung

Als Substrat wurde im Zelltest radioaktiv markiertes Estron eingesetzt. Dazu wurde eine Mischung aus radioaktiv markiertem und unmarkiertem Estron hergestellt. Pro Testwell wurden 3 μ l einer [³H]-Estronlösung (500 nM in Ethanol) in einem 5 ml Schraubdeckelröhrchen abgedampft.

Die unmarkierte Estronlösung wurde in einer Konzentration von 4,7 mM in Methanol angesetzt und schrittweise auf eine Konzentration von 0,47 μ M Estron (DMEM mit 1% Methanol) verdünnt. Pro Testwell wurden 50 μ l dieser 0,47 μ M Estronlösung zu dem abgedampften markierten Estron gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 0,5 μ M Estron-Mix ergab. Von dieser Lösung wurden 50 μ l pro Testwell

eingesetzt, was bei einem Gesamtvolumen von 500 μl im Testansatz einer Substratkonzentration von 50 nM entsprach.

12.3.3 Hemmstoff-Lösungen

Für die Hemmstoffe wurden 10 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt. Diese wurden dann mit DMSO weiter verdünnt. Pro Testansatz wurden 5 μl Hemmstofflösung in DMSO zugegeben, so dass die DMSO-Konzentration im Test 1% betrug. Die Hemmstofflösungen mussten also in 100x Konzentration hergestellt werden. Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurden drei verschiedene Konzentrationen eines Inhibitors vermessen.

12.3.4 Testvorgang

In den vorbereiteten 24 well-Platten wurde das Medium in den einzelnen Vertiefungen vorsichtig abgesaugt ohne den Zelllayer zu beschädigen und 445 μl frisches DMEM ohne FKS zugegeben. Dann wurden 5 μl Hemmstofflösung getaktet vorsichtig zupipettiert und für 30 min bei 37°C im Inkubator präinkubiert. Der Test wurde durch Zugabe von 50 μl Estronmix (500 nM) gestartet und nach 30 min Inkubation bei 37°C im Inkubator durch Abpipettieren der Überstände gestoppt.

12.3.5 Probenaufarbeitung

Die Steroide wurden durch Etherextraktion aus den Überständen ausgeschüttelt. Dazu wurden den Überständen 950 μl Ether zugesetzt und 10 min auf dem Schüttler kräftig durchmischt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (5 min, 10 000 xg , 4°C) getrennt und die wässrige Phase im Ethanol-Trockeneisbad ausgefroren. Die Etherphase wurde in Eppendorfgeläße (1,5 ml) überführt und der Ether abgedampft. Die Steroide wurden in 40 μl Acetonitril aufgenommen und mittels HPLC aufgetrennt.

12.3.6 HPLC-Analytik mit Radiodetektion

Die HPLC-Analytik wurde an einem Agilent System (1100 Serie) und einem Radioflow-Detektor (Berthold LB509) durchgeführt. Für die chromatographische Trennung der Steroide wurden 25 μl der Lösung in Acetonitril injiziert. Die Trennung

wurde auf einer Umkehrphasensäule (Macherey & Nagel, CC 125 x 3 mm Nukleodur 100-3 C18) isokratisch mit einer Mischung aus Acetonitril:Wasser (45:55) bei einem Fluss von 0,95 ml/min durchgeführt. Der Druck während der Trennung lag bei 250-260 bar. Die Detektion erfolgte mittels Radiodetektor bei einem Szintillatorfluss von 0,9 ml/min. Die Identität der Steroide wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten radiomarkierter Reinsubstanzen bei Trennung unter gleichen Bedingungen überprüft.

Die Integration und Datenverarbeitung erfolgte mit der Agilent Chem-Station-Software (REV.A.09.01[1206]). Die Software errechnet die Fläche eines Peaks und gibt diese zusammen mit der Retentionszeit als %-Wert der Gesamtfläche aller Peaks an. Die Retentionszeit wird zur Identifizierung der gebildeten Steroide benötigt. Die prozentuale Fläche des Estradiolpeaks entspricht dem prozentualen Umsatz an Substrat.

12.3.7 Berechnung der prozentualen Hemmung

Für die Berechnung der prozentualen Hemmung, die durch einen Hemmstoff in der entsprechenden Konzentration hervorgerufen wurde, wurde folgende Gleichung eingesetzt:

$$\% \text{Hemmung} = \left[1 - \frac{\% \text{Inhibitor}}{\% \text{Kontrolle}} \right] \times 100$$

Mit

%Inhibitor: prozentualer Umsatz in Inhibitorprobe

%Kontrolle: prozentualer Umsatz in Kontrolle

12.4 Testverfahren SV-HFO Zellen

12.4.1 Bestimmung der Hemmung der Estradiol- und Testosteronkonversion

Testvorbereitung

Zellen, die unter den Standardkulturbedingungen in α MEM kultiviert worden waren, wurden beim Splitten mit phenolrotfreiem α MEM und steroidhormonfreiem FKS weiterkultiviert. Konfluente Platten wurden dann mit Trypsin/EDTA wie beschrieben abgelöst, mit steroidhormonfreiem α MEM abgeerntet und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf 250 000 Zellen/ml verdünnt und je 100 μ l pro Vertiefung

einer 24 well-Platte ausgesät, so dass 25 000 Zellen/well vorlagen. Das Kulturvolumen wurde durch Zugabe von steroidhormonfreiem α MEM auf 500 μ l aufgefüllt.

Start der Differenzierung

Um die Differenzierung der Zellen zu starten, wurde nach 24 h das Medium entfernt und durch 500 μ l osteogenes Medium ersetzt. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel mit osteogenem Medium durchgeführt. Am Tag 10 der Differenzierung wurde beim letzten Mediumwechsel vor der Testdurchführung auf den Zusatz von Dexamethason im osteogenen Medium verzichtet.

Herstellung der Substratlösungen

Bei der Herstellung der Substratlösungen wurde verfahren wie unter 12.3.2 für Estron beschrieben. Da im SV-HFO Zellassay die Substratkonzentration bei 10 nM liegen sollte wurde eine 7 mM Estradiolstammllösung hergestellt, die dann auf 0,07 μ M Estradiol verdünnt wurde. Davon wurden 50 μ l pro Testwell zu der zuvor abgedampften [3 H]-Estradiollösung gegeben.

Zur Herstellung der Testosteronlösung wurden 4 μ l einer markierten [3 H]-Testosteronlösung (500 nM in Ethanol) pro Testwell abgedampft und 50 μ l einer 0,06 μ M unmarkierten Testosteronlösung dazugegeben.

Herstellung der Hemmstofflösungen

Da sich SV-HFO Zellen als sehr empfindlich gegenüber DMSO erwiesen hatten, wurde auf einen Zusatz von DMSO in den Testansätzen verzichtet. Die Hemmstoffe wurden in Aceton zu 10 mM gelöst und aus dieser Stocklösung wurde durch mehrere Verdünnungsschritte die gewünschte Konzentration in Aceton hergestellt. 5 μ l der Hemmstofflösung in Aceton wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben, abgedampft und in 450 μ l osteogenem Medium (ohne Dexamethason) gelöst. Das Endvolumen des Testansatzes betrug 500 μ l (nach Substratzugabe) und somit wird der Hemmstoff 100-fach verdünnt.

Testvorgang

Die in 24 well-Platten differenzierten SV-HFO Zellen wurden am 13. Differenzierungstag zur Hemmstofftestung eingesetzt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und pro well 450 μ l des hemmstoffhaltigen Mediums zugegeben.

Teststart

Der Test wurde durch Zugabe von 50 µl Substratlösung (10 nM) gestartet. Die Zellen wurden für 8 h bei 37°C im Inkubator bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert.

Teststopp

Durch Abpipettieren der Überstände in 2 ml Reaktionsgefäße wurde der Test abgestoppt.

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung erfolgte mittels Etherextraktion wie unter 12.3.5 beschrieben. Die zur Trockne eingedampften Rückstände der Estradiolinkubationen wurden wie beschrieben mit Acetonitril aufgenommen, für die Testosteroninkubationen wurden 40 µl eines Gemisches aus Methanol und Wasser (48%/52%) eingesetzt.

Analytik

Für Estradiol wurde die gleiche analytische Methode wie im T47D Zelltest eingesetzt. Für die Trennung von Testosteron und Androstendion wurde die chromatographische Trennung an einer Nucleosil C8 Säule (Macherey-Nagel, CC125/4 Nucleosil 120-3 C8) durchgeführt. Die Elution erfolgte isokratisch mit 48% Methanol und 52% H₂O über 23 min bei einem Fluss von 1 ml/min. Zur Radiodetektion am Radioflowdetektor (Berthold, LB509) wurde der Szintillator mit einem Fluss von 1,2 ml/min zugesetzt. Die Berechnung des Testosteronumsatzes wurde mit Hilfe der Chemstationsoftware durchgeführt. Die prozentualen Hemmwerte wurden wie unter 12.3.7 beschrieben berechnet.

12.4.2 Zellzahlbestimmung mit dem Resazurin-Assay

In lebenden Zellen wird der blaue Farbstoff Resazurin zu dem pinkfarbenen Resorufin reduziert. Das Ausmaß der Pinkfärbung korreliert mit der Zellzahl, daher kann der Resazurin-Assay zur Bestimmung der Zellzahl herangezogen werden. Ein Vorteil der Methode ist, dass Resazurin wasserlöslich und nicht cytotoxisch ist, so dass die Zellen nach Abschluss des Assays noch für weitere Versuche eingesetzt werden können.

Die Resazurin Stocklösung (1 mg/ml) wurde mit PBS auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt. Die Inkubation wurde mit den in 24 well-Platten kultivierten

Zellen durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium gegen 450 µl frisches Medium ausgetauscht und 50 µl der verdünnten Resazurin-Lösung (0,1 mg/ml) zugegeben. Die Zellen wurden für 2 h bei 37°C im Inkubator inkubiert. Dann wurden je 200 µl des Überstands in die Vertiefungen einer schwarzen 96 well Platte überführt und die Fluoreszenz im Multiwellplaterreader (Wallac Victor) mit einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen.

Das Vermessen von Proben mit verschiedenen bekannten Zellzahlen liefert eine Kalibriergerade, mit Hilfe derer auf die unbekannte Zellzahl in der Probe zurückgeschlossen werden kann.

12.4.3 Einfluss von Estradiol auf die OPG-Expression

SV-HFO Zellen wurden wie unter 12.4.1 beschrieben in 24 well-Platten ausgesät und für 5 Tage in steroidhormonfreiem α MEM kultiviert. Am Testtag wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden dem Medium 1 nM E2 zugesetzt und die Inkubationen nach 6, 12, 24, 48 und 72 h durch Abpipettieren der Überstände gestoppt. Die Kontrollansätze enthielten 0,1% Ethanol. Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit wurden dem Medium verschiedene Konzentrationen an E2 zugesetzt (10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM) und für 24 h mit den Zellen inkubiert. Zur Bestimmung der OPG-Konzentration wurden die Zellkulturüberstände nach entsprechender Behandlung der Zellen abgenommen, in Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

12.4.4 Einfluss der Medienzusammensetzung auf die OPG-Expression

SV-HFO Zellen wurden wie unter 12.4.1 beschrieben in 24 well-Platten ausgesät, dabei wurden dem Medium entweder 10% (10% FKS und 0,1% BSA-Proben) oder 2% steroidhormonfreies FKS zugesetzt. Am Tag 5 wurde das Medium entfernt und durch steroidhormonfreies α MEM ersetzt, zu dem 10 nM E2 und entweder 10% oder 2% steroidhormonfreies FKS oder 0,1% BSA zugegeben worden waren. Die Kontrollproben enthielten statt E2 0,1% Ethanol. Nach 48 h wurden die Überstände abpipettiert und bis zur weiteren Analytik bei -20°C eingefroren. Die Zellzahlbestimmung wurde wie unter 12.4.2 beschrieben durchgeführt.

12.4.5 Einfluss von Fulvestrant auf die OPG-Expression

SV-HFO Zellen wurden wie unter 12.4.1 beschrieben in 24 well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und durch steroidhormonfreies α MEM (2% FKS) ersetzt. Diesem wurden 10 nM E2, 1 μ M Fulvestrant oder 10 nM E2 und 1 μ M Fulvestrant zugefügt und die Zellen für 48 h inkubiert. Die nachfolgende Analytik wurde wie unter 12.4.6 durchgeführt.

12.4.6 OPG-ELISA

Die Bestimmung der OPG-Konzentration wurde mit dem OPG-ELISA-Kit der Firma RayBio nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Proben für die OPG-Bestimmung, die nach unterschiedlichen Versuchsbedingungen gewonnen worden waren, wurden aufgetaut und für 5 min bei 10000 g unter Kühlung (4°C) abzentrifugiert. Die Zellkulturüberstände wurden 1:20 oder 1:50 mit einem vom Hersteller empfohlenen Puffer verdünnt und 100 μ l dieser Verdünnung im ELISA eingesetzt.

Ein OPG-spezifischer Antikörper, der an der Microtiterplatte immobilisiert ist, bindet die OPG-Moleküle aus den Zellkulturüberständen. Nach einem Waschschrift, der nichtgebundene Proteine entfernt, wird ein zweiter biotinylierter OPG-spezifischer Antikörper hinzugegeben, der an die gebundenen OPG-Moleküle bindet. Ungebundener Antikörper wird durch Waschen entfernt. Im nächsten Schritt bindet Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) an den biotinylierten Antikörper. Durch Umsetzung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durch die HRP entsteht ein farbiges Produkt, dessen Konzentration durch photometrische Vermessung bei 450 nm bestimmt werden kann. Durch eine Kalibriergerade, die mit rekombinant hergestelltem humanen OPG erstellt wird, kann die OPG-Konzentration in den Zellkulturüberständen ermittelt werden.

12.5 Proteinaufreinigung

12.5.1 Photometrischer Aktivitätstest

Der photometrische Aktivitätstest beruht auf der Reduktion von NAD^+ zu NADH durch 17 β -HSD1 bei der Oxidation von Estradiol zu Estron. Die Katalyse der

Oxidationsreaktion durch 17 β -HSD1 kann *in vitro* durch ein entsprechendes Substrat- und Cofaktorangebot erreicht werden.

Der photometrische Assay bietet die Möglichkeit während der Proteinaufreinigung sofort Informationen über die vorhandene Enzymaktivität zur Verfügung zu haben.

Testvorgang

300 μ l Assay-Mastermix (50 mM Na₂CO₃ pH 9,2; 25 μ M Estradiol; 0,5 mM NAD⁺) werden in einer Quarzküvette vorgelegt und der Nullabgleich durchgeführt. Durch Zugabe von Enzymlösung wird die Reaktion gestartet. Die Absorption bei 340 nm wird über einen Zeitraum von 2 min im Abstand von 0,5 sec gemessen. Aus der Steigung der Absorptions-Zeitkurve wird die Aktivität der 17 β -HSD1 berechnet.

12.5.2 Gewebeaufarbeitung

Zur Gewinnung der 17 β -HSD diene humanes Plazentagewebe als Ausgangsmaterial. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Plazenta wurde möglichst zeitnah mit gekühlter 0,9% NaCl-Lösung abgespült und mit Zellstoff trockengetupft. Die Placenta wurde von Nabelschnur, Fruchtblase und Bindegewebe befreit. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Skalpell von den Blutgefäßen abgetrennt. Das Gewicht des verbleibenden Plazentagewebes wurde bestimmt und mit dem doppelten Volumen an Homogenatpuffer versetzt. Das Gewebe wurde zunächst mit einem Standmixer 10x für je 10 sec - mit je 50 sec Kühlpause - zerkleinert. Der so erhaltene Gewebebrei wurde zum Abtrennen der Zelltrümmer für 30 min bei 800xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und zur Trennung von Zellkernen und Mitochondrien erneut bei 10000xg für 30 min zentrifugiert. Durch Ultrazentrifugation bei 100000xg für 1 h ließen sich schließlich die Mikrosomen (Pellet) vom Cytosol (Überstand) separieren.

12.5.3 Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung wurde als fraktionierte Fällung mit zwei Fällungsschritten durchgeführt. Dazu wurde das Volumen der cytosolischen Fraktion ermittelt. Der erste Fällungsschritt wurde zwischen 0 und 30% Sättigung an Ammoniumsulfat durchgeführt. Auf das gekühlte Cytosol wurde langsam unter Rühren 16,4 g (NH₄)₂SO₄/100ml Flüssigkeit aufgestreut. Das verwendete Ammoniumsulfat sollte

fein pulverisiert sein. Während der Fällung wurde der pH-Wert mit 3 M Ammoniak-Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Nachdem das gesamte Ammoniumsulfat zugegeben worden war, wurde die Lösung über Nacht bei 4°C langsam gerührt. Im Anschluss wurde das gefällte Protein durch Zentrifugation bei 10 000xg für 30 min abgetrennt. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert und für den zweiten Fällungsschritt eingesetzt. Die zweite Fällung erfolgte bei 60% Sättigung an Ammoniumsulfat. Hierzu wurden pro 100 ml Lösung 18,1 g Ammoniumsulfat eingesetzt. Die Vorgehensweise war analog der ersten Fällung. Nach Zugabe des Ammoniumsulfats wurden die Proteine über 6 h unter langsamem Rühren bei 4°C ausgefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet gewogen und in 50 ml Einfrierpuffer gelöst. Dazu wurde das Pellet zunächst im Einfrierpuffer suspendiert und in einen 50 ml Probenbecher überführt. Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C gerührt bis sich alle Pelletpartikel gelöst hatten. Anschließend wurde die erhaltene Lösung bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

12.5.4 Ionenaustauschchromatographie

Vorbereitung der Säule

Die Q-Sepharose-Säule wurde mit 700 ml 18% Puffer B und 82% Puffer A equilibriert.

Vorbereitung der Ladefraktion

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit einem Pool von 3-4 Ammoniumsulfatfällungen durchgeführt. Da die Ammoniumsulfatfällungen mit Einfrierpuffer, der 50% Glycerol enthält, gelagert worden waren, musste die Lösung auf einen Glycerolgehalt von 20% verdünnt werden. Dazu wurde das Volumen der vereinigten Ammoniumsulfatfällungen bestimmt und das 1,5 fache Volumen an Puffer A' dazugegeben. Um Proteinaggregationen, die zu einem Verschluss der Säule führen könnten, zu vermeiden, wurde der Ladefraktion 1% Triton-X-100 zugesetzt. Da die Ionenstärke der Ammoniumsulfatfällungen sehr hoch ist, muss diese für die Ionenaustauschchromatographie durch Verdünnen erniedrigt werden. Dies geschah in Abhängigkeit vom Gewicht der Pellets der Ammoniumsulfatfällungen. Das Gesamtpelletgewicht der vereinigten Fällungen wurde berechnet und pro g 50 ml Puffervolumen eingesetzt. Das so berechnete Gesamtvolumen setzte sich aus dem Probevolumen, dem Volumen an Puffer A', dem Volumen der 25% Triton-X-100-Lösung und dem Volumen an Puffer A zusammen. Die Pufferlösungen und die Triton-X-Lösung wurden über Nacht bei 4°C unter langsamem Rühren gemischt. Dann wurde die benötigte Menge PMSF und DTT zugegeben und schließlich die Ammoniumsulfatfällungen quantitativ in die Puffermischung überführt. Diese Lösung wurde nochmals für 30 min bei 4°C langsam gerührt. Die Lösung wurde bei 100 000xg für 30 min unter Kühlung (4°C) abzentrifugiert, um feine Partikel abzutrennen.

Laden der Säule

Die durch Ultrazentrifugation erhaltenen Überstände wurden mit einem Fluss von 8 ml/min auf die Q-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 350 ml) geladen. Die 17β-HSD1-Aktivität in der Ladefraktion und im Eluat während des Beladens wurde mit Hilfe des photometrischen Aktivitätstests überprüft. Nach Abschluss des Ladens der Säule wurde die Säule mit 18% Puffer B und 82% Puffer A gespült bis keine Proteine im Eluat mehr detektiert werden konnten (Baseline).

Elution

Die Elution erfolgte durch einen NaCl-Gradienten von 18% Puffer B auf 100% Puffer B über ein Volumen von 1000 ml bei einer Flussrate von 5 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen. Die 17 β -HSD1-Aktivität wurde in allen Fraktionen photometrisch überprüft. Der Quotient aus der Aktivität/ml und der Absorption der Fraktion bei 280 nM (Chromatogramm) wurde als Maß für die Reinheit der einzelnen Fraktionen herangezogen. Als Limit für die weitere Aufreinigung einer Fraktion wurde der Wert der aktivsten Fraktion durch 6 geteilt. Alle Fraktionen die innerhalb dieser Grenze lagen wurden vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden auf einen Glycerolgehalt von 50% eingestellt und über Nacht bei -20°C gelagert.

Waschen der Säule

Nach Abschluss der Elution wurde die Säule mit einer Sequenz aus je 500 ml Puffer B, 1 M NaOH, 1 M NaCl gewaschen, zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mit 500 ml H₂O gespült.

12.5.5 Affinitätschromatographie

Vorbereitung der Säule

Die Blue-Sepharose-Säule wurde mit Puffer A equilibriert bis der pH-Wert des Eluats dem von Puffer A entsprach.

Vorbereitung der Ladefraktion

Die vereinigten Q-Sepharose-Fraktionen wurden mit Puffer A' auf einen Glycerolgehalt von 20% verdünnt und mit einer Flussrate von 4 ml/min auf die Blue-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 20 ml) geladen. Nach Abschluss des Beladens wurde die Säule mit Puffer A bis zur Baseline gespült.

Elution

Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit einer Lösung von 60 mM NaCl in Puffer A eluiert. Danach wurde die Elution von 17 β -HSD1 mit einem zweistufigen NADP⁺-Gradienten durchgeführt: von 0% auf 20% Puffer B' in 20 ml und auf 40% Puffer B' in weiteren 20 ml. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen und die Aktivität in allen Fraktionen überprüft. Die Reinheit der aktiven Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Nach Auswertung der SDS-PAGE wurden Fraktionen mit nur 1 Bande vereinigt. Die Fraktionen wurden mittels Ultrafiltration über Centricon-Filter-Tubes aufkonzentriert und mit Puffer A gewaschen. Zur Lagerung wurde dem Puffer 50% Glycerol zugegeben. Während der Ultrafiltration wurde darauf geachtet, dass die Konzentration des Proteins einen Wert von 2-3 mg/ml nicht überschritt, da ansonsten die Gefahr einer Präzipitation besteht.

Waschen der Säule

Nach Abschluss der Elution wurde die Säule mit einer Sequenz aus je 100 ml 0,1 M Tris-HCl/ 0,5 M NaCl (pH 8,5) und 0,1 M NaOAc/0,5 M NaCl (pH 4,5) gewaschen, zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mit 200 ml H₂O gespült.

12.5.6 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Vorbereitung der Säule

Die Phenyl-Sepharose-Säule wurde mit 5 ml Puffer C' equilibriert.

Vorbereitung der Ladefraktion

Die vereinigten und konzentrierten Blue-Sepharose-Fraktionen wurden mit Puffer A' auf einen Glycerolgehalt von 20% verdünnt. Anschließend wurde die verdünnte Probe mit dem gleichen Volumen Puffer C' vorsichtig vermischt. Die so vorbereitete Probe wurde mit einer Flussrate von 0,3 ml/min auf die Phenyl-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 1ml) geladen. Nach Abschluss des Beladens wurde die Säule mit Puffer C' bis zur Baseline gespült.

Elution

Die Elution von 17 β -HSD1 wurde mit einem fallenden Ammoniumsulfat-Gradienten durchgeführt: von 100% auf 0% Puffer C' in 10 ml bei einer Flussrate von 0,3 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen und die Aktivität in allen

Fraktionen überprüft. Die Reinheit der aktiven Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Nach Auswertung der SDS-PAGE wurden Fraktionen mit nur einer Bande vereinigt. Die Fraktionen wurden mit 0,06% β -OG versetzt, um die Präzipitation zu vermeiden, und mittels Ultrafiltration über Centricon-Filter-Tubes bis auf ein minimales Volumen von 50 μ l aufkonzentriert und 3 mal mit 500 μ l Puffer A (mit 0,06% β -OG) gewaschen. Zur Lagerung wurde der Puffer gegen Einfrierpuffer ausgetauscht.

Waschen der Säule

Nach Abschluss der Elution wurde die Säule mit einer Sequenz aus je 1 ml 40% Essigsäure und 0,1 M NaOH gewaschen, zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mit 3 ml H₂O gespült.

12.5.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können im elektrischen Feld mit Hilfe der SDS-PAGE entsprechend ihrer Ladung aufgetrennt werden. Die Zugabe des anionischen Detergenzes Natriumdodecylsulfat (SDS) zu einer Proteinprobe maskiert die individuelle Ladung der Proteine. Die Bindung von SDS ist proportional zur Masse des Proteins (1,4 g SDS/ g Protein). Daher sind alle Proteine negativ geladen und wandern entsprechend ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld zur Anode. Außerdem bricht SDS Wasserstoffbrückenbindungen auf und verhindert hydrophobe Wechselwirkungen. Dadurch wird die Sekundärstruktur der Proteine aufgelöst und die Proteine werden denaturiert. Der Zusatz des reduzierenden Dithiothreitol (DTT) zur Proteinprobe löst Disulfidbrücken und zerstört dadurch die Tertiärstruktur.

Die Porengröße und damit die Trennungseigenschaften der Polyacrylamidgele sind abhängig von der Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration des Gels. Diese Konzentration wird entsprechend der Größe der zu trennenden Proteine ausgewählt und liegt üblicherweise bei 10 oder 12%. Während der Trennung wird eine konstante Spannung von 120-150 V angelegt. Verwendet wurden vertikale Flachbettgele mit den Ausmaßen 7 cm x 8 cm x 0,75 mm. Um schärfere Banden zu erhalten, wurde die Proteinprobe in einem Sammelgel aufkonzentriert, bevor sie dann bei ihrer weiteren Wanderung im Trenngel aufgetrennt wurde.

Die Proteinprobe wurde mit reduzierendem Probenpuffer 5 min bei 95°C erhitzt. 20 μ l der Probe wurde in die Kammern des Sammelgels geladen. Zur Bestimmung des

Molekulargewichts der Probenproteine wurde auf jedem Gel ein Referenzmarker mit Proteinen bekannter Masse aufgetragen.

Die Gele wurden nach folgender Rezeptur hergestellt:

	Trenngel (12%)	Sammelgel
H₂O	3,35 ml	3 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,25 ml
Acrylamid 30%	4 ml	0,65 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
APS	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	0,005 ml

Die einzelnen Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert, vorsichtig gemischt und in die vorbereitete Gelkammer eingefüllt, das Trenngel wurde mit n-Butanol überschichtet und während 1 h auspolymerisiert. Danach wurde das n-Butanol entfernt, die Geloberfläche mit Wasser abgewaschen und mit der Sammelgel-Lösung überschichtet, in die der Kamm zur Bildung der Taschen eingesetzt wurde. Nach etwa 30 min konnte der Kamm entfernt werden, die Taschen wurden mit Wasser gespült und das Gel beladen.

Die gelelektrophoretische Trennung wurde in Tris/Glycin-haltigem Laufpuffer durchgeführt.

Anschließend wurden die Gele für 10 min in Färbelösung gefärbt und unspezifisch angefärbte Bereiche über Nacht in Entfärbelösung entfärbt.

12.6 Kristallisation

12.6.1 Ultrafiltration

Für die Kristallisation muss eine hochkonzentrierte 17 β -HSD1-Lösung eingesetzt werden. Dazu wurde die aufgereinigte Enzympräparation, die zu Lagerungszwecken mit 50% Glycerol versetzt worden war, auf eine Glycerolkonzentration von 20% verdünnt und in Gegenwart von 0,06% β -OG auf eine Proteinkonzentration von 16 mg/ml aufkonzentriert. Die spezifische Aktivität der aufkonzentrierten Lösung wurde mit Hilfe des photometrischen Aktivitätstests und der

Proteinbestimmungsmethode nach Warburg und Christian bestimmt. Dazu wurde die Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen und der Proteingehalt nach folgender Formel berechnet.

Proteinkonzentration [mg/ml] = $(1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$

12.6.2 Kristallisation und Soaking

Die Kristallisation erfolgte nach der „*hanging drop*“-Methode. In 24 well-Kristallisationsplatten wurden 500 µl der Präzipitationslösung pro Vertiefung vorgelegt. Anschließend wurde die Platte bei der jeweiligen Kristallisationstemperatur äquilibriert. Auf einem silikonisierten Deckglas wurden die aufkonzentrierte Proteinlösung und die Präzipitationslösung zusammenpipettiert und das well mit dem Deckglas verschlossen. Zur Abdichtung wurde ein Silikonöl hoher Viskosität verwendet. Die Platten wurden regelmäßig auf Kristallwachstum überprüft.

Für das Soaking wurde eine ethanolische Lösung des Inhibitors hergestellt. 0,2 µl der Inhibitorlösung wurden an den Rand des Kristallisationstropfens gegeben, um eine langsame Diffusion des Inhibitors in den Kristall zu ermöglichen. Das well wurde verschlossen und weiter inkubiert.

12.6.3 Cokristallisation

Für die Cokristallisation wurde wie unter dem Kapitel 12.6.1 Ultrafiltration beschrieben, die Proteinlösung in Gegenwart des Inhibitors aufkonzentriert. Dazu wurde eine 25 µM Hemmstofflösung in Puffer zubereitet und diese zum Protein zugegeben. Nach Filtration der Pufferlösung wurde mehrmals inhibitorhaltige Lösung zugegeben und jeweils aufkonzentriert. Die so erhaltenen Komplexe zwischen Protein und Ligand wurden wie unter Kapitel 12.6.2 Kristallisation beschrieben mit der „*hanging drop*“-Methode kristallisiert.

Abkürzungsverzeichnis

BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein
BCRP	Breast cancer resistance protein
BMP	Bone morphogenetic protein
BMU	Bone remodelling unit
BSA	Bovines Serumalbumin
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P 450
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
E1	Estron
E2	Estradiol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen Response Element
FKS	Fötales Kälberserum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon, Follitropin
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GPR30	G-Protein related Rezeptor 30
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
HRT	Hormone replacement therapy
HSD	Hydroxysteroid Dehydrogenase
HSP	Hitzeschockprotein
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
LH	Luteinisierendes Hormon, Lutropin
MAPK	Mitogen activated Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDR1	Multiple drug resistance protein 1
NAD(P)	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat)
OPG	Osteoprotegerin
PEG	Polyethylenglycol
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PBS	Phosphate buffered saline
pIC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus des IC ₅₀ -Wertes
PGE2	Prostaglandin E2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RANK	Receptor activator of NF-κB
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institut
SAR	Structure activity relationship
SDR	Short Chain Dehydrogenase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
SF	Selektivitätsfaktor
StAR	Steroid acute regulatory protein
SULT	Sulfotransferase
TGFβ	Transforming growth factor β
Wnt	Signalprotein

Literaturverzeichnis

- [1] Penning, T. M. (1997), Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases, *Endocr Rev* **18**, 281-305
- [2] Ackerman, G. E. and Carr, B. R. (2002), Estrogens, *Rev Endocr Metab Disord* **3**, 225-230
- [3] Gudermann, T. (2009), Wirkungen und Stoffwechsel der wichtigsten natürlichen Sexualsteroiden der Frau, *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*, F. Leidenberger, T. Strowitzki and O. Ortmann, 23-52
- [4] Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. and Huber, J. C. (2002), Production and actions of estrogens, *N Engl J Med* **346**, 340-352
- [5] Clarke, B. L. and Khosla, S. (2010), Female reproductive system and bone, *Arch Biochem Biophys* **503**, 118-128
- [6] Payne, A. H. and Hales, D. B. (2004), Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocr Rev* **25**, 947-970
- [7] Magoffin, D., Kumar, A., Yildiz, B. and Azziz, R. (2005), Endocrinology of the Ovary, *Endocrinology Basic and Clinical Principles*, S. Melmed and P. M. Conn, 391-403
- [8] Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., Belanger, A., Simard, J., Lin, S. X. and Pelletier, G. (2003), Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone, *Endocr Rev* **24**, 152-182
- [9] Lamberts, S. W., van den Beld, A. W. and van der Lely, A. J. (1997), The endocrinology of aging, *Science* **278**, 419-424
- [10] Labrie, F. (1991), Intracrinology, *Mol Cell Endocrinol* **78**, C113-118
- [11] Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (2011), Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes, *Clin Pharmacol Ther* **89**, 44-55
- [12] Levin, E. R. (2009), Plasma membrane estrogen receptors, *Trends Endocrinol Metab* **20**, 477-482
- [13] Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B. and Sklar, L. A. (2007), GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen, *Mol Cell Endocrinol* **265-266**, 138-142
- [14] RKI (2010), Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends, 52
- [15] Possinger, K., Schmid, P., Schmoll, H.-J., Höffken, K., Kreienberg, R. and Dunst, J. (2006), Mammakarzinom der Frau, *Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie*, H.-J. Schmoll, 4215-4332

- [16] Pasqualini, J. R. and Chetrite, G. S. (2005), Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**, 221-236
- [17] Lanigan, F., O'Connor, D., Martin, F. and Gallagher, W. M. (2007), Molecular links between mammary gland development and breast cancer, *Cell Mol Life Sci* **64**, 3159-3184
- [18] Speirs, V., Green, A. R. and Atkin, S. L. (1998), Activity and gene expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from normal and tumourous human breast tissue: the role of IL-8, *J Steroid Biochem Mol Biol* **67**, 267-274
- [19] Osborne, C. K. and Schiff, R. (2011), Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer, *Annu Rev Med* **62**, 233-247
- [20] Oehmke, F., Suwandinata, F., Deisting, C. and Tinneberg, H. R. (2007), Datenlage zur Endometriose, *Gynäkologe* **40**, 521-526
- [21] Sampson, J. A. (1927), Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation, *Am J Pathol* **3**, 93-110 143
- [22] Halme, J., Hammond, M. G., Hulka, J. F., Raj, S. G. and Talbert, L. M. (1984), Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis, *Obstet Gynecol* **64**, 151-154
- [23] Bulun, S. E., Zeitoun, K. M., Takayama, K. and Sasano, H. (2000), Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance, *J Mol Endocrinol* **25**, 35-42
- [24] Bulun, S. E., Lin, Z., Imir, G., Amin, S., Demura, M., Yilmaz, B., Martin, R., Utsunomiya, H., Thung, S., Gurates, B., Tamura, M., Langoi, D. and Deb, S. (2005), Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment, *Pharmacol Rev* **57**, 359-383
- [25] Bulun, S. E. (2009), Endometriosis, *N Engl J Med* **360**, 268-279
- [26] Zeitoun, K., Takayama, K., Sasano, H., Suzuki, T., Moghrabi, N., Andersson, S., Johns, A., Meng, L., Putman, M., Carr, B. and Bulun, S. E. (1998), Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol, *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 4474-4480
- [27] Folkerd, E. J. and Dowsett, M. (2010), Influence of sex hormones on cancer progression, *J Clin Oncol* **28**, 4038-4044
- [28] Deutsche Krebsgesellschaft (2008), Interdisziplinäre S3 Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms

- [29] Cleator, S. J., Ahamed, E., Coombes, R. C. and Palmieri, C. (2009), A 2009 update on the treatment of patients with hormone receptor-positive breast cancer, *Clin Breast Cancer* **9 Suppl 1**, S6-S17
- [30] Orlando, L., Schiavone, P., Fedele, P., Calvani, N., Nacci, A., Rizzo, P., Marino, A., D'Amico, M., Sponziello, F., Mazzoni, E., Cinefra, M., Fazio, N., Maiello, E., Silvestris, N., Colucci, G. and Cinieri, S. (2010), Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer, *Cancer Treat Rev* **36 Suppl 3**, S67-71
- [31] Miller, W. R., Bartlett, J. M., Canney, P. and Verrill, M. (2007), Hormonal therapy for postmenopausal breast cancer: the science of sequencing, *Breast Cancer Res Treat* **103**, 149-160
- [32] Giudice, L. C. (2010), Clinical practice. Endometriosis, *N Engl J Med* **362**, 2389-2398
- [33] Giudice, L. C. and Kao, L. C. (2004), Endometriosis, *Lancet* **364**, 1789-1799
- [34] Novartis (2010), BGS649 Monotherapy in Moderate to Severe Endometriosis Patients, NCT01190475
- [35] NIH Consensus Conference (2001), Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, *JAMA* **285**, 785-795
- [36] DachverbandOsteologiee.V. (2009), DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen, *Osteologie* **18**, 304-328
- [37] Kawai, M., Modder, U. I., Khosla, S. and Rosen, C. J. (2011), Emerging therapeutic opportunities for skeletal restoration, *Nat Rev Drug Discov* **10**, 141-156
- [38] Stupphann, D. and Pietschmann, P. (2008), Sekundäre Osteoporose - Abgrenzung zur primären Osteoporose, *J Miner Stoffwechs* **15**, 2-5
- [39] Riggs, B. L., Khosla, S. and Melton, L. J., 3rd (2002), Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton, *Endocr Rev* **23**, 279-302
- [40] Bodine, P. V. and Komm, B. S. (2002), Tissue culture models for studies of hormone and vitamin action in bone cells, *Vitam Horm* **64**, 101-151
- [41] Manolagas, S. C. (2000), Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr Rev* **21**, 115-137
- [42] Biomedical Tissue Research Group Paul Genever, Bone Remodelling, <http://www.york.ac.uk/res/btr/Image%20Library/Bone%20remodelling.jpg>
- [43] Reifstein, E. C. and Albright, F. (1947), The Metabolic Effects of Steroid Hormones in Osteoporosis, *J Clin Invest* **26**, 24-56

- [44] Khosla, S., Melton, L. J., 3rd and Riggs, B. L. (2011), The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed?, *J Bone Miner Res* **26**, 441-451
- [45] Riggs, B. L. (2000), The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption, *J Clin Invest* **106**, 1203-1204
- [46] Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. and Boyle, W. J. (1997), Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell* **89**, 309-319
- [47] Hofbauer, L. C., Kuhne, C. A. and Viereck, V. (2004), The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases, *J Musculoskelet Neuronal Interact* **4**, 268-275
- [48] Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Spelsberg, T. C. and Riggs, B. L. (1999), Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells, *Endocrinology* **140**, 4367-4370
- [49] Bord, S., Ireland, D. C., Beavan, S. R. and Compston, J. E. (2003), The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts, *Bone* **32**, 136-141
- [50] Shevde, N. K., Bendixen, A. C., Dienger, K. M. and Pike, J. W. (2000), Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7829-7834
- [51] Srivastava, S., Toraldo, G., Weitzmann, M. N., Cenci, S., Ross, F. P. and Pacifici, R. (2001), Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation, *J Biol Chem* **276**, 8836-8840
- [52] Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D. W., Ebeling, P. R., Felsenberg, D., Gagel, R. F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., McCauley, L. K., McGowan, J., McKee, M. D., Mohla, S., Pendrys, D. G., Raisz, L. G., Ruggiero, S. L., Shafer, D. M., Shum, L., Silverman, S. L., Van Poznak, C. H., Watts, N., Woo, S. B. and Shane, E. (2007), Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research, *J Bone Miner Res* **22**, 1479-1491
- [53] Lenart, B. A., Neviasser, A. S., Lyman, S., Chang, C. C., Edobor-Osula, F., Steele, B., van der Meulen, M. C., Lorch, D. G. and Lane, J. M. (2009), Association of low-energy femoral fractures with prolonged bisphosphonate use: a case control study, *Osteoporos Int* **20**, 1353-1362

- [54] Gallacher, S. J. and Dixon, T. (2010), Impact of treatments for postmenopausal osteoporosis (bisphosphonates, parathyroid hormone, strontium ranelate, and denosumab) on bone quality: a systematic review, *Calcif Tissue Int* **87**, 469-484
- [55] NAMS (2010), Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society, *Menopause* **17**, 25-54
- [56] Möller, G. and Adamski, J. (2009), Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases, *Mol Cell Endocrinol* **301**, 7-19
- [57] Möller, G. and Adamski, J. (2006), Multifunctionality of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases, *Mol Cell Endocrinol* **248**, 47-55
- [58] Marchais-Oberwinkler, S., Henn, C., Moller, G., Klein, T., Negri, M., Oster, A., Spadaro, A., Werth, R., Wetzel, M., Xu, K., Frotscher, M., Hartmann, R. W. and Adamski, J. (2011), 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenases (17beta-HSDs) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development, *J Steroid Biochem Mol Biol* **125**, 66-82
- [59] Luu-The, V., Tremblay, P. and Labrie, F. (2006), Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women, *Mol Endocrinol* **20**, 437-443
- [60] Day, J. M., Foster, P. A., Tutill, H. J., Parsons, M. F., Newman, S. P., Chander, S. K., Allan, G. M., Lawrence, H. R., Vicker, N., Potter, B. V., Reed, M. J. and Purohit, A. (2008), 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase Type 1, and not Type 12, is a target for endocrine therapy of hormone-dependent breast cancer, *Int J Cancer* **122**, 1931-1940
- [61] Langer, L. J. and Engel, L. L. (1958), Human placental estradiol-17 beta dehydrogenase. I. Concentration, characterization and assay, *J Biol Chem* **233**, 583-588
- [62] Gangloff, A., Garneau, A., Huang, Y. W., Yang, F. and Lin, S. X. (2001), Human oestrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase specificity: enzyme regulation through an NADPH-dependent substrate inhibition towards the highly specific oestrone reduction, *Biochem J* **356**, 269-276
- [63] Sherbet, D. P., Papari-Zareei, M., Khan, N., Sharma, K. K., Brandmaier, A., Rambally, S., Chattopadhyay, A., Andersson, S., Agarwal, A. K. and Auchus, R. J. (2007), Cofactors, redox state, and directional preferences of hydroxysteroid dehydrogenases, *Mol Cell Endocrinol* **265-266**, 83-88
- [64] Lin, S. X., Yang, F., Jin, J. Z., Breton, R., Zhu, D. W., Luu-The, V. and Labrie, F. (1992), Subunit identity of the dimeric 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human placenta, *J Biol Chem* **267**, 16182-16187

- [65] Ghosh, D., Pletnev, V. Z., Zhu, D. W., Wawrzak, Z., Duax, W. L., Pangborn, W., Labrie, F. and Lin, S. X. (1995), Structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution, *Structure* **3**, 503-513
- [66] Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jornvall, H. and Oppermann, U. (2002), Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases, *J Biol Chem* **277**, 25677-25684
- [67] Gangloff, A., Shi, R., Nahoum, V. and Lin, S. X. (2003), Pseudo-symmetry of C19 steroids, alternative binding orientations, and multispecificity in human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Faseb J* **17**, 274-276
- [68] Huang, Y. W., Pineau, I., Chang, H. J., Azzi, A., Bellemare, V., Laberge, S. and Lin, S. X. (2001), Critical residues for the specificity of cofactors and substrates in human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1: variants designed from the three-dimensional structure of the enzyme, *Mol Endocrinol* **15**, 2010-2020
- [69] Sherbet, D. P., Guryev, O. L., Papari-Zareei, M., Mizrachi, D., Rambally, S., Akbar, S. and Auchus, R. J. (2009), Biochemical factors governing the steady-state estrone/estradiol ratios catalyzed by human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases types 1 and 2 in HEK-293 cells, *Endocrinology* **150**, 4154-4162
- [70] Ghosh, D. and Vihko, P. (2001), Molecular mechanisms of estrogen recognition and 17-keto reduction by human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1, *Chem Biol Interact* **130-132**, 637-650
- [71] Negri, M., Recanatini, M. and Hartmann, R. W. (2010), Insights in 17beta-HSD1 enzyme kinetics and ligand binding by dynamic motion investigation, *PLoS One* **5**, e12026
- [72] Peltoketo, H., Isomaa, V., Poutanen, M. and Vihko, R. (1996), Expression and regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *J Endocrinol* **150 Suppl**, S21-30
- [73] Bonenfant, M., Provost, P. R., Drolet, R. and Tremblay, Y. (2000), Localization of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and protein in syncytiotrophoblasts and invasive cytotrophoblasts in the human term villi, *J Endocrinol* **165**, 217-222
- [74] Poutanen, M., Isomaa, V., Lehto, V. P. and Vihko, R. (1992), Immunological analysis of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in benign and malignant human breast tissue, *Int J Cancer* **50**, 386-390
- [75] Miyoshi, Y., Ando, A., Shiba, E., Taguchi, T., Tamaki, Y. and Noguchi, S. (2001), Involvement of up-regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers, *Int J Cancer* **94**, 685-689

- [76] Pasqualini, J. R., Chetrite, G., Blacker, C., Feinstein, M. C., Delalonde, L., Talbi, M. and Maloche, C. (1996), Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients, *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 1460-1464
- [77] Miyoshi, Y., Ando, A., Hasegawa, S., Ishitobi, M., Taguchi, T., Tamaki, Y. and Noguchi, S. (2003), High expression of steroid sulfatase mRNA predicts poor prognosis in patients with estrogen receptor-positive breast cancer, *Clin Cancer Res* **9**, 2288-2293
- [78] Mäentausta, O., Sormunen, R., Isomaa, V., Lehto, V. P., Jouppila, P. and Vihko, R. (1991), Immunohistochemical localization of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human endometrium during the menstrual cycle, *Lab Invest* **65**, 582-587
- [79] Dassen, H., Punyadeera, C., Kamps, R., Delvoux, B., Van Langendonck, A., Donnez, J., Husen, B., Thole, H., Dunselman, G. and Groothuis, P. (2007), Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis, *Hum Reprod* **22**, 3148-3158
- [80] Kruchten, P., Werth, R., Marchais-Oberwinkler, S., Bey, E., Ziegler, E., Oster, A., Frotscher, M. and Hartmann, R. W. (2009), Development of biological assays for the identification of selective inhibitors of estradiol formation from estrone in rat liver preparations, *Comptes Rendus Chimie* **12**, 1110-1116
- [81] Möller, G., Husen, B., Kowalik, D., Hirvela, L., Plewczynski, D., Rychlewski, L., Messinger, J., Thole, H. and Adamski, J. (2010), Species used for drug testing reveal different inhibition susceptibility for 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *PLoS One* **5**, e10969
- [82] Husen, B., Huhtinen, K., Poutanen, M., Kangas, L., Messinger, J. and Thole, H. (2006), Evaluation of inhibitors for 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in vivo in immunodeficient mice inoculated with MCF-7 cells stably expressing the recombinant human enzyme, *Mol Cell Endocrinol* **248**, 109-113
- [83] Grümmer, R., Schwarzer, F., Bainczyk, K., Hess-Stumpp, H., Regidor, P. A., Schindler, A. E. and Winterhager, E. (2001), Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model, *Hum Reprod* **16**, 1736-1743
- [84] Fechner, S., Husen, B., Thole, H., Schmidt, M., Gashaw, I., Kimmig, R., Winterhager, E. and Grümmer, R. (2007), Expression and regulation of estrogen-converting enzymes in ectopic human endometrial tissue, *Fertil Steril* **88**, 1029-1038
- [85] Firnhaber, S. (2006), Expression und Regulation von Enzymen des Östrogenmetabolismus in humanen Endometriumläsionen kultiviert in der Nacktmaus, *Fachbereich Biologie und Geographie Universität Duisburg-Essen*

- [86] Einspanier, A., Lieder, K., Bruns, A., Husen, B., Thole, H. and Simon, C. (2006), Induction of endometriosis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*), *Mol Hum Reprod* **12**, 291-299
- [87] Qiu, W., Campbell, R. L., Gangloff, A., Dupuis, P., Boivin, R. P., Tremblay, M. R., Poirier, D. and Lin, S. X. (2002), A concerted, rational design of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: estradiol-adenosine hybrids with high affinity, *Faseb J* **16**, 1829-1831
- [88] Laplante, Y., Cadot, C., Fournier, M. A. and Poirier, D. (2008), Estradiol and estrone C-16 derivatives as inhibitors of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: blocking of ER+ breast cancer cell proliferation induced by estrone, *Bioorg Med Chem* **16**, 1849-1860
- [89] Messinger, J., Husen, B., Koskimies, P., Hirvela, L., Kallio, L., Saarenketo, P. and Thole, H. (2009), Estrone C15 derivatives--a new class of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors, *Mol Cell Endocrinol* **301**, 216-224
- [90] Möller, G., Deluca, D., Gege, C., Rosinus, A., Kowalik, D., Peters, O., Droescher, P., Elger, W., Adamski, J. and Hillisch, A. (2009), Structure-based design, synthesis and in vitro characterization of potent 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors based on 2-substitutions of estrone and D-homo-estrone, *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 6740-6744
- [91] Lilienkamp, A., Karkola, S., Alho-Richmond, S., Koskimies, P., Johansson, N., Huhtinen, K., Vihko, K. and Wahala, K. (2009), Synthesis and biological evaluation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) inhibitors based on a thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one core, *J Med Chem* **52**, 6660-6671
- [92] Frotscher, M., Ziegler, E., Marchais-Oberwinkler, S., Kruchten, P., Neugebauer, A., Fetzer, L., Scherer, C., Müller-Vieira, U., Messinger, J., Thole, H. and Hartmann, R. W. (2008), Design, synthesis, and biological evaluation of (hydroxyphenyl)naphthalene and -quinoline derivatives: potent and selective nonsteroidal inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) for the treatment of estrogen-dependent diseases, *J Med Chem* **51**, 2158-2169
- [93] Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M., Ziegler, E., Werth, R., Kruchten, P., Messinger, J., Thole, H. and Hartmann, R. W. (2009), Structure-activity study in the class of 6-(3'-hydroxyphenyl)naphthalenes leading to an optimization of a pharmacophore model for 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) inhibitors, *Mol Cell Endocrinol* **301**, 205-211
- [94] Marchais-Oberwinkler, S., Kruchten, P., Frotscher, M., Ziegler, E., Neugebauer, A., Bhoga, U., Bey, E., Müller-Vieira, U., Messinger, J., Thole, H. and Hartmann, R. W. (2008), Substituted 6-phenyl-2-naphthols. Potent and selective nonsteroidal inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1): design, synthesis, biological evaluation, and pharmacokinetics, *J Med Chem* **51**, 4685-4698

- [95] Marchais-Oberwinkler, S., Wetzel, M., Ziegler, E., Kruchten, P., Werth, R., Henn, C., Hartmann, R. W. and Frotscher, M. (2011), New drug-like hydroxyphenyl-naphthol steroidomimetics as potent and selective 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors for the treatment of estrogen-dependent diseases, *J Med Chem* **54**, 534-547
- [96] Bey, E., Marchais-Oberwinkler, S., Kruchten, P., Frotscher, M., Werth, R., Oster, A., Algül, O., Neugebauer, A. and Hartmann, R. W. (2008), Design, synthesis and biological evaluation of bis(hydroxyphenyl) azoles as potent and selective non-steroidal inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) for the treatment of estrogen-dependent diseases, *Bioorg Med Chem* **16**, 6423-6435
- [97] Bey, E., Marchais-Oberwinkler, S., Negri, M., Kruchten, P., Oster, A., Klein, T., Spadaro, A., Werth, R., Frotscher, M., Birk, B. and Hartmann, R. W. (2009), New insights into the SAR and binding modes of bis(hydroxyphenyl)thiophenes and -benzenes: influence of additional substituents on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) inhibitory activity and selectivity, *J Med Chem* **52**, 6724-6743
- [98] Bey, E., Marchais-Oberwinkler, S., Werth, R., Negri, M., Al-Soud, Y. A., Kruchten, P., Oster, A., Frotscher, M., Birk, B. and Hartmann, R. W. (2008), Design, synthesis, biological evaluation and pharmacokinetics of bis(hydroxyphenyl) substituted azoles, thiophenes, benzenes, and aza-benzenes as potent and selective nonsteroidal inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1), *J Med Chem* **51**, 6725-6739
- [99] Al-Soud, Y. A., Bey, E., Oster, A., Marchais-Oberwinkler, S., Werth, R., Kruchten, P., Frotscher, M. and Hartmann, R. W. (2009), The role of the heterocycle in bis(hydroxyphenyl)triazoles for inhibition of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (17 β -HSD) type 1 and type 2, *Mol Cell Endocrinol* **301**, 212-215
- [100] Oster, A., Hinsberger, S., Werth, R., Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M. and Hartmann, R. W. (2010), Bicyclic substituted hydroxyphenylmethanones as novel inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) for the treatment of estrogen-dependent diseases, *J Med Chem* **53**, 8176-8186
- [101] Oster, A., Klein, T., Henn, C., Werth, R., Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M. and Hartmann, R. W. (2011), Bicyclic Substituted Hydroxyphenylmethanone Type Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17 β -HSD1): The Role of the Bicyclic Moiety, *ChemMedChem* **6**, 476-487
- [102] Oster, A., Klein, T., Werth, R., Kruchten, P., Bey, E., Negri, M., Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M. and Hartmann, R. W. (2010), Novel estrone mimetics with high 17 β -HSD1 inhibitory activity, *Bioorg Med Chem* **18**, 3494-3505

- [103] Wu, L., Einstein, M., Geissler, W. M., Chan, H. K., Elliston, K. O. and Andersson, S. (1993), Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity, *J Biol Chem* **268**, 12964-12969
- [104] Puranen, T. J., Kurkela, R. M., Lakkakorpi, J. T., Poutanen, M. H., Itaranta, P. V., Melis, J. P., Ghosh, D., Vihko, R. K. and Vihko, P. T. (1999), Characterization of molecular and catalytic properties of intact and truncated human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzymes: intracellular localization of the wild-type enzyme in the endoplasmic reticulum, *Endocrinology* **140**, 3334-3341
- [105] Penning, T. M. (2011), Human hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation: Insights into inhibitor design and evaluation, *J Steroid Biochem Mol Biol*
- [106] Casey, M. L., MacDonald, P. C. and Andersson, S. (1994), 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progesterin regulation of gene expression in human endometrium, *J Clin Invest* **94**, 2135-2141
- [107] Dong, Y., Qiu, Q. Q., Debear, J., Lathrop, W. F., Bertolini, D. R. and Tamburini, P. P. (1998), 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human bone cells, *J Bone Miner Res* **13**, 1539-1546
- [108] Feix, M., Wolf, L. and Schweikert, H. U. (2001), Distribution of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human osteoblast-like cells, *Mol Cell Endocrinol* **171**, 163-164
- [109] Janssen, J. M., Bland, R., Hewison, M., Coughtrie, M. W., Sharp, S., Arts, J., Pols, H. A. and van Leeuwen, J. P. (1999), Estradiol formation by human osteoblasts via multiple pathways: relation with osteoblast function, *J Cell Biochem* **75**, 528-537
- [110] van der Eerden, B. C., Lowik, C. W., Wit, J. M. and Karperien, M. (2004), Expression of estrogen receptors and enzymes involved in sex steroid metabolism in the rat tibia during sexual maturation, *J Endocrinol* **180**, 457-467
- [111] Bagi, C. M., Wood, J., Wilkie, D. and Dixon, B. (2008), Effect of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 inhibitor on bone strength in ovariectomized cynomolgus monkeys, *J Musculoskelet Neuronal Interact* **8**, 267-280
- [112] Blomquist, C. H., Lindemann, N. J. and Hakanson, E. Y. (1984), Inhibition of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17 beta-HSD) activities of human placenta by steroids and non-steroidal hormone agonists and antagonists, *Steroids* **43**, 571-586

- [113] Bydal, P., Auger, S. and Poirier, D. (2004), Inhibition of type 2 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase by estradiol derivatives bearing a lactone on the D-ring: structure-activity relationships, *Steroids* **69**, 325-342
- [114] Deluca, D., Moller, G., Rosinus, A., Elger, W., Hillisch, A. and Adamski, J. (2006), Inhibitory effects of fluorine-substituted estrogens on the activity of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases, *Mol Cell Endocrinol* **248**, 218-224
- [115] Gunn, D., Akuche, C., Baryza, J., Blue, M. L., Brennan, C., Campbell, A. M., Choi, S., Cook, J., Conrad, P., Dixon, B., Dumas, J., Ehrlich, P., Gane, T., Joe, T., Johnson, J., Jordan, J., Kramss, R., Liu, P., Levy, J., Lowe, D., McAlexander, I., Natero, R., Redman, A. M., Scott, W., Seng, T., Sibley, R., Wang, M., Wang, Y., Wood, J. and Zhang, Z. (2005), 4,5-Disubstituted cis-pyrrolidinones as inhibitors of type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Part 2. SAR, *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 3053-3057
- [116] Wood, J., Bagi, C. M., Akuche, C., Bacchiocchi, A., Baryza, J., Blue, M. L., Brennan, C., Campbell, A. M., Choi, S., Cook, J. H., Conrad, P., Dixon, B. R., Ehrlich, P. P., Gane, T., Gunn, D., Joe, T., Johnson, J. S., Jordan, J., Kramss, R., Liu, P., Levy, J., Lowe, D. B., McAlexander, I., Natero, R., Redman, A. M., Scott, W. J., Town, C., Wang, M., Wang, Y. and Zhang, Z. (2006), 4,5-Disubstituted cis-pyrrolidinones as inhibitors of type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Part 3. Identification of lead candidate, *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 4965-4968
- [117] Wetzel, M., Marchais-Oberwinkler, S. and Hartmann, R. W. (2011), 17beta-HSD2 inhibitors for the treatment of osteoporosis: Identification of a promising scaffold, *Bioorg Med Chem* **19**, 807-815
- [118] Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S. and Brenner, H. J. (1979), Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin, *Eur J Cancer* **15**, 659-670
- [119] NIH (2011), Assay Guidance Manual, <http://assay.nih.gov/>
- [120] Messinger, J., Hirvela, L., Husen, B., Kangas, L., Koskimies, P., Pentikainen, O., Saarenketo, P. and Thole, H. (2006), New inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Mol Cell Endocrinol* **248**, 192-198
- [121] Yang, F., Zhu, D. W., Wang, J. Y. and Lin, S. X. (1992), Rapid purification yielding highly active 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: application of hydrophobic interaction and affinity fast protein liquid chromatography, *J Chromatogr* **582**, 71-76
- [122] Zhu, D. W., Lee, X., Breton, R., Ghosh, D., Pangborn, W., Duax, W. L. and Lin, S. X. (1993), Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the complex of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase with NADP⁺, *J Mol Biol* **234**, 242-244

- [123] Azzi, A., Rehse, P. H., Zhu, D. W., Campbell, R. L., Labrie, F. and Lin, S. X. (1996), Crystal structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complexed with 17 beta-estradiol, *Nat Struct Biol* **3**, 665-668
- [124] Breton, R., Housset, D., Mazza, C. and Fontecilla-Camps, J. C. (1996), The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors, *Structure* **4**, 905-915
- [125] Mazza, C., Breton, R., Housset, D. and Fontecilla-Camps, J. C. (1998), Unusual charge stabilization of NADP⁺ in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *J Biol Chem* **273**, 8145-8152
- [126] Han, Q., Campbell, R. L., Gangloff, A., Huang, Y. W. and Lin, S. X. (2000), Dehydroepiandrosterone and dihydrotestosterone recognition by human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. C-18/c-19 steroid discrimination and enzyme-induced strain, *J Biol Chem* **275**, 1105-1111
- [127] Mazumdar, M., Aka, J., Poirier, D. and Lin, S.-X. (2009), 17β-HSD1 stimulates breast cancer by DHT inactivation in addition to estradiol production, 10.2210/pdb3dey/pdb
- [128] Shi, R. and Lin, S. X. (2004), Cofactor hydrogen bonding onto the protein main chain is conserved in the short chain dehydrogenase/reductase family and contributes to nicotinamide orientation, *J Biol Chem* **279**, 16778-16785
- [129] Aka, J. A., Mazumdar, M., Chen, C. Q., Poirier, D. and Lin, S. X. (2010), 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 stimulates breast cancer by dihydrotestosterone inactivation in addition to estradiol production, *Mol Endocrinol* **24**, 832-845
- [130] Mazumdar, M., Chen, J. and Lin, S.-X. (2010), Molecular basis of sex-steroids: their translational activity, DOI:10.2210/pdb3klp/pdb
- [131] Mazumdar, M., Fournier, D., Zhu, D. W., Cadot, C., Poirier, D. and Lin, S. X. (2009), Binary and ternary crystal structure analyses of a novel inhibitor with 17beta-HSD type 1: a lead compound for breast cancer therapy, *Biochem J* **424**, 357-366
- [132] Mazza, C. (1997), Human type 1 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: site directed mutagenesis and x-ray crystallography structure-function analysis, DOI:10.2210/pdb1a27/pdb
- [133] Sawicki, M. W., Erman, M., Puranen, T., Vihko, P. and Ghosh, D. (1999), Structure of the ternary complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with 3-hydroxyestra-1,3,5,7-tetraen-17-one (equilin) and NADP⁺, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 840-845
- [134] Mazumdar, M., Chen, J. and Lin, S.-X. (2010), Molecular basis of sex-steroid translation, DOI:10.2210/pdb3km0/pdb

- [135] Häussler, B., Gothe, H., Gol, D., Glaeske, G., Pientka, L. and Felsenberg, D. (2007), Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study, *Osteoporos Int* **18**, 77-84
- [136] Poirier, D., Bydal, P., Tremblay, M. R., Sam, K. M. and Luu-The, V. (2001), Inhibitors of type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Mol Cell Endocrinol* **171**, 119-128
- [137] Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**, 248-254
- [138] Segel, I. H. (1975), *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, 6. Mai 1993, John Wiley & Sons, ISBN 0471303097
- [139] Chiba, H., Sawada, N., Ono, T., Ishii, S. and Mori, M. (1993), Establishment and characterization of a simian virus 40-immortalized osteoblastic cell line from normal human bone, *Jpn J Cancer Res* **84**, 290-297
- [140] Arts, J., Kuiper, G. G., Janssen, J. M., Gustafsson, J. A., Lowik, C. W., Pols, H. A. and van Leeuwen, J. P. (1997), Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells, *Endocrinology* **138**, 5067-5070
- [141] Iba, K., Chiba, H., Sawada, N., Hirota, S., Ishii, S. and Mori, M. (1995), Glucocorticoids induce mineralization coupled with bone protein expression without influence on growth of a human osteoblastic cell line, *Cell Struct Funct* **20**, 319-330
- [142] Kerns, E. H. and Di, L. (2003), Pharmaceutical profiling in drug discovery, *Drug Discov Today* **8**, 316-323
- [143] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J. (1997), Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews* **523** 3-25
- [144] Spink, D. C., Spink, B. C., Cao, J. Q., DePasquale, J. A., Pentecost, B. T., Fasco, M. J., Li, Y. and Sutter, T. R. (1998), Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells, *Carcinogenesis* **19**, 291-298
- [145] Mitra, R., Guo, Z., Milani, M., Mesaros, C., Rodriguez, M., Nguyen, J., Luo, X., Clarke, D., Lamba, J., Schuetz, E., Donner, D. B., Puli, N., Falck, J. R., Capdevila, J., Gupta, K., Blair, I. A. and Potter, D. A. (2011), CYP3A4 Mediates Growth of Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Cells in Part by Inducing Nuclear Translocation of Phospho-Stat3 through Biosynthesis of (+/-)-14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid (EET), *J Biol Chem* **286**, 17543-17559

- [146] Faneyte, I. F., Kristel, P. M. and van de Vijver, M. J. (2001), Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer, *Int J Cancer* **93**, 114-122
- [147] Kruchten, P., Werth, R., Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M. and Hartmann, R. W. (2009), Development of a biological screening system for the evaluation of highly active and selective 17beta-HSD1-inhibitors as potential therapeutic agents, *Mol Cell Endocrinol* **301**, 154-157
- [148] Kruchten, P., Werth, R., Bey, E., Oster, A., Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M. and Hartmann, R. W. (2009), Selective inhibition of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17betaHSD1) reduces estrogen responsive cell growth of T47-D breast cancer cells, *J Steroid Biochem Mol Biol* **114**, 200-206
- [149] Cadot, C., Laplante, Y., Kamal, F., Luu-The, V. and Poirier, D. (2007), C6-(N,N-butyl-methyl-heptanamide) derivatives of estrone and estradiol as inhibitors of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: Chemical synthesis and biological evaluation, *Bioorg Med Chem* **15**, 714-726
- [150] Starcevic, S., Kocbek, P., Hribar, G., Lanisnik Rizner, T. and Gobec, S. (2011), Biochemical and biological evaluation of novel potent coumarin inhibitor of 17beta-HSD type 1, *Chem Biol Interact* **191**, 60-65
- [151] Lawrence, H. R., Vicker, N., Allan, G. M., Smith, A., Mahon, M. F., Tutill, H. J., Purohit, A., Reed, M. J. and Potter, B. V. (2005), Novel and potent 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors, *J Med Chem* **48**, 2759-2762
- [152] Zeitvogel, A., Baumann, R. and Starzinski-Powitz, A. (2001), Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model, *Am J Pathol* **159**, 1839-1852
- [153] Banu, S. K., Lee, J., Starzinski-Powitz, A. and Arosh, J. A. (2008), Gene expression profiles and functional characterization of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells, *Fertil Steril* **90**, 972-987
- [154] Banu, S. K., Starzinski-Powitz, A., Speights, V. O., Burghardt, R. C. and Arosh, J. A. (2009), Induction of peritoneal endometriosis in nude mice with use of human immortalized endometriosis epithelial and stromal cells: a potential experimental tool to study molecular pathogenesis of endometriosis in humans, *Fertil Steril* **91**, 2199-2209
- [155] Day, J. M., Tutill, H. J., Newman, S. P., Purohit, A., Lawrence, H. R., Vicker, N., Potter, B. V. and Reed, M. J. (2006), 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 and Type 2: association between mRNA expression and activity in cell lines, *Mol Cell Endocrinol* **248**, 246-249
- [156] Clover, J. and Gowen, M. (1994), Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype?, *Bone* **15**, 585-591

- [157] Rao, L. and Murray, T. (2000), Studies on Human Osteoblasts in vitro: Estrogen Actions and Interactions with other hormones at different stages of differentiation, *Drug Development Research* **49**, 174-186
- [158] Harris, S. A., Tau, K. R., Enger, R. J., Toft, D. O., Riggs, B. L. and Spelsberg, T. C. (1995), Estrogen response in the hFOB 1.19 human fetal osteoblastic cell line stably transfected with the human estrogen receptor gene, *J Cell Biochem* **59**, 193-201
- [159] Robinson, J. A., Harris, S. A., Riggs, B. L. and Spelsberg, T. C. (1997), Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation, *Endocrinology* **138**, 2919-2927
- [160] Watanabe, M., Simpson, E. R., Pathirage, N., Nakajin, S. and Clyne, C. D. (2004), Aromatase expression in the human fetal osteoblastic cell line SV-HFO, *J Mol Endocrinol* **32**, 533-545
- [161] Eijken, M., Hewison, M., Cooper, M. S., de Jong, F. H., Chiba, H., Stewart, P. M., Uitterlinden, A. G., Pols, H. A. and van Leeuwen, J. P. (2005), 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase expression and glucocorticoid synthesis are directed by a molecular switch during osteoblast differentiation, *Mol Endocrinol* **19**, 621-631
- [162] Eijken, M., Koedam, M., van Driel, M., Buurman, C. J., Pols, H. A. and van Leeuwen, J. P. (2006), The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization, *Mol Cell Endocrinol* **248**, 87-93
- [163] Wallace, D. G. and Rosenblatt, J. (2003), Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering, *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1631-1649
- [164] Bland, R. (2000), Steroid hormone receptor expression and action in bone, *Clin Sci (Lond)* **98**, 217-240
- [165] Traish, A. M., Newton, A. W., Styperek, K., Beazley, R. and Kavanah, M. (1995), Estrogen receptor functional status in human breast cancer, *Diagn Mol Pathol* **4**, 220-228
- [166] Balmelli-Gallacchi, P., Schoumacher, F., Liu, J. W., Eppenberger, U., Mueller, H. and Picard, D. (1999), A yeast-based bioassay for the determination of functional and non-functional estrogen receptors, *Nucleic Acids Res* **27**, 1875-1881
- [167] Oursler, M. J., Pederson, L., Fitzpatrick, L., Riggs, B. L. and Spelsberg, T. (1994), Human giant cell tumors of the bone (osteoclastomas) are estrogen target cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5227-5231
- [168] Vidal, O., Kindblom, L. G. and Ohlsson, C. (1999), Expression and localization of estrogen receptor-beta in murine and human bone, *J Bone Miner Res* **14**, 923-929

- [169] Sorensen, M. G., Henriksen, K., Dziegiel, M. H., Tanko, L. B. and Karsdal, M. A. (2006), Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts, *DNA Cell Biol* **25**, 475-483
- [170] Michael, H., Harkonen, P. L., Vaananen, H. K. and Hentunen, T. A. (2005), Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption, *J Bone Miner Res* **20**, 2224-2232
- [171] Walsh, J. S. and Henriksen, D. B. (2010), Feeding and bone, *Arch Biochem Biophys* **503**, 11-19
- [172] Eisman, J. A., Bone, H. G., Hosking, D. J., McClung, M. R., Reid, I. R., Rizzoli, R., Resch, H., Verbruggen, N., Hustad, C. M., DaSilva, C., Petrovic, R., Santora, A. C., Ince, B. A. and Lombardi, A. (2011), Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: three-year continued therapy and resolution of effect, *J Bone Miner Res* **26**, 242-251
- [173] Rawadi, G. and Roman-Roman, S. (2005), Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis, *Expert Opin Ther Targets* **9**, 1063-1077

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

Prof. Dr. Rolf W. Hartmann für die interessante Thematik, das entgegengebrachte Vertrauen, die gute Betreuung und die zielführenden Diskussionen.

Prof. Dr. Dr. Hans H. Maurer für die Übernahme des Koreferats.

Prof. Dr. Uli Kazmaier für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Dr. Jessica Hoppstädter für Übernahme des Beisitzes der Prüfungskommission.

Dem DAAD für die finanzielle Unterstützung während meines Auslandsjahres.

Dr. Martin Frotscher für die Leitung der 17 β -HSD1-Projektgruppe.

Dr. Sandrine Marchais-Oberwinkler für die Leitung der 17 β -HSD2-Projektgruppe und für ihre ständige Bereitschaft sich in biologische Fragestellungen einzudenken.

Dr. Stefan Boettcher für die Unterstützung bei diversen HPLC-Problemen, LC-MS/MS-Optimierungen und unbürokratische Problemlösungen.

Dr. Alexander Oster für seine Freundschaft während der gesamten Zeit und seine unglaublich gute Laune, wenn mal wieder nichts geklappt hatte.

Dr. Patricia Kruchten für die Einführung in die Welt der Zellkultur, den gemeinsamen Kampf gegen das Testdaten-Chaos und für ihre Diskussionsbereitschaft.

Claudia Henn für offene Ohren und die schöne gemeinsame Zeit im Büro, Labor und beim Skifahren, Tobias Klein für Tipps und Tricks im Umgang mit „MÖ“, Dr. Cornelia Grombein, Sebastian Krug und Stefan Hinsberger für die gute Laune in unserer Bürozeile und den Spaß bei der gemeinsamen Pflege der Kaffeepflanzen.

Dr. Christina Zimmer und Sabrina Rau für den fruchtbaren Austausch über biologische Fragestellungen und nette Mittagspausen.

Dr. Anke Steinbach, Dr. Patricia Kruchten, Dr. Alexander Oster, Claudia Henn, Stefan Hinsberger und Christine Maurer für die gemeinsame Gestaltung, Planung und Betreuung des EAB-Praktikums.

Martina Schwarz, Corina Przybyla und Katrin Schmitt für die außerordentlich gute Organisation im Sekretariat.

Lothar Jager für seine prompte Hilfe bei technischen Problemen.

Meinem Wahlpflichtpraktikanten Clemens Tscheka für die fleißige Arbeit.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises für den Spaß und das gute Arbeitsklima.

Meiner Familie, die mich jederzeit bei allem unterstützt hat und ohne die ich das alles nie geschafft hätte.

Meinem Mann Wendelin für seine Motivationskünste, Geduld und Unterstützung.